

**T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VALSARTANIN FARKLI MATRİKLERDE TAYİNİNE YÖNELİK  
ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE KARARLILIK  
ÇALIŞMASI**

**HAKAN SERBEST**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
YRD. DOÇ. DR. SEYFULLAH KEYF**

**EŞ DANIŞMAN  
DOÇ. DR. SEZGİN BAKIRDERE**

**İSTANBUL, 2016**

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VALSARTANIN FARKLI MATRİKLERDE TAYİNİNE YÖNELİK  
ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE KARARLILIK  
ÇALIŞMASI**

Hakan SERBEST tarafından hazırlanan tez çalışması 10.05.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Yrd. Doç. Dr. Seyfullah KEYF  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Eş Danışman**

Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Yrd. Doç. Dr. Seyfullah KEYF  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. İsmail AKDENİZ  
Bozok Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Fatih Ahmet ERULAŞ  
Siirt Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Burcu D. ÇORBACIOĞLU  
Yıldız Teknik Üniversitesi

## ÖNSÖZ

---

Tez çalışmalarım boyunca beni doğru kaynaklara yönlendiren, maddi manevi yardımını esirgemeyen, birlikte fikir alışverişi yaptığım değerli tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Seyfullah KEYF'e,

Tanıştığım ilk günden bu yana, hayatımı çok iyi yerlere getiren, sahip olduğu donanımı ile tüm çalışmalarımın kilidine anahtar, dehası ile bana örnek olan; idolüm, değerli tez eş danışmanım sayın Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye,

Aynı hedefe varmak için birlikte her zorluğu aşarak ilerlediğim, yapmış olduğum çalışmalarda yardımlarını eksik etmeyen, içtenlikleri ile bana destek olan değerli arkadaşlarım Tuğçe UNUTKAN ve Elif Seda KOÇOĞLU'na,

Çalışmalarına içtenlikle ve büyük bir nezaketle katkıda bulunan değerli arkadaşlarım Selali Dotse CHORMEY'e, Duygu TERZİOĞLU'na ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Beni ben yapan ve daha iyi yerlere gelmem için birçok fedakârlıkta bulunan kıymetli dostlarım Erdem HARMANCI ve Şennur SAKALLI'ya,

Tez çalışmalarım boyunca gösterdikleri anlayış ve verdikleri desteklerden dolayı, çalıştığım firma İNNOVA KUYUMCULUK HEDİYELİK EŞYA SAN. ve TİC. A.Ş. ailesine ve değerli kardeşim Onurcan MİLİG'e,

Attığım her adımda arkamda duran, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak bugünlerime gelmemi sağlayan ve dualarını esirgemeyen aileme, kardeşim Volkan'a, biricğim Merve'ye ve son olarak başarılarımın gizli kahramanı Leyla'ya sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Mayıs, 2016

Hakan SERBEST

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti .....	1
1.2 Tezin Amacı .....	2
1.3 Hipotez .....	2
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Hipertansiyonun Tanımı ve Tarihçesi.....	4
2.2 Antihipertansif İlaçlar .....	7
2.2.1 Anjiotensin 2 Reseptör Antagonistleri .....	8
2.3 Valsartan Hakkında Genel Bilgiler.....	9
2.3.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	9
2.3.2 Farmakolojik Özellikleri .....	9
2.3.3 Farmakokinetik Özellikleri.....	10
2.3.4 Valsartanın Hipertansiyon Tedavisindeki Yeri .....	10
2.3.5 Piyasadaki Valsartan Etkin Maddesi İçeren İlaçlar.....	11
BÖLÜM 3	
İLAÇ ETKEN MADDE MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİ .....	12

3.1	Kromatografik Yöntemler	12
3.1.1	Adsorpsiyon Kromatografisi	13
3.1.2	Dağılma Kromatografisi	13
3.1.2.1	Ters-Faz Sıvı Kromatografisi	14
3.1.2.2	Normal-Faz Sıvı Kromatografisi	15
3.1.3	İyon Değişirme Kromatografisi	15
3.1.4	İyon Çifti Kromatografisi	16
3.1.5	Eleme Kromatografisi	16
3.2	Spektroflorimetrik Yöntem	17
3.3	Spektroskopik Yöntem	19
3.4	Elektrokimyasal Yöntem	19

## BÖLÜM 4

### YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)..... 21

4.1	HPLC Cihazının Çalışma Prensibi	21
4.2	HPLC Cihazının Ekipmanları	22
4.2.1	Mobil Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri	22
4.2.2	Pompa	22
4.2.2.1	Şırınga Pompalar	23
4.2.2.2	Pistonlu Pompalar	23
4.2.2.3	Pnömatik Pompalar	23
4.2.3	Enjektör	23
4.2.3.1	Manuel Enjektörler	23
4.2.3.2	Otomatik Enjektörler	23
4.2.4	Kolon	24
4.2.5	Dedektör	24
4.2.6	Yazıcı Sistemi	24
4.3	HPLC ile ilgili Yapılan Çalışmalar	24

## BÖLÜM 5

### EKSTRAKSİYON ..... 26

5.1	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	26
5.2	İyon Değişirme	27
5.3	Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)	27
5.4	Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu	28

## BÖLÜM 6

### DENEYSEL ÇALIŞMALAR ..... 29

6.1	Kullanılan Ekipmanlar	29
6.1.1	HPLC Sistemi ve Kolon	29
6.1.2	Diğer Ekipmanlar	30
6.2	Kimyasallar	31
6.3	DeneySEL Kısım	31
6.3.1	Optimizasyon Çalışmaları	31
6.3.2	Sistem Analitik Performansının Tespiti	35

6.3.3	Farklı Ortam Koşullarında Valsartan Davranışının İncelenmesi ve Bozunma Tayini.....	38
6.3.4	Valsartan Etken Maddesi İçeren D İsimli 80 mg Tabletinin Yapay Mide Ortamında İncelenmesi .....	40
6.3.5	Valsartan Etken Maddesi İçeren Tabletlerde Analit Miktar Tayinleri	42
6.3.6	Atık Çamurda Bulunan Valsartan Etken Maddesinin Sodyum Dodesil Sülfat ile Ekstraksiyonu Sonrası HPLC Sisteminde Tayini...	45

## BÖLÜM 7

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR .....	51
ÖZGEÇMİŞ .....	59



## SİMGE LİSTESİ

---

$\alpha_1$	Alfa 1
$\alpha_2$	Alfa 2
$\Delta\lambda$	Dalga boyu farkı
$\lambda_{em}$	Emisyon dalga boyu
$\lambda_{ex}$	Uyarılma dalga boyu
A	Frekans faktörü
AT <sub>1</sub>	Anjiyotensin 2 tip 1
AT <sub>2</sub>	Anjiyotensin 2 tip 2
<sup>o</sup> C	Derece Celsius
dk	Dakika
K	Adsorpsiyon katsayısı
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
$\mu$ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmHg	Milimetre cıva
nm	Nanometre
P	Bölme katsayısı
psi	Pounds per square inch
v	Hacim
V	Volt

## KISALTMA LİSTESİ

---

ACN	Asetonitril
ADE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş Klorür
AML	Amlodipin
ARB	Anjiyotensin Reseptör Blokerleri
BCG	Bromokresol Yeşili
BPB	Bromofenol Mavisi
BTB	Bromotimol Mavisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HPLC-UV	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi - Ultraviyole
HT	Hipertansiyon
IR	Kırmızı Ötesi
IRB	İrbesartan
LC-MS	Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi - Tandem Kütle Spektrometresi
LOD	Gözlenebilme Limiti
LOQ	Tayin Edilebilme Limiti
LOS	Losartan
NaCl	Sodyum Klorür
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ODS	Oktadesilsilan
RP	Ters Faz
RP-HPLC	Ters Faz- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
TELM	Telmisartan
UV	Ultraviyole
UV-VIS	Ultraviyole - Görünür Bölge
VAL	Valsartan

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Valsartanın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 5.1 HPLC cihazının şematik olarak gösterimi .....	22
Şekil 6.1 Kullanılan HPLC cihazı .....	30
Şekil 6.2 %50 ACN-%50 tampon sisteminde, Nucleosil 5 C18 100A kolonunda valsartan için HPLC-UV sisteminde elde edilen kromatogram .....	33
Şekil 6.3 %50 ACN-%50 tampon sisteminde Hypersil H5ODS kolonunda Valsartan için HPLC-UV sisteminde elde edilen kromatogram .....	34
Şekil 6.4 %50 ACN-%50 Tampon (pH 3.7) sisteminde valsartan için HPLC-UV sisteminde elde edilen kromatogram .....	35
Şekil 6.5 2.0-500 mg L <sup>-1</sup> aralığındaki valsartan standartlarının HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlar .....	35
Şekil 6.6 Valsartanın pik alanı kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği .....	36
Şekil 6.7 Valsartanın pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği .....	36
Şekil 6.8 0.05 mg L <sup>-1</sup> standart valsartan çözeltisinin optimum şartlar altında sisteme gönderilmesi ile elde edilen elde kromatogramlar .....	37
Şekil 6.9 Valsartanın oda koşulunda 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi ...	38
Şekil 6.10 Valsartanın derin dondurucuda 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi .....	39
Şekil 6.11 Valsartanın buzdolabında 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi ...	39
Şekil 6.12 Valsartan standartlarının hplc sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar .....	41
Şekil 6.13 Yapay mide ortamından 30 dakikalık periyotlarla alınan numunelerin HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar .....	41
Şekil 6.14 Pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği .....	43
Şekil 6.15 Marka A numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı.....	43
Şekil 6.16 Marka B numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı.....	44
Şekil 6.17 Marka C numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı.....	44
Şekil 6.18 Kurutulmuş çamur numunesinin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ekstraksiyonu sonrası HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogram .....	46
Şekil 6.19 0.2 mL 500 mg L <sup>-1</sup> valsartan spike edilmiş çamur numunesinin 10 mL 0.10 M SDS ekstraksiyonu sonrası elde edilen HPLC kromatogramı .....	46
Şekil 6.20 Sinyal pik alanı kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği .....	47

Şekil 6.21 Valsartan spike edilmiş çamur örneğinin ekstraksiyonundan elde edilen çözeltinin ve tayin öncesi 500 mg L<sup>-1</sup> valsartan ilave edilmiş numunenin HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar ..... 48



## ÇİZELGE LİSTESİ

---

	Sayfa
Çizelge 2.1 Kan basıncındaki değişimlerin sınıflandırılması .....	4
Çizelge 2.2 Sekonder hipertansiyona neden olan durumlar .....	5
Çizelge 2.3 Antihipertansif İlaçların ve ilaç sınıflarının keşifleri .....	7
Çizelge 2.4 Valsartan etken maddeli ilaçlar .....	11
Çizelge 6.1 HPLC sisteminde valsartan etken maddesinin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları .....	32
Çizelge 6.2 Valsartan için elde edilen sistem analitik performans değerleri .....	37
Çizelge 6.3 Yapay mide ortamı parametreleri .....	40
Çizelge 6.4 A, B, C ilaçlarının 80 mg valsartan içeren tabletlerinde miktar tayinleri .....	45

**VALSARTANIN FARKLI MATRİKSLERDE TAYİNİNE YÖNELİK  
ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE KARARLILIK  
ÇALIŞMASI**

Hakan SERBEST

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Seyfullah KEYF

Eş Danışman: Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Anjiotensin antagonistleri hipertansiyon tedavisinde yıllardır önemli bir rol oynamaktadır. Anjiotensin II Tip I reseptör antagonistleri sınıfına ait olan valsartan etkili, yüksek seçiciliğe sahip, oral yoldan aktif bir hipertansiyon ilacıdır. Valsartan, anjiotensin II tip I reseptörlerini bloke ederek kan basıncını düşürür, bu sayede kan damarlarını genişletir ve kan akış hızını normal hale getirir.

Valsartan ağız yoluyla alındıktan sonra hızlı bir şekilde emilir. Ağız yolu uygulamasından sonra 2-4 saat süre arasında pik plazma konsantrasyonuna ulaşır ve bu konsantrasyon 6-9 saat yarı ömür süresinden sonra azalmaya başlar. Safra eliminasyonu valsartan için esas prosestir. Valsartanın %70'inden fazlası safra salgısı ile elimine edilir. Böbrek atılımı genelde doz alımından 2 gün sonra tamamlanır. Diğer yandan dışkı ile atılım 4-7 gün arasında devam eder.

Bu tez çalışmasında ticari ilaçlarda ve atık çamur örneklerinde bulunan valsartanın tayin edilmesi için HPLC-UV sisteminde analitik bir metot geliştirilmiştir. Farklı çevresel depolama koşullarının valsartan stabilitesine olan etkisi 85 günlük bir periyot için incelenmiş ve sonrasında bozulmanın olmadığı gözlenmiştir. Aynı zamanda birçok ilacın aktif bileşeni olarak valsartan için oral uygulama sonrasındaki valsartan stabilitesi yapay mide koşullarında araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar valsartan yapısının 3.5 saat

boyunca korunduğunu göstermiştir. Çalışmanın kalibrasyon grafiği geniş bir konsantrasyon aralığı boyunca ve 0.9999 korelasyon katsayısı ile doğrusaldır. Geliştirilen yontemin gozlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0.014 mg L<sup>-1</sup> ve 0.046 mg L<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Atık amurdan valsartanın geri kazanım yuzdesi ise % 99.8 olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Valsartan, Atık amur, Ekstraksiyon, HPLC, Mide Koşulu, Tablet



## ABSTRACT

---

### **DEVELOPMENT AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF VALSARTAN IN DIFFERENT MATRICES AND ITS STABILITY STUDY**

Hakan SERBEST

Department of Chemical Engineering

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Seyfullah KEYF

Co-Adviser: Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Angiotensin antagonists have been playing a major role in hypertension management for many years. Valsartan which belongs to the angiotensin II type I receptor antagonists class is an effective, highly selective and orally active hypertensive drug. This chemical reduces blood pressure by blocking the angiotensin II type I receptor, thereby widening the blood vessels and restoring a normal blood flow rate.

Valsartan is absorbed shortly after oral administration. It reaches its peak plasma concentration between 2-4 hours after oral application and this concentration declines after 6-9 hours as its half-life. Biliary elimination is a primary process for valsartan. More than 70% of valsartan is eliminated by biliary. Renal excretion is generally completed after two days of administering the drug. On the other hand, fecal elimination continues in the range of 4-7 days.

In this thesis, an analytical method was developed for the determination of valsartan in commercial drug and sewage sludge samples by HPLC-UV. The effect of different environmental storage conditions on the stability of valsartan was examined for a period of 85 days, after which no degradation was observed. The post oral administration stability of the valsartan was also investigated by simulating gastric conditions for valsartan as active ingredient of many drugs. Results obtained showed that the structure

of valsartan was conserved over 3.5 hour period. The calibration plot of the study was linear over a wide concentration range with a correlation coefficient of 0.9999. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of the method developed were found to be 0.014 mg L<sup>-1</sup> and 0.046 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The percentage recovery of valsartan from sewage sludge was found to be 99.8%.

**Keywords:** Valsartan, Sewage Sludge, Extraction, HPLC, Gastric Condition, Tablet



#### 1.1 Literatür Özeti

Hipertansiyon dünya genelinde toplum içerisinde sıklıkla karşılaşılan bir hastalık çeşididir. Kanı pompalayan kalp, görevini yerine getirirken daha fazla çalışarak kan basıncının yükselmesine neden olur. Hipertansiyon ile birlikte ortaya zamanla çeşitli rahatsızlıklar çıkmaktadır. Başlıca kalp ve damar hastalıkları olmak üzere, kanama, beyin damarlarında tıkanma, böbrek hastalıkları, göz hastalıkları gibi diğer rahatsızlıklara sebebiyet vermektedir. Tedavi sürecinin gerçekleşmemesi durumunda ise ölümlerle sonuçlanan durumlarla karşılaşmaktadır [1], [2], [3].

Tedavi sürecinde kan basıncını normal değerlerde tutmak için çeşitli etki mekanizmalarına sahip antihipertansif ilaçlar kullanılmaktadır. İzlenecek programda hastaların durumuna göre en etkili ve en doğru ilaçlar seçilerek kan basıncı ideal değerlerde tutulur. Yapılan bilimsel çalışmalar ile geliştirilen ve üretilen çok sayıda antihipertansif ilaç hipertansiyon tedavisi için kullanılmaktadır [4], [5], [6].

İlaç çeşitlerinin artması ile birbirinden farklı tayin yöntemleri de geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de kromatografik yöntem olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir. Duyarlılığı, kantitatif tayinler için uyumluluğu, uçucu olmayan veya sıcaklık etkisi ile kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılması için uygunluğu ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sık kullanılan bir analitik yöntemdir [7], [8].

## 1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının temel amacı, farklı matrislerde bulunan ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan antihipertansif sınıfındaki valsartanın düşük seviyelerde tayin edilmesine yönelik HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) sisteminde bir analitik yöntem geliştirmektir. Bu amaca yönelik olarak, geliştirilen analitik yöntem ile piyasada satılan valsartan etken maddeli ilaçların prospektüslerinde belirtilen miktarların yüksek doğruluk ve hassasiyetle tayin edilebilirliğini sağlamak ve kıyaslamak, farklı ortam koşullarında valsartanın muhafaza edilmesi ile bozunma sürecini incelemek, valsartanın mide ortamındaki davranışını ve bozunup bozunmadığını tespit etmek, geliştirilen ekstraksiyonu yöntemi ile atık çamurda bulunan valsartanın yüksek geri kazanımda ekstraksiyon sonrası tayin etmek bu tez kapsamında hedeflenmiştir.

## 1.3 Hipotez

Günümüzde teknolojinin ilerlemesiyle bilinmeyen birçok hastalık gün yüzüne çıkarılmakta ve buna bağlı olarak uygun tedavi şekilleri araştırılmaktadır. İlaç tedavisi uygulamalarında amaç doğrudan rahatsızlık veren bölgeye müdahale edip, bu olumsuz etkileri ortadan kaldırmaktır. İlaç kullanımında tedavi şekli zaman zaman bilinçsizce yönetilmektedir. Hangi ilacın, ne tür rahatsızlığa etki ettiği kulaktan doğma bilgilerle öğrenilmiş ve kimi zaman da bunun sonucu olarak sağlıklı olan diğer organlar bilinçsiz ilaç kullanımından dolayı hasar görmeye başlamıştır. Yeni ilaçların üretilmesiyle, kullanılan etken maddelerin diğer organlarla ilişkisi, hizmet ettiği hastalıkların belirlenmesi ve normal bir birey için belirlenen dozaj değerlerinin uygunluğunun araştırılması yakın gelecekte uygulanan tedavilerin daha etkili bir hale geleceği fikrini ortaya koymaktadır.

Hipertansiyon günümüzde oldukça sık rastlanan bir hastalıktır. Gerek sağlık bakımından, gerekse ilaç sektörüne olan doğru orantılı etkisinden dolayı hipertansiyon üzerinde farmakolojik çalışmalar devam etmektedir. Tedavi sürecinde antihipertansif ilaçların kullanımı kan basınç değerlerini düzenleyerek normal seviyelere getirir. Valsartan hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir antihipertansif ilaçtır. Valsartanın tedavi sürecinde fiziksel ve kimyasal özelliklerinin anlaşılması, doğru bir şekilde kullanılması ve ortaya çıkabilecek yan etkilerin önüne geçilmesi için yeni, kolay, hızlı ve yüksek hassasiyetli analitik yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. HPLC

valsartan analitinin farklı matrislerde yüksek doğruluk ve kesinlikte tayininde kullanılan en güvenilir yöntemlerden birisidir. HPLC sisteminin tayininde değişken tüm parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Valsartanın vücuttaki biyoerişilebilirliğinin belirlenmesinde mide ortamındaki davranışı büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda yapılacak olan çalışmalar valsartanın mide içerisindeki durumu hakkında bilgiler sunarak literatürde bu konuyla ilgili eksiklikleri tamamlamada büyük katkılar sağlayacaktır. Ayrıca valsartanın atık çamurdan geri kazanımı için metotlar geliştirilmesi arıtma stratejilerinin sürekliliğinin sağlanması bakımından önem arz etmektedir.



### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 Hipertansiyonun Tanımı ve Tarihçesi

Hipertansiyon dünya genelinde her toplumda yaygın olarak görülen bir sağlık sorunudur. Kalp ve damar hastalıkları alanında yapılan araştırmalar neticesinde morbidite ve mortalitenin toplumda büyük ve küçük tansiyon olarak bilinen sırasıyla sistolik ve diyastolik kan basıncı ile alakalı olduğu saptanmıştır [9], [10], [11].

Hipertansiyon, büyük tansiyon olarak nitelendirilen sistolik kan basıncının 140 mm/Hg, küçük tansiyon olarak diyastolik kan basıncının 90 mm/Hg seviyesinin üzerinde seyretmesidir [1], [12]. Kan basıncının farklı değerlerde seyretmesine istinaden hipertansiyona ait yapılan sınıflandırma Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Kan basıncındaki değişimlerin sınıflandırılması [13]

Sınıflandırma	Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	Diyastolik Kan Basıncı (mmHg)
Optimal	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Yüksek Normal	130-139	85-89
HT 1.Evre	140-159	90-99
HT 2.Evre	160-179	100-109
HT 3.Evre	> 180	> 110
İzole Sistolik HT	> 140	< 90

Primer ve sekonder olarak ikiye ayrılan hipertansiyon hastalığında primer hipertansiyonun oluşum nedenleri belli olmamakla birlikte, bu oran yaklaşık %95'lik bir yüzdeyi sekonder hipertansiyonun oluşum nedenleri ise Çizelge 2.2'de verilmiş olup, bu oran yaklaşık %5'lik bir yüzdeyi içerisine alır [14], [15].

Çizelge 2.2 Sekonder hipertansiyona neden olan durumlar [13]

<b>Faktör</b>
Kronik böbrek hastalıkları
Renovasküler hipertansiyon
Cushing sendromu ve diğer kronik steroid içeren glukokortikoid
Aort koarktasyonu
Uyarıcı ve buna yakın ilaçlar
Feokromasitoma
Primer Aldostrenizm ve diğer mineralkortikoid fazlalığı
Uyku apnesi
Tiroid/Partiroid hastalığı

Hipertansiyon araştırılması tarihte kan basıncını ölçmek için uygun tekniklerin geliştirilmesi ile başlar. Peder Stephen Hales 1733 yılında atlarda doğrudan damar içi kan basıncını ölçen ilk insan olarak tanınmaktadır. Neredeyse bir yüzyıl sonra, kan basıncını cerrahi müdahale olmaksızın ölçmek için spirografik cihazlar geliştirilmiştir. Geliştirilen ilk cihazlar ağır çalışan ve duyarlılığı olmayan cihazlardır. 1800'lü yılların sonu, 1900'lü yılların başında spirografik cihazların klinik uygulamalara giriş yapması, uygulamacılar tarafından tanılara değerli bir yardım olarak kabul edilmiştir. Korotkoff'un 1905 yılında dönüm noktası olarak nitelenen nabız dalgalarının görünümü ile ilişkili olan sesleri tarif etmesinden sonra, 20. yüzyılın ilk yarısında kan basıncı ölçümünde bir miktar değişim olmuştur. 20. yüzyılın sonlarına doğru, esas olarak cıva ile ilişkilendirilen sağlık sorunları nedeniyle, cıva manometreleri aneroid ve elektronik cihazlar ile değiştirilmiştir. Cıva halen bu cihazların kalibrasyonu için kullanılmakta olup, standart protokollerde de cihazların doğruluklarının sağlanması adına kullanımı tavsiye edilmektedir [16].

Kan basıncı ölçümü yeteneğinin zaman içerisinde artış göstermesiyle kan basıncının değişkenliği, fiziksel ve duygusal olarak uyarıların etkisi ve uyku sırasında kan

basıncının azalması 20. yüzyılın ortalarında tespit edilmiştir. 1940'lı yıllarda, Sir Horace Smirk esas ve geçici kan basıncı arasında ayırım yapmanın klinik açıdan yararlı olacağını düşünmüştür [16], [17].

Amerika Birleşik Devletleri'nde sigortacılık sektörü yüksek kan basıncının klinik açıdan önemini belirtmek adına oldukça tutarlı deliller ortaya koymuştur. 1906 yılında birkaç sigorta şirketi sistolik kan basıncı ölçme çalışmalarına başlamıştır [16]. 1911 yılında Northwestern Ortak Yaşam Sigorta Şirketi tıbbi direktörü tansiyon aletlerinin muayenelerde vazgeçilmez hale geldiğini ve zaman içinde de gelişen sigorta şirketlerinin muayenelerde bu aletlerin kullanımına sürekli ihtiyacı olduğunu belirtmiştir [16], [18]. Bunun ardından yeni ölçüm teknikleri geliştirilmiş ve yapılan çalışmalar ile yüksek kan basıncının ölümlerle olan ilişkisi hakkında bulgular elde edilmiştir. 1918 yılına gelindiğinde şirketler el ile muayene ölçülen sistolik kan basıncı tekniğine göre daha da standartlara oturtulmuş şartlar altında sistolik ve diastolik kan basıncını dinleme metoduyla ölçmeye başlamışlardır [16].

19. ve 20. yüzyıl arasında hipertansiyon ile ilgili yapılan klinik çalışmalarda önceleri bu hastalığın kronik böbrek hastalıkları ile ilgili olduğu fikri ortaya atılmıştır. İleri safhalardaki çalışmalarda hipertansiyonun sağlıklı kişiler arasında hızla yayılan böbrek ve kardiyovasküler hastalıkların belirtisi olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraları hipertansiyon ile ilgili olarak arteriyal kan basıncını arttıran parametreler, hipertansiyonun oluşum evresi, sekonder hipertansiyon sebepleri, tedavi sürecinde ilaç kullanımı evreleri, ilaçların etki mekanizmaları gibi çalışmalar yapılmıştır [19], [20].

Dünya genelinde bakılacak olursa, hipertansiyon en yaygın kardiyovasküler hastalık olmakta ve gelişmiş ülkelerde %20-50 arasında bir yüzdeyle yetişkin nüfusunda görülmektedir [21]. Hipertansiyonu olan kişilerin %50'si yaşadığı bu sağlık sorununun bilincinde olup, bu kişilerin %50'si tedavi sürecine girmekte ve tedavi görenlerin de %50'si kontrol altına alınabilmektedir [22]. Amerika'da hipertansiyon konusunda bilinçlenme ile farkındalık oranı %50'den %70 civarlarına, tedavi görenlerin oranı da %31'den %59'a çıkmıştır. Avrupa'da durum Amerika ile benzerlik göstermekle beraber, hipertansiyonun kontrol altına alınma oranı Amerika'dan düşük olup, bu değer %8 civarındadır [23]. Türkiye'de yapılan istatistiksel bir çalışmaya göre yetişkin erkeklerde %36,6, yetişkin kadınlarda da %49,1 oranında hipertansiyon rahatsızlığı görülmektedir [24].

## 2.2 Antihipertansif İlaçlar

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan antihipertansif ilaçlarla kan basıncının optimal düzeyde tutulması amaçlanmaktadır. Bunun yanı sıra, tedavi sürecinde hastanın fiziksel olarak da uygun kiloya gelmesi ve buna bağlı olarak dengeli beslenme ve spor yapma alışkanlığı kazanması, alkol, sigara gibi sağlığı olumsuz yönde etkileyen faktörlerden uzak kalması tedaviyi olumlu yönde etkileyecektir [5] [13].

İlk olarak kullanılan farmakolojik ilaçlar nitrit, tiyosiyanat, dehidrojenasyon olmuş ergot, pirojenler ve veratrum viritler ile ekstrakteleri içermektedir. 1960'lı yılların sonunda sıklıkla kullanılan ilaçlar diüretikler, rauwolfya alkaloidleri, ganglion blokerleri ve sempatik antagonistlerdir [25]. Çizelge 2.3' de antihipertansif ilaçların ve ilaç sınıflarının keşfi ile ilgili tarihler verilmiştir.

Çizelge 2.3 Antihipertansif İlaçların ve İlaç Sınıflarının Keşifleri [25]

Yıllar	Antihipertansif Ajanlar
1900	Sodyum Tiyosiyanat
1931	Reserpin
1947-1950	Ganglion Önleyici İlaçlar
1958	Tiyazit Türü Diüretikler
1950'ler	Hidralazin
1950'ler	Guanetidin
1957	Spirolakton
1960	Metildopa
1973	B-Reseptör Önleyicileri (Ör: Propanolol)
1970'ler	Santral $\alpha_2$ Agonistleri (Ör: Clonidine)
1975	Periferel $\alpha_1$ Reseptör Önleyicileri
1977	ADE İnhibitörler (Ör: Kaptopril)
1977	Kalsiyum Kanal Önleyicileri (Ör: Verapamil)
1993	Anjiyotensin II Reseptörleri (Ör: Losartan)
2000	Renin İnhibitörleri (Ör: Aliskiren)

Antihipertansif ilaçların tarihsel sürecinde 2.Dünya Savaşı öncesinde etkili bir antihipertansif ilacın olmadığı görülmektedir. 1900 yılında sodyum tiyosiyanat Treupel ve Edinger tarafından ve sonrasında Hines tarafından Mayo Klinik'te kullanılmıştır

[26]. Yapılan denemeler sonrası sodyum tiyasiyanatın etkinliğinin olmadığı ve potansiyel toksik bir madde olduğu gözlemlenmiştir. Dozajı belli bir güven aralığında tutmak için kan seviyesi ölçümleri oldukça gerekli hale gelmiş ve o zamanlarda bile yan etkilerin seyrek olmadığı görülmüştür. Bundan dolayı, zaman içerisinde ilaç tedavisinin önemi tıp otoriteleri tarafından ön plana çıkarılmış ve bu konu hakkında çalışmalar başlamıştır. 1960'lerde bazı uzmanlar damar hastalıklarının hipertansiyonun bir sonucu olmasından ziyade hipertansiyonun nedeni olduğuna inanmışlardır. Bunun yanında, ağırlıklı görüşün ilaç kullanımını hasta tedavisi yerine manometre tedavisi olarak görmüş ve toksisite sıklığının hipertansiyonun erken ilaç tedavisi ile ilişkili olduğunu bu görüşle desteklemişlerdir [26].

Antihipertansif grubuna ait olan ilaçlar; diüretikler, beta blokerler, anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ADE), anjiotensin reseptör blokerleri (ARB), kalsiyum antagonistleri, alfa reseptör antagonistleri, santral sempatolitik etkili ilaçlar, vazodilatörler ve periferik sempatik inhibitörleridir [27].

### **2.2.1 Anjiotensin 2 Reseptör Antagonistleri**

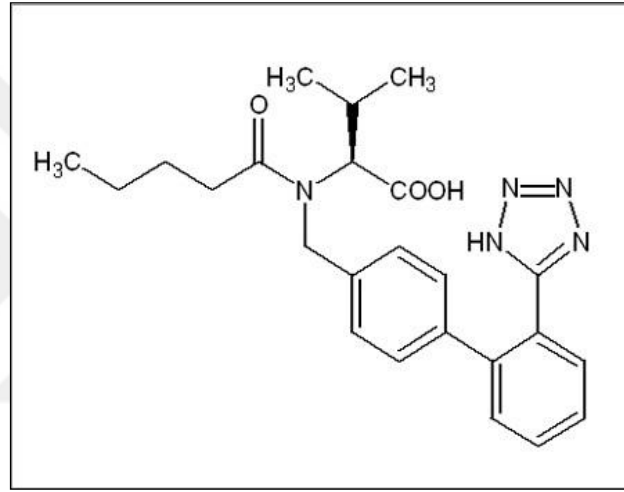
Renin-anjiotensin sistemi açık bir şekilde hipertansiyon patofizyolojisi, konjestif kalp yetmezliği, miyokardiyal enfarktüs, diyabetik nefropati alanlarına katılmaktadır [28]. Böbrekte proteolitik olarak üretilen bir enzim olan renin, karaciğerde üretilen  $\alpha_2$  globulin formundaki anjiotensinle reaksiyona girerek anjiotensin 1' i meydana getirir. Bir sonraki adımda, anjiotensin 1 anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) ile reaksiyona girerek anjiotensin 2' yi oluşturur. Anjiotensin 2 (A2)'nin neden olduğu durumlar doğrudan vasküler etki ile vazokonstriksiyon ve aldosteron salgılatıcı etki ile vücutta sıvı ve sodyum birikmesidir. A2' nin yarılanmasından sonra yine peptid olan anjiotensin 3 ve anjiotensin 4 oluşur [29].

Anjiotensin 2 reseptör antagonistleri sartan grubu olarak bilinmekte olup, sartan grubuna ait ilaçlar losartan, valsartan, kandesartan, irbesartan, telmisartan, eprosartan ve olmesartandır [30].

## 2.3 Valsartan Hakkında Genel Bilgiler

### 2.3.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Valsartan yapısı Şekil 2.1 de gösterildiği üzere 3-metil-2-(N-{[2'-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)bifenil-4-yl]metil}pentanamido) bütanoik asit olarak adlandırılır ve  $C_{24}H_{29}N_5O_3$  formülasyonu ile gösterilir. Molekül kütlesi  $435.519 \text{ g mol}^{-1}$  olarak belirlenmiştir [31]. Beyaz renkli ve pudra boyutunda olan valsartan etanol ve metanolde oldukça iyi çözünür. Bunun yanı sıra asetonitril ve suda da çözünebilir, ancak sudaki çözünürlüğü  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta  $0.18 \text{ mg L}^{-1}$  olup, bu değer çözünürlük için çok az bir miktarı temsil etmektedir [32], [33].



Şekil 2.1 Valsartanın kimyasal yapısı [31]

Valsartanın erime sıcaklığı  $105-110 \text{ }^\circ\text{C}$  arası değerlerdedir. Metanoldeki  $[\alpha]_D^{20}$  spesifik rotasyonu  $68^\circ$  ve bölme katsayısı (P)  $0.033$ 'tür. Bu kimyasalın oldukça hidrofilik bir karaktere sahip olduğu görülmüştür. Partikül boyutunun da ince olduğu göz önünde bulundurulursa, atmosfer ortamından nemi bünyesine alma durumu söz konusu olmaktadır. Dolayısıyla bu bileşiğin kuru ortamlarda saklanması gerekmektedir [32].

### 2.3.2 Farmakolojik Özellikleri

Anjiotensin 2 Tip 1 ( $AT_1$ ) reseptör antagonisti ailesine ait olan valsartan (VAL) oral yoldan alınan, etkili ve yüksek seçiciliğe sahip bir hipertansiyon ilacıdır. Valsartan, anjiotensin 2 tip 1 ( $AT_1$ ) reseptörlerini engelleyerek kan basıncını azaltır. Valsartanın

kullanılmasıyla kan damarlarında meydana gelen daralma ortadan kalkar ve kan akış hızı normale döner [32], [34], [35].

Valsartanın anjiotensin 2 tip 2 (AT<sub>2</sub>) reseptörlerine olan afinitesinin, anjiotensin 2 tip 1 (AT<sub>1</sub>) reseptörlerine oranı 1/20000'dir. Bu olay kan basıncının azalmasında etkili olduğu gibi, düz kaslarda kasılmaların azalmasında, böbrek fonksiyonlarının iyileştirilmesinde ve ateroskleroz lezyonların azalmasında da oldukça etkilidir. Bunun yanında, valsartanın AT<sub>1</sub> reseptörlerini engellemesiyle ortamdaki Anjiotensin 2 konsantrasyonu artar ve uyarılan AT<sub>2</sub> reseptörüne bağlanır [36].

### **2.3.3 Farmakokinetik Özellikleri**

Valsartan ağız yoluyla alındıktan sonra hızlı bir şekilde emilir ve 2-4 saat süre sonra plazma seviyeleri tepe noktasına ulaşır. Daha sonra bu seviyeler, çeşitli çalışmalarda da gözlenen 6-9 saat aralığındaki yarı ömür süresiyle birlikte de azalmaya başlar. Plazma kısmının dışında sınırlı bir dağıtıma sahip olan valsartan, %94-97 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Karboksilik grupların varlığından dolayı valsartan nötr pH aralığında çözünür ve fizyolojik pH aralığında iyonlaşmış şekilde bulunur. Kararlı haldeyken dağıtım hacmi yaklaşık 17 litredir [31].

Valsartan ve inaktif metaboliti için esas eliminasyon prosesi safrada meydana gelmektedir [24]. İlacın %70'inden fazlası safra salgısı ile elimine edilir [31], [38], [39], [40]. Böbrek atılımı genelde doz alımından 2 gün sonra tamamlansa da, dışkı ile atılım 4-7 gün arasında devam eder [38], [41].

Oral solüsyon şeklinde valsartan alındığında, dozun öncelikle yaklaşık %83'ü dışkı ile yaklaşık %13'ü idrar ile değişikliğe uğramadan atılır. Atılımı gerçekleşen ve yapısal değişikliğe uğramamış ilacın %20'si metabolitleri şeklinde olmakla beraber, bunun %9'u da esas ve hipertansiyonda inaktif metabolit olan valeril 4-hidroksi valsartandır [42], [41].

### **2.3.4 Valsartanın Hipertansiyon Tedavisindeki Yeri**

Kan basıncı seviyeleri ile çeşitli kalp rahatsızlıkları riskleri arasında açıkça bir yakınlık bulunmaktadır. Hafif hipertansiyon olarak tanımlanan kan basıncı seviyeleri eşik değeri çeşitli kurallar arasında farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, kan basıncı

seviyesine veya üzerine çıkan değerlerin tedavi sürecinde azalma gösterdiği kabul edilmiştir.

İlaç tedavisinin uygulanmasına karar verildiğinde ilaç sınıflarının geniş bir seçimi vardır. Bununla birlikte, başlangıç tedavisi için, antihipertansif ilaçlar arasında görüş birliği bulunmamaktadır [43], [34].

Valsartan gibi anjiotensin 2 antagonistlerinin avantajları kaynağı ne olursa olsun anjiotensin 2 blokajı ve bradikinin ile prostaglandinin bozulma etkisinin yetersizliğidir [34].

### 2.3.5 Piyasadaki Valsartan Etken Maddesi İçeren İlaçlar

Hipertansiyon tedavisi uygulamalarında kullanılan ve piyasada satılmakta olan valsartan etken maddeli ilaçlar Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2.4 Valsartan etken maddeli ilaçlar [44]

İLAC	FİRMA	İLAC FORMU
Cardopan	Sanovel	Tablet
Diovan	Novartis	Tablet
Premium	Abdi İbrahim	Tablet
Wansaar	Pharmactive	Tablet
Exforge	Novartis	Tablet
Cardofix	Sanovel	Tablet
Combisar	Bilim	Tablet

Günümüzde hipertansiyon hastalığının giderek yaygınlaşması sonucu kan basıncı değerlerinin normal düzeylere indirmek için kullanılan antihipertansif sınıftaki valsartan etken maddeli ilaçların tüketimi aynı oranda artış göstermektedir.

### İLAÇ ETKEN MADDE MİKTAR TAYİN YÖNTEMLERİ

Günümüzde dünyanın her yerinde çeşitli amaçlar için kullanılmakta olan ilaçlarda etken maddelerin tanınması büyük önem arz etmektedir. Her ilacın vücuda etki mekanizması farklı olmakla beraber, etki mekanizmasını oluşturan temel unsur da ilaç etken maddeleridir. İlaç kullanımında alınan dozun alınması sağlık açısından önem taşımaktadır. İlaç etken maddesinin, ilaç bileşimleri içerisindeki miktarları her ilaca göre değişkenlik göstermekle beraber, kullanılacak olan dozun normalinden yüksek değerlere çıkması, görülebilecek yan etkilere sebebiyet vermektedir. Aynı şekilde normalden düşük miktarda etken madde kullanımı da gerekli etkiyi göstermeye yeterli olmamaktadır. Üretimden tüketime kadar olan süreçte gerek kullanılan ilaçlardaki, gerekse farklı madde miktar tayinleri bu konuda giderek önem kazanmaktadır. İlaç etken madde tayin yöntemleri kromatografik yöntemler, spektrofotometrik yöntemler, spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntemler olarak özetlenebilir [45].

#### 3.1 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi yapısal olarak birbirine benzeyen maddeleri ayırmada kullanılan ve bu ayırımdan sonra tanınmasını ve tayin edilmesini sağlayan yöntemlerin tek bir başlık altında toplandığı bir terimdir [45]. Bu ayırımın sağlanması ve devamında tayin edilmesi için alınan numune gaz, sıvı veya süperkritik formda olan hareketli bir faz eşliğinde sabit faz üzerinden taşınır. Söz konusu sabit faz, katı bir yüzeyde ya da kolonda sabit konumda duran ve gelen numuneyle herhangi bir karışma meydana getirmeyen bir fazdır. Hareketli fazın numuneyi sabit faza getirmesiyle karışım içindeki maddeler sabit faz üzerinde farklı hızlarda hareket etmeye başlar ve birbirinden ayrılma olayı

gerçekleşir [46]. Sabit fazın karışımdaki bileşenleri tutma kuvveti değiştikçe bu bileşenlerin sabit fazda ilerleme hızı ve buna bağlı olarak sabit fazdan ayrılma süresi de değişir. Örneğin; bileşen sabit faz tarafından daha büyük kuvvetle tutulduğunda, hareket hızı yavaş ve sabit fazdan ayrılma süresi uzundur [47].

Kromatografide hareketli fazın tipine göre sıvı ve gaz kromatografisi mevcuttur. Sıvı formun hareketli faz olduğu yöntem sıvı kromatografisi, gaz formun hareketli faz olduğu yöntem ise gaz kromatografisidir. İki kromatografi çeşidi arasındaki fark; sıvı kromatografisinin kolonlarda ve düz yüzeylerde, gaz kromatografisinin ise yalnızca kolonlarda gerçekleşmesidir [46], [48].

Kromatografik yöntemler genel olarak beş grup altında toplanmıştır [49], [50].

### **3.1.1 Adsorpsiyon Kromatografisi**

Çözünen bir maddenin katı faz yüzeyinde tutunması esasına dayanır. Çözünen maddenin fiziksel özelliğine göre; sıvı için sıvı-katı, gaz için gaz-katı kromatografisi ismini alır. Organik solventlerde çözünmüş farklı polaritelere sahip maddelerin ayrımı ilkesine dayanır. Maddenin molekül yapısındaki fonksiyonel grupların miktarına ve çeşidine bağlı olarak tutunma gücü hakkında değerlendirme yapılabilir [51].

### **3.1.2 Dağılım Kromatografisi**

Karışım içerisindeki maddelerin hareketli ve sabit faz arasında farklı dağılımlara sahip olması ilkesi ile ayırım meydana gelmektedir. Sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinen bu kromatografi çeşidinde birbiri içinde çözünmeyen 2 sıvı faz mevcuttur. Sabit faz, kolon dolgu malzemesinin üzerine yerleşmiş, ince sıvı film tabakasından ibarettir. Hareketli faz ise söz konusu diğer sıvıdır. Hareketli ve sabit faz polaritesinin farklı olması iyi bir ayırım için önem arz etmektedir [52], [53].

Çözünen maddenin adsorpsiyon katsayısı  $K$ , söz konusu maddenin adsorbandaki ve hareketli fazdaki derişimleriyle orantılıdır. Bu derişim değerleri sırasıyla  $C_1$  ve  $C_2$  olarak verilirse;

$$K = C_1 / C_2 \quad (3.1)$$

Verilen denkleme göre  $K$  değeri arttıkça karışım içindeki madde adsorban tarafından daha iyi tutulur ve sabit fazda daha yavaş hareket eder.  $K$  değerinin azalması ise söz

konusu maddenin sabit fazda daha az tutunduğunu ve daha hızlı hareket ettiğini ifade eder [54].

Dağılma kromatografisi hareketli ve sabit fazın polaritelerinin farklılığına istinaden ters-faz ve normal-faz sıvı kromatografisi olarak iki alt başlığa ayrılmaktadır.

### 3.1.2.1 Ters-Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit fazın hareketli fazdan daha az polar olduğu sıvı kromatografisi yöntemidir. Apolar maddelerin ayrımının sağlandığı bu yöntemde, hareketli fazın hazırlanmasında kullanılan su saflığının yüksek olması ve çözücünün suyla karışması oldukça önem arz eder. Günümüzde apolar yapıya sahip olan ilaçların analizlerinde sıkça başvurulur. Kullanılan sabit fazlardan oktadesilsilan (ODS) 18 karbon atomu zincirinden meydana gelir ve daha apolar özellikteki maddelerin ayrılmasında kullanılır. Polar özellikteki maddeler C<sub>18</sub> kolonunda daha az tutunmaktadır. C<sub>8</sub> gibi kısa zincirli, fenil ve sikloheksil bağlanmış sabit fazlar da polar maddelerin ayrılmasında kullanılır. Apolar özellikteki maddeler bu tip sabit fazlarda daha az tutunmaktadır. [49], [55], [56].

Bu kromatografik sistemin ilaç etken maddeleri tayininde kullanıldığı birçok çalışma literatürde rapor edilmiştir. Birajdar ve arkadaşları, nebivolol hidroklorid ve valsartanın birlikte bulunduğu farmasötik katı formda eş zamanlı tayinlerine yönelik basit bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC) ve iki tekrarlı ultraviyole spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Dalga boyu valsartanın spektrofotometrik ölçümü için 246.6 nm ve nebivolol hidroklorid eş zamanlı ölçümü için 280.2 nm'ye, Q analizi ölçümü için ise iki dalga boyu 246.6 nm ve 275 nm olarak ayarlanmıştır. Spektrofotometrik yöntem ile, nebivolol hidroklorid için doğrusallık aralığı 0.5-2.5 µg/ml ve valsartan için ise 5.0-25 µg/ml olarak bulunmuştur. Her iki analit için de analizler HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiş ve ters fazlı C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm partikül boyutu) kolon kullanılmıştır. 50 mm amonyum asetat tamponu kullanılarak pH'ı 3.5'a ayarlanan isokratik mobil faz asetonitril de içermektedir (30:70, v/v). Akış hızı, tayin dalga boyu 275 nm için 0.80 mL dk<sup>-1</sup> olarak ayarlanmıştır. Loratidin iç standart olarak kullanılmıştır. HPLC yöntemi ile, nebivolol hidroklorid için lineer aralık 2.0-12 mg L<sup>-1</sup> ve valsartan için ise 5.0-30 mg L<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Tüm yöntemler için korelasyon katsayıları, 0.998'e eşit veya daha yüksek değerler olarak elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla nebivolol hidroklorid ve valsartan için 12

mg L<sup>-1</sup> ve 38 mg L<sup>-1</sup>, 32 mg L<sup>-1</sup> ve 95 mg L<sup>-1</sup>'dir. Yöntemlerin kesinliği geri kazanım ölçümleriyle değerlendirilmiş ve iyi sonuçlar elde edilmiştir. Geri kazanım yüzdeleri, tüm yöntemler için % 98.28 ile %102.25 aralığında bulunmuş bağıl standart sapma değerleri %3'ün altında elde edilmiştir [57].

Rao ve arkadaşları, isokratik, ters fazlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Inertsil ODS C8 (100 x 4.6 ) mm, 5 µm kolonu ve tampon çözelti ve asetonitrilin homojen karışımını içeren mobil faz (65:35, v/v) analizler boyunca kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 mL dk<sup>-1</sup> ve dalga boyu 250 nm olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem; doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, sistem uygunluğu, seçicilik, sağlamlık gibi parametrelere bağlı kalarak yöntemin uygunluğunu kanıtlamak amacıyla değerlendirilmiştir [58].

Kumar ve arkadaşları 2011 yılında saf ve tablet formülasyonunda valsartan miktarının belirlenmesi için hızlı, kesin, doğru, spesifik ve duyarlı bir tes faz likit kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik yöntem Kromasil C<sub>18</sub> kolonu (250 mm x 4.6 mm I.D. 5µ) kullanılarak 233 nm dalga boyu ve 1.0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında metod için parametreler oluşturulmuştur. Hareketli faz olarak fosfat tamponu ve asetonitril (ACN) (55:45 v/v) karışımının kullanıldığı sistemde alıkonma zamanı 3.94 dakika olarak belirlenmiştir. Geri kazanım yüzdesi %99.62 ve %99.88 arasında olup, yöntemin doğruluğu ve hassasiyeti için yüzde standart sapma değeri %2'den düşüktür. Bu metodun valsartanın ilaç tabletlerindeki rutin kalite kontrol analiz çalışmalarında kullanılabilir olduğu beyan edilmiştir [59].

### **3.1.2.2 Normal-Faz Sıvı Kromatografisi**

Sabit fazın hareketli fazdan çok daha polar olduğu sıvı kromatografisi yöntemidir. Sabit faz olarak silika ve alümina yaygın olarak kullanılmaktadır. Hareketli faz bileşeni olarak genellikle metilen klorür, dietil eter, kloroform, hekzan gibi çözücüler kullanılmaktadır. Sabit yüzey polar olduğundan dolayı, maddenin polaritesi ile alıkonma süreleri arasında doğru orantı söz konusudur [47], [60].

### **3.1.3 İyon Değiştirme Kromatografisi**

Sabit fazdaki ve örnekteki aynı yüklü iyonların yer değiştirmesi ilkesine dayanır. Maddenin iyonik halde olması ya da iyonlaşması iyi bir ayırım sağlanması için önemli bir husustur. Hareketli faz olarak kullanılan sıvı, belli bir pH değerine ayarlanmış bir

tampon çözeltilidir. Hareketli fazın pH değeri ve konsantrasyonu iyon değiştirmeyi etkileyen unsurlardır [52], [61].

Ayrılması zor olan iyonların, proteinlerin, peptidlerin ve aminoasitlerin ayrılmasında iyon değiştirme kromatografisi kullanılmaktadır.

### **3.1.4 İyon Çifti Kromatografisi**

Hareketli fazı organik çözücü ihtiva eden sulu bir tampon çözelti ve madde ile zıt yüklü karşıt iyon içeren bir iyonik bileşikten meydana gelen bu yöntemde iyonik ve iyonlaşabilen türlerin ayrımı ve tayin edilmesi söz konusudur. İyon çifti oluşturan maddeler elde edilen sinyallerde pikin başlangıç ve bitiş noktalarında meydana gelebilecek kuyruk oluşumunu önler ve dolayısıyla pikin keskinliğini artırır [50], [30].

Bhatia ve arkadaşları, tablet formundaki valsartan ve hidroklorotiazitin eş zamanlı tayinini gerçekleştirmek için UV spektrofotometrik ve iyon çifti kromatografisi olarak basit, duyarlı, hızlı ve doğruluğu yüksek iki yöntem geliştirmişlerdir. UV spektrofotometresinde valsartan için doğrusal aralık  $5.0-45 \text{ mg L}^{-1}$ , hidroklorotiazit için  $2.0-18 \text{ mg L}^{-1}$  olarak tayin edilmiştir. İyon çifti kromatografisinde HIQsil ODS kolonu ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz (pH 4.6) %70 oranında metanol, %30 oranında  $0.0025 \text{ M}$  orto-fosforik asit ihtiva etmektedir.  $259 \text{ nm}$  dalga boyunda valsartan için konsantrasyon aralığı  $0-240 \text{ mg L}^{-1}$ , hidroklorotiazit için  $0-75 \text{ mg L}^{-1}$  olarak tayin edilmiştir [62].

### **3.1.5 Eleme Kromatografisi**

Molekül büyüklüğü farklı olan maddelerin ayrılmasında kullanılan bu yöntemin bir diğer adı da jel filtrasyondur. Bu yöntemde katı olan sabit faz ile numune arasında herhangi bir etkileşim meydana gelmemektedir. Alıkonma zamanını etkileyen iki önemli parametre sabit fazda bulunan dolgu maddesinin büyüklüğü ve gelen numunenin molekül büyüklüğüdür. Temel olarak; büyük moleküller dolgu maddesinin boyutundan büyük olduğu için gözeneklere takılmadan diğer moleküllere göre erken çıkar. Orta büyüklükteki moleküllerin bir kısmı gözeneklere difüze olur ve gözeneklerde geçirdikleri zamana göre alıkonma belirlenir. Küçük boyuttaki moleküller ise gözeneklere difüze olarak kolondan diğer moleküllere göre en geç sürede çıkar [50].

### 3.2 Spektroflorimetrik Yöntem

Farmasötik çalışmalarda düşük tayin limiti, duyarlılık, spesifik oluşu, çalışma kolaylığı sağlaması gibi avantajlara sahip olması nedeniyle florimetri miktar tayinlerinde kullanılan bir yöntemdir [63]. Yöntem  $0.001-1 \text{ mg.L}^{-1}$  derişimli analitleri doğru, kesin, seçici ve büyük bir hassasiyetle tayin etme kabiliyetiyle diğer yöntemlere göre üstünlüğe sahiptir [64]. Sahip olduğu molekül yapılarından dolayı floresans özellik gösteren ilaç etken maddelerinde spektroflorimetrik metotlar uygulanabilmektedir [65]. Floresans tekniği doğrudan bir metot değildir, bu nedenle analitin türevlendirilmesini gerektirir [66], [67].

Shalan ve arkadaşları, amlodipin besilat (AML) ve valsartan (VAL) ikili karışımının eş zamanlı tayini için son derece hassas, basit bir spektroflorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde bu ilaçların sulu bir sodyum dodesil sülfat (SDS) sistemi içerisinde  $\Delta\lambda=80 \text{ nm}$ 'de eş zamanlı floresans yoğunluğunun ölçülmesi esas alınmıştır. AML ve VAL'ın her ikisinin de floresans yoğunlukları SDS sisteminde büyük ölçüde sırasıyla %200 ve %220 oranında geliştirilmiştir. Lineer aralık floresans – konsantrasyon grafiğinde VAL ve AML için sırasıyla  $0.5-4.0 \text{ mg L}^{-1}$  ve  $0.05-3.0 \text{ mg L}^{-1}$  aralığında belirlenmiş, LOD değerleri  $0.027 \text{ mg L}^{-1}$  ve  $0.022 \text{ mg L}^{-1}$ , LOQ değerleri  $0.083 \text{ mg L}^{-1}$  ve  $0.007 \text{ mg L}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir [68].

Shalan ve arkadaşları, amlodipin ve valsartanın birlikte bulunduğu tabletlerde her iki analitin eş zamanlı tayini için basit, hassas, ve güvenilir bir spektroflorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem, AML ve VAL için  $455 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}}$   $360 \text{ nm}$ ) ve  $378 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}}$   $245 \text{ nm}$ ) floresans ölçümlerini içermektedir. Önerilen spektroflorimetrik yöntemde analitik performansın doğrusallık, hassasiyet, doğruluk, seçicilik, sağlamlık ve tayin edilen miktarlar ile validasyonu yapılmıştır. Lineer aralık floresans yoğunluğu – konsantrasyon grafiğinde AML ve VAL için sırasıyla  $0.2-3.6 \text{ mg L}^{-1}$  ve  $0.008-0.080 \text{ mg L}^{-1}$  arasında belirlenmiş olup, LOD değerleri  $0.025 \text{ mg L}^{-1}$  ve  $0.0012 \text{ mg L}^{-1}$ , LOQ değerleri de  $0.083 \text{ mg L}^{-1}$  ve  $0.04 \text{ mg L}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Söz konusu iki analitin kombine olarak kullanıldığı tabletlerde optimum koşullarda gerçekleştirilmesi amaçlanan çalışmada geri kazanımın %98.85'den az olmadığı hesaplanmıştır [69].

EI-Kosasy ve arkadaşları, amlodipin ve valsartanın eş zamanlı tayini için dört farklı floresans yöntemi geliştirmişlerdir. Bu metodlar her iki ilacın  $\lambda_{\text{ex}}$   $300 \text{ nm}$ 'de uyarılması, daha sonra sırasıyla AML ve VAL için,  $\lambda_{\text{em}}$   $378$  ve  $496 \text{ nm}$  maksimum emisyon

verilmesi esasına dayanmaktadır. İlk yöntemde, tek  $\lambda_{ex}$  herhangi bir ilave olmaksızın kullanılmıştır. Bu yöntemin duyarlılığı, diğer üç yöntem içindeki, hidroksi propilmetil selüloz (HPMC) yüzey aktif maddesi,  $\beta$ -siklodekstrin ya da demir oksit manyetit nanopartikülleri eklenerek artırılmıştır. Farklı sürfaktan tipleri ve  $\beta$ -siklodekstrin ve demir oksit nanopartiküllerinin her ikisinin farklı konsantrasyon seviyeleri, duyarlılığı artırmak için optimum koşulları belirlemek üzere taranmıştır. Söz konusu her iki ilacın florans yoğunluğunu etkileyen, eklenen çözücü tipi ve hacmi ve pH gibi faktörler incelenip optimize edilmiştir [70].

Omar ve arkadaşları, losartan (LOS), irbesartan (IRB), telmisartan (TELM) ve valsartan (VAL) gibi bazı anjiyotensin reseptör blokerlerinin saf ve tablet formlarında tayin edilmesi için basit, hızlı ve duyarlı bir spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntem geliştirilmişlerdir. Spektrofotometrik yöntem 413-419 nm'de sülfölatein indikatörlerle stabil, sarı renkli iyon çifti kompleksi oluşumu ile IRB, LOS ve TELM etkileşimine dayanmaktadır. Bromotimol mavisi (BTB), bromofenol mavisi (BPB) ve bromokresol yeşili (BCG) indikatör olarak kullanılmıştır. Spektroflorimetrik yöntem hiçbir yüzey aktif madde kullanmadan eosin ve LOS, IRB, TELM ve VAL arasında ekstaktif olmayan ikili kompleks oluşumu esasına dayanmaktadır. Söz konusu analitlerin tablet formlarında ve bozunma ürünlerinin varlığında belirlenmesi için geliştirilen yöntemde yüksek bir geri kazanım elde edilmiş olup, zamanın ve maliyetin önem taşıdığı alanlarda, kalite kontrol ve rutin analizler için uygunluğu belirlenmiştir [71].

Mohammed, blokaten adlı amlodipin ve valsartan kombinasyonu içeren tabletlerde eş zamanlı analit tayini için spektroflorimetrik iki farklı yöntem geliştirmiştir. İlk yöntem, her iki ilacın doğal floresans yoğunluğu ölçümlerine bağlı olup, AML ve VAL için suda sırasıyla  $\lambda_{ex}$  390 nm ve 227 nm,  $\lambda_{em}$  460 nm ve 385 nm olarak belirlenmiştir. İkinci yöntemde, AML ve VAL için  $\Delta\lambda=80$  nm kullanılarak sırasıyla 375 nm ve 285 nm dalga boyunda emisyon spektrumunun eş zamanlı florimetrik kantitatif taraması gerçekleştirilmiştir. AML ve VAL için doğrusallık sırasıyla 0.40-14 mg L<sup>-1</sup> ve 1.0-22 mg L<sup>-1</sup> aralığında belirlenmiş olup, LOD ve LOQ değerleri ilk yöntemde AML için sırasıyla 0.165 mg L<sup>-1</sup> ve 0.5 mg L<sup>-1</sup>, VAL için 0.495 mg L<sup>-1</sup> ve 1.5 mg L<sup>-1</sup> olarak, ikinci yöntemde ise AML için sırasıyla 0.148 mg L<sup>-1</sup> ve 0.45 mg L<sup>-1</sup>, VAL için 0.396 mg L<sup>-1</sup> ve 1.2 mg L<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır [72].

### 3.3 Spektroskopik Yöntem

Bir maddenin elektromanyetik ışınlarla olan etkileşimini inceleyen spektroskopide, organik maddeler kalitatif/kantitatif olarak, yapısal olarak, stereokimyasal nitelik olarak ve saflık olarak incelenebilir [45], [73].

UV-VIS (Ultraviyole-Görünür Bölge), IR (Kızıl ötesi), NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) ve kütle spektroskopisi başta olmak üzere raman, mikrodalga ve elektron spinini rezonansı spektroskopisi yöntem dahilindedir [45], [73].

Spektrskopik yöntemlerin valsartan tayininde kullanıldığı birçok çalışma literatürde rapor edilmiştir. Li ve arkadaşları, insan plazmasındaki valsartan ve hidroklorothiazidin eş zamanlı tayinine yönelik hızlı ve hassas bir sıvı kromatografisi - tandem kütle spektrometresi (LC/MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Asetonitril kullanılarak gerçekleştirilen basit bir protein çöktürmesinden sonra, analitler Zorbax SB-AQ C18 kolon kullanılarak ayrılmış ve mobil faz olarak asetonitril ve 10 mM amonyum asetat (60:40, v/v, pH 4.5) kullanılmıştır. Akış hızı 1.20 mL dk<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Valsartan ve hidroklorothiazid sırasıyla 2.08 ve 1.50'nci dakikalarda ayrılmıştır. Geliştirilen yöntem, 4.0-3600 mg L<sup>-1</sup> aralığında valsartan için doğrusal olmakla birlikte, 1.0-900 mg L<sup>-1</sup> aralığında hidroklorothiazid için doğrusaldır. Yöntem, dağılabilen özellikte, her biri 80 mg valsartan ile 12.5 mg hidroklorothiazdi içeren tabletin 20 sağlıklı gönüllüde ağız yoluyla alımından sonra yapılan farmakokinetik çalışmada başarıyla uygulanmıştır [74].

Nataraj ve arkadaşları, valsartanın kullanılan saf ve dozaj formların miktarının belirlenmesi için basit, kesin ve hassas bir UV spektroskopisi yöntemi geliştirmiş ve doğrulamışlardır. Spektroskopik yöntem 250 nm dalga boyunda ve kalibrasyon standartları 0.2-20 mg L<sup>-1</sup> arasında olup korelasyon sabiti 0.9968 olarak tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri UV spektroskopisinde sırasıyla 0.15 ve 0.449 mg L<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur [75].

### 3.4 Elektrokimyasal Yöntem

Ana bileşen içeren çözeltinin elektrokimyasal davranışlarını inceleyen kantitatif yöntemleri konu alan elektroanalitik yöntemlerde düşük tayin limitlerine ulaşmanın yanısıra, bu yöntemlerin uygulandığı alanlarda ara yüzeylerin yük transferinin eşitliği ve

hızı, kütle transfer hızı, gerçekleşen kimyasal tepkimelerde hız ve denge sabiti gibi parametrelerin değerlerini verir [45].

Elektroanalitik yöntemlerle valsartan analitinin de aralarında olduğu birçok ilaç aktif bileşenin kantitatif tayinleri yapılmaktadır. Ibrahim, iki farklı hipertansiyon ilacı olan valsartan (VAL) ve losartan (LOS) analitlerinin termal davranışlarını termogravimetri, ikincil termogravimetri ve diferansiyel tarama kalorimetri gibi farklı termal teknikler kullanarak araştırmıştır. VAL ve LOS bozunumunun ilk aşamasından elde edilen verilerde aktivasyon enerjisi, frekans faktörü (A), tepkime derecesi ve bozunma entalpisi gibi kinetik parametrelerin belirlenmiştir. VAL ve LOS için saflık diferansiyel görüntüleme kalorimetresi ile tespit edilmiştir. LOS analitinin VAL analitinden daha fazla ısıl kararlılığa sahip olduğu birinci dereceden kinetik davranışı ve bağıl ısıl kapasitesi ile değerlendirilmiş olup, VAL ve LOS analitlerinin termal bozunması takip edilmiştir. Ayırma şekilleri incelenmiş ve kütle spektroskopisi ile termal bozunmayı ilişkilendirmek için LOS analiti örnek olarak alınmıştır. Diferansiyel görüntüleme kalorimetresi ile incelenen VAL ve LOS analitlerinin saflığı sırasıyla %99.84 ve %99.91 olarak bulunmuştur [76].

Erden ve arkadaşları, amlodipin besilat (AML) ve valsartan ikili karışımının anodik davranışını Britton-Robinson tamponunda, pH 5.0'de, AML'nin 0.95 V ve VAL'ın 1.15 V'da Ag/AgCl'e karşı tek yönlü oksidasyon camısı karbon elektrotlarında incelemiştir. Diferansiyel puls voltametik yöntemi ilaçlardaki AML ve VAL tayininin gerçekleştirilmesi ve insan serumuna spike edilmesi önerilmiştir. Doğrusallığın AML ve VAL konsantrasyonunun eş zamanlı arttırılmasıyla AML için 1.0-35 µM aralığında, VAL için 1.5-32 µM aralığında olduğu belirlenmiş olup, LOD ve LOQ değerleri AML için sırasıyla 0.31 µM ve 1.03 µM, VAL için sırasıyla 0.36 µM ve 1.21 µM olarak tespit edilmiştir [77].

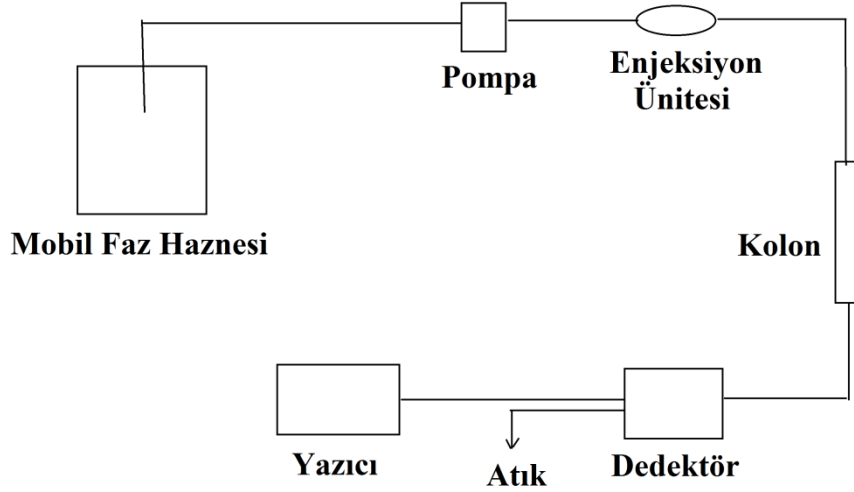
Gürler ve arkadaşları, hipertansiyon tedavisinde kullanılan valsartanı ve protein bağlayıcı VAL serumunu voltametik yöntem kullanarak, camısı karbon elektrodunda incelemiştir. Ayrıca, ilaç hazırlamada ve insan idrarında aynı ajanların doğrudan tayin edilebilmesi için adsorptif sıyırma voltametri yöntemi de geliştirilmiştir. Sonuçlar UV absorpsiyon çalışmalarından elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve %95 oranında bir güven seviyesinde tespit edilen farklılığın önemsiz olduğu iddia edilmiştir [78].

### YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) çok geniş bir kullanım alanına sahip bir analitik yöntemdir [79], [80]. Yüksek ayırma gücü, basınca dayanıklı küçük çaplı ve paslanmaz çelik kolon kullanımı, hızlı analiz, yüksek mobil faz basıncının ve akış hızının kontrol edilebilmesi HPLC'nin teknik özelliklerinden olup, başlıca tercih sebeplerindedir [79], [81].

#### 4.1 HPLC Cihazının Çalışma Prensibi

Genel olarak bakıldığında, HPLC sisteminde numune hareketli faz içerisinde çözünüp, oluşan karışım yüksek basınç altında sabit faz olan dolgulu kolondan geçirilmektedir. Hareketli faz akış kontrolü yapan piston pompası ile mobil faz haznesinden pompalanmaya başlanır, numune de piston pompası ile dolgulu kolon arasındaki enjeksiyon valfi ile dolgulu kolona girer. Numune içerisindeki bileşikler sahip oldukları polaritelerin farklı olması nedeniyle, kolondan farklı hızlarda, dolayısıyla farklı sürelerde ayrılırlar. Kolondan çıkan hareketli faz dedektöre gelerek analite ait sinyal elde edilir. Analitin enjeksiyon sonrası dedektöre varışına kadar geçen zaman alıkonma süredir [81], [82]. Tipik HPLC akış şeması Şekil 5.1 de görülmektedir.



Şekil 5.1 HPLC cihazının şematik olarak gösterimi [81]

## 4.2 HPLC Cihazının Ekipmanları

### 4.2.1 Mobil Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri

Cam veya çelik malzemeden yapılan, bir veya birden fazla sayıda olan ve her biri 500-1000 mL hacimli çözücü kapasitesine sahip mobil faz hazneleri kolon içerisinde ve dedektör sisteminde ortaya çıkan ve sistemi olumsuz yönde etkileyecek olan gazların bertaraf edilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Mobil fazın sisteme verilmeden önce 0.45  $\mu\text{m}$  membran filtrelerden geçirilerek süzülmesi ve aynı zamanda çözünmüş gazların uzaklaştırılması sağlanır. Aksi halde, çözünmüş gazlar kolon içerisinde gaz kabarcıklarına neden olacağından pik genişlemesine, dedektör performansının azalmasına neden olur. Ultrasonik banyolarda bekletmek ve çözücüden inert gaz geçirmek de gazları uzaklaştırmak için kullanılacak alternatifler arasındadır [55], [60].

### 4.2.2 Pompa

Hareketli fazın kolona girmesini, kolon boyunca ilerlemesini ve dedektöre ulaşmasını sağlayan pompanın sağlaması gereken teknik özelliklerinden bahsetmek gerekirse; 6000 psi basınca kadar çıkabilir olması, akış hızının 0.1-10 mL dk<sup>-1</sup> kadar değişkenlik gösterebilmesi, basınç çıkışında sıvının puls ihtiva etmemesi, sıvı akış kontrolün % 0.5 veya daha iyi bir tekrarlanabilirlikte olması, kullanılan parçaların korozif etkilere dayanıklı olması olarak sıralanabilir [83], [84].

#### **4.2.2.1 Şırınga Pompalar**

Akış hızı kontrolünün kolay olması ve puls içermeyen sıvı çıkışı sağlaması en bilinen özelliklerindedir. 250 mL gibi çözücü kapasitesinin sınırlı olması ve değişik çözücülerin kullanıma uygun olmayışı dezavantaj yaratmaktadır [83].

#### **4.2.2.2 Pistonlu Pompalar**

Motor tarafından güç sağlanan bir pistonun ileri ve geri yönde hareketi ile silindirik bir tüpün içerisi çözücü ile doldurulup pompalanır. Akış ilk başta puls gösterse de, kısa süre içerisinde toparlar ve sürekli bir hale gelir. İç hacim çapının küçük olması, sıvı çıkış basıncının yüksek olması, çözücünün viskozite değeriyle bağlantılı olmayan sabit akış hızı gibi özellikler avantaj olarak gösterilebilir [83], [84].

#### **4.2.2.3 Pnömatik Pompalar**

Sıkıştırılmış bir gaz kullanılarak dayanımı az olan bir kabın içerisine konulan sıvının hareketini sağlayan pompalardır. Maliyeti düşük ve akışlar puls göstermez. Kapasite sınırlılığı, basınç dayanımının az olması, sıvı çıkış basıncının düşük olması ve sıvı çıkış hızının çözücü viskozitesine bağlı olması dezavantaj olarak gösterilebilir [83].

#### **4.2.3 Enjektör**

Numunenin sabit faza girmeden önce hareketli faz içerisine enjekte edilmesi amacıyla kullanılan enjektörler manuel ve otomatik enjektörler olarak ikiye ayrılır.

##### **4.2.3.1 Manuel Enjektörler**

Numuneyi yüksek basınçlı ortama iletmek için kullanılan ekipmandır. Enjeksiyon valfi iki aşamadan oluşur. İlkinde numune yükleme yapılır. Bunun için öncelikle enjektör yükleme pozisyonuna getirilir, sonrasında loop içerisine doldurulur. İkinci kısımda enjektör basınçlı ortama yöneltilerek numune sisteme iletilir [83].

##### **4.2.3.2 Otomatik Enjektörler**

Programlanan koordinatlara giden enjektör, numune şişesinden numuneyi çekerek, loop içerisinde hareketli faza enjekte ederek sisteme gönderilmesini sağlar. Enjeksiyon

hacmi loop hacmi ile sınırlandırılmış olup, bu enjektör tipiyle çok sayıda enjeksiyon yapılması mümkündür [83].

#### **4.2.4 Kolon**

Çoğunlukla paslanmaz çelikten imal edilen HPLC kolonları düzgün bir iç çapa sahip olup, bu çap değeri 4-10 mm'dir. Uzunlukları 10-30 cm arasında değişen kolonların dolgu maddelerinin tanecik çapı da 3-10 µm arasında değişkenlik göstermektedir [84]. Dolgu maddeleri silisyum dioksit, alüminyum oksit ve iyon değiştirici reçineden üretilirler. Kullanımı en yaygın dolgu maddesi silisyum dioksit, yani silikadır. İnce, organik bir film tabakası silikanın yüzeyine çeşitli metodlarla kaplanır [84] [85].

#### **4.2.5 Dedektör**

Numunenin derişimi ile orantılı olarak elektrik sinyali üreten ve buna bağlı olarak numunenin kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesini sağlayan dedektörler HPLC cihazı için önemli ekipmandır. Duyarlılık, kararlılık, tekrarlanabilirlik, güvenilirlik özelliklerinin iyi olması, çalışma aralığı bakımından geniş olması, her numunedeki analit için aynı nitelikte yanıt alınması bir dedektörün taşıması gereken özelliklerdir. HPLC sisteminde bahsedilen özelliklere göre değişik dedektör tipleri bulunmaktadır. Bunlar; ultraviyole/görünür bölge (UV-VIS), sıralı foto diyot, floresans, iletkenlik, reaktif indeks, elektrokimyasal, kütle ve evaporatif ışık dağıtıcı dedektörlerdir [85].

#### **4.2.6 Yazıcı Sistemi**

Dedektörden çıkan sinyaller elektronik ortamda bir veri toplama cihazında bir araya gelmektedir. Bu cihaz bir bilgisayar olup, elde edilen sonuçların yorumlanması, tekrarlanabilirliğin artması ve kaydedilmesi hususunda önem arz eder.

### **4.3 HPLC ile ilgili Yapılan Çalışmalar**

Çelebier ve arkadaşları, amlodipin ve valsartanın eş zamanlı tayinini gerçekleştirmek amacıyla HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bunun için ters-faz HICROM Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub> kolon (250 mm x 4.6 mm I.D.) kullanılmıştır. Sistemde oda sıcaklığında, izokratik olarak çalışılmış ve hareketli faz olarak pH 3.6'da olan 0.01 M fosfat tamponu: asetonitril (ACN): metanol (50:40:10 v/v) karışımı kullanılmıştır. Hareketli

faz karıştırıldıktan sonra 0.45 µm membran filtreden geçirilerek, sisteme 1.0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında beslenmiştir. 240 nm dalga boyunda yapılan çalışmada alıkonma süreleri amlodipin ve valsartan için sırasıyla 8.23 ve 10.43 dakika olarak belirlenmiştir. Doğrusal çalışma aralığı 0.05-600 mg L<sup>-1</sup> olarak bulunmuş ve LOD, LOQ değerleri sırasıyla 0.02-0.05 mg L<sup>-1</sup> olarak tayin edilmiştir [86].

Tian ve arkadaşları, valsartan ve hidroklorotiazitin tabletlerde eş zamanlı tayini için basit, hızlı ve doğruluğu yüksek bir ters-faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kullanılan kolon izokrotik ve 200 x 4.6 mm boyutlarındadır. Kullanılan mobil faz metanol, asetonitril, su, izopropil alkol içermekle birlikte oranları sırasıyla %22, %18, %68, %2 olarak belirlenmiş olup, pH değeri 8.0' e trietilamin ile ayarlanmıştır. 1.0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında ve 270 nm dalga boyunda optimize edilen yöntemde alıkonma zamanları valsartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 3.42 dk ve 8.43 dk olarak, doğrusal aralık ise sırasıyla 5-150 mg L<sup>-1</sup> ve 78-234 mg L<sup>-1</sup> olarak tayin edilmiştir [87].

Şatana ve arkadaşları, valsartan ve hidroklorotiazit kombine tabletlerinde UV spektrofotometresi ve HPLC kullanarak analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada sırasıyla 270.6 nm ve 335 nm dalga boylarında çalışılmış ve lineer aralık valsartan için 4.0-12.1 mg L<sup>-1</sup>, hidroklorotiazit için 12-36.1 mg L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Kullanılan mobil fazın pH değeri 3.2 olup, bileşimi %45 0.02 M fosfat tamponu - %55 asetonitril ihtiva etmektedir [88].

Chitlange ve arkadaşları amlodipin besilat ve valsartanın RP C<sub>18</sub> Kromasil (250 x 4.6 mm) kolonunda eş zamanlı tayinini gerçekleştirmek için basit, hızlı ve yüksek doğrulukta bir RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. pH değeri 3.0 olan 0.02 M fosfat tamponu ile asetonitril sırasıyla %56-%44 oranında kullanılarak mobil faz hazırlanmış, 1.0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında ve 234 nm dalga boyunda yöntem optimize edilmiştir. Amlodipin besilat ve valsartan için alıkonma süreleri sırasıyla 3.07 ve 6.20 dakika olarak belirlenmiştir [89].

### EKSTRAKSİYON

Ekstraksiyon yoğun matris içeren örneklerde analitin doğru ve hassas bir şekilde tayin edilebilmesi için başvurulan bir yöntemdir. Ekstraksiyon ile tayini yapılmak istenen analitin çözelti içerisine alınması ve daha sonra kalitatif ve kantitatif tayin edilebilmesi mümkün olabilmektedir. Tayin edilecek analitin yabancı maddelerden uzaklaştırılması uygulanacak analitik yöntemin doğruluğunu ve hassasiyetini artırması için önem arz etmektedir. Ayrıca ekstraksiyon prosesinde temel amaç, yüksek oranda geri kazanım sağlamaktır [90].

Sıkça kullanılan ekstraksiyon yöntemleri sıvı-sıvı ekstraksiyonu, iyon değiştirme, katı faz ekstraksiyonu ve bulutlanma noktası ekstraksiyonu olarak dört grupta toplanabilir [91].

#### 5.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Çözelti içerisindeki analitin geri kazanımı için, çözeltinin organik madde ile temas ettirilmesiyle analitin çözücüye geçmesi sıvı-sıvı ekstraksiyon olarak tanımlanır [92]. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde çözeltinin polaritesine göre polar ya da polar olmayan bir çözücü seçilmektedir [93].

Valsartan tayini için literatürde sıvı-sıvı ekstraksiyonla ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır. Daneshtalab ve arkadaşları 2002 yılında sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak insan kan plazmasında anjiyotensin 2 reseptör antagonisti olan valsartanın miktar tayini için basit bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem metil tersiyer bütül eter kullanılarak 1.0 mL insan kan plazmasından asit ekstraksiyonu ve bunu takiben bazik bir ortama geri ekstraksiyonunu içerir. Çalışmalar oda sıcaklığında yapılmış olup

izokratik bir HPLC ters faz kolonu ve bir floresans dedektörü kullanılmıştır. Valsartanın 10-2000 mg L<sup>-1</sup> arasında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Denek olarak oral yoldan 160 mg valsartan verilen 3 kişinin plazmasında 25-1540 mg L<sup>-1</sup> valsartan tespit edilmiştir [94].

## 5.2 İyon Değişirme

İyon değişim prosesi çözelti içerisindeki iyonlar ile çözünmemiş katı faz içerisindeki iyonlar arasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir [95].

İyon değişimi sürecinde iyonlar, iyon değişim katısı ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Sentetik reçineler veya polimerler bu amaçla kullanılan iyon değişim katıdır. Bazı sentetik reçineler anyonik olan sülfonik, karboksilik veya fenolik gruplar içermekte olup, bu gruplar katyonlarla iyon değişimi yapabilirler. Amin grubu içeren sentetik reçineler, çözültideki hidroksit iyonu değişimi için kullanılmaktadır [95].

Kuvvetli asit ve kuvvetli bazlarda izlenen iyon değişimi sürecinde, çözelti içindeki iyonlar hidrojen ve hidroksit iyonlarıyla yer değiştirilerek devam etmektedir. Yer değiştirmiş olan iyonlar reçineye tutunmaktadır. Katyon değişimi için kuvvetli asit çözeltisi, anyon değişimi için kuvvetli baz çözeltisi temas ettirilerek bu süreç tekrarlanmaktadır [95].

## 5.3 Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Örnek hazırlamada geniş bir kullanım alanına sahip bir yöntem olan katı faz ekstraksiyonu, analitin katı faz üzerinde farklı bir forma dönüştürülüp adsorplanması ve sonrasında uygun bir çözücü ile katı faz üzerinden desorplanması işlemlerini kapsamaktadır [96].

Temel olarak, kullanılacak olan ekstraksiyon kolonuna birtakım tutucu maddelerin konulması ve sıvı numunelerin hazırlanan kolondan geçirilmesi şeklinde ifade edilmekte olan katı faz ekstraksiyonunda tayini yapılacak maddenin molekülleri ile tutucu maddenin molekülleri arasındaki etkileşimler büyük önem arz etmektedir. Gerek tayini yapılacak maddenin, gerekse tutucu maddenin moleküllerinin birbirine bağlanmasıyla analit, istenmeyen bileşiklerden ayrılmaktadır [97].

Her ne kadar sıvı-sıvı ekstraksiyonu numune hazırlamada yaygın olarak kullanılan bir yöntem olsa da, harcanan çözücü miktarının fazla olması, çok zaman harcanması ve maliyetinden dolayı katı faz ekstraksiyonu daha cazip hale gelmektedir [96].

Katı faz ekstraksiyonunun valsartan tayininde kullanıldığı çalışmalar literatürde yerini almıştır. Koseki ve arkadaşları insan plazmasında valsartan tayininin yapılabilmesi için LC/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yüksek performanslı Empore ekstraksiyon diski, evrensel reçine-96 kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 0.5 mL aliyat ekstre edilmiştir. Doğrusal aralık 2-2000 mg L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin gün içerisindeki doğruluğu %94.8-107 aralığında olduğu %2.19-5.40 bağıl standart sapma ile, diğer günlerdeki doğruluğu %93.5-105 aralığında olduğu %1.87-5.67 bağıl standart sapma ile tespit edilmiştir. 24 saate kadar 10 °C sıcaklıkta tutulan örneklerde valsartan kaybı görülmemiştir [98].

Levi ve arkadaşları insan plazmasında ve idrarında bulunan valsartanın (5-2000 mg L<sup>-1</sup>) ve kandesartanın (1-200 mg L<sup>-1</sup>) tayin edilebilmesi için tandem kütle spektroskopisine bağlı katı faz ekstraksiyon yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin doğruluğu %89.2-111 aralığında olduğu %0.9-16.9 bağıl standart sapma ile tayin edilmiştir. Toplam analiz süresi 4.5 dakika olarak kaydedilmiştir [99].

#### **5.4 Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu**

Çözeltiye ilave edilen yüzey aktif madde, çözeltiden ayrılması istenen analit ile misel oluşturmaktadır. Sıcaklığın artırılmasıyla bulutlanma noktasında faz ayrımı gerçekleşmektedir. Oluşan fazlar yüzey aktif maddenin konsantrasyonunun fazla olduğu kısım ve az olduğu sulu faz kısımlarıdır. Yöntemde, faz ayrımının gerçekleştiği sıcaklık değerinin ısıtıldıktan sonra düşürülmesiyle tek fazlı görünüm elde edilebilmekte ve bu da yönteme geri dönüşümlü olma özelliği katmaktadır [92].

### DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu tez çalışmasında hipertansiyon tedavisinde kullanılan valsartan etken maddesi tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde hassas, doğru ve kesinliği yüksek bir analitik yöntem geliştirilmesine yönelik deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 250 nm olarak tek dalga boyunda optimize edilen metotda, valsartanın farklı ortam sıcaklıklarındaki zamana bağlı bozunmaları incelenmiştir. Piyasaya sürülen hipertansiyon ilaçlarından valsartan etken maddesi içeren bazı ilaçlarda valsartan miktar tayini yapılmıştır. Mide ortamında valsartan davranışının incelenmesi maksadıyla, hazırlanan yapay mide ortamında piyasadaki söz konusu ilaçlardan bir tanesi kullanılarak valsartanın zamana bağlı davranışı incelenmiştir. Atık su tesisinden temin edilen atık çamur numunesinin içerisinden valsartanın ekstraksiyonu gerçekleştirilerek geri kazanım yüzdesi hesaplanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm valsartan standartları 5000 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonlu valsartan stok çözeltisinden hazırlanmıştır.

#### 6.1 Kullanılan Ekipmanlar

##### 6.1.1 HPLC Sistemi ve Kolon

- Vakum: Spectra System SCM1000 (Thermo)
- Pompa: Spectra System P1500 (Thermo)
- Kontrol elemanı: Spectra System SN4000 (Thermo)
- Auto Sampler: Spectra System AS3000 (Thermo)
- Dedektör: Spectra System UV2000 (Thermo)

- Software: ChromQuest
- Kolon (Hypersil, H5ODS 4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ )



Şekil 6.1 Kullanılan HPLC cihazı

### 6.1.2 Diğer Ekipmanlar

- Mekanik çalkalayıcı (Kermanlar)
- pH metre (Hanna HI 2211)
- Manyetik karıştırıcı (ETS-D5, IKA)
- Elektronik kontakt termometre (ETS-D5, IKA)
- Oven (D-650, Heraeus)
- Hassas terazi (A120S, Sartorius ve AEG-220 G, Libror)
- Mikro pipet (PhysioCare Concept - Eppendorf Research Plus (100-1000  $\mu$ L ve 500-5000  $\mu$ L))
- Derin dondurucu (Uğur Derin Dondurucu UCF 1600 L )
- 0.45  $\mu$ m filtre
- Mikrovialler: Agilent
- Saf su cihazı (Milli- Q<sup>®</sup>)
- Cam malzemeler (Balon joje, mezür, havan, erlen, beher, saat camı)

## 6.2 Kimyasallar

Tüm tez çalışmasında kullanılan valsartan etken maddesi Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan saf su Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan A Milli-Q® Reference System cihazından elde edilmiştir. Kullanılan solvent ve kimyasallar aşağıda verilmiştir.

- Asetonitril, >%99 (Merck)
- Sodyum Dihidrojen Fosfat (Merck)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck)
- Ortofosforik Asit, %85 (Merck)
- Metanol, >%99 (Merck)
- Hidroklorik Asit, %37 (Merck)
- Sodyum Klorür (Merck)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Merck)

## 6.3 Deneysel Kısım

### 6.3.1 Optimizasyon Çalışmaları

HPLC sistem optimum parametrelerini belirlemek için bir dizi deneyler yapılmıştır. Söz konusu optimizasyon çalışmaları Çizelge 6.1 de gösterilmiş olup, yapılması düşünülen tüm çalışmalar belirlenen optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma 1, 2 ve 3'te tampon çözelti hazırlanmasında 1.02 g potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 300 mL suda çözülmüştür. 200 mL asetonitril eklenerek karıştırılmış ve 0.10 M hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmıştır.

Çalışma 4'te tampon çözelti hazırlanmasında 1.7 g potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 250 mL suda çözülmüştür. 250 mL asetonitril eklenerek karıştırılmış ve 0.10 M hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmıştır.

Çalışma 5 ve 6'da tampon çözelti hazırlanmasında 1.5 g sodyum dihidrojen fosfat tartılarak 250 mL suda çözülmüştür. 250 mL asetonitril eklenerek karıştırılmış ve ortofosforik asit ile pH değeri ayarlanmıştır.

Çalışma 7’de %80 metanol ihtiva edecek şekilde 200 mL metanol alınmış hacmi 250 mL’ye saf su ile tamamlanmıştır.

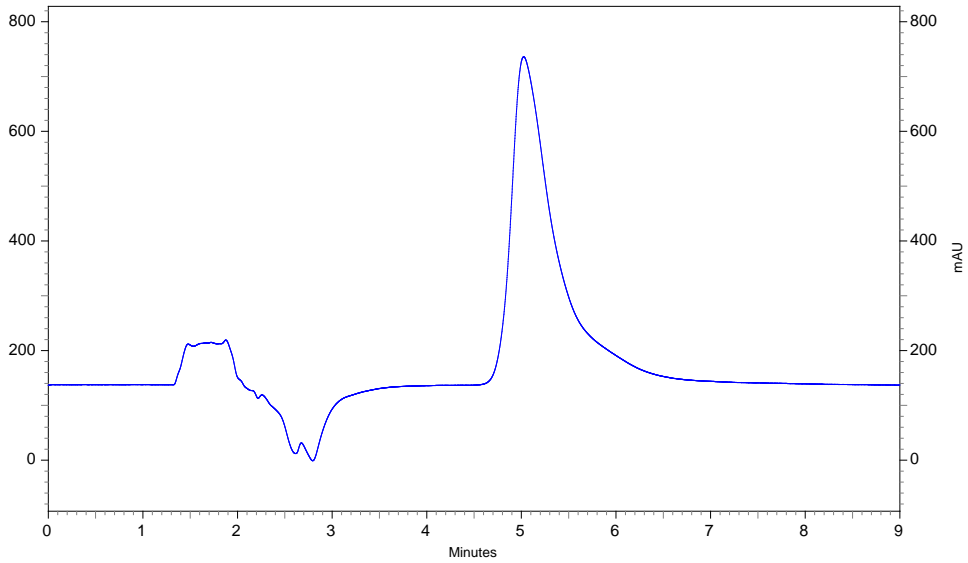
Çalışma 8 ve 10’da tampon çözelti hazırlanmasında 3.9 g sodyum dihidrojen fosfat tartılarak 500 mL suda çözülmüştür. 500 mL asetonitril eklenerek karıştırılmış ve orto-fosforik asit ile pH değeri ayarlanmıştır.

Çalışma 9’da tampon çözelti hazırlanmasında 3.9 g sodyum dihidrojen fosfat tartılarak 500 mL suda çözülmüştür. 500 mL metanol eklenerek karıştırılmış ve orto-fosforik asit ile pH değeri ayarlanmıştır.

Çizelge 6.1 HPLC sisteminde valsartan etken maddesinin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları

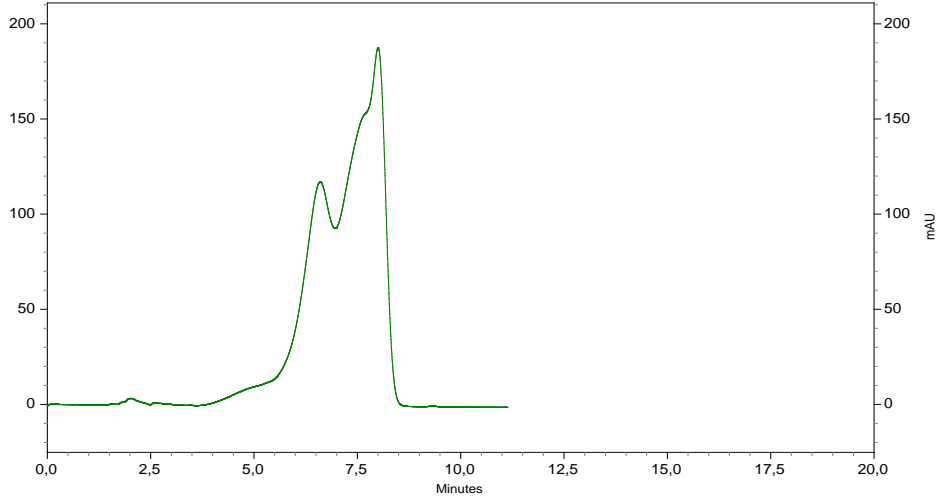
	Parametreler				
	Mobil Faz	pH	Akış Hızı, mL dk <sup>-1</sup>	Dalga Boyu, nm	Kolon
Çalışma 1	%40 ACN - %60 Tampon	3.1	1.0	250	Nucleosil 5 C18 100A
Çalışma 2	%40 ACN - %60 Tampon	3.1	1.0	260	Nucleosil 5 C18 100A
Çalışma 3	%40 ACN - %60 Tampon	3.1	1.0	270	Nucleosil 5 C18 100A
Çalışma 4	%50 ACN - %50 Tampon	5.9	1.2	270	Nucleosil 5 C18 100A
Çalışma 5	%50 ACN - %50 Tampon	3.7	1.0	250	Nucleosil 5 C18 100A
Çalışma 6	%50 ACN - %50 Tampon	3.7	1.0	250	Hypersil H5ODS
Çalışma 7	%80 CH <sub>3</sub> OH - %20 H <sub>2</sub> O	-	1.0	250	Eclipse C18
Çalışma 8	%50 ACN - %50 Tampon	3.7	1.0	250	Inertsil ODS - 3V
Çalışma 9	%50 CH <sub>3</sub> OH - %50 Tampon	3.7	1.0	250	Inertsil ODS – 3V
Çalışma 10	%50 ACN - %50 Tampon	3.7	1.0	250	Hypersil H5ODS

1, 2 ve 3 numaralı çalışmalar aynı kolon ile aynı mobil faz, pH ve akış hızı parametreleri kullanılarak birbirini izleyen 3 analiz şeklinde takip etmiştir. 250, 260, 270 nm gibi farklı dalga boyları kullanılarak bir sinyal tespit edilme amacı olsa da, bu çalışmada herhangi bir alıkonma zamanı gözlenmemiştir. 4 numaralı çalışmada, ilk üç çalışmadan farklı bir mobil faz, pH ve akış hızı denenmiş, ancak bu çalışmada herhangi bir alıkonma zamanı gözlenmemiştir. 5 ve 6 numaralı çalışmalarda, belirlenen aynı şartlar altında deneme çalışmaları yapılmıştır. 5 numaralı çalışmada Nucleosil 5 C18 100A kolonunda 5,543 dakikada alıkonma zamanı elde edilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 6.1’de gösterilmiştir.



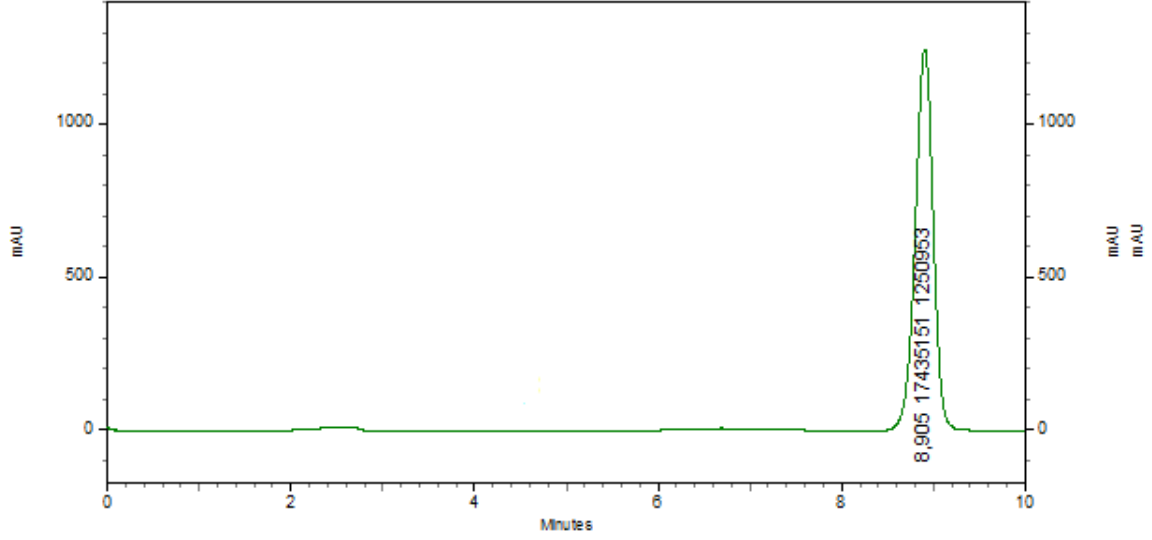
Şekil 6.2 %50 ACN-%50 Tampon (pH 3.7) Sisteminde, Nucleosil 5 C18 100A Kolonunda Valsartan için HPLC-UV Sisteminde Elde Edilen Kromatogram

Çalışma 5 için elde edilen ve Şekil 6.2’de gösterilen kromatogramda analit sinyali 5. dakikaya girildiğinde yukarı doğru doğrusal bir şekilde artmaya başlamış ve 5.543 dakikada tepe noktasına ulaşmıştır. Sinyalin sağ tarafında görüldüğü üzere, azalmaya başladığı saniyelerde pik eteklere doğru omuz vermeye başlamıştır. Her ne kadar sinyalin oluşumu tatminkar olsa da, omuz verme nedenlerinden biri olan akış hızında yapılacak değişikliğin sinyali ölü zamana yakınlaştıracakı düşünüldüğünden farklı bir kolonla çalışma kararı alınmıştır. Bu çalışmanın akabinde 6 nolu çalışma yapılmış ve burada kolon değişimi yapılarak Hypersil H5ODS kullanılmasıyla Şekil 6.3’deki sinyal elde edilmiştir.



Şekil 6.3 %50 ACN-%50 tampon (pH 3.7) sisteminde Hypersil H5ODS kolonunda valsartan için HPLC-UV sisteminde elde edilen kromatogram

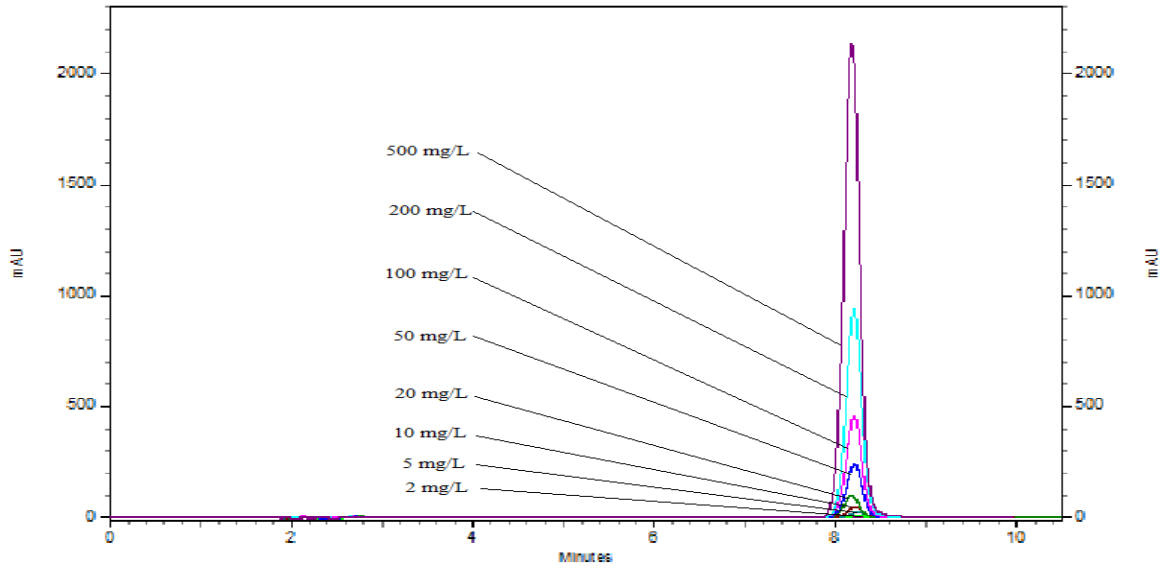
Elde edilen kromatogramda görüldüğü üzere sinyal hem simetrik değil hem de sinyalde yarılmalar mevcuttur. Pik genişliği yaklaşık olarak 3 dakika olarak gözlenmiştir. Bu durum belirtilen kromatografik ayırma şartlarının valsartan analitinin kantitatif tayini için uygun olmadığını ortaya koymaktadır. 7 numaralı çalışmada valsartan standartının metanol-su karışımı içerisinde HPLC sistemine gönderilerek herhangi bir sürede alıkonma meydana getirip getiremeyeceğine dair bir deneme çalışması yapılmıştır. Ancak, herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. 8 ve 9 numaralı çalışmalarda Inertsil ODS-3V kolonu ve aynı tampon çözelti ancak, çözücü olarak çalışma 8’de metanol, çalışma 9’da asetonitil olmak üzere iki farklı mobil faz için deneme yapılmıştır. Çalışma 8’de sonunda elde edilen kromatogramda 13.78 dakikada alıkonma süresi elde edilmiştir. Çalışma 9 için aynı koşullar altında herhangi bir alıkonma zamanı gözlemlenmemiştir. Bu çalışmadan sonra mobil faz için çözücü olarak asetonitril kullanılacağına karar verilmiştir. Çalışma 10’da %50 tampon çözelti - %50 asetonitril çözeltisi kullanılmıştır. Hypersil H5ODS kolonu HPLC sistemine dahil edildikten sonra yapılan analizde valsartana ait sinyal 8.905 dakikada elde edilmiştir. Bu alıkonma süresine göre optimum koşulların Çalışma 10’da belirlenen sistem parametreleri olacağına karar verilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 6.4’ de gösterilmiştir.



Şekil 6.4 %50 ACN-%50 tampon (pH 3.7) sisteminde valsartan için HPLC-UV sisteminde elde edilen kromatogram

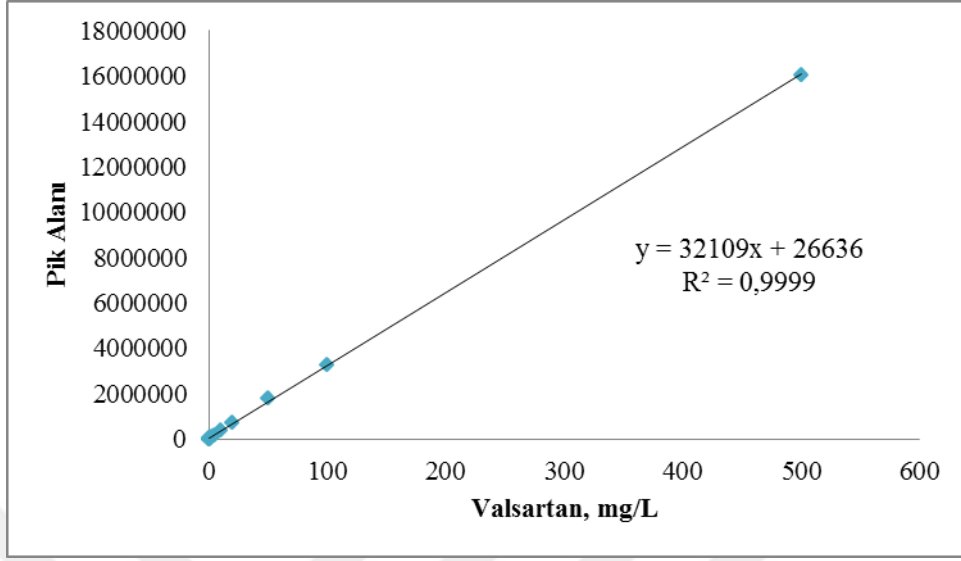
### 6.3.2 Sistem Analitik Performansının Tespiti

Valsartanın sistem performans değerlerinin tespiti amacı ile belirlenen optimum şartlar altında 0.05-500 mg L<sup>-1</sup> aralığında valsartan standartları HPLC sistemine enjekte edilmiş ve Şekil 6.5’de görülmekte olan kromatogramlar elde edilmiştir.

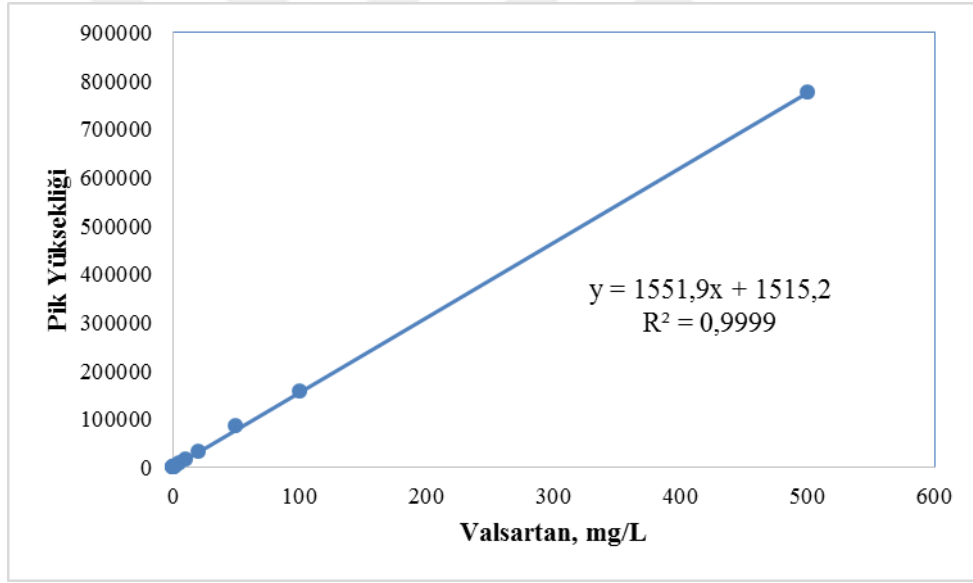


Şekil 6.5 2.0-500 mg L<sup>-1</sup> aralığındaki valsartan standartlarının HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.5’ de görülen kromatogramlarda valsartanın pik alanı ve pik yüksekliği kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 6.6 ve Şekil 6.7’de görülmektedir.

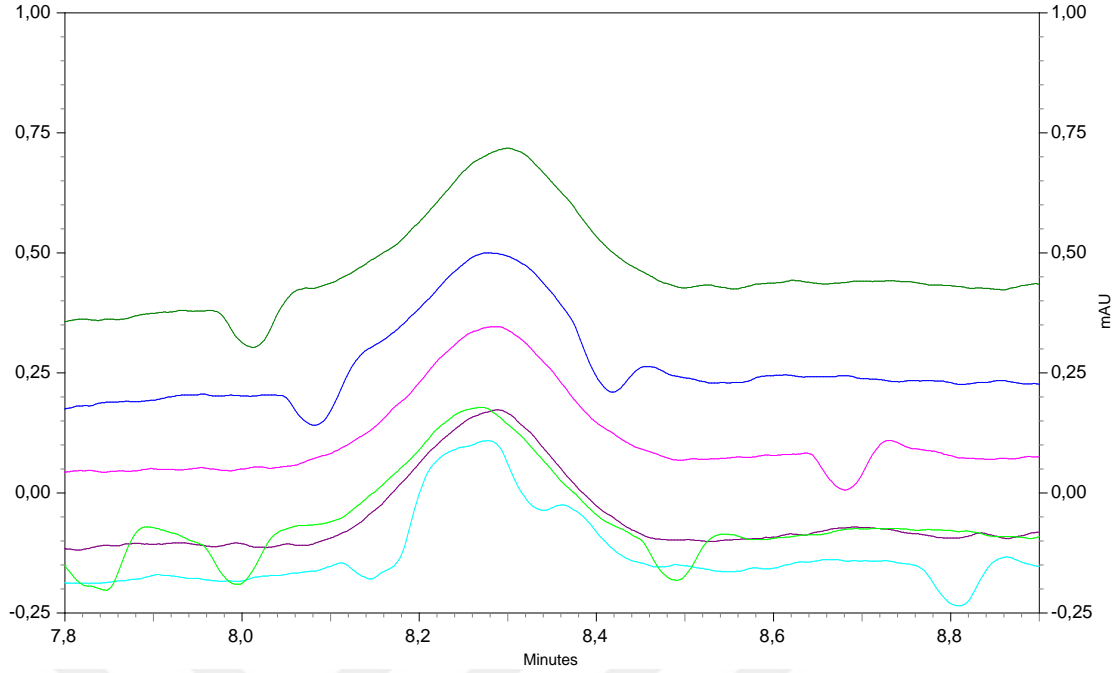


Şekil 6.6 Valsartanın pik alanı kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği



Şekil 6.7 Valsartanın pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

HPLC-UV sisteminin LOD (Limit of Detection, Gözlenebilme Limiti) ve LOQ (Limit of Quantitation, Tayin Limiti) değerlerinin tespiti amacı ile kalibrasyon grafiğinde kullanılan en düşük derişim 0.05 mg L<sup>-1</sup>, sisteme 6 defa gönderilmiş ve Şekil 6.8’ teki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.8 0.05 mg L<sup>-1</sup> standart valsartan çözeltisinin optimum şartlar altında sisteme gönderilmesi ile elde edilen elde kromatogramlar

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır;

$$\text{LOD} = 3 \times \text{Standart sapma} / \text{Eğim} \quad (7.1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{Standart sapma} / \text{Eğim} \quad (7.2)$$

Elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin de aralarında olduğu valsartan için tespit edilen sistem analitik performans değerler Çizelge 6.2' te görülmektedir.

Çizelge 6.2 Valsartan için elde edilen sistem analitik performans değerleri

	<b>Pik Alanı</b>	<b>Pik Yüksekliği</b>
<b>LOD, mg L<sup>-1</sup></b>	0.014	0.010
<b>LOQ, mg L<sup>-1</sup></b>	0.046	0.032
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9999	0.9999
<b>y=mx+n</b>	y=32109x+26636	y=1551,9x + 1515,2
<b>%RSD</b>	% 1.9-% 3.4 arası (Gerçek numuneler için)	
<b>Doğrusal Aralık, mg L<sup>-1</sup></b>	0.05-500	

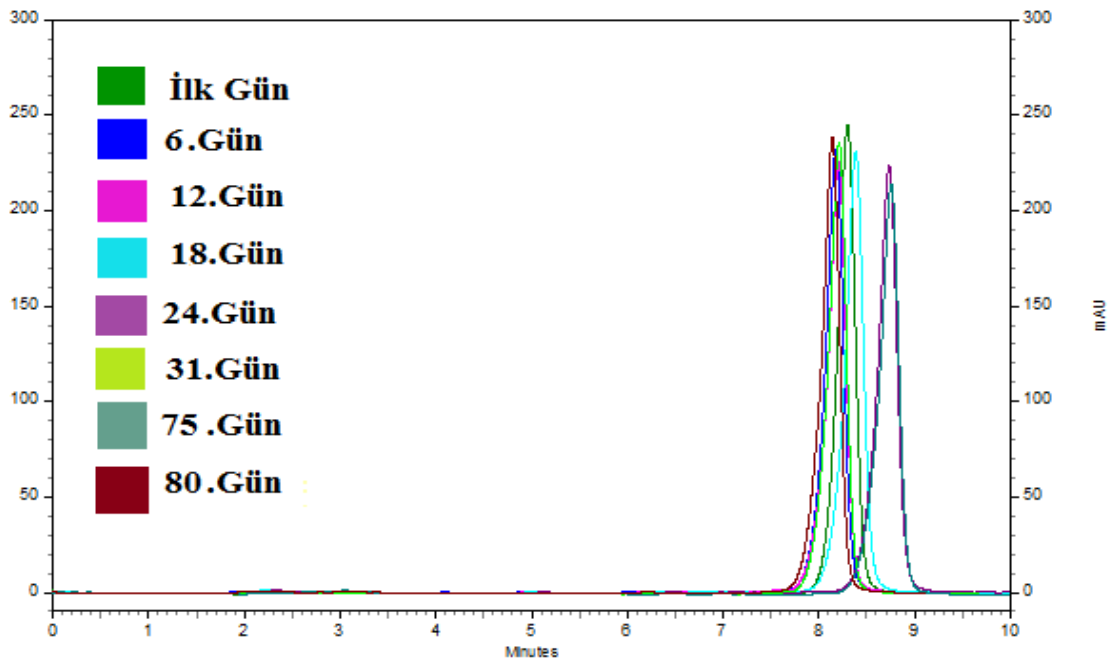
Çizelge 6.2' te görüldüğü gibi optimize edilen şartlar altında valsartan basit bir HPLC sistemi ile düşük seviyelerde tayin edilebilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda hem pik yüksekliği, hem de pik alanı sayısal değerleri kaydedilmiştir. Kantitatif çalışmalarda pik yüksekliği esas alınmış olup, ortaya çıkabilecek herhangi bir durumda pik alanı sayısal değerleri kontrol amaçlı hesaplamaya dâhil edilmiştir.

### 6.3.3 Farklı Ortam Koşullarında Valsartan Davranışının İncelenmesi ve Bozunma Tayini

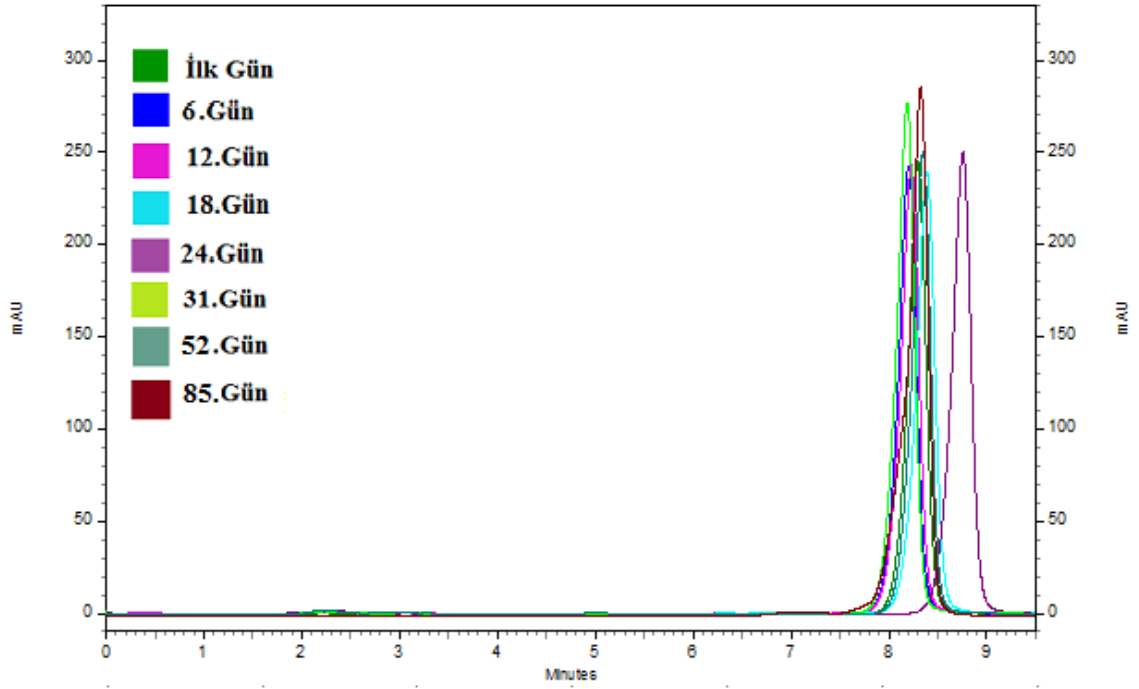
Bu çalışmada valsartan etken maddesinin farklı şartlar altında ne şekilde bir davranış gösterdiği ve bozunup bozunmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Numune olarak stok çözeltisinden 100 mg L<sup>-1</sup> valsartan standart çözeltisi hazırlanmış olup, bunlar viallere konularak oda koşuluna, buzdolabına ve derin dondurucuya yerleştirilmiştir.

Hazırlanan standart çözelti HPLC sistemine gönderilerek valsartan tayini yapıp, ilk gün kromatogramı elde edilmiştir. Bunu takiben her 3 günlük periyotta önceden hazırlanan vialler HPLC sistemine yerleştirilerek çalışmanın amacına yönelik tayinler yapılmıştır.

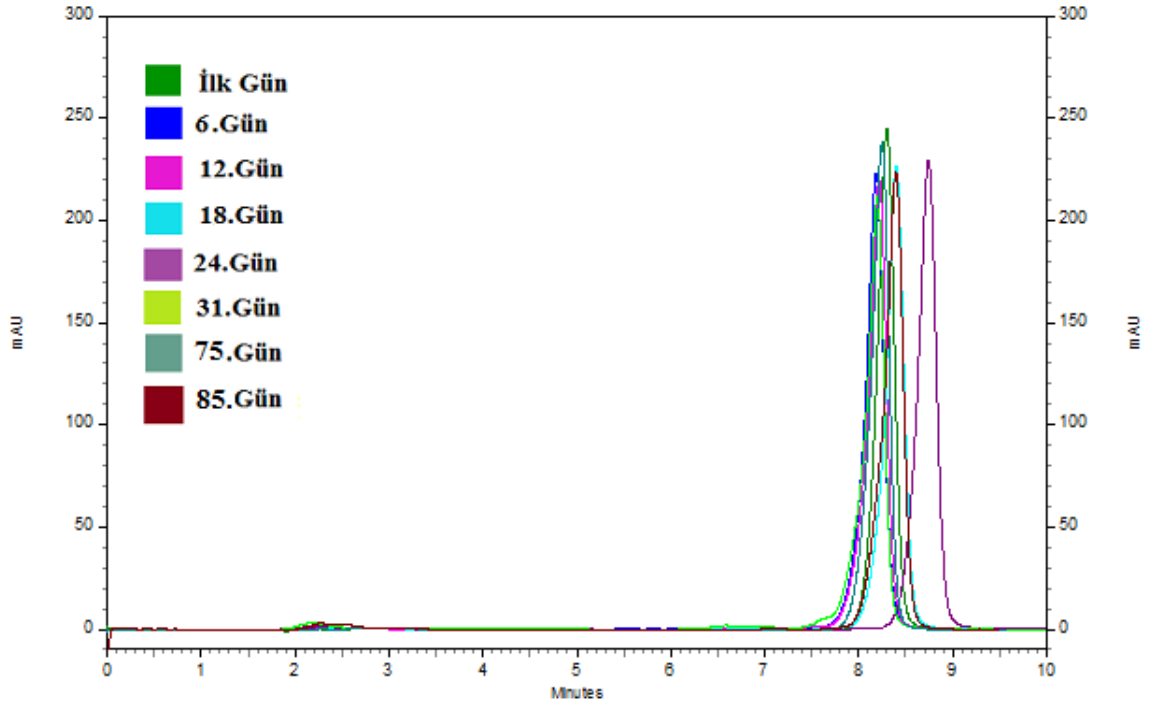
Valsartan -24 °C'de derin dondurucu, 4 °C'de buzdolabı, 25 °C'de oda koşulu olmak üzere 3 farklı ortamda muhafaza edilmiştir. 85 günlük süreçte, çalışılan 3 ortam için elde edilen kromatogramlar Şekil 6.9, Şekil 6.10 ve Şekil 6.11'de gösterilmiştir.



Şekil 6.9 Valsartanın oda koşulunda 3 günlük sürelerle bozunma kromatografisi



Şekil 6.10 Valsartanın derin dondurucuda 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi



Şekil 6.11 Valsartanın buzdolabında 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi

Yapılan çalışmalar sonrasında  $100 \text{ mg L}^{-1}$  valsartan standart numunelerinin her üç koşulda herhangi bir yapısal değişikliğe uğramadığı görülmüştür. Her üç günde bir yapılan tayinlerde 31. güne gelindiğinde bozunma gerçekleşmemesi üzerine analit

tayinlerine devam edilmiş ve bu süreç 85 güne kadar uzatılmıştır. 85. günde yapılan tayinlere göre valsartan için bozunmanın söz konusu olmadığı görülmüştür. 24. günde valsartan sinyalinde meydana gelen kaymanın yeni hazırlanan mobil faz çözeltisinden kaynaklandığı ve alikonma süresinin arttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar valsartanın uzun sürede ortam fark etmeksizin muhafaza edilebileceğini göstermiştir.

#### **6.3.4 Valsartan Etken Maddesi İçeren D İsimli 80 mg Tabletinin Yapay Mide Ortamında İncelenmesi**

Valsartan analitinin mide ortamındaki davranışının incelenmesi ve yapısal olarak bozulma olup olmadığının belirlenmesi için tablet şeklinde satılan Marka D ilacı kullanılmıştır. Gerçekleştirilecek analiz için söz konusu yapay mide ortamı, uygun prosedür izlenerek hazırlanmıştır. 100 mL balon joje içerisine öncelikle 0.70 mL %35-36'lık HCl alınarak, üzerine bir miktar saf su eklenmiştir. 0.20 g NaCl ve 0.32 g pepsin enzimi tartılarak balon jojeye aktarılmış ve hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu karışım bir behere aktararak ısıtmalı manyetik karıştırıcıya konulmuş olup, sıcaklığın 37 °C'ye gelmesi sağlanmış ve karıştırma işlemine 200 rpm hızında devam edilmiştir.

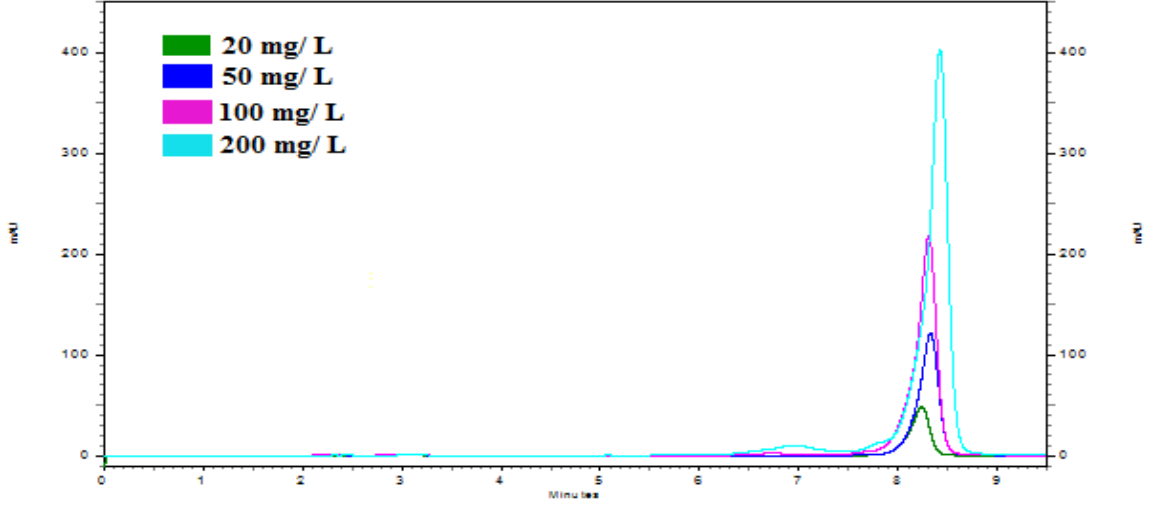
Yapay mide ortamı parametreleri Çizelge 6.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 6.3. Yapay mide ortamı parametreleri [100]

<b>Parametre</b>	<b>Değer</b>
HCl (%35-36)	0.70 mL
NaCl	0.20 g
Pepsin	0.32 g
Sıcaklık	37 °C
Joje	100 mL

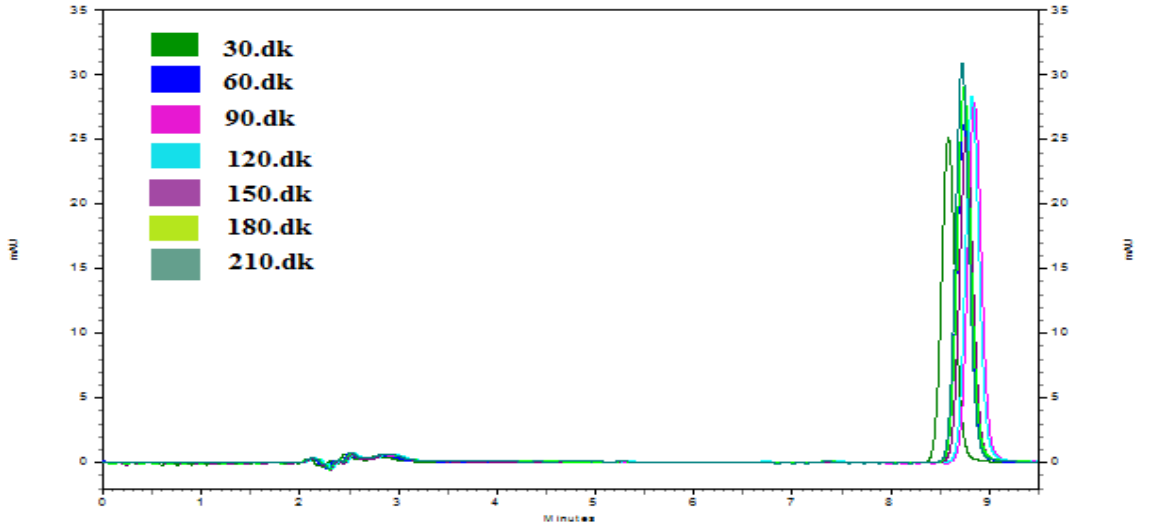
Karışım 37 °C sıcaklığa ulaştığında, içerisinde 80 mg valsartan içeren D markalı rastgele bir tablet bu karışımın içerisine atılmıştır. Tablet çözüldüğü andan itibaren 30 dakikalık periyotlarla bu karışımdan numune alınarak 0.45 µm filtrede süzölmüş ve kalibrasyon aralığına girecek şekilde seyreltme yapılarak optimum koşullar altında HPLC sistemine gönderilmiştir.

Valsartan analitinin tayininden önce valsartan etken maddesinin 20, 50, 100 ve 200 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonlu standartları HPLC sistemine gönderilerek kalibrasyon doğrusu ve denklemi elde edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 6.12’ de gösterilmiştir.



Şekil 6.12 Valsartan standartlarının HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar

Yapay mide ortamındaki davranışı ve yapısı incelenen valsartan içeren tabletten her 30 dakikada bir alınan numunelerin HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar Şekil 6.13’de gösterilmiştir.



Şekil 6.13 Yapay mide ortamından 30 dakikalık periyotlarla alınan numunelerin HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogramlar

80 mg valsartan içeren Marka D tableti ile yapay mide ortamında yapılan analizler sonucu, HPLC sistemine her 30 dakikada bir gönderilen numunelerden elde edilen ve

Şekil 6.13’de gösterilen kromatogramlarda piklerde ve dolayısı ile analitin yapısında herhangi bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Alıkonma zamanlarının ve pik yüksekliklerinin standart sapmaya bağlı olarak değiştiği ortaya konulmuştur. Tüm bunlar değerlendirildiğinde, 210 dakikalık analiz süresi sonunda valsartanın mide ortamında bozunmadığı ve yapısal olarak herhangi bir değişikliğe uğramadığı kanıtlanmıştır.

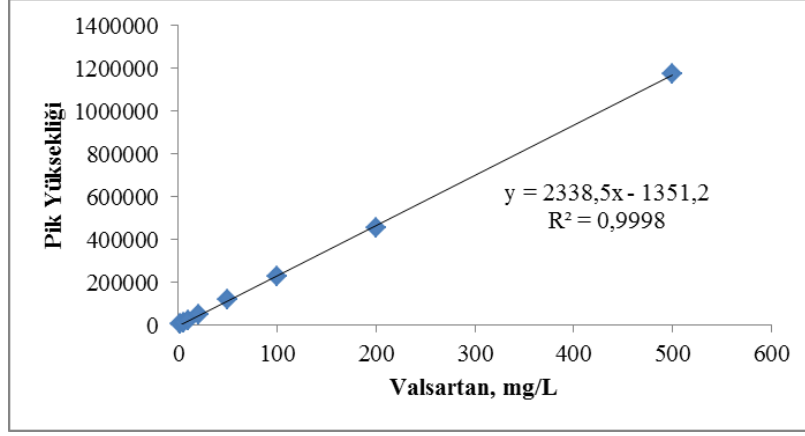
### **6.3.5 Valsartan Etken Maddesi İçeren Tabletlerde Analit Miktar Tayinleri**

Bu çalışmada hipertansiyon tedavisinde sıklıkla kullanılan valsartan etken maddesi içeren ilaçlar kullanılmıştır. 80 mg valsartan içeren ve tablet şeklinde satılan Marka A, Marka B ve Marka C ilaçlarının yapılarında bulunan valsartanın kalitatif ve kantitatif tayininin yapılması amacı ile her bir markadan alınan tabletler ile uygun deney prosedürü izlenerek optimum şartlar altında tayin edilmiştir.

Öncelikle, alınan her bir tablet 0.0001 g hassasiyete sahip terazide tartılmıştır. Daha sonra, steril koşullarda saklanan havanlarda öğütülerek, toz haline getirilmiştir. Toz haline gelen her numune, 100 mL balon joje içerisine aktararak çözücü olarak kullanılan metanol ile hacmi 100 mL menisküs çizgisine kadar tamamlanmıştır. Kalibrasyon aralığına girecek şekilde, süzgeç kağıdından süzülüp, 10 kat seyreltilerek HPLC analizi öncesi viallere alınmıştır.

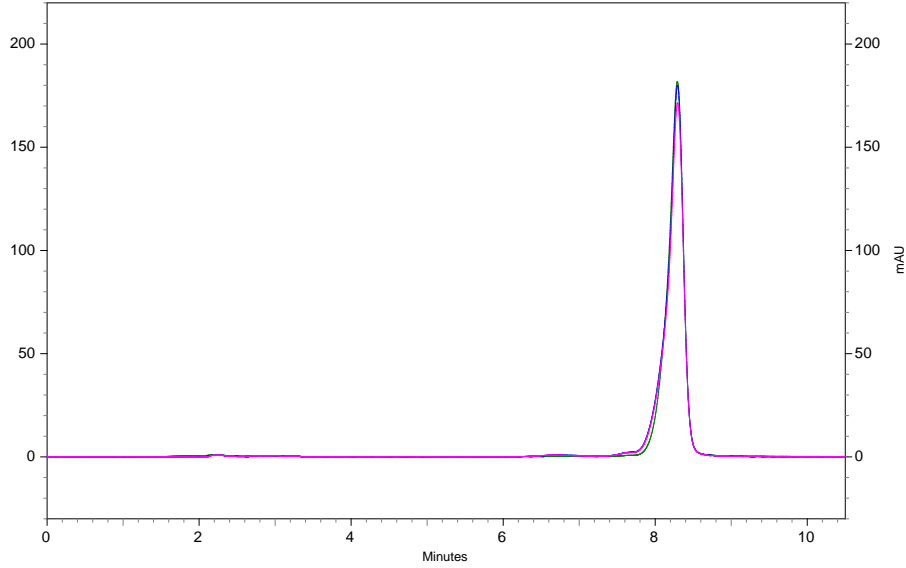
Valsartan standartlarının en küçük derişimden, en yüksek derişime doğru HPLC sistemine gönderilmesiyle kalibrasyon doğrusu ve denklemi elde edilmiştir. A, B, C isimli ilaçlara ait numunelerin sisteme gönderilmesiyle de, elde edilen sinyal değerlerinin kalibrasyon doğru denklemi sayısal değerleri kullanılarak yapılan hesaplamalardan miktar tayinleri yapılmıştır.

Valsartan standartları derişimlerinin pik yüksekliği kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 6.14’de gösterilmiştir.



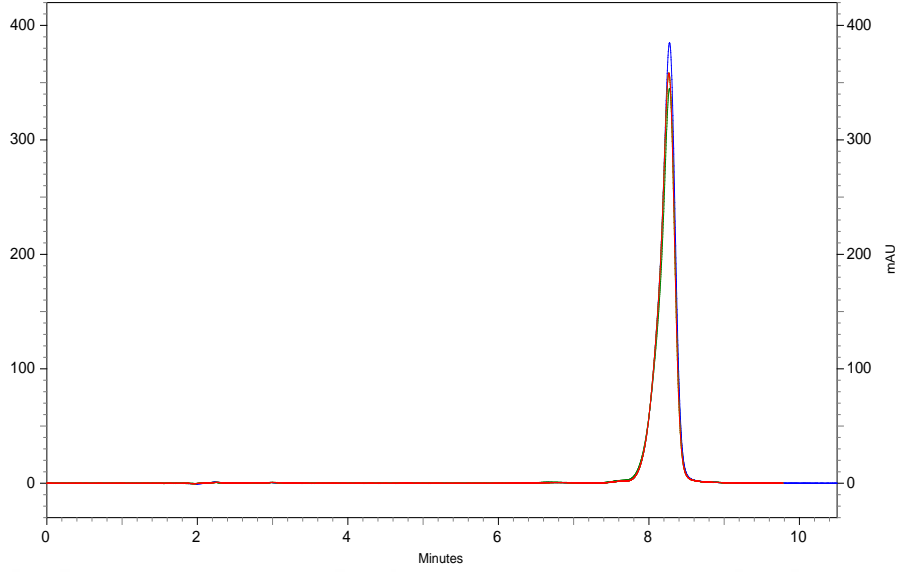
Şekil 6.14 Pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

Marka A, Marka B, Marka C adlı 80 mg valsartan etken maddesi içeren tabletlerle, her bir marka için yapılan 3 tekrarlı analiz sonucu optimum koşullar altında elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 6.15, Şekil 6.16, Şekil 6.17’de verilmiştir.



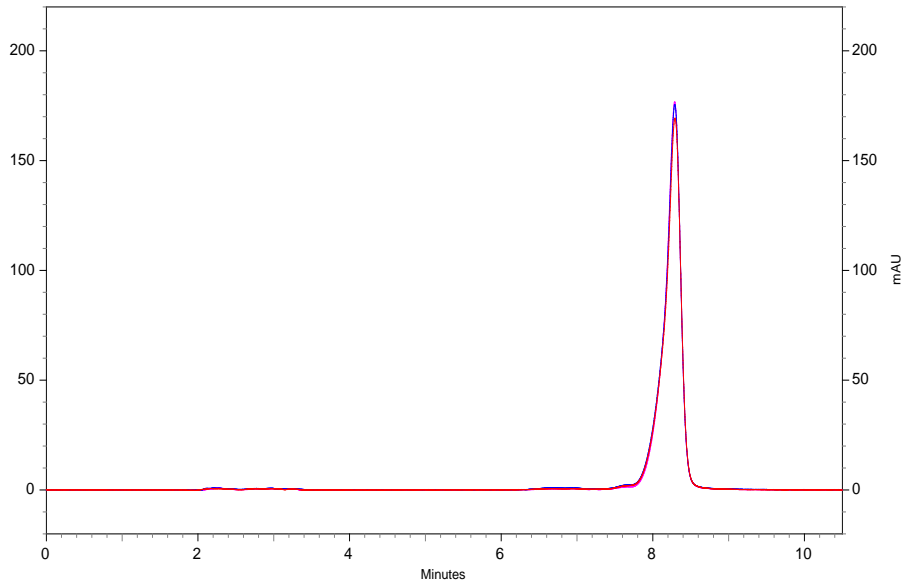
Şekil 6.15 Marka A numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı

Rastgele seçilen 3 adet Marka A tabletinden hazırlanan numuneler HPLC sistemine gönderilmiştir. Şekil 6.15’ deki kromatogramlara bakıldığında, yaklaşık 8.4 dakikada alıkonma zamanı elde edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında, belirlenen koşullar altında elde edilen analit sinyallerinin yine bu süre civarında alıkonma gösterdiği kanıtlandığından dolayı, bu çalışmada tabletlerden hazırlanan numunelerin sinyallerinin doğruluğunu anlamak için spike deneyi yapılmasına ihtiyaç duyulmamıştır.



Şekil 6.16 Marka B numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı

Rastgele seçilen 3 adet Marka B tabletinden hazırlanan numuneler HPLC sistemine gönderilmiştir. Şekil 6.16'deki kromatogramlara bakıldığında, yaklaşık 8.4 dakikada alıkonma zamanı elde edilmiş ve ölçümlerin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.17 Marka C numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı

Marka C den alınan üç tabletin optimum şartlarda sisteme enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlar Şekil 6.17 de görülmektedir. Kromatogramlara bakıldığında, yaklaşık

8.4 dakikada alıkonma zamanı elde edilmiş ve pik yükseklik ve alanlarında belirgin bir farklılık tespit edilmemiştir.

Elde edilen verilerden hareketle bulunan analit miktarları Çizelge 6.4' te görülmektedir.

Çizelge 6.4 A, B, C ilaçlarının 80 mg valsartan içeren tabletlerinde miktar tayinleri

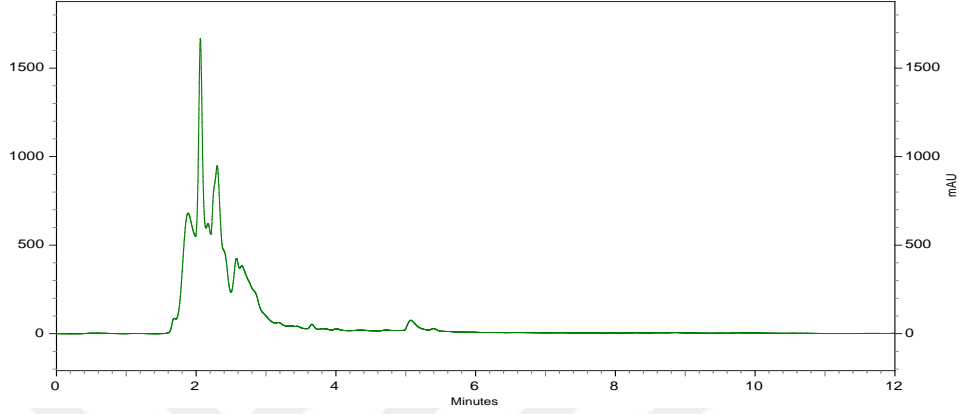
Numune Adı	Hesaplanan Etken Madde Miktarı, mg	Ortalama Etken Madde Miktarı, mg	Standart Sapma	%RSD
Marka A-1	73.21	76.23	2.66	3.4
Marka A-2	75.80			
Marka A-3	79.68			
Marka B-1	77.49	74.05	2.45	3.3
Marka B-2	71.99			
Marka B-3	72.67			
Marka C-1	78.66	77.13	1.46	1.9
Marka C-2	75.16			
Marka C-3	77.58			

Elde edilen sonuçlara göre, temin edilen A, B, C markalarının 80 mg Valsartan tabletlerinde yapılan miktar tayinleri sonucu bu ilaçların içeriğinde sırasıyla A markasında  $76.23 \pm 2.66$ , B markasında  $74.05 \pm 2.44$ , C markasında  $77.13 \pm 1.46$  mg valsartan etken maddesinin olduğu belirlenmiştir. Görüldüğü gibi ilaç prospektüsünde yazan miktarlardan daha az ilaç aktif bileşenin tabletlerde var olduğu A, B, C markaları için sırasıyla %3.4, %3.3 ve %1.9 standart sapma ile tespit edilmiştir.

### 6.3.6 Atık Çamurda Bulunan Valsartan Etken Maddesinin Sodyum Dodesil Sülfat ile Ekstraksiyonu Sonrası HPLC Sisteminde Tayini

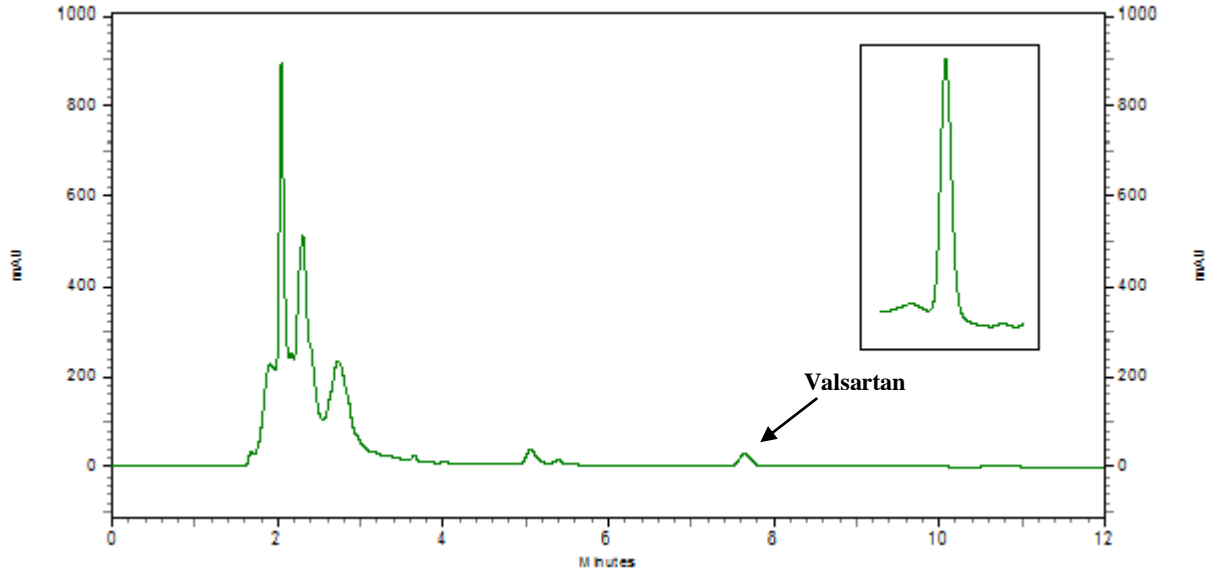
Bu çalışmada atık su işletmesinden temin edilen kurutulmuş çamur ile çamur bünyesine geçirilmiş valsartanın sodyum dodesil sülfat (SDS) maddesi kullanılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi öncesi çamur örneklerinde bulunan nemi uzaklaştırmak amacı ile 5.0 g numune behere alınarak etüvde 80 °C sıcaklıkta kurutulmaya başlanmıştır. 15 dakikalık periyotlarla tartım alınmış ve tartım miktarı sabitleninceye kadar kurutma işlemine devam edilmiştir. Sabit tartım sonrası çamur etüvden çıkartılmış ve 2.0 g kurutulmuş çamur alınarak ekstraksiyon işlemi

uygulanmıştır. Ekstraksiyonda yapıda bulunan olası valsartan etken maddesinin matriksten ayrılabilmesine yönelik 10 mL 1.0 M sodyum dodesil sülfat çözeltisi kullanılmıştır. 60 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılan numune süzgeç kağıdı ve 0.45 µm filtre sisteminde süzülerek optimum şartlar altında HPLC sistemine gönderilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 6.18’de görülmektedir.



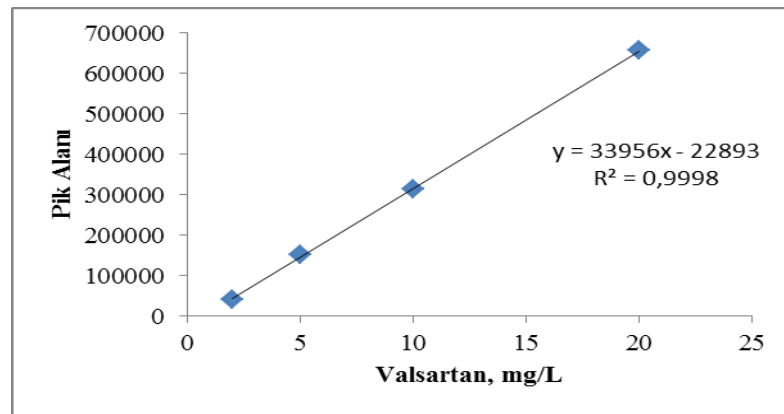
Şekil 6.18 Kurutulmuş çamur numunesinin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ekstraksiyonu sonrası HPLC sistemine gönderilmesiyle elde edilen kromatogram

Şekil 6.18’de da görüldüğü gibi valsartanın alıkonma süresinde herhangi bir sinyal elde edilememiştir. Bu da numunede valsartan olmadığını göstermektedir. Çamur örneklerinde valsartan olması durumunda geliştirilen ekstraksiyon yöntemi ile doğruluğu yüksek bir şekilde tayin edilip edilemeyeceğinin tespiti amacı ile çamur örneklerinde spike çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla sabit tartıma getirilmiş 2.0 g çamur örneği üzerine 0.20 mL 500 mg/L valsartan standardından ilave edilmiş ve numune 50 °C sıcaklığa ayarlanmış etüve konularak kurutulmuştur. Kurutma sonrası numune homojen hale getirilerek 10 mL 1.0 M SDS ile karıştırıcı üzerinden 30 dakika boyunca ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Süzülen numune HPLC sistemine gönderilerek analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 6.19’de görülmektedir.



Şekil 6.19 0.2 mL 500 mg L<sup>-1</sup> valsartan spike edilmiş çamur numunesinin 10 mL 0.10 M SDS ekstraksiyonu sonrası elde edilen HPLC kromatogramı

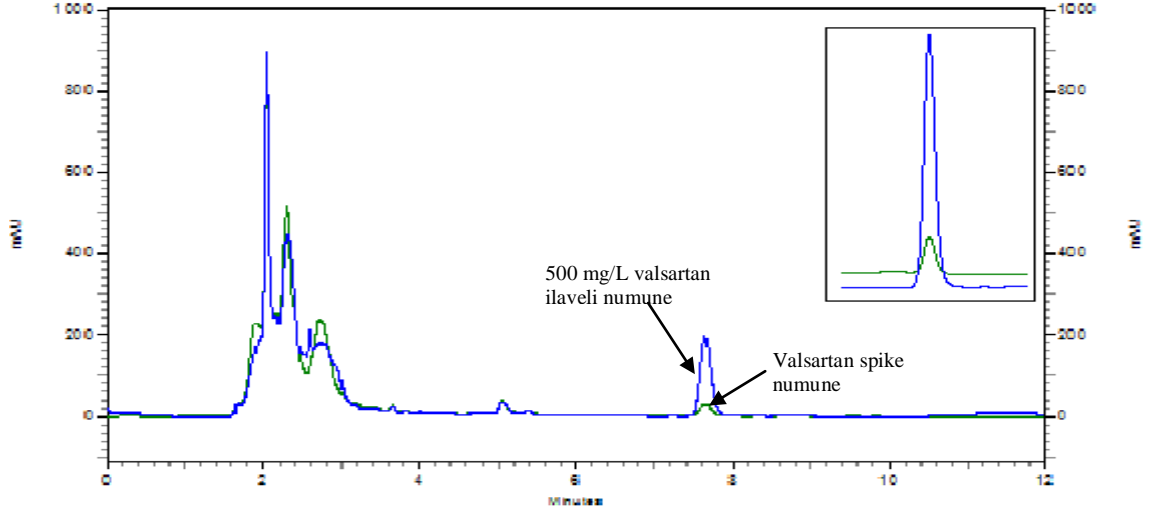
Şekil 6.19'da görüldüğü üzere 7.8 dakika alıkonma süresine sahip valsartan aktif bileşenine ait sinyal tespit edilmiştir. Geri kazanım verimini tespit etmek amacı ile bir seri standart çözelti HPLC sistemine gönderilmiş ve Şekil 6.20'de görülen doğrusal kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 6.20 Pik alanları kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

Şekil 6.20'de görülen doğrusal grafik yardımı ile spike yapılmış numunede valsartan miktarı 49.9 mg/kg olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi spike edilen numunede 50 mg/kg valsartan beklenirken bu değer 49.9 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bu da geri kazanım veriminin %99.8 olduğunu göstermektedir. 7.8 dakikada gelen sinyalin valsartana ait olduğundan emin olmak için HPLC analizi öncesi numuneye matriksi

büyük oranda seyreltmeyecek şekilde yüksek derişimde valsartan standartı ilave edilmiştir. Bu amaçla 1.0 mL ekstraksiyon çözeltisi üzerine 0.10 mL 500 mg L<sup>-1</sup> valsartan ilave edilmiştir. Valsartan spike edilmiş çamur örneğinin ekstraksiyonundan elde edilen çözeltinin ve tayin öncesi 500 mg L<sup>-1</sup> valsartan ilave edilmiş numunenin HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 6.21’de görülmektedir.



Şekil 6.21 Valsartan spike edilmiş çamur örneğinin ekstraksiyonundan elde edilen çözeltinin ve tayin öncesi 500 mg L<sup>-1</sup> valsartan ilave edilmiş numunenin HPLC sistemine gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.21’de görüldüğü üzere 0.10 mL 500 mg L<sup>-1</sup> valsartan ilave edilmiş numunede bulunan analit sinyali aynı alıkonma süresinde tespit edilmiştir. Bu da matriksin belirtilen şartlar altında analit sinyali üzerine etkisinin olmadığını göstermektedir.

Geliştirilen ekstraksiyon yöntemiyle yapılan deneysel çalışmalar sonucu atık çamur bünyesine alınan valsartanın tekrar geri kazanımı için sodyum dodesil sülfat ile yapılan ekstraksiyon verimi %99.8 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuç, arıtma stratejilerinin geliştirilmesi ve sürekliliğinin sağlanması bakımından önem taşımaktadır.

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında günümüzün yaygın hastalıklarından biri olarak görülen ve özellikle orta ve ileri yaştaki insanlarda rastlanan hipertansiyonda tedavi süreci boyunca başvurulan antihipertansif sınıfındaki kimyasallardan biri olan valsartanın tayin edilmesi için basit, hızlı, kesin ve doğru bir HPLC tayin yöntemi geliştirilmiştir. Sistemin değişken tüm parametreleri doğruluk ve duyarlılığı yüksek düşük limitlerde tayin yapılabilmesi için optimize edilmiştir. Optimum şartlar altında HPLC-UV sisteminde kullanılan Hypersil H5ODS kolonu için hesaplanan LOD / LOQ değerleri sırasıyla 0.014 mg L<sup>-1</sup> ve 0.046 mg L<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

Valsartanın farklı sıcaklıklarda bozunmasının tespiti amacı ile yapılan deneysel çalışmalarda valsartanın seksen beş günlük süreçte oda koşulu, buzdolabı ve derin dondurucu içerisinde yapısal olarak herhangi bir şekilde değişikliğe uğramadığı anlaşılmıştır. Bu durum valsartan etken maddesi içeren ilaçların ilk kullanım tarihinden itibaren yüksek raf ömrüne sahip olduğunu ve analitin yaklaşık üç ay süre ile yapısını muhafaza ettiğini ortaya koymaktadır.

Giderek yaygınlaşan bir hastalık haline gelen hipertansiyon tedavisinde kullanılmakta olan valsartanın kullanım doğruluğu açısından prospektüsünde belirtilen miktarda alınıp alınmadığı vücut içerisindeki konsantrasyonu ve etki mekanizması açısından önem arz etmektedir. Geliştirilen analitik tayin yönteminin piyasada mevcut olan ilaç formülasyonlarının yapısında bulunan valsartanın yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayininde kullanılıp kullanılmayacağını tespiti amacı çalışmalar bu tez kapsamında yapılmıştır. Bu amaçla, ilaç endüstrisinde üretimi yapılan ve piyasaya sunulan ilaçlardan üç tanesi ekstraksiyon sonrası optimum şartlar altında yapılarında bulunan

aktif bileşen tayini için analiz edilmiş ve tayin edilen miktarın ürün kutusunda iddia edilen miktara yakın olduğu tespit edilmiştir.

Valsartanın vücuda alındıktan sonra midede bulunduğu süre içerisindeki davranışını incelemek amacıyla, miktar tayininde kullanılan ilaçlardan farklı olarak başka bir marka ilaçtan rastgele seçilen bir adet tabletin hazırlanan yapay mide ortamındaki davranışı incelenmiştir. Optimum koşullar altında elde edilen analiz sonuçlarına göre, valsartanın zamana bağlı olarak mide ortamında yapısal olarak herhangi bir bozunmaya uğramadığı ortaya konulmuştur.

Yaşam döngüsü içerisinde ortaya çıkan insani atıkların iletim hatlarıyla ulaştırıldığı ve toplandığı atık su tesislerinde arıtma işlemi büyük önem arz etmektedir. İçerisinde yoğun matriks bulunan atık çamur bünyesinde valsartan analitinin kantitatif tayinine yönelik çalışmaların geliştirilen analitik yöntem ile yapılabilirliği bu tez kapsamında belirlenmiştir. Optimum şartlar altında SDS ekstraksiyonu sonrası valsartan için yüksek geri kazanım verimi elde edilmiştir. Belirtilen analitin atık su sistemlerinde arıtımlarına yönelik strateji geliştirmede yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayinler büyük önem taşıdığından geliştirilen analitik yöntem literatürde var olan boşluğu doldurmaya büyük katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

---

- [1] Bayır, S., (2008). Valsartan-Hidroklorotiazit İçeren Tabletlerde Yeni Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [2] Gürler, N., (2012). Valsartanın Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi Ve Tayini İçin Anodik Adsorptif Sıyırma Yönteminin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [3] McCann, M.D., (2001). The History of Hypertension; Not a Modern Day Phenomenon, <http://www.drdonnica.com/display.asp?article=2086>, 10 Mart 2016.
- [4] Demirezen, E., (2006). Türkiye’de ve Almanya’da Yaşayan Antihipertansif İlaç Kullanan Türklerde İlaç Tedavisine Uyum, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [5] Öksüz, E., (2004). “Hipertansiyonda Klinik Değerlendirme ve İlaç Dışı Tedavi”, Sürekli Eğitim Dergisi, 13: 3, 99-104.
- [6] Sweetman, S., Mortindale, C., (2007). The Complete Drug Reference, 35<sup>th</sup>Ed. Pharmaceutical Pres. London.
- [7] Malyiva, R., Bansal, V., Pal, O.P. ve Sharina, P.K., (2010). “High Performance Liquid Chromatography: A Short Review, Journal of Global Pharma Technology”, 2(5):22-26.
- [8] Martin, M. ve Guiochon, G., (2005). “Effects of High Pressures in Liquid Chromatography”. Journal of Chromatography A, (1-2)7:16-38
- [9] Dönmez, İ., Memioğlu, T. ve Erdem, F., (2015). “The Diagnosis and Treatment of Hypertension in the Light of New Guidelines”, Eur. J. Health Sci., 1(1): 49-53
- [10] Poulter, N.R., Prabhakaran, D. ve Caulfield, M., (2015). “Hypertension”, Lancet, 386(9995):801-12.
- [11] Tutaş, Y., (2010). Hipertansif Hastalarda Ameliyat Sabahı Antihipertansif İlaç Kullanımının Anestezi İndüksiyonunda ve Peroperatuar Hemodinamik Etkilerinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.

- [12] Mycek, J.M., Harvey, A.R. ve Champe, C.P., (1998). Lippicott's Illustrated Review Serisinden: Farmakoloji. 2.Baskı, Nobel Kitap Evi, İstanbul.
- [13] Chobanian, A.V., (2003). "The Seventh Report Of The Joint Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report". JAMA, 289(19):2560-72.
- [14] Kılıç, T. ve Üstü, Y., (2012). "An Evidence Based Guideline For Hypertension in Primary Care", 12(4): 205-213.
- [15] Zungur, M. ve Yıldız, A., (2004). "Hipertansif Hastaya Yaklaşım", 13(8):298
- [16] Kotchen, T.A., (2011). "Historical Trends and Milestones in Hypertension Research: A Model of the Process of Translational Research", Journal of the American Heart Association, 58: 522-538.
- [17] Smirk, F.H., (1976). "Casual, Basal and Supplemental Blood Pressures in 519 First-Degree Relatives of Substantial Hypertensive Patients and in 350 Population, Clinical Science and Molecular Medicine", 51: 13-17.
- [18] Fisher, J.W., (1914). "The Diagnostic Value of the Sphygmomanometer in Examinations for Life Insurance", Journal of the American Medical Association, 63: 1752-1754.
- [19] Acehan, O., (2010). Hipertansiyon Kontrolünde Hastalık Algısı ve Grup Görüşmelerinin Etkisi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana.
- [20] Krakoff, L. R., (2009). Hipertansiyon Geçmişi, Kozan, Ö., Hipertansiyon Temelleri ve Uygulama, İstanbul Avrupa Tıp Kitapçılık, 1: 3-14.
- [21] Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Whelton P.K. ve He, J., (2004). "Worldwide Prevalence of Hypertension: A Systematic Review", Journal of Hypertens, 22: 11-19.
- [22] Erdine, S., (2000). "How Well is Hypertension Controlled in Europe", Journal of Hypertens, 18: 1348-1349.
- [23] Müller, D.N. ve Luft, F.C., (2006). "Direct Renin Inhibition with Aliskiren in Hypertension and Target Organ Damage", Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 1: 221-228.
- [24] Onat, A., Sansoy, V., Hergenç, G., Soydan, İ. ve Adalet, K., (2005). Tekharf, 60-71.
- [25] Fries, E.D., (2005). "A History of Hypertension Treatment", Oparil S, Weber, M.A., "Companion to Brenner & Rector's The Kidney", 2: 1-6.
- [26] Fries, E.D., (1995). "Historical Development of Antihypertensive Treatment, Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management" 164(2): 2741-2751.
- [27] Uçar, A., (2000). Uzmanlar Tus Serisi Farmakoloji, 1. Baskı. Atlas Yayıncılık.
- [28] Sabbah, Z.A., Mansoor, A. ve Upendra, K., (2013). "Angiotensin Receptor Blockers – Advantages of the New Sartans", Journal of the Association of Physicians of India, 61: 464-470.

- [29] Michel, M.C., Foster, C., Brunner, H.R. ve Liu, L., (2013). “A Systematic Comparison of the Properties of Clinically Used Angiotensin II Type I Receptor Antagonists”, *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 65: 809-848.
- [30] Özgür, D., (2011). Anjiotensin II Reseptör Blokeri Bazı İlaçların Hidroklorotiyazid ile Kombinasyonlarının UPLC Yöntemi ile Aynı Anda Tayini ve Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [31] Flesch, G., Lloyd, P. ve Müller, P.H., (1997). “Absolute Bioavailability And Pharmacokinetics of Valsartan, An Angiotensin II Receptor Antagonist, in Man”, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 52: 115-120.
- [32] Saydam, M. ve Takka, S., (2007). “Bioavailability File: Valsartan. FABAD J. Pharm. Sci.”, 32: 185-196.
- [33] Criscone, L., Bradley, P., Buhlmayer, P., Whitebread, S., Glazer, R., Lloyd, P., Mueller, P. ve Gasparo, M.D., (1995). “Valsartan: Preclinical and Clinical Profile of an Antihypertensive Angiotensin-II Antagonist”, *Cardiovasc. Drug. Rev.*, 13(3):230-250.
- [34] Markhan, A. ve Goa, K.L., (1997). “Valsartan: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Use in Essential Hypertension Drugs”, 54(2): 299-311.
- [35] Hermida, R.C., Ayala, D.E., Khder, Y. ve Calvo, C., (2008). “Ambulatory Blood Pressure-Lowering Effects of Valsartan and Enalapril After A Missed Dose in Previously Untreated Patients with Hypertension: A Prospective, Randomized, Open-Label, Blinded End-Point Trial *Clinical Therapeutics*”, 30(1): 108-120.
- [36] McInnes, G.T., (1999). “Clinical Advantage of Valsartan”, *Cardiology*, 91(1): 14-18.
- [37] Brookman, L.J., Rolan P.E., Benjamin, I.S., Palmer, K.R., Wyld, J.P., Lloyd, P., Waldmeier, G.F.F., Sioufi, A. ve Mullins, F., (1997). “Pharmacokinetics of Valsartan in Patients with Liver Disease”, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 62: 272-278.
- [38] Waldmeier, F., Flesch, G., Muller, P., Winkler, T., Kriemler, H.P., Buhlmayer, P. ve Gasparo, M.D., (1997). “Pharmacokinetics, Disposition and Biotransformation of [14C]-Radiolabelled Valsartan in Healty Male Volunteers After A Single Oral Dose”, *Xenobiotica*, 27(1): 59-71.
- [39] Perez, M., Cardenas, W., Ramirez, G., Perez, M. ve Restrepo, P., (2006). “A Comparative Cross-Over, Double Blind, Randomized Study for Bioequivalence Assessment Between Two Formulations of Valsartan Capsules vs. Tablets”, *Colomb Med*, 37(2): 114-120.
- [40] Prasad, P.P., Yeh, C.M., Gurrieri, P., Glazer, R. ve McLeod, J., (2002). “Pharmacokinetics Of Multiple Doses Of Valsartan In Patients With Heart Failure”, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40:801-807
- [41] Wellington, K. ve Faulds, D.M., (2002). “Valsartan/Hydrochlorothiazide: A Review Of Its Pharmacology, Therapeutic Efficacy And Place In The Management Of Hypertension. *Drugs*”, 62(13): 1983-2005.

- [42] Physicians' Desk Reference (PDR), (2005). 58: 2296-2298.
- [43] Kaplan, N.M. ve Gifford.Jr.R.W., (1996). "Choice of Initial Therapy For Hypertension", JAMA May 22-29; 275: 1577-80.
- [44] T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, E-Reçete İlaç Listesi, <http://www.titck.gov.tr/SKRS3>, 26 Nisan 2016.
- [45] Skoog, D., Holler, F.J. ve Nieman, T.A., (1998). Principles Of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, USA, S; 673-766.
- [46] Hamilton, R.J. ve Sewel, P.A., (1982). Introduction to High Performance Liquid Chromatography, 2 Nd Ed, Chapman And Hall, New York, S. 1-160.
- [47] Bidlingmeyer, B.A., (1992). Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, s. 69-200.
- [48] Koyunoğlu, S., (2008). Paeonia Türleri İçerisindeki Monoterpen Glikozitlerinin Yapı Tayinleri ve Kromatografik Analizleri İçin Yöntem Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [49] Adamovics, J.A., (1997). Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, 2nd Edition, Marcel Dekker Inc., New Jersey.
- [50] Sewell, P.A., Clarke, B. ve Kealey, D., (1987). Chromatographic Separations, John Wiley & Sons, Great Britain.
- [51] Trathnigg, B., Fraydl, S. ve Veronik, M., (2004). "Thermodynamic Study of Retention in Liquid Exclusion-Adsorption Chromatography", Journal of Chromatography A, 1038: 43-52.
- [52] Süslü, İ., (2004). Astım Tedavisinde Kullanılan Zafirlukastın Elektrokimyasal ve Kromatografik Yöntemler ile Farmasötik Preparatlardan ve Biyolojik Materyallerden Analizi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [53] Smith, R.M., (1998). Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry, UK.
- [54] White, R., (1990). Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications, New York and Basel, Marcel Dekker, Inc: 1-15.
- [55] Meyer, V.R., (1988). Practical High Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, USA.
- [56] Aburuz, S., Millership, J. ve McElnay, J., (2003). "Determination of Metformin in Plasma Using a New Ion Pair Solid Phase Extraction Technique and Ion Pair Liquid Chromatography", Journal of Chromatography B, 798: 203-209.
- [57] Birajdar, A.S., Meyyanathan, S.N. ve Suresh, B., (2011). "Simultaneous Determination of Nabivolol HCl and Valsartan in Solid Dosage Form by Spectrophotometric and RP-HPLC Method", International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2(2): 424-431.

- [58] Rao, G.S., Raju, T.N.T., Ramarao, P.V.V.S., Vardhan, S.V.M. ve Ramachandran, D., (2014). "Development and Validation of New RP-HPLC Assay Method for Valsartan in Pure and in Formulations", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(2): 596-599.
- [59] Kumar, P.V.S., Sahu, M., Prasad, K.D. ve Shekhar, M.C., (2011). "Development and Validation of Analytical Method for the Estimation of Valsartan in Pure and Tablet Dosage Form by RP-HPLC Method", *IJRPC*, 1(4): 945-949.
- [60] Snyder, L.R., Glajch, J.L. ve Kirkland J.J. (1988). *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, USA.
- [61] Kato, Y., Nakamura, K., Kitamura, T., Tsuda, T., Hasegawa, M. ve Sasaki, H., (2004). "Effect of Chromatographic Conditions on Resolution in High-Performance Ion-Exchange Chromatography of Proteins on Macroporous Anion-Exchange Resin", *Journal of Chromatography A*, 1031: 101-105.
- [62] Bhatia, N.M., Bhatia, M.S., Choudhari, P.B. ve Ingale, K.B., (2010). "Development and Validation of Spectrophotometric and Ion Pair Chromatographic Technique for Estimation of Valsartan and Hydrochlorothiazide", *JPRHC*, 2(1): 2-14.
- [63] Küçükkolbaşı, S., Gündüz, B. ve Kılıç, E., (2004). Tabletlerde Mebendazolün Spektroflorimetrik Tayini, *24(3)*: 159-174.
- [64] Maden, M., (2010). *Spectrofluorimetric Determination of Organic And Inorganic Selenium in Vitamin Supplements After Cloud Point Extraction*, Middle East Technical University, Thesis of Master Science, Ankara.
- [65] Udenfriend, S., (1962 and 1969). *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Volumes I and II, Academic Press, New York.
- [66] Guilbault, G., (1967). *Fluorescence: Theory and Intepretation, and Practice*, Marcel Dekker Inc., New York.
- [67] Becker, R.S., (1969). *Theory and Intepretation of Fluorescence and Phosphorescence*, John Wiley Sons Inc., New York.
- [68] Shalan, S., El-Enany, N. ve Belal, F., (2015). "Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Valsartan Using a Micelle-Enhanced First Derivative Synchronous Spectrofluorimetric Method and Application in Their Co-Formulated Tablets", *Analytical Methods*, 7: 8060-8068.
- [69] Shalaan, R.A. ve Belal, T.S., (2010). "Simultaneous Spectrofluorimetric Determination of Amlodipine Besylate and Valsartan in their Combined Tablets", *Drug Testing and Analysis*, 2: 489-493.
- [70] El-Kosasy, A.M., Tawakkol, S.M., Ayad, M.F. ve Sheta, A.I., (2015). "New Methods for Amlodipine and Valsartan Native Spectrofluorimetric Determination with Factors Optimization Study", *Talanta*, 143: 402-413.
- [71] Omar, M.A., Abdelmageed, O.H., Abdel-Gaber, A.A. ve Abdel-Megied, A.M., (2011). "Spectrophotometric and Spectrofluorimetric Determination of Certain Angiotensin Receptor Blockers Through Complex Formation", *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(10): 1499-1510.

- [72] Mohammed, T.A., (2015). "Native and Synchronous Spectrofluorimetric Methods for Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate/Valsartan Combination in Tablets", Asian Journal of Science and Technology, 6(8): 1690-1698.
- [73] Yıldız, A., Genç, O. ve Bektaş, S., (1997). Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- [74] Li, H., Wang, Y., Jiang, Y., Tang, Y., Wang, J., Zhao, L. ve Gu, J., (2007). "A Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Quantification of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma", Journal of Chromatography, 852: 436-442.
- [75] Nataraj, K.S., Charya, S.V.R. ve Goud, E.S., (2011). "Simple Quantitative Method Development and Validation of Valsartan in Pureform and Pharmaceutical Dosage Forms by UV-Spectroscopy", IJPBS, 1(2): 67-73.
- [76] Ibrahim, M.M., (2015). "Investigation on Thermal Stability and Purity Determination of Two Antihypertensive Drugs, Valsartan and Losartan Potassium", International Journal of Current Pharmaceutical Research, 7(3): 64-69.
- [77] Erden, P.E., Taşdemir, İ.H., Kaçar, C. ve Kılıç, E., (2014). "Simultaneous Determination of Valsartan and Amlodipine Besylate in Human Serum and Pharmaceutical Dosage Forms by Voltammetry", International Journal of Electrochemical Science, 9: 2208-2220.
- [78] Gürler, N., Bayraktepe D.E., Durmuş. Z. ve Dinç, E., (2013). "Electrochemical Characterization and Voltammetric Anodic Stripping Methods for the Determination of Valsartan", Revista de Chimie-Bucharest, 64(11): 1211-1217.
- [79] Bhardwaj, S.K., Dwivedi, K. ve Agarwal, D.D., (2015). "A Review: HPLC Method Development and Validation", International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry, 5(4): 76-81.
- [80] Gupta, V., Jain, A.D.K., Gill, N.S. ve Gupta, K. (2012). "Development and Validation of HPLC Method- A Review". International Research Journal of Pharmaceutical Applied Sciences, 2(4): 17-25.
- [81] Gündüz, T., (1999). İnrümental Analiz, Gazi Kitabevi Ankara, 1225-1273.
- [82] Korkmaz, A., (2006). Çoklu İlaç Karışımlarında Etken Maddelerin Kantitatif Tayinleri İçin Metot Geliştirme. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- [83] Koyunoğlu, S., (2008). Paeonia Türleri İçerisindeki Monoterpen Glikozitlerinin Yapı Tayinleri ve Kromatografik Analizleri İçin Yöntem Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [84] Saylan, Y., (2011). Boronat Afinite Kromatografisi İçin Monolitik HPLC Kolonlarının Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- [85] İleri, H., (2011). Bir Grup Antioksidan Bileşiminin Tayini İçin HPLC Yöntemi Geliştirilmesi ve Çoklu Dedektör Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [86] Çelebier, M., Kaynak, M.S., Altınöz, S. ve Şahin, S., (2008). “Validated HPLC Method Development: The Simultaneous Analysis of Amlodipine and Valsartan in Samples for Liver Perfusion Studies”. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, 28(1): 15-30.
- [87] Tian, D.F., Tian, X.L., Tian, T., Wang, Z.Y. ve Mo, F.K., (2008). “Simultaneous Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablets by RP-HPLC”, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 70(3): 372-374.
- [88] Şatana, E., Altınay, Ş., Günden, N.G., Özkan, A.S. ve Şentürk, Z., (2001). “Simultaneous Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablets by First-Derivative Ultraviolet Spectrophotometry and Liquid Chromatography”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 25: 1009-1013.
- [89] Chitlange, S.S., Kiran, B. ve Sakarkar, D.M., (2008). “Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Valsartan and Amlodipine in Capsule Formulation”, Asian Journal of Research in Chemistry, 1(1): 15-18.
- [90] Bakırdere, S., (2009). Speciation Studies Using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS, PhD. Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.
- [91] Caner, C., (2015). Bazı Metal İyonlarının Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Zenginleştirilerek USN-ICP-OES Cihazı ile Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- [92] Akpınar, D., (2013). Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Amonyanın Önderiştirilmesi ve Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [93] Turan, Ş., (2013). Şelat Yapıcı Polimer ve Katı Faz Ekstraksiyonu ile Bazı Ağır Metal İyonlarının Zenginleştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- [94] Daneshtalab, N., Lewanczuk, R.Z. ve Jamali, F., (2002). “High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Angiotensin II Receptor Antagonist Valsartan Using a Liquid Extraction Method”, Journal of Chromatography B, 766: 345-349.
- [95] Geankopolis, C.J., (2011). Taşınma Süreçleri ve Ayırma Süreci İlkeleri, Çeviren: Yapıcı, S., 4:771-772.
- [96] Atalay, E. D., (2012). Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemiyle Endüstriyel Atık Sulardaki Kromun Tayini ve Uzaklaştırılması, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- [97] Yavuz, O. ve Aksoy, A., (2006). “Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu”, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 20(3): 259-269.

- [98] Koseki, N., Kawashit, H., Har, H., Niin, M., Tanak, M., Kawai, R., Nagae, Y. ve Masuda, N., (2007). “Development and Validation of a Method for Quantitative Determination of Valsartan in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 1769–1774.
- [99] Levi, M., Wuerzner, G., Ezan, E. ve Pruvost, A., (2009). “Direct Analysis of Valsartanor Candersatan in Human Plasma and Urines by on-line Solid Phase Extraction Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(10): 919-926.
- [100] Galia, E., Nicolaidis, E., Hörter, D., Löbenberg, R., Reppas, C. ve Dressman, J.B., (1998). “Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting in Vivo Performance of Class I and II Drugs”, *Pharm. Res.*, 15(5):698-705.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Hakan SERBEST  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 10.08.1990 - Seyhan  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : hknsrbst@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Kimya Mühendisliği	Hitit Üniversitesi	2012
Lise	Fen Bilimleri	Cıbalı YDA Lisesi	2008

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2015	İnnova Kuyumculuk Hediyelik Eşya San. ve Tic. A.Ş	Kimya Mühendisi
2014	Pharmavision İlaç San ve Tic A.Ş.	Uzman Yardımcısı

## **BİLDİRİ**

1. Serbest, H., Bakırdere, S. ve Keyf, S., (2016). ‘‘Development of an Analytical Method for the Determination of Valsartan in Commercial Drug and Sewage Sludge Samples by HPLC and Evaluation of its Stability under Simulated Gastric System’’, International Conference: 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 Sep-2 Oct 2016.

## **ÖDÜLLERİ**

1. Hitit Üniversitesi Mühendislik Fakültesi 4.lüğü, Kimya Mühendisliği Sınıf 1.ligi.

