



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BAZI ANJİOTENSİN II ANTAGONİSTİ İLAÇ
KARIŞIMLARININ FOTODİYOT DİZİ DEDEKTÖR VE
KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE SIVI
KROMATOGRAFİSİNDE AYNI ANDA ANALİZLERİ
VE VALİDASYONLARI**

Tuğba NEMLİOĞLU

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel Aysıl ÖZKAN**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ANJİOTENSİN II ANTAGONİSTİ İLAÇ
KARIŞIMLARININ FOTODİYOT DİZİ DEDEKTÖR VE
KÜTLE-KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE SIVI
KROMATOGRAFİSİNDE AYNI ANDA ANALİZLERİ
VE VALİDASYONLARI**

Tuğba NEMLİOĞLU

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel Ayşıl ÖZKAN**

**ANKARA
2019**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bazı anjiotensin II antagonisti ilaç karışımlarının fotodiyot dizi dedektör ve kütle-kütle spektrometresi ile sıvı kromatografisinde aynı anda analizleri ve validasyonları” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: TUĞBA NEMLİOĞLU

Tarih: 01.03.2019

İmza:

Kabul ve onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında

TUĞBA NEMLİOĞLU tarafından hazırlanan

“Bazı anjiotensin II antagonisti ilaç karışımlarının fotodiyot dizi dedektör ve kütle-
kütle spektrometresi ile sıvı kromatografisinde aynı anda analizleri ve
validasyonları” adlı tez çalışması

Aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.03.2019

Prof. Dr. Sibel A. Özkan
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nursabah BAŞCI
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU
Hacettepe Üniversitesi

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

Prof. Dr. Mehmet OKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	iii
Kabul ve onay	iv
İçindekiler	v
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Angiotensin - II Reseptör Antagonistler (Sartanlar)	4
1.2. Kalsiyum Kanal Blokörü İlaçlar	5
1.3. Tiazit Grubu Diüretik	5
1.4. Tez Kapsamında Kullanılan İlaç Etken Maddelerine Ait Bilgiler	6
1.4.1. Valsartan	6
1.4.2. Olmesartan Medoksomil	7
1.4.3. Telmisartan	8
1.4.4. Amlodipin	10
1.4.5. Hidroklorotiyazid	11
1.5. Tez Maddeleri ile Yapılmış Literatürdeki Çalışmalar	13
1.6. Tezin Amacı	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Gereç	17
2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Maddeler	17
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	18
2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar	19
2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.5. Fotodiyot Dizi Dedektör Kullanılan Sıvı Kromatografi Yöntemi	20
2.1.5.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı	20
2.1.5.2. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanışı	28
2.1.5.3. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı	30
2.1.5.4. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı	34
2.1.6. Kütle-Kütle Spektrometre Dedektör Kullanılan Sıvı Kromatografi Yöntemi	35
2.1.6.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı	35
2.1.6.2. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanışı	43
2.1.6.3. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı	46
2.1.6.4. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı	50
2.2. Yöntem	51
2.2.1. Kromatografi	51
2.2.2. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	52
2.2.2.1. Adsorpsiyon Kromatografisi	53
2.2.2.2. Dağılma Kromatografisi	54

2.2.2.3. Normal Faz Sıvı Kromatografisi	55
2.2.2.4. Ters Faz Sıvı Kromatografisi	55
2.2.2.5. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (HILIC)	56
2.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	59
2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri	60
2.2.3.2. Pompalama Sistemleri	61
2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri	62
2.2.3.4. Sıvı Kromatografi Kolonları	63
2.2.3.4.1. Analitik Kolonlar	63
2.2.3.4.2. Koruyucu Kolonlar	64
2.2.3.4.3. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri	64
2.2.3.5. Dedektörler	65
2.2.3.5.1. UV/GB Dedektör	66
2.2.3.5.2. Fotodiyot Dizi Dedektör (FDD)	69
2.2.3.5.3. Floresans Dedektör	70
2.2.3.5.4. Elektrokimyasal Dedektör	72
2.2.4. Kütle Spektrometreleri	73
2.2.4.1. Örnek Giriş Sistemi	73
2.2.4.2. İyon Kaynağı	74
2.2.4.2.1. Elektron Çarpması Yöntemi	75
2.2.4.2.2. Kimyasal İyonlaştırma	73
2.2.4.2.3. Elektrosprey İyonlaştırma Yöntemi	73
2.2.4.2.4. İkincil İyonlaşma Yöntemi	73
2.2.4.3. Kütle Analizörü	73
2.2.4.3.1. Kuadropol Ayırıcı	73
2.2.5. Kütle Spektrometreleri Uygulamaları ve Birleştirilmiş Sistemler	73
2.2.5.1. Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (SK/KS) Sistemi	73
2.2.5.2. Tandem Kütle Spektrometresi (KS/KS) Sistemi	73
2.2.6. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	80
2.2.6.1. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri	83
2.2.6.2. Validasyonun Genel İşlemleri	84
2.2.6.2.1. Seçicilik	86
2.2.6.2.2. Doğrusallık ve Aralık	87
2.2.6.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)	88
2.2.6.2.4. Kesinlik	89
2.2.6.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)	90
2.2.6.2.6. Sağlamlık	91
2.2.6.2.7. Tutarlılık	92
2.2.6.2.8. Stabilitate	92
3. BULGULAR	94
3.1. Saflık Kontrolü	94
3.1.1. IR Spektroskopisi	94
3.1.2. Dalga Boyu Taraması	97
3.2. Olmesartan, Valsartan, Telmisartan, Amlodipin ve Hidroklorotiyazid Maddeleri için Geliştirilen YPSK-FDD Yöntemine Ait Analiz Bulguları	102
3.2.1. YPSK-FDD Yönteminin Optimizasyonu	102

3.2.1.1.Hareketli Fazdaki Organik Çözücü ve Sulu Çözeltinin Yüzdelerinin Belirlenmesi	102
3.2.1.2. Sabit Fazın Seçimi	105
3.2.1.3. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	105
3.2.1.4. Akış Hızı Optimizasyonu	106
3.2.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları	107
3.2.3. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar	108
3.2.4. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık	112
3.2.5. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar	115
3.2.6. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar	117
3.3. Olmesartan, Valsartan, Telmisartan, Amlodipin ve Hidroklorotiyazid Maddeleri için Geliştirilen SK-K/KS Yöntemine Ait Analiz Bulguları	123
3.3.1. SK-K/KS Yönteminin Optimizasyonu	123
3.3.1.1. SK-K/KS Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi	123
3.3.1.2.Hareketli Fazdaki Organik Çözücü ve Sulu Çözeltinin Yüzdelerinin Belirlenmesi	124
3.3.1.3. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	130
3.3.1.4. Akış Hızı Optimizasyonu	130
3.3.4. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık	132
3.3.5. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar	141
3.3.6. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar	141
4. TARTIŞMA	147
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	155
ÖZET	157
SUMMARY	158
KAYNAKLAR	159
ÖZGEÇMİŞ	164

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları kapsamında hipertansiyon tedavisinde kullanılan olmesartan, telmisartan, valsartan, amlodipin ve Hidroklorotiyazid etken maddelerinin yeni nesil iki farklı dedektör kullanılarak YPSK’da analizi ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Olmesartan, telmisartan, valsartan, amlodipin ve Hidroklorotiyazid’in eş zamanlı analizi için en uygun hareketli faz bileşimi belirlenmiş, kolon sıcaklıkları ve akış hızı denenerek yöntem için en uygun şartlar seçilmiş ve yeni, basit, hızlı, duyarlı, seçici bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler için yöntem geçerlilik testleri ve validasyon çalışmaları yapılarak bu maddelerin farmasötik dozaj şekillerinden eş zamanlı analizi için uygun olduğu görülmüştür.

Doktora eğitimime başladığımdan beri her daim yanımda olan, sabrı ve ilgisini hiç eksik etmeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve en önemlisi bana olan inancını yitirmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Sibel A. Özkan’a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora çalışmaları süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana hep yardımcı olan, her koşulda değerli zamanını bana ayıran, sabırla destekleyen ve güç veren Dr. Öğr. Üyesi Mehmet GÜMÜŞTAŞ’ a çok teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim süresince sağladıkları katkılardan dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı’nın öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmaları süresince tüm sevgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana hep yardımcı olan, mezun olmam için baskılardan kaçınmayan, benim için çok özel ve değerli müdürüm Dr. Ayşegül Alev TUNCA’ ya çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sevgilerini hep hissettiğim, her kararında bana destek ve yardımcı olan, bana her zaman inanan ve güvenen sevgili annem ve babama, yine her kararında beni destekleyen ve sabreden sevgili eşime hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik Faktörü
ACN	Asetonitril
AML	Amlodipin
Bias	Bağıl Hata
BSS	Bağıl Standart Sapma
FDA	Food and Drug Administration – Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDD	Fotodiyot Dizi Dedektörü
GK	Gaz Kromatografisi
HCTZ	Hidroklorotiyazid
ICH	International Conference on Harmonization- Uluslararası Uyum Konferansı
k	Kapasite Faktörü
K/KS	Kütle-Kütle Spektrometre
LC	Sıvı Kromatografisi
LC/MS-MS	Sıvı Kromatografisi/Kütle-Kütle Spektrometresi
m	Eğim
MEOH	Metanol
MRM	Çoklu Reaksiyon Monitörü
n	Kesişim
N	Etkin Tabaka Sayısı
OLM	Olmesartan
r	Korelasyon katsayısı
Rs	Ayırma Gücü

SK	Sıvı Kromatografisi
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
T	Kuyruklanma Faktörü
TAS	Tayin Alt Sınırı
TEL	Telmisartan
t _R	Alıkonma zamanı
TS	Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı
USP	United States Pharmacopeia – Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
UV	Ultra viyole
UV-GB	Ultra Viyole-Görünür Bölge
VAL	Valsartan
WHO	World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kromatografik ayırımların temeli	51
Şekil 2.2. Farklı yöntemler ile HILIC'in kombinasyonu	57
Şekil 2.3. Normal faz ve ters faz yöntemlerinin tamamlayıcısı HILIC	58
Şekil 2.4. Scopus endeksli 'HILIC' ile 'HILIC ve ilaç analizleri' terimleri için toplam yayın sayısı	58
Şekil 2.5. YPSK cihazının şematik gösterimi (Perkin- Elmer Corporation)	59
Şekil 2.6. Farklı polaritede çözümler kullanılarak yapılan örnek analiz	61
Şekil 2.7. Çift ışın yollu bir UV/GB dedektörü	69
Şekil 2.8. Floresans dedektör	71
Şekil 2.9. YPSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram	81
Şekil 3.1. Olmesartanın IR spektrumu	94
Şekil 3.2. Valsartanın IR spektrumu	95
Şekil 3.3. Telmisartanın IR spektrumu	95
Şekil 3.4. Amlodipinin IR spektrumu	96
Şekil 3.5. Hidroklorotiyazidin IR spektrumu	96
Şekil 3.6. Olmesartanın 20 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu	97
Şekil 3.7. Valsartanın 80 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu	98
Şekil 3.8. Telmisartanın 20 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu	99
Şekil 3.9. Amlodipinin 5 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu	100
Şekil 3.10. Hidroklorotiyazidin 12,5 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu	101
Şekil 3.11. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (35:40:25, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	103

Şekil 3.12. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (35:20:45, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	103
Şekil 3.13. pH 3,0 çözeltisi:MeOH (50:50, h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	104
Şekil 3.14. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (50:25:25, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	104
Şekil 3.15. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	105
Şekil 3.16. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h) ve 30°C kolon sıcaklığı ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	106
Şekil 3.17. SUT'a ait kromatogram	107
Şekil 3.18. 80 µg mL ⁻¹ Konsantrasyonunda Valsartan Standardının Asit Bozundurmasına Ait Kromatogram	109
Şekil 3.19. 20 µg mL ⁻¹ Konsantrasyonunda Olmesartan Standardının Asit Bozundurmasına Ait Kromatogram	109
Şekil 3.20. 20 µg mL ⁻¹ Konsantrasyonunda Olmesartan Standardının Baz Bozundurmasına Ait Kromatogram	110
Şekil 3.21. 20 µg mL ⁻¹ Konsantrasyonunda Olmesartan Standardının Hidrojen Peroksit Bozundurmasına Ait Kromatogram	110
Şekil 3.22. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu	113
Şekil 3.23. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu	113
Şekil 3.24. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu	114
Şekil 3.25. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon	114
Şekil 3.26. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon	115
Şekil 3.27. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	118
Şekil 3.28. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	119
Şekil 3.29. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	120

Şekil 3.30. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	121
Şekil 3.31. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	122
Şekil 3.32. Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (40:60, h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	126
Şekil 3.33. Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (50:50, h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram	126
Şekil 3.34. Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Amlodipin kromatogramı	127
Şekil 3.35. Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Hidroklorotiyazid kromatogramı	128
Şekil 3.36. Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Olmesartan kromatogramı	128
Şekil 3.37. Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Telmisartan kromatogramı	129
Şekil 3.38. Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Valsartan kromatogramı	129
Şekil 3.39. Amlodipin kromatogramı	130
Şekil 3.40. Hidroklorotiyazid kromatogramı	131
Şekil 3.41. Olmesartan kromatogramı	131
Şekil 3.42. Telmisartan kromatogramı	131
Şekil 3.43. Valsartan kromatogramı	132
Şekil 3.44. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu	133
Şekil 3.45. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu	134
Şekil 3.46. Doğrusallık Standardında Yer Alan Valsartan Piki	134
Şekil 3.47. Doğrusallık Standardında Yer Alan Telmisartan Piki	134
Şekil 3.48. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu	135
Şekil 3.49. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon	135

Şekil 3.50. Doğrusallık Standardında Yer Alan Valsartan Piki	135
Şekil 3.51. Doğrusallık Standardında Yer Alan Telmisartan Piki	136
Şekil 3.52. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon	136
Şekil 3.53. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	142
Şekil 3.54. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	143
Şekil 3.55. Geri Kazanım Çözeltisinde Yer Alan Valsartan Piki	143
Şekil 3.56. Geri Kazanım Çözeltisinde Yer Alan Telmisartan Piki	144
Şekil 3.57. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	144
Şekil 3.58. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	145
Şekil 3.59. Geri Kazanım Çözeltisinde Yer Alan Valsartan Piki	145
Şekil 3.60. Geri Kazanım Çözeltisinde Yer Alan Telmisartan Piki	146
Şekil 3.61. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı	146

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Valsartanın özellikleri	17
Çizelge 1.2. Olmesartanın özellikleri	8
Çizelge 1.3. Telmisartanın özellikleri	9
Çizelge 1.4. Amlodipinin özellikleri	10
Çizelge 1.5. Hidroklorotiyazidin özellikleri	12
Çizelge 1.6. Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar	13
Çizelge 2.1. Etken maddeler	17
Çizelge 2.2. Piyasa preparatları	18
Çizelge 2.3. Kullanılan kolonların özellikleri	19
Çizelge 2.4. Her iki çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	20
Çizelge 2.5. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	53
Çizelge 2.6. Ters ve Normal faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması	55
Çizelge 2.7. Kütle spektrometri türleri	73
Çizelge 2.8. SUT parametreleri	82
Çizelge 2.9. Validasyon parametreleri	84
Çizelge 3.1. Optimizasyon sonuçları	106
Çizelge 3.2. SUT parametreleri	107
Çizelge 3.3. Hızlandırılmış Bozunmaya Ait Sonuçlar	111
Çizelge 3.4. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreler	112
Çizelge 3.5. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	116
Çizelge 3.6. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	116
Çizelge 3.7. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	116
Çizelge 3.8. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	117

Çizelge 3.9. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	117
Çizelge 3.10. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	118
Çizelge 3.11. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	119
Çizelge 3.12. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	120
Çizelge 3.13. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	121
Çizelge 3.14. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	122
Çizelge 3.15. Optimizasyon sonucunda bulunan SK-K/KS cihaz parametreleri	124
Çizelge 3.16. Optimizasyon sonucunda bulunan SK-K/KS akış gradienti	130
Çizelge 3.17. Kalibrasyon sonucunda bulunan validasyon parametreleri	133
Çizelge 3.18. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	137
Çizelge 3.19. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması	137
Çizelge 3.20. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	138
Çizelge 3.21. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması	138
Çizelge 3.22. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	138
Çizelge 3.23. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması	139
Çizelge 3.24. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	139
Çizelge 3.25. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması	139
Çizelge 3.26. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları	140

Çizelge 3.27. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması	140
Çizelge 3.28. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	142
Çizelge 3.29. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	143
Çizelge 3.30. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	144
Çizelge 3.31. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	145
Çizelge 3.32. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları	146

1. GİRİŞ

Hipertansiyon basit olarak yüksek kan basıncı demektir. Kan basıncı ya da daha doğrusu kanı kalpten dokulara taşıyan damarların kan basıncı, hastaya ait özellikler (yaş, cinsiyet, ırk gibi) ve fiziksel durumdan (dinlenme, efor gibi) etkilenen bir parametredir.

Bugün kabul edilen kan basıncı değeri dinlenme halindeki normal bir yetişkinde 120/80 mmHg'dır (milimetre civa). Herhangi bir kişide kan basıncı uyku sırasında düşük, sinirli ya da heyecanlıyken yüksektir. Normal şartlarda, sürekli olarak kan basıncı 120/80 mmHg üzerinde olan kişiler hipertansiyon hastalığı adayı kabul edilmektedir. Kan basıncı sürekli olarak 140/90 mmHg ve üzerinde bir basınçla seyrediyorsa hipertansiyondan bahsedilir. Hipertansiyon kalp hastalıkları için temel bir risk faktörüdür. Eğer tedavi edilmezse beyin, dolaşım, kalp, damar, göz ve böbrek hastalıkları için temel hazırlar. Bir kez teşhis yapıp tedaviye başlanırsa artan kan basıncı düşürülebilir, kalp ve dolaşım sistemindeki hastalık riski azaltılabilir. Sanayileşmiş ülkelerdeki yetişkin nüfusun %10-20 kadarında hipertansiyon bulunduğu hesaplanmaktadır. Kişiye ait yaş, cinsiyet ve ırk hipertansiyonun sıklığı söz konusu olduğunda belirleyici faktörlerdir. Kişinin yaşının hipertansiyona olan katkısı öncelikle damarlarda yaşlanmaya eşlik eden anormalliklerdir. Söz konusu durum özellikle de kalpten damarlara taşıyan kan damarlarındaki esneklik kaybı ile açıklanabilir. Fakat bazı ilkel toplumlarda yaşla hipertansiyon arasındaki bu bağlantıya hiç rastlanmamaktadır. Bu durumda etkili olan faktörün "uygarlaşma" ve buna bağlı olarak yaşam biçimi olduğu da söylenebilir. Tuz kullanım oranı, aşırı beslenme, hareketsiz yaşam, stres vs buna neden olan faktörler arasında yer alır. Hipertansiyon ciddi bir durumdur. Hipertansiyon, tek başına öldürücü değildir; ancak tedavi edilmediği zaman hipertansiyonun sonuçları da öldürücü olabilir (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2008).

Hipertansiyon kalbi zorlar ve kalp yetmezliğine neden olabilir. Bununla birlikte ateroskleroz ve bunun yol açabileceği iskemik kalp rahatsızlığı (belirli bir bölgede kan akışının kesilmesi sebebiyle oluşan geçici kansızlık nedeniyle dokuların hava alamaması) riskini de önemli ölçüde artırır. Ayrıca; hipertansiyon hastalarının kanama ve beyindeki kan damarlarının pıhtı ile tıkanması olayına diğer kişilerden daha kolay yakalanırlar. Hipertansiyon bunlara ek olarak koroner arter hastalığına da büyük katkıda bulunur ki, bu hastalık sanayileşmiş toplumlarda ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bütün bu olgular tedavi edilmeyen hipertansiyonun sonuçları olup, hipertansiyona bağlı mortalite (ölüm) veya morbidite (hastalık) büyük bir bölümünü oluşturur.

Hipertansiyon, nedenine göre 2 grupta sınıflandırılabilir.

- i. esansiyel (primer - birincil) hipertansiyon
- ii. sekonder (ikincil) hipertansiyon

Hipertansiyon hastalarının yaklaşık %90'ı, sebebi (etioloji) bilinmediğinden primer veya "esansiyel" hipertansiyon olarak adlandırılır. Hipertansiyon hastalarının diğer bölümüne, yani yaklaşık %10'una bu durumun nedeni bilindiğinden "sekonder" hipertansiyon denir. Bunların en yaygın olanı böbrek kökenli olan (renal) hipertansiyondur. Kan basıncının istenen seviyelerde kontrolü, tedavideki tek amaç değildir. Bunun yanı sıra yaşam kalitesinin yükseltilmesi, tedavi yan etkilerinin en azda tutulması, tedavi maliyetinin azaltılması, komplikasyonların engellenmesi, ölüm oranlarının azaltılması ve eşlik eden hastalıkların da (ateroskleroz, iskemik kalp hastalığı, dislipidemi vb) önlenmesi/iyileştirilmesi, tedavi amaçları arasındadır (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2008).

Tedavi üç grupta incelenebilir.

- i. İlaçsız tedavi (kilo verme, tuz kısıtlaması, sigaranın bırakılması, alkolden kaçınma, stresten uzaklaşma, egzersiz),
- ii. İlaç tedavisi,
- iii. Cerrahi tedavi.

Günümüzde değişik gruplardan ilaçlar, birçok etki mekanizmasıyla hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Bu da hipertansiyon tedavisinde ilaç seçimini çok önemli hale getirmektedir.

Antihipertansif ilaçların sınıflaması: Antihipertansif ilaçlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir ve tedavide genellikle ilk 6 grupta yer alan ilaçlar kullanılmaktadır (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2008).

- i. İdrar söktürücüler
- ii. β adrenerjik reseptör blokerleri
- iii. α adrenerjik reseptör blokerleri
- iv. Kalsiyum kanal blokerleri
- v. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEİ)
- vi. Angiotensin II (AT-II) reseptör blokerleri
- vii. Direkt etkili damar genişleticiler
- viii. Santral etkili sempatotik ilaçlar
- ix. Adrenerjik nöron blokerleri
- x. Sadece hipertansif kriz tedavisinde kullanılan ilaçlar

1.1. Angiotensin - II Reseptör Antagonistler (Sartanlar)

Sartanlar ailesi de denen bu ilaçların başlıca üyeleri şunlardır: Losartan, Valsartan, Olmesartan, İrbesartan, Telmisartan, Eprosartan'dır.

Güçlü vazokonstriktif angiotensin II'nin (AT II) AT1 reseptöre yapışmasını önleyerek etki gösterirler. Bradikinin üzerine ACE-inhibitörleri gibi etkileri yoktur.

Arteriyel hipertansiyon sol ventrikül hipertrofinin önemli nedenlerinden birisidir. Hipertansiyonun sol ventriküle olan etkisi oldukça karmaşık olup bazı hipertansif hastalarda sol ventrikül kitlesi artarken bazılarında ise normal kalmaktadır. Arteriyel hipertansiyonda sol ventrikül hipertrofinin, anjiyotensin II reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak oluştuğu söylenmektedir. Basınç yüklenmesinin kardiyovasküler sistemde oluşturduğu ilk etki ventriküler hipertrofik değişimlerdir. Renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) aktif hormonu, ACE (anjiyotensin dönüştürücü enzim) etkisiyle AT1' den meydana getirilen AT II'dir. Anjiyotensin II, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin en önemli vazoaktif hormonudur ve hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler bozuklukların fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar. AT II reseptör antagonistleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. ACE inhibitörlerine benzer antihipertansif etkinliğe ve düşük bir yan etki potansiyeline sahiptirler. AT1 reseptörlerini seçici ve yarışmalı olarak bloke ederler. Anjiyotensin II bazı dokuların hücre membranlarındaki spesifik reseptörlere bağlanır. Buna ek olarak vücuttaki sodyum tutulması ve aldosteron salgılanmasını destekler. (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2008)

1.2. Kalsiyum Kanal Blokörü İlaçlar

Kalsiyum antagonistleri veya kalsiyum kanal blokerleri olarak adlandırılan ilaç grubu uzun yıllardan beri hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde antihipertansif amaçla kullanılan kalsiyum antagonistleri 3 grup altında toplanabilir. Bunlar fenilalkilaminler (verapamil), benzodiazepinler (diltiazem) ve dihidropridinler (nifedipin, nikardipin, nisoldipin, isradipin, felodipin ve amlodipin) dir. Bu gruplar birbirinden oldukça farklı özelliklere sahiptirler. Kalsiyum antagonistleri diğer antihipertansif ilaçlarla karşılaştırıldığında yaklaşık olarak aynı oranlarda kan basıncı düşürücü etki gösterirler. (RxMediapharma, 2008)

1.3. Tiazit Grubu Diüretik

Hipertansiyon; inme, koroner arter hastalığı (KAH), konjestif kalp yetersizliği (KKY), kronik böbrek yetersizliği (KBY) gibi kardiyovasküler hastalıkların gelişimi için en önemli risk faktörlerindendir. İnmelerin yaklaşık olarak %54'ü, KAH'nın %47'si, total ölümlerin %13'ü hipertansiyona bağlı oluşmaktadır. Günümüzde erişkinlerin yaklaşık üçte birinde hipertansiyon bulunmaktadır. Bu kadar sık görülen ve önemli olan hastalığın tedavisinde kullanılan ajanlardan bir tanesi de diüretiklerdir. Diüretikler, özellikle dirençli hipertansiyon, yaşlı, diyabetik ve obez hastalar gibi tuza duyarlı hipertansiyon tiplerinde yararlıdır. Tiyazid diüretikler, etkilerini esas olarak böbrek distal tüplerine etki ederek, buradaki sodyum ve klor (Na-Cl) taşınmasını engelleyerek gösterirler. Ancak, kronik kullanımda, tiyazidler kan basıncı (KB) üzerine farklı yollarla etki ederler. (RxMediapharma, 2008)

1.4. Tez Kapsamında Kullanılan İlaç Etken Maddelerine Ait Bilgiler

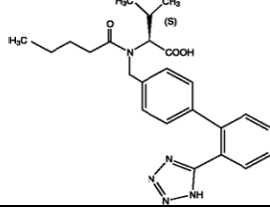
Tez kapsamında angiotensin - II reseptör antagonistlerden Valsartan (VAL), Olmesartan (OLM) ve Telmisartan (TEL) ile çalışılmıştır. Kalsiyum kanal blokörü olarak Amlodipin (AML) ve tiazit grubu diüretik olarak Hidroklorotiyazid (HCTZ) kullanılmıştır.

1.4.1.Valsartan

Valsartan, oral yolla alındığı zaman aktif olan, spesifik bir anjiotensin II (AT II) reseptör antagonistidir. Özellikle AT1 reseptör alt-tipi üzerinde seçici bir etki gösterir. AT1 reseptöründe hiçbir kısmi agonist etkisi olmayan valsartanın bu reseptöre olan afinitesi, AT II reseptörüne olan etkisinin yaklaşık 20 000 katıdır. Valsartan, aynı zamanda kininaz II adıyla da bilinen, AT1'i anjiotensin II'ye dönüştüren ve bradikinin parçalayan bir enzim olan “anjiotensin dönüştürücü enzimi” (ACE) inhibe etmez. Valsartan, öteki hormon reseptörlerine ya da kardiyovasküler düzenlemede önemli oldukları bilinen iyon kanallarına bağlanmaz veya onları bloke etmez. Hipertansiyon hastalarının valsartan alması sonucunda, nabız sayısında değişiklik olmaz ve kan basıncı azalır. Bir tek oral dozun alınmasından sonraki 2 saat içerisinde hastaların birçoğunda antihipertansif etki başlar ve 4-6 saat içerisinde en üst düzeye gelir. Dozun verilmesinden sonra antihipertansif etki 24 saat boyunca devam eder.

Ödem, uykusuzluk, asteni, libido azalması, deri döküntüsü, baş dönmesi tesbit edilebilen yan etkileridir. Valsartan plazma proteinlerine güçlü bir şekilde bağlandığı için, hemodiyaliz yoluyla vücuttan uzaklaştırılmaz (RxMediapharma, 2008; Sweetman, 2007).

Çizelge 1.1. Valsartan'ın özellikleri

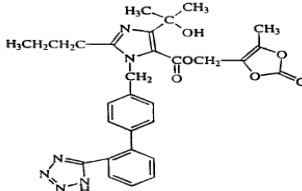
Yapısı	
Kapalı Formülü	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃
Sistemik Adı	[2'-(1H-tetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]-4-il] metil]-L-valin
Molekül Ağırlığı	435,5 g mol ⁻¹
Erime Noktası	116-117 °C
Sudaki Çözünürlüğü	1.406 mg mL ⁻¹

1.4.2.Olmesartan Medoksomil

Olmesartan medoksomil, oral yoldan etkili, kuvvetli, seçici bir anjiyotensin II reseptör (tip AT1) antagonistidir. AT II'nin kaynaktan veya sentezinde bağımsız olarak AT1'in aracılık yaptığı bütün AT II etkilerini bloke ederek etkimesi beklenmektedir. Anjiyotensin II reseptörlerinin seçici olarak antagonizmi, plazma renin seviyelerinde ve plazma aldosteron derişimlerindeki bir miktar azalmayla ve anjiyotensin I ve II derişimlerindeki yükselmelerle sonuçlanmaktadır. AT II, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin primer vazoaktif hormonudur. Bu hormon AT1 reseptörü yoluyla hipertansiyon fizyopatolojisinde anlamlı bir rol oynamaktadır. Hipertansiyonda, Olmesartan, arteriyel kan basıncında doza bağlı, uzun süre devam eden bir azalmaya neden olmaktadır. Olmesartan günde tek doz ile, 24 saatlik doz aralığı süresince kan basıncında düzgün ve etkili bir azalma sağlamaktadır. Günde tek doz kullanımı, aynı günlük dozda günde 2 kez kullanımı ile kan basıncında benzer azalma meydana getirir. Sürekli tedaviyle, kan basıncını düşürme etkisinin önemli bir kısmı 2 haftalık tedaviden sonra gözlenebilir olsa da, kan basıncındaki maksimum azalmalara tedaviye başlandıktan 8 hafta sonra ulaşılmaktadır. Hidroklorotiyazid ile birlikte kullanıldığında kan basıncında ek bir azalma etkisi olmaktadır ve birlikte kullanılmaları iyi bir şekilde tolere edilmektedir. Olmesartan medoksomil iyi bir ön ilaçtır. Barsak mukozasında ve gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu sırasında portal kan içindeki esterezlarla hızlı

bir şekilde farmakolojik olarak aktif metabolite olan olmesartana dönüşmektedir. (RxMediapharma, 2008; Sweetman, 2007).

Çizelge 1.2. Olmesartan Medoksomil'in özellikleri

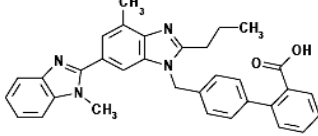
Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_{29}H_{30}N_6O_6$
Sistemik Adı	2,3-dihidroksi-2-butenil4(1-hidroksi-1-metil)-2-propil-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil) benzil]imidazole 5-karboksilat
Molekül Ağırlığı	558,59 g mol ⁻¹
Erime Noktası	175-180 °C
Sudaki Çözünürlüğü	1.24 mg mL ⁻¹

1.4.3.Telmisartan

Telmisartan yağda çözülebilen, tetrazol yapısı taşımayan anjiyotensin II (Tip1) reseptör blokörüdür. Aynı gruptaki Valsartan ve Losartan'a benzemektedir. Telmisartan'ın AT1 reseptör alt tipine olan ilgisi AT II reseptör alt tipine olan ilgisine göre çok daha fazladır. Telmisartan, AT II'nin etkilerini insüline duyarlılığı artıran ilaçların hedefi olan peroksizom proliferatörünce aktive edilen reseptör- γ 'yı aktive ettiği gösterilmiştir (PPAR- γ). Antihipetansif etkisinin yanında, insülin duyarlılığını da artırarak, hipertansiyon oluşum mekanizması, hedef organ hasarı ve mortalite, morbiditede önemli rol oynayan lipid ve glükoz metabolizması üzerine olumlu etkisi bulunur. Telmisartan, diğer benzeri ilaçların moleküllerinden daha kuvvetli biçimde kalp, karaciğer ve böbreklerde bulunan AT1 reseptörlerine bağlanarak uzun süre koruma sağlar. Kanda bulunan ve vücuttaki kan basıncını arttıran AT II hormonunu daha etkili baskıladığı için daha uzun süreli etki göstermektedir. Yapılan çalışmalar Telmisartan'ın 35 saat etki yapabildiği için hipertansiyon hastalarında görülen sabah kalp krizi riskini azalttığı yönündedir.

Telmisartan sadece oral yoldan kullanılır. Oral yoldan verildiğinde plazmada doruk derişim düzeylerine alındıktan 0.5-1 saat sonra ulaşır. Oral yoldan tek doz halinde verildiğinde antihipertansif etkisi 3 saat içersinde başlar. Mutlak biyoyararlanımı doza bağımlı olup 40 mg dozda verildiğinde %42 ve 60 mg dozda verildiğinde %58'dir. Besinlerle birlikte alınması telmisartanın biyoyararlanımını hafifçe azaltır; besinler eğrinin altında kalan alan (AUC) değerini 40 mg'lık tabletleri için %6 ve 160 mg'lık tabletleri için ise yaklaşık %20 oranında azaltır. Telmisartanın farmakokinetiği 20-160 mg doz aralığında doğrusal nitelik göstermez; doz yükseldikçe plazma derişimlerinde görülen oransal artışlara (Cmax ve AUC) göre daha fazladır (RxMediapharma, 2008; Sweetman, 2007).

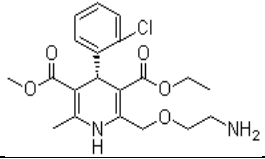
Çizelge 1.3. Telmisartan'ın özellikleri

Yapısı	
Kapalı Formülü	C ₃₃ H ₃₀ N ₄ O ₂
Sistemik Adı	4'-[(1,4'-dimetil-2'-propil[2,6'-bi-1H-benzimidazol]-1'-yl)metil]-[1,1'-bifenil]-2-karboksilik asit
Molekül Ağırlığı	514,63 g mol ⁻¹
Erime Noktası	261-263 °C
Sudaki Çözünürlüğü	Pratikte çözünmez

1.4.4.Amlodipin

Amlodipin dihidropiridin sınıfından bir kalsiyum antagonisti (kalsiyum kanal blokörü)'dir. Kalsiyum iyonunun miyokard ve düz kas hücre membranındaki kalsiyum kanalları (yavaş kanallar) yoluyla hücre içine girişini inhibe eder. Amlodipin miyokarddan çok vasküler düz kas hücreleri için seçicidir. Bu hücrelerin kontraksiyonu için ekstrasellüler kalsiyum iyonlarının hücre içine girmesi gerekir. Amlodipin transmembran kalsiyum akımını engelleyerek periferik arteriyollerde vazodilatasyon yapar, periferik rezistansı ve sistemik kan basıncını düşürür. Eforla gelen angina pectoriste terapötik etkisi, kalp yükünün (afterload) ve buna bağlı olarak miyokard oksijen gereksiniminin azalmasına bağlıdır. Vazospastik angina pectoristeki (Prinzmetal anjini) etkenliği koroner arter spazmını bloke etmesiyle açıklanır. Amlodipin ağız yoluyla alındıktan sonra iyi absorbe olur ve 6-12 saat sonra doruk plazma konsantrasyonları oluşur. Mutlak biyoyararlılığı % 64-90 olup midede besin bulunmasından etkilenmez. Dolaşımdaki ilacın % 93'ü plazma proteinlerine bağlıdır. Amlodipin yoğun bir hepatik metabolizma (% 90) ile inaktif metabolitlere dönüşür ve ilacın % 10'u değişmemiş molekül, % 60'ı metabolitler şeklinde idrarla atılır. Plazmadan terminal eliminasyon yarı ömrü 30-50 saattir. Art arda her gün verildiği zaman 7-8 günde kararlı durum plazma düzeyleri oluşur. Renal yetmezlikte amlodipin kinetiği değişmez ve doz ayarlaması gerektirmez (RxMediapharma, 2008; Sweetman, 2007).

Çizelge 1.4. Amlodipin'in özellikleri

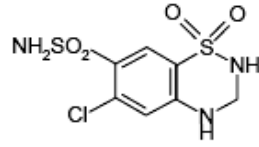
Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_{20}H_{25}ClN_2O$
Sistemik Adı	Metiletil2-(2-aminoetoksimetil)-4-(2-klorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridin 3,5dikarboksilat
Molekül Ağırlığı	408,88 g mol ⁻¹
Erime Noktası	178-179 °C
Sudaki Çözünürlüğü	75,3 mg mL ⁻¹

1.4.5.Hidroklorotiyazid

Hidroklorotiyazid ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazit yapılı bir diüretiktir. Tiazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine kullanılırlar. Kıvrım diüretiklerden farklı olarak, böbrek yetmezlikli hastalarda etkinlikleri zayıflar. Hidroklorotiyazid diabetes insipidus ve hiperkalsüri tedavisi içinde kullanılır. Hidroklorotiyazid, FDA gebelikte ilaç kullanımı risk sınıflandırmasında B kategorisine dahildir (hayvan deneyleri ve gebelerde yapılan kontrollü çapraz çalışmalarda risk olasılığı doğrulanmamış ilaçlar).

Tiazit grubu diüretikler böbrek tubulus epitelyumundan sodyum iyon transportunu inhibe ederek sodyum, klor ve suyun atılımını artırır. Tiazitlerin bu etkiyi göstermelerinde farklı mekanizmalar rol oynayabilirse de, yaptıkları diürezden sorumlu esas mekanizma Henle kıvrımının çıkan kolunun kortikal bölümü (kortikal dilüe edici segment) ile distal tubulusun proksimal bölümünde aktif klorür reabsorbsiyonunu inhibe etmeleridir. İkincil olarak sodyum reabsorbsiyonunu da azaltırlar. Klorür transportunu nasıl azalttıkları tam olarak bilinmemektedir. Tiazitler ayrıca potasyum ve bikarbonat atılımını artırır, kalsiyum ve ürik asit eliminasyonunu azaltırlar. Hidroklorotiyazidlerin potasyum atılımını artırmaları renal tübülüslerin distal bölümünde sodyum yükünü arttırmalarına (Na^+ iyonundan zengin filtrat) bağlıdır; böylece sodyum-potasyum değiş-tokuş mekanizmasını harekete geçirerek potasyum salgılanmasını indirekt olarak artırmış olurlar. Neden oldukları hipokloremi ve hipokalemi hafif metabolik alkalozu yol açabilir. Hidroklorotiyazidlerin diüretik etkileri hastanın asit-baz dengesinden etkilenmez. Hidroklorotiyazidler aldosteron antagonisti etki göstermezler ve esas etkileri karbonik anhidraz enzim inhibisyonundan bağımsızdır (RxMediapharma, 2008; Sweetman, 2007).

Çizelge 1.5. Hidroklorotiyazid'in özellikleri

Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$
Sistemik Adı	6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazin-7-sulfonamid 1,1-dioksit
Molekül Ağırlığı	297,74 g mol ⁻¹
Erime Noktası	266-268 °C
Sudaki Çözünürlüğü	722 mg mL ⁻¹

1.5. Tez Maddeleri ile Yapılmış Literatürdeki Çalışmalar

Çizelge 1.6. Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar

Etken Madde	Yöntem	Kolon	Hareketli Faz	Analiz Süresi (dk)	Dedektör	Sistem Uygunluk Testi Parametreleri			Yöntem Geçerlilik Testi Parametreleri					Kaynak
						R _s	α	N	Doğrusal Aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TAS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	KESİNLİK (BSS %)	Doğruluk (%)	
Amlodipin	Ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC)	Cosmosil PAQ ters faz C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm)	Hareketli Faz Asodyumdihidrojen fosfat tamponu : Hareketli Faz B Asetonitril Gradient sistem	7,4 dk	FDD	19,6	-	56678	2-150	-	-	0,85	99,6	R.A. Mhaske ve ark, 2011
Valsartan				8,4 dk		7,24	-	44004	2-150	-	-	0,96	100,4	
Telmisartan				10,2 dk		11,16	-	72930	2-150	-	-	1,07	100,4	
Hidroklorotiyazid				3,1 dk		-	-	6253	2-150	-	-	0,48	102,0	
Amlodipin	Spektroflorimetrik	-	-	-	Spektroflorimetre Eksitasyon 367 nm Emisyon 454 nm	-	-	-	0,1-1,4	0,034	-	-	-	Tarek S. Belal ve ark, 2014
Telmisartan				-		-	-	-	0,0025-0,05	0,0007	-	-	-	
Amlodipin	Ultra Performans sıvı kromatografisi (UPLC)	Acquity BEH sield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)	Hareketli Faz A:Sodyum perklorat pH 3,2: Asetonitril (90:10; h/h) Hareketli Faz B:Sodyum perklorat pH 3,2: Asetonitril (20:80; h/h)	3,3	UV	36,9	-	43314	2-6	-	-	0,54	99,7	Santaji Nalwade ve ark, 2011
Telmisartan				3,9		8,3	-	34765	16-48	-	-	0,15	100,4	
Hidroklorotiyazid				0,9		-	-	2974	5-15	-	-	0,08	99,4	

Çizelge 1.6. (devam) Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar

Olmesartan	Ultra Performans sıvı kromatografisi (UPLC)	Phenyl C ₁₈ (50 x 2,1 mm, 1.8µm)	Hareketli Faz A:Sodyum perklorat pH 3,2: Asetonitril (90:10; h/h)	3,5	UV	-	-	-	2-6	-	-	-	-	Kakumani ve ark, 2012
Amlodipin			Hareketli Faz B:Sodyum perklorat pH 3,2: Asetonitril (10:90; h/h)	3,3		-	-	-	0,5-1,5	-	-	-	-	
Hidroklorotiyazid				0,9					1,25-3,75	-	-	-	-	
Olmesartan	Kapiler Elektroferez	Silika kapiler (55cm x 50µm)	Sodyum dodesil sülfat:Asetonitril (90:10; h/h)	5,7	-	-	-	-	2-80	0,32	1,25	1,13	99,1	Mahesh ve ark, 2015
Amlodipin				3,7		-	-	-	1-40	0,13	0,44	0,95	100,1	
Hidroklorotiyazid				3					5-200	1,22	3,81	1,40	99,8	
Telmisartan	Ters faz sıvı kromatografisi	-	Asetonitril: MeOH (30:70; h/h)	2,80	UV	-	-	-	-	-	-	-	-	Leena R.B: ve ark., 2007
Hidroklorotiyazid				1,79		-	-	-	-	-	-	-	-	
Telmisartan	Ters faz sıvı kromatografisi	ODS Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)	Potasyum dihidrojen ortofosfat:Asetonitril (40:60; h/h)	5,19	UV	-	-	-	4,1-20,48	-	-	-	-	Wankhede SB. ve ark, 2007
Hidroklorotiyazid				2,97		-	-	-	1,28-6,4	-	-	-	-	
Hidroklorotiyazid	Ters faz sıvı kromatografisi	Welchrom C18 (250*4,6mm, 5µm)	Fosfat tamponu pH 3.3:Asetonitril (50:50; h/h)	3,30	UV	-	-	246247	2,5-12,5	0,30	0,98	0,13	100,01	Panchumarthy Ravisankar ve ark, 2016
Telmisartan				3,78		3,78	-	247368	8-40	0,57	1,89	0,13	100,02	
Olmesartan				5,25		4,93	-	305005	8-40	1,20	3,96	0,44	100,41	
Valsartan				5,57		2,01	-	343756	16-80	0,12	0,35	0,31	100,05	
Amlodipin	Sıvı kromatografisi	ODS3 C18 (150*4,6mm, 5µm)	Fosfat tamponu pH 6.0:Asetonitril (40:60; h/h)	4,0	UV	-	-	-	5-30	-	-	-	96<	Saurabh K Sinha ve ark, 2012
Telmisartan				8,2		-	-	-	10-60	-	-	-	96<	

Çizelge 1.6. (devam) Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar

Telmisartan	Ters faz sıvı kromatografisi	Kromasil C18 (250 x 4,6mm, 5µm)	2,0 g Dihidrojen fosfat ve 1,04 Sodyum 1 Heksan sulfonik asit:Asetonitril:MeOH (80,20, h/h)	17,7	UV	-	-	740969	-	0,10	0,30	0,60	100,3	Sutirtho ve ark, 2011
Hidroklorotiyazid				34,8		-	-	17221	-	0,03	0,09	2,63	98,1	
Amlodipin	Ters faz sıvı kromatografisi	LichroCART RP18 (250 x 4,6mm, 5µm)	Trietilamin-fosforik asit (pH: 3,0):Asetonitril:MeOH (50/40/10, h/h/h)	5,2	UV	2,1	-	-	2,65- 26,50	0,51	1,70	0,43	97,89	Filiz Arıöz ve ark, 2014
Amlodipin	Ters faz sıvı kromatografisi	Qualisil BDS C18 (250 x 4,6mm, 5µm)	Fosfat tamponu pH 2,5:Asetonitril (60/40, h/h)	4,86	UV	-	-	3161	2-25	0,05	1	-	103,14	N Delhiraj ve ark, 2014
Telmisartan				7,68		-	-	2313	10-80	2	7	-	100,35	
Amlodipin	Sıvı kromatografisi (LC/MS-MS)	Chromolith (100 mm x 4,6 mm)	Asetonitril:2 mM Amonyum format (90:10, h/h)	1,80	MS- MS	-	-	-	0,00002- 0,002	-	0,00002	-	97,1	Jaivik V. Shah ve ark, 2017
Valsartan				1,08		-	-	-	0,005-10	-	0,005	-	98,2	
Hidroklorotiyazid				1,43		-	-	-	0,00002- 0,02	-	0,0002	-	98,9	
Amlodipin	Sıvı kromatografisi (LC/MS-MS)	Hypurity advance C18 (50 x 4,6mm, 5µm)	Amonyum asetat tamponu pH 4,0:Asetonitril (50/50, h/h)	0,65	MS- MS	-	-	-	0,00005- 0,001	-	0,00005	0,63	99,67	Vasu Babu Ravi ve ark, 2012
Telmisartan				1,52		-	-	-	0,002-0,4	-	0,002	0,68	99,75	

1.6. Tezin Amacı

Bu tez kapsamında, amlodipin, olmesartan, telmisartan, valsartan ve hidroklorotiyazid içeren ikili ve üçlü farmasötik dozaj formlarının aynı anda kromatografik tayininde doğru, duyarlı, hızlı ve basit bir yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemlerin miktar tayini analizlerine uygulanması amaçlanmıştır. Sıvı kromatografisi (SK) ve bu sistemde kullanılan fotodiyot dizi (FDD) dedektörü ve kütle spektrometresi ile bir ayırım olabilmesi için kromatografik şartların optimizasyonu ve meydana gelen bu şartlarda amlodipin, olmesartan, telmisartan, valsartan ve hidroklorotiyazid etken maddelerini içeren, hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçların kısa sürede analizlerinin uygulanması amaçlanmıştır.

Bu nedenle amlodipin, olmesartan, telmisartan, valsartan ve hidroklorotiyazid etken maddelerini içeren, hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçların kısa sürede miktar tayini için geliştirilecek olan yöntemin geçerliliği için yöntem validasyonu uygulanacak, istatistiksel olarak analizlerin sonuçları değerlendirilecektir. Geliştirilmiş olan yöntemlerin doğruluğu, duyarlılığı, kesinliği, doğrusallık ve doğrusallık aralığı, cihaz tekrarlanabilirliği, yöntem tekrarlanabilirliği, bağıl ve mutlak geri kazanımları, piyasada bulunan numune analizlerine uygulanabilirliği gibi parametreleri değerlendirilecek, sistem uygunluk testleri gerçekleştirilecektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasal maddeler, safsızlıklardan gelebilecek hataları engellemek için analitik ve kromatografik saflıklarda kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Etken maddeler

Etken Madde	Firma
Amlodipin Besilat	GLOCHEM İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş
Hidroklorotiyazid	INDUKEM İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş
Olmesartan Medoksomil	DR. REDDY'S İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.
Telmisartan	ENALTEC LABS İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş
Valsartan	AUROBINDO İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.

Çizelge 2.2. Piyasa preparatları

Etken Madde	Firma	Piyasa Preparatı	Dozaj Formu	İçeriği
Olmesartan medoksomil + Amlodipin besilat	DAIICHI SANKYO İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.	Sevikar®	Film Tablet	20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin
Valsartan + Hidroklorotiyazid + Amlodipin besilat	NOVARTIS İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.	Exforge HCT®	Film Tablet	160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin
Olmesartan medoksomil + Hidroklorotiyazid + Amlodipin besilat	DAIICHI SANKYO İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş..	Sevikar HCT®	Film Tablet	20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin
Valsartan + Amlodipin besilat	NOVARTIS İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.	Exforge®	Film Tablet	160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin
Telmisartan + Amlodipin besilat	BOEHRINGER INGELHEIM İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.	Twynsta®	Film Tablet	40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

- YPSK sistemi: Agilent 1200 (Santa-Clara, CA, ABD)
- Fotodiyot dizi dedektörü (FDD) Agilent (Santa-Clara, CA, ABD)
- Kütle spektrometresi Agilent (Santa-Clara, CA, ABD)
- Manyetik karıştırıcı: Variomag multipoint (Thermo Sientific, Kanada, ABD)

- Elektronik hassas terazi: Mettler Toledo (ABD)
- Saf su sistemi: Sartorius Pro UV-T (Almanya)
- pH metre: Model 780 Metrohm (İsviçre)
- Ultrasonik su banyosu: Bandelin (Berlin, Almanya)
- Farklı hacimlere sahip sarf malzemeler
- 0.45µm PVDF filtre: Sartorius (Almanya)

2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar

Tez çalışmalarında kullanılan kolonlara ait sabit fazlar ve özellikleri Çizelge 2.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Kullanılan kolonların özellikleri

Kolon Adı	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Partikül Çapı (µm)	Kimyasal Yapısı	Yöntem	Firma
Symmetry Shield RP-18	150	4.6	3.5	Saf silika	Fotodiyot dizi dedektör	Waters (ABD)
Poroshell 120 EC C-18	50	3.0	2.7	Saf silika	Kütle spektrometresi	Agilent (ABD)

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Her iki yöntemdeki hareketli fazların hazırlanmasında kullanılan organik çözücüler kromatografik saflıkta olup ve diğer kimyasal analitik saflıktadır.

Çizelge 2.4. Her iki çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Yöntem	Firma
Orto-Fosforik Asit	Fotodiyot dizi dedektör	MERCK MILLIPORE Darmstadt, Almanya)
Asetonitril	Fotodiyot dizi dedektör Kütle spektrometresi	MERCK MILLIPORE Darmstadt, Almanya)
MeOH	Fotodiyot dizi dedektör	MERCK MILLIPORE Darmstadt, Almanya)
Amonyum Format	Kütle spektrometresi	MERCK MILLIPORE Darmstadt, Almanya)
Formik Asit	Kütle spektrometresi	MERCK MILLIPORE Darmstadt, Almanya)

2.1.5. Fotodiyot Dizi Dedektör Kullanılan Sıvı Kromatografi Yöntemi

2.1.5.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tez kapsamında kullanılan ikili ve üçlü karışımlara ait standart çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır: Hassas analitik terazi ile tartım sonucu her bir madde MeOH'de çözülerek stok standart çözeltileri oluşturulmuştur. Sonrasında tüm seyreltmeler çözücü olarak belirtilen pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (40:20:40, h\h\h) karışımıyla hacimlerine tamamlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltiler 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılmıştır.

20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan medoksomil standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

%5'lik doğrusallık standardı: 1'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%10'luk doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%25'lik doğrusallık standardı: 5'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%50'lik doğrusallık standardı: 10'ar mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%75'lik doğrusallık standardı: 15'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%100'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%150'lik doğrusallık standardı: 3'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 4'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

25 mg Hidroklorotiyazid, 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3: Yaklaşık 25,0 mg Hidroklorotiyazid standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 4 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

%5'lik doğrusallık standardı: 1'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%10'luk doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%25'lik doğrusallık standardı: 5'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%50'lik doğrusallık standardı: 10'ar mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%75'lik doğrusallık standardı: 15'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%100'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 1,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%150'lik doğrusallık standardı: 3'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 1,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 4'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 1,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

12,5 mg Hidroklorotiyazid, 20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan medoksomil standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3: Yaklaşık 25,0 mg Hidroklorotiyazid standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 4 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

%5'lik doğrusallık standardı: 1'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%10'luk doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%25'lik doğrusallık standardı: 5'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%50'lik doğrusallık standardı: 10'ar mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%75'lik doğrusallık standardı: 15'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 10,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%100'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 1,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%150'lik doğrusallık standardı: 3'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 1,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 4'er mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'den, 1,0 mL stok standart çözelti 4'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

%5'lik doğrusallık standardı: 1'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%10'luk doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%25'lik doğrusallık standardı: 5'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%50'lik doğrusallık standardı: 10'ar mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%75'lik doğrusallık standardı: 15'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%100'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%150'lik doğrusallık standardı: 3'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 4'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3 (İç standart): Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

%5'lik doğrusallık standardı: 1'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%10'luk doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%25'lik doğrusallık standardı: 5'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%50'lik doğrusallık standardı: 10'ar mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%75'lik doğrusallık standardı: 15'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 10,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%100'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%150'lik doğrusallık standardı: 3'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 4'er mL stok standart çözelti 1 ve 2'den, 1,0 mL stok standart çözelti 3'ten alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücü ile tamamlanır.

2.1.5.2. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanışı

Optimize edilen YPSK-FDD metodu ile piyasa preparatları analizlerinde miktar tayinlerini belirlemek için her bir tabletten çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerdeki etken madde miktarları her bir preperatın kendine ait standart çözelti kalibrasyonlarıyla hesaplanmıştır.

İç standart çözeltisi 1: Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

İç standart çözeltisi 2: Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Sevikar® 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Film Tablet:

20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevikar® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu esnada ultrasonik banyonun sıcaklığının artmamasına dikkat edilir. Bu çözeltinin 2,0 ml'si alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve 1,0 mL iç standart çözeltisi 1'den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge HCT® 25 mg Hidroklorotiyazid + 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

25 mg Hidroklorotiyazid, 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge HCT® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve 1,0 mL iç standart çözeltisi 1'den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Sevikar HCT® 12,5 mg Hidroklorotiyazid+ 20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Film Tablet:

12,5 mg Hidroklorotiyazid, 20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevikar HCT® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen

olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml’lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml’si alınarak 20,0 ml’lik balon jojeye aktarılır ve 1,0 mL iç standart çözeltisi 1’den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge® 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml’lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml’si alınarak 20,0 ml’lik balon jojeye aktarılır ve 1,0 mL iç standart çözeltisi 1’den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Twynsta® 40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin Tablet:

40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Twynsta® tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml’lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml’si alınarak 20,0 ml’lik balon jojeye aktarılır ve 1,0 mL iç standart çözeltisi 2’den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

2.1.5.3. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı

Farmasötik dozaj formu içindeki yardımcı katkı maddelerinin etken maddelerin analizinde girişim etkisinin olup olmadığını belirlemek için ikili ve üçlü etken

maddelerin bulunduğu farmasötik dozaj formları üzerinde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla dozaj formuna ait stok çözeltinin bilinen sabit miktarının üzerine her birinden saf etken madde ilavesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan dozaj formuna eklenen saf olan madde miktarlarının hangi oranda tayin edildiği başka bir deyişle hangi oranda geri kazanıldığı hesaplanmıştır.

Sevikar® 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan medoksomil standardı ve 5,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevikar® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 2,0 mL stok standart çözeltisi 1'den ve 1,0 mL stok standart çözeltisi 2'den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge HCT® 25 mg Hidroklorotiyazid + 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı, 25,0 mg Hidroklorotiyazid standardı ve 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat

standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

25 mg Hidroklorotiyazid, 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge HCT® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 2,0 mL stok standart çözeltisi 1'den ve 1,0 mL stok standart çözeltisi 2'den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Sevikar HCT® 12,5 mg Hidroklorotiyazid+ 20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 40,0 mg Olmesartan medoksomil standardı, 25,0 mg Hidroklorotiyazid standard ve 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

12,5 mg Hidroklorotiyazid, 20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevikar HCT® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml'lik balon jojeye

alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 2,0 mL stok standart çözeltisi 1'den ve 1,0 mL stok standart çözeltisi 2'den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge® 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı ve 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Üzerine 2,0 mL stok standart çözeltisi 1'den ve 1,0 mL stok standart çözeltisi 2'den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Twynsta® 40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin Tablet:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı ve 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2 (İç standart): Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Twynsta® tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si alınarak 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve 1,0 mL iç standart çözeltisi 2'den eklenir. Hacmine çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

2.1.5.4. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı

Analizlerde kullanılmak üzere öncelikle pH 3,0 sulu çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti farklı oranlardaki asetonitril ve metanol organik çözücüleri ile karıştırılmıştır ve sisteme izokratik olarak verilmiştir.

pH 3,0 sulu çözelti: 1000 mL saf suyun pH değeri orto-fosforik aist ile $3.0 \pm 0,05$ 'e ayarlanır.

Hareketli Faz 1: pH 3,0 sulu çözelti: MeOH (50:50, h\h)

Hareketli Faz 2: pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (35:25:40, h\h\h)

Hareketli Faz 3: pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (35:45:20, h\h\h)

Hareketli Faz 4: pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (40:20:40) (h\h\h)

Optimize edilen YPSK-FDD metodunda hareketli faz 4 kullanılmıştır.

2.1.6. Kütle-Kütle Spektrometre Dedektör Kullanılan Sıvı Kromatografi Yöntemi

2.1.6.1. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tez kapsamında kullanılan ikili ve üçlü karışımlara ait standart çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Hassas analitik terazi ile tartım sonucu her bir madde MeOH'de çözülerek stok standart çözeltileri oluşturulmuştur. Sonrasında tüm seyreltmeler çözücü olarak belirtilen tampon çözelti: asetonitril (60/40, h\h) karışımıyla hacimlerine tamamlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltiler 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılmıştır.

Tampon Çözelti: Yaklaşık 0.63 g Amonyum Format 1000.0 mL su ile çözülür. Üzerine 1,0 mL formik asit eklenerek karıştırılır.

20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan medoksomil standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%60'lık doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 3,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%80'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 4,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%100'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 5,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 10,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%300'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 15,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%400'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 20,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

25 mg Hidroklorotiyazid, 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Tablet İçin Standart çözeltilerin hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3: Yaklaşık 25,0 mg Hidroklorotiyazid standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 4 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si 200,0 mL balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%60'lık doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 3,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%80'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 4,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%100'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 5,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 10,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%300'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 15,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%400'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 20,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

12,5 mg Hidroklorotiyazid, 20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan medoksomil standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3: Yaklaşık 25,0 mg Hidroklorotiyazid standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 4 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si 200,0 mL balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%60'lık doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 3,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%80'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 4,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%100'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 5,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 10,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%300'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 15,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%400'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1, 2 ve 3'ten 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 20,0 ml'si ile stok standart çözelti 4'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3 (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si 200,0 mL balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%60'lık doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 3,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%80'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 4,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%100'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 5,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 10,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%300'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 15,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%400'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 20,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin Tablet İçin Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

Stok standart çözelti 1: Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 2: Yaklaşık 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Stok standart çözelti 3 (İç standart): Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si 200,0 mL balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%60'lık doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 3,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%80'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 4,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%100'lik doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 5,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%200'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 10,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%300'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 15,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

%400'lük doğrusallık standardı: 2'şer mL stok standart çözelti 1 ve 2'den 200,0 ml'lik balon jojeye alınarak hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu çözeltinin 20,0 ml'si ile stok standart çözelti 3'ün 5,0 ml'si 50,0 ml'lik balon jojeye konulur. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

2.1.6.2. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanışı

Optimize edilen SK-K/KS (LC-MS/MS) metodu ile piyasa preparatları analizlerinde miktar tayinlerini belirlemek için her bir tabletten çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerdeki etken madde miktarları her bir preparatın kendine ait standart çözelti kalibrasyonlarıyla hesaplanmıştır.

Tampon Çözelti: Yaklaşık 0.63 g amonyum format 1000.0 mL su ile çözülür. Üzerine 1,0 mL formik asit eklenerek karıştırılır.

Çözücü: Tampon çözelti: Asetonitril (60/40, h\h) karışımıyla hacimlerine tamamlanmıştır.

İç standart çözeltisi 1: Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

İç standart çözeltisi 2: Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır.

Sevikar® 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Film Tablet:

20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevikar® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu esnada ultrasonik banyonun sıcaklığının artmamasına dikkat edilir. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Hazırlanan son çözeltinin 5,0 ml'si ile 5,0 mL iç standart çözeltisi 1 50,0 ml'lik balon jojeye alınır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge HCT® 25 mg Hidroklorotiyazid + 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

25 mg Hidroklorotiyazid, 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge HCT® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu esnada ultrasonik banyonun sıcaklığının artmamasına dikkat edilir. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Hazırlanan son çözeltinin 5,0 ml'si ile 5,0 mL iç standart çözeltisi 1 50,0 ml'lik balon jojeye alınır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Sevikar HCT® 12,5 mg Hidroklorotiyazid+ 20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Film Tablet:

12,5 mg Hidroklorotiyazid, 20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevikar HCT® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu esnada ultrasonik banyonun sıcaklığının artmamasına dikkat edilir. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Hazırlanan son çözeltinin 5,0 ml'si ile 5,0 mL iç standart çözeltisi 1 50,0 ml'lik balon jojeye alınır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge® 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge® film kaplı tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu esnada ultrasonik banyonun sıcaklığının artmamasına dikkat edilir. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Hazırlanan son çözeltinin 5,0 ml'si ile 5,0 mL iç standart çözeltisi 1 50,0 ml'lik balon jojeye alınır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Twynsta® 40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin Tablet:

40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Twynsta® tablet tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu esnada ultrasonik banyonun sıcaklığının artmamasına dikkat edilir. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Hazırlanan son çözeltinin 5,0 ml'si ile 5,0 mL iç standart çözeltisi 2 50,0 ml'lik balon jojeye alınır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

2.1.6.3. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı

Farmasötik dozaj formu içindeki yardımcı katkı maddelerinin etken maddelerin analizinde girişim etkisinin olup olmadığını belirlemek için ikili ve üçlü etken maddelerin bulunduğu farmasötik dozaj formları üzerinde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla dozaj formuna ait stok çözeltinin bilinen sabit miktarının üzerine her birinden saf olan etken madde ilavesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan dozaj formuna eklenen saf madde miktarlarının hangi oranda tayin edildiği başka bir deyişle hangi oranda geri kazanıldığı hesaplanmıştır.

Sevikar® 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevika® film kaplı tablet hassas olarak tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Üzerine yaklaşık 20,0 mg Olmesartan medoksomil standardı ve 5,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı tartılarak aynı balon joje içerisine aktarılır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu son çözeltiden de 5,0 mL alınarak 50,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve üzerine 5,0 mL stok standart çözeltisi eklenir. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge HCT® 25 mg Hidroklorotiyazid + 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

25 mg Hidroklorotiyazid, 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge HCT® film kaplı tablet hassas olarak tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Üzerine yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı 25,0 mg Hidroklorotiyazid standardı ve 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı tartılarak aynı balon joje içerisine aktarılır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu son çözeltiden de 5,0 mL alınarak 50,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve üzerine 5,0 mL stok standart çözeltisi eklenir. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Sevikar HCT® 12,5 mg Hidroklorotiyazid+ 20 mg Olmesartan ve 5 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

12,5 mg Hidroklorotiyazid, 20 mg Olmesartan medoksomil ve 5 mg Amlodipin içeren 5 adet Sevikar HCT® film kaplı tablet hassas olarak tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Üzerine Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan medoksomil standardı, 12,5 mg Hidroklorotiyazid standardı ve 5,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı tartılarak aynı balon joje içerisine aktarılır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu son çözeltiden de 5,0 mL alınarak 50,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve üzerine 5,0 mL stok standart çözeltisi eklenir. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Exforge® 160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin Film Tablet:

Stok standart çözelti (İç standart): Yaklaşık 40,0 mg Telmisartan standardı 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

160 mg Valsartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Exforge® film kaplı tablet hassas olarak tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Üzerine Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı ve 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı tartılarak aynı balon joje içerisine aktarılır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu son çözeltiden de 5,0 mL alınarak 50,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve üzerine 5,0 mL stok standart çözeltisi eklenir. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

Twynsta® 40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin Tablet:

Stok standart çözelti (İç standart): Yaklaşık 20,0 mg Olmesartan standardı 100,0 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar MeOH ile ultrasonik su banyosunda çözülerek hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücüsü ile tamamlanır.

40 mg Telmisartan ve 10 mg Amlodipin içeren 5 adet Twynsta® tablet hassas olarak tartılır ve havanda toz edilir. Homojen olan bu toz karışımdan bir tablete eşdeğer miktar tartılır ve 200,0 ml'lik balon jojeye alınır. Üzerine Yaklaşık 160,0 mg Valsartan standardı ve 10,0 mg Amlodipin'e eşdeğer Amlodipin besilat standardı tartılarak aynı balon joje içerisine aktarılır. Bir miktar MeOH eklenir, ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca çözünmesi sağlanır ve hacmine MeOH ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 200,0 ml'lik balon jojeye aktarılır. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır. Bu son çözeltiden de 5,0 mL alınarak 50,0 ml'lik balon jojeye aktarılır ve üzerine 5,0 mL stok standart çözeltisi eklenir. Hacmine çözücüsü ile tamamlanır ve karıştırılır. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek enjeksiyon yapılır.

2.1.6.4. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı

Analizlerde kullanılmak üzere öncelikle amonyum format çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti farklı oranlardaki asetonytril organik çözücüsü ile karıştırılmıştır ve sisteme farklı oranlarda izokratik olarak verilmiştir.

Hareketli Faz A: Yaklaşık 0.63 g amonyum format 1000.0 mL su ile çözülür. Üzerine 1 mL formik asit eklenerek karıştırılır.

Hareketli Faz B: Asetonytril

Hareketli Faz 1: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (80:20, h\h)

Hareketli Faz 2: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (40:60, h\h)

Hareketli Faz 3: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (50:50, h\h)

Hareketli Faz 4: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h)

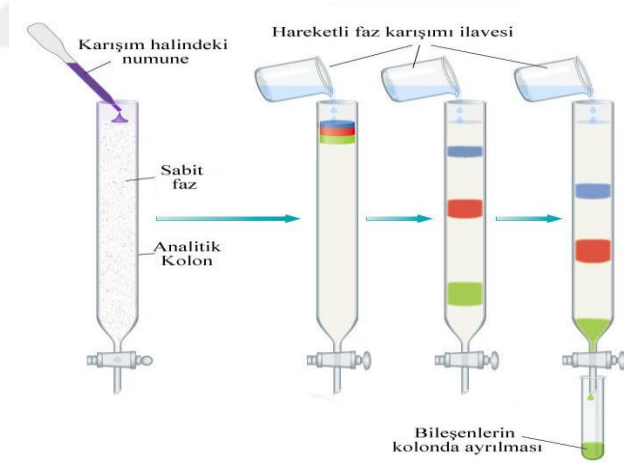
Optimize edilen SK-K/KS (LC-MS/MS) metodunda akış gradient ile birlikte hareketli faz 4 kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kromatografi

Kromatografi terimi bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbiri ile karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, saflaştırılması, teşhisi ve tayini işlemlerinin genel adıdır.

Kromatografi yöntemi ilk defa Rus botanikçi olan Mikhail Tswett geliştirmiştir. Tsweet bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanmıştır. Kullandığı kolonda renkli bantlar oluştuğunu gözlemiştir. Renkli bantların oluşmasından dolayı renk anlamına gelen ‘chroma’ ve yazma anlamına gelen ‘graphein’ kelimeleri ile yöntem kromatografi adını almıştır (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992 ve Gümüştas, 2009).



Şekil 2.1. Kromatografik ayırımların temeli (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992 ve Gümüştas, 2009).

Kromatografik ayırımlarda analizi yapılacak madde veya maddeler; sıvı, gaz ya da süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınır. Hareketli faz, katı yüzey veya kolonda sabitlenmiş ve hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinden geçirilir. Bu fazların seçimlerinde, bileşenlerin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılması veya çözünmesi temel alınır. Numune içindeki bileşenler ile sabit

fazın arasında bir takım fiziksel ve kimyasal etkileşimler olmaktadır. Bu etkileşimlere örnek olarak elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler, hidrojen bağı oluşumu ve çözünürlük gibi etkileşimler verilebilmektedir (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992 ve Gümüştas, 2009).

2.2.2. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Bugün onlarca temel kromatografi yöntemlerinden başka hemen her gün yeni katılımlarla kromatografik yöntem sayısı artmaktadır. Bu nedenle tek bir sınıflandırma ile kromatografik yöntemleri sıralamak gerçekçi olmayacaktır. Çeşitli kromatografi kitaplarında kromatografik yöntemler farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırmalarda değişik kriterler temel alınmaktadır (Demirci ve ark., 2009).

Sınıflandırmalarda alınan kriterler:

- Kromatografik ortamın fiziksel şekli
- Örneğin kromatografik ortama veriliş biçimi
- Kromatografik ayırım mekanizması
- İki fazın polarlık durumları
- İki fazın fiziksel durumu

Çizelge 2.5. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Ortamin Fiziksel Durumuna Göre	Kolon Kromatografisi
	Düzlem Kromatografisi
Örneğin Kromatografik Ortama Veriliş Şekline Göre	Öncül (Frontal)
	Yer Değiştirme (Displacement)
	Sürüklenme ile Yürütme (Elusyon)
Ayırım Mekanizmasına Göre	Dağılma (Partisyon) Kromatografisi
	Dışa Soğurma (Adsorpsiyon) Kromatografisi
	İyon Değiştirme Kromatografisi
	İyon-Çifti Kromatografisi
	Molekül Seçme (Jel Filtrasyon) Kromatografisi
	İlgi (Affinite) Kromatografisi
İki Fazın Polarlık Durumuna Göre	Normal Faz Kromatografisi
	Ters Faz Kromatografisi
	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
Fazların Fiziksel Şekline Göre	Gaz Kromatografisi
	*Gaz-Sıvı Kromatografisi
	*Gaz-Katı Kromatografisi
	Sıvı Kromatografisi
	*Sıvı-Sıvı Kromatografisi
	*Sıvı-Katı Kromatografisi
	*İyon Değiştirme Kromatografisi
	*Molekül Seçme Kromatografisi
	Süperkritik Akışkan Kromatografisi

2.2.2.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bu kromatografi çeşidi bir sıvı/gaz-katı kromatografisidir. Bu yöntem örnek bileşenlerinin sabit faz yüzeyine tutunma özelliğine dayanır. Adsorpsiyon esnasında çözücü içerisindeki maddeler desorbe veya adsorbe olabilmektedir. Desorpsiyon ve adsorpsiyon hızlarının farkı toplam adsorpsiyon hızı şeklinde tanımlanmaktadır ve desorpsiyon ve adsorpsiyon hızları birbirine eşit olduğunda sistem denge haline gelmektedir. Sistem dengede iken madde kolon boyunca sabit bir hızla ilerlemektedir. Bir A çözüneninin sabit faz ile hareketli faz arasındaki kütle aktarımı aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir.

$$A_{Hareketli\ Faz} = A_{Sabit\ Faz} \quad (\text{Eşitlik 2.1.})$$

Çözünenin adsorpsiyon katsayısı veya dağılma katsayısı (K); maddelerin sabit fazdaki molar derişimlerinin (C_1), maddenin hareketli fazdaki derişimlerine (C_2) oranıyla tanımlanmaktadır.

$$K = \frac{C_1}{C_2} \quad (\text{Eşitlik 2.2.})$$

K değeri çok büyük ise, karışım içindeki madde sabit faz tarafından daha iyi tutunmaktadır ve K değeri daha düşük olan maddelere göre kolon boyunca daha yavaş ilerlemektedir. K değeri küçükse madde hareketli faza daha ilgilidir bu yüzden madde kolon boyunca daha hızlı ilerlemektedir (Skoog ve ark., 2013; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştas, 2009).

2.2.2.2. Dağılma Kromatografisi

Sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinen dağılma kromatografisinin temeli ise maddelerin birbiri ile karışmayan iki sıvı faz arasında dağılması ilkesine dayanır. Sıvı fazlardan biri katı bir yüzey üzerindeki kolon dolgu maddesinin üzerine tutturulmuş ince bir sıvı film tabakası olan sabit faz iken, diğeri hareketli fazdır. Karışım da bulunan maddenin sabit fazda bir miktar çözünmesi gerçekleşmektedir. Dağılma kromatografisinde, karışım da bulunan maddenin sabit faz içerisindeki çözünürlüğü fazla iken hareketli faz içerisindeki çözünürlüğü ise az olmalıdır. Aksi takdirde maddelerin ayırımı tam olarak gerçekleşemez ve hareketli faza olan ilgilerinden dolayı kolondan dışarı atılırlar. Ayrıca hem sabit faz hem de hareketli faz farklı polariteye sahip oldukları için örnek moleküllerinin çözünürlükleri de farklıdır denebilir (Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştas, 2009; Fanali ve ark., 2013).

2.2.2.3. Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisi sabit fazın hareketli faza göre daha polar olduğu kromatografi türüdür. Hareketli faz bileşeni olarak genellikle hekzan, metilen klorür, dietil eter ve kloroform gibi apolar çözücüler kullanılmaktadır. Bu kromatografi türünde en çok tercih edilen sabit fazlar; alümina ve silikadır. Normal ve ters faz sıvı kromatografilerindeki farklılıkları Tablo-2-2’de özetlenmiştir (Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988 ve Skoog ve ark., 1998).

Çizelge 2.6. Ters ve Normal faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması

	Normal Faz	Ters Faz
Sabit Fazın Polaritesi	Yüksek	Düşük
Hareketli Fazın polaritesi	Düşükten Ortaya	Ortadan Yüksekçe
Alıkonma Sırası	En az polar önce	En polar önce
Hareketli Faz Polarite Artışının Etkisi	Elüsyon zamanını azaltır	Elüsyon zamanını artırır

İlaçlar genellikle apolar yapıdadırlar. Bu yüzden ilaç analizlerinde ters faz sıvı kromatografisi yöntemi normal faz sıvı kromatografisi yöntemine oranla daha fazla tercih edilmektedir. Ayrıca kromatografik ayırimda etkili olan solvofobik olaylar, hareketli faz bileşeni olarak kullanılan organik çözücülerin ucuz olması, analizlerde sulu tampon çözeltilerin oranlarının yüksek tutulabilmesi gibi nedenlerden ötürü de ters faz sıvı kromatografisi daha çok kullanılmaktadır (Gümüştas., 2009).

2.2.2.4. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Hareketli fazın polaritesinin sabit fazın polaritesine göre daha fazla polar olduğu kromatografi türü ters faz sıvı kromatografisidir. Ters faz sıvı kromatografisinde kimyasal olarak bağlanan fonksiyonel gruplara sahip sabit fazlar (karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan yani ODS-18) sıkça kullanılmaktadır. Bu kolonlar ile birlikte fonksiyonel grup anlamında daha kısa zincirli olan (C₈, C₂ gibi), fenil ve siyano (CN) bağlı sabit fazlarda kullanılmaktadır.

Hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltiler de ters faz sıvı kromatografisinde son derece önemlidir. Tampon çözeltiler hazırlanırken kullanılan su oldukça saf olmalıdır. Hareketli fazın bir diğer önemli bileşeni ise, su ile karışan organik çözücülerdir. Hareketli fazlarda su, MeOH veya asetonitril gibi organik çözücüler kullanılır.

Ters faz sıvı kromatografisi çoğunlukla apolar maddelerin ayırımı için tercih edilmektedir. Uzun alkil zincirine sahip olan sabit fazlar (C₁₈) daha apolar maddelerin ayrılmasında kullanılırken, kısa alkil zincirli olan sabit fazlar (C₈, C₂) ise polar olan maddelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Sonuç olarak polar olan maddeler uzun alkil zincirine sahip sabit fazda daha az tutunuyorken, apolar maddeler de kısa alkil zincirlerine sahip sabit fazda daha az tutunmaktadırlar (Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988; Fanali ve ark., 2013; Gümüştas, 2009).

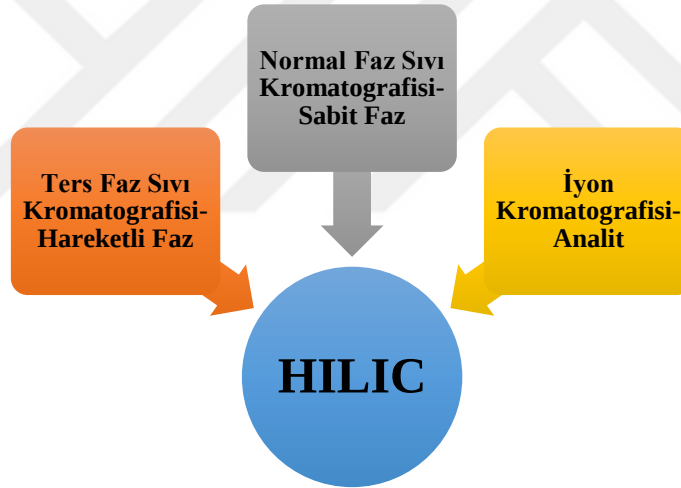
2.2.2.5. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (HILIC)

1970'lerden bu yana, bir ayırma tekniği olarak YPSK'nın kullanılması analitik bilimlerde önemli ilerlemeler sağlamıştır. Polar hareketli fazlarla apolar sabit fazları kullanarak yapılan ters faz ayırımı, bu kromatografik tekniğin uygulanmasını büyük ölçüde arttırmıştır. Günümüzde YPSK ayırımlarının yaklaşık % 70'i ters faz sıvı kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirilmektedir.

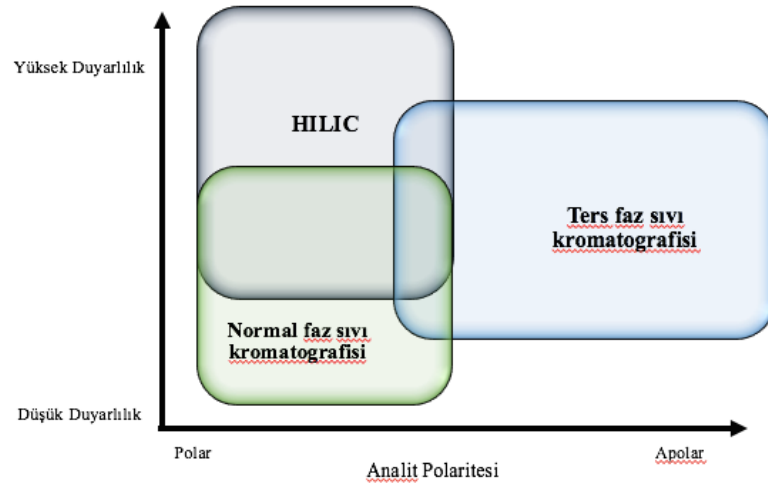
Ters faz sıvı kromatografisi yönteminin bu kadar çok kullanılmasının nedenleri birçok madde ve bileşikte geniş uygulanabilirliği ve yeni sabit fazların sürekli geliştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Fakat ters faz yöntemindeki hala bazı dezavantajları vardır. Yüksek polariteye sahip olan bileşikler ve bazik bileşiklerin analizi YPSK'nın başlangıcından beri sorun teşkil etmektedir. Birçok polar bileşiği, analiz etmek çok zordur, çünkü en inert kolonlar kullanılsa dahi, yüksek konsantrasyonlarda sulu tampon çözeltilere ihtiyaç duyarlar ve analizler düzgün olmayan pik şekilleri ile sonuçlanır.

Bir diğ er ayırma yöntemi olan normal faz sıvı kromatografide, polar bileşikleri analiz ederken asimetrik pikler meydana gelmektedir ve analiz sonuçlarında istenilen verimler alınamaz.

Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-’HILIC’) polar bileşiklerin analizi için son yıllarda daha da gelişen alternatif bir yöntemdir. HILIC, normal faz yönteminde kullanılan sabit fazlar ile ters faz yönteminde kullanılan hareketli fazların kombine edildiği bir yöntem olarak tanımlanabilir. Bu nedenle, HILIC’in tipik uygulamalarında, saf veya kimyasal olarak modifiye edilmiş silika veya polar polimerler gibi sabit fazlar kullanılırken ,% 30’a kadar su içeren asetonitril, MeOH gibi polar organik       lerin kullanıldığı hareketli fazlar kullanılır (Gama ve ark., 2012).

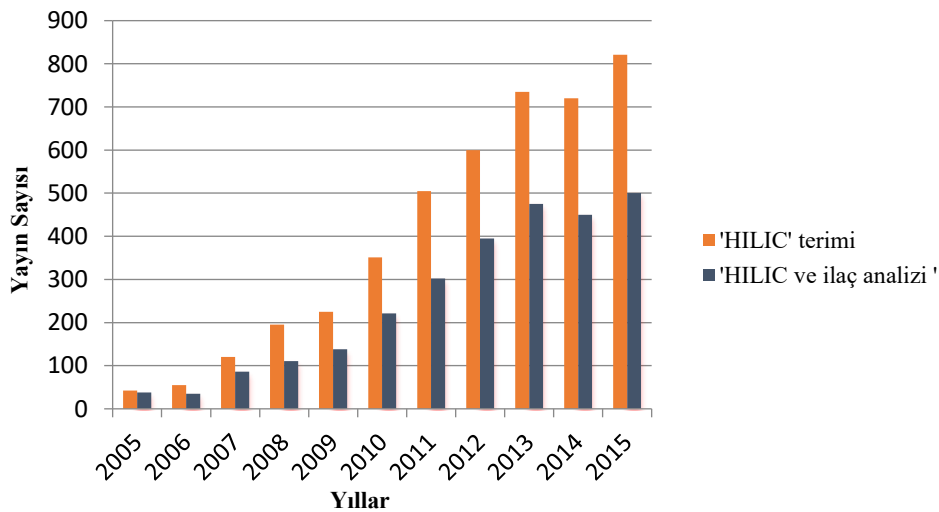


şekil 2.2. Farklı yöntemler ile HILIC’in kombinasyonu (Buszewski ve ark., 2012)



Şekil 2.3. Normal faz ve ters faz yöntemlerinin tamamlayıcısı HILIC (Adams ve ark., 2014)

HILIC'in uygulamaları, ilaçların gelişimine katkıda bulunan maddelerin (örn., biyolojik belirteçler, nükleozidler, insan ve bitkisel metabolitler, farmasötik maddeler, proteinler vs.) ve diğer bir çok maddenin ayrılmasını içerir. HILIC uygulamalarında görülen artış, kimya, moleküler biyokimya, metabolomik ve diğer alanlarda bu konuyla ilgili yayınların artmasıyla anlaşılmıştır ve HILIC'in ayırma yöntemi olarak özellikle 2000'li yılların sonlarına doğru araştırmacılar tarafından giderek daha çok benimsendiği anlaşılmıştır.

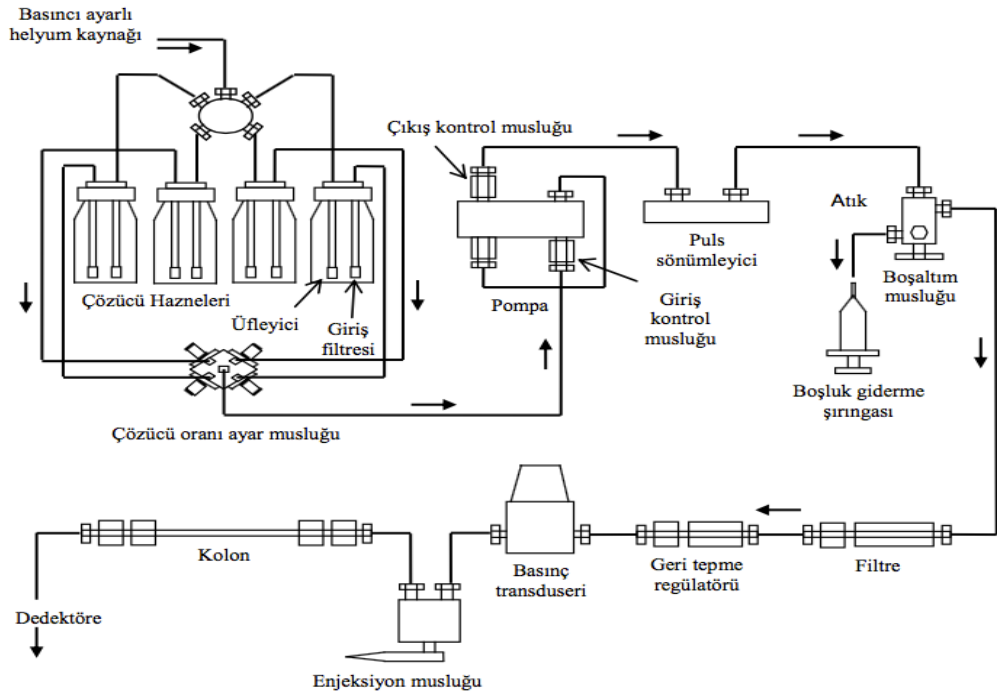


Şekil 2.4. Scopus endeksli 'HILIC' ile 'HILIC ve ilaç analizleri' terimleri için toplam yayın sayısı

2.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Bir sabit faz üzerinden hareketli faz geçirilerek, bir numunedeki bileşenlerin dağılma ve adsorpsiyon gibi mekanizmalar yoluyla farklı zaman süreçlerinde taşınma ve ayrılması işlemidir.

Sıvı kromatografisi ilk kullanılmaya başlandığı zamanlarda, bir kolona doldurulan tanecikler üzerine numune ve daha sonra sıvı elüent ilave edilip sıvının yukarıdan aşağıya akması beklenir ve bu oldukça uzun zaman alırdı. Gelişen cihaz teknolojisi ile çok daha küçük tanecikleri içeren kolonlar hazırlanarak tabaka sayıları iyileştirilmiş ve kolona basınç uygulanarak akış hızı arttırılmıştır. Bu şekilde elde edilen sıvı kromatografi sistemlerine arttırılmış performanslarından dolayı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilmiştir. YPSK, sağladığı yüksek doğruluk, kesinlik ve hassaslığı ve uçucu olmayan türler için de kullanılabilmesi nedeniyle en çok tercih edilen enstrumantal kromatografi türüdür. Bir YPSK cihazına ait başlıca bileşenler Şekil 2.5’da basit haliyle gösterilmiştir. (Skoog ve ark. 1998).



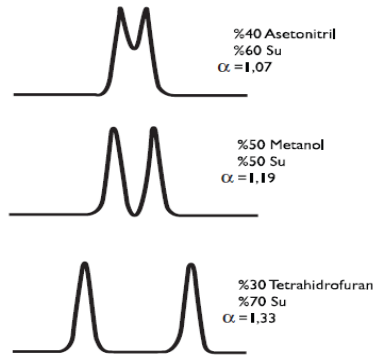
Şekil 2.5. YPSK cihazının şematik gösterimi (Perkin- Elmer Corporation, Norwalk).

2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri

Bir YPSK analizinin başarısı büyük oranda doğru çözücü sisteminin belirlenmesine bağlıdır.

- Kaynama noktaları çözücünün uzaklaştırılabilmesi için yüksek olmamalıdır,
- Kolon içerisinde yüksek basınç oluşmamasını için viskozite düşük olmalıdır,
- Kullanılan dedektörle uyumlu olmalıdır, analizi yapılacak numunenin sinyalini engellememelidir.
- Mümkün olduğunca güvenli bir kimyasal olmalı, toksisitesi düşük olmalıdır.

YPSK’da hareketli faz olarak genellikle iki veya daha fazla çözücüden oluşan bir karışım kullanılır. Bu karışımlarda da sıklıkla belli oranlarda suyu zayıf çözücü olarak ve tetrahidrofuran, metanol ve asetonitril kuvvetli çözücü olarak da gibi organik çözücüler seçilir. Seçicilik parametresinde, bu çözücü oranları ya da bileşimi değiştirilerek kolaylıkla iyileştirilebilir. Şekil 2.6’da bir karışımın aynı kolonda üç farklı polaritede çözücü kullanılarak yapılan analizinde üç farklı kromatogram elde edildiği görülmektedir. Seçicilik değerlerindeki bu farklılık kullanılan çözücüye göre çözücü ve molekül arasında oluşan hidrojen bağlanmaları, dipol-dipol etkileşimleri gibi moleküller arası etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. %40 asetonitril ve %60 sudan oluşan bir çözücü karışımında pikler tam ayrılmazken, %30 tetrahidrofuran ve %70 su karışımının oluşturduğu bir çözücü kullanıldığında ise pik ayrımı tam olarak gerçekleşmektedir.



Şekil 2.6. Farklı polaritede çözümler kullanılarak yapılan örnek analiz

Bazı çok bileşenli numunelerde, analiz boyunca aynı çözücü bileşimi kullanıldığında bazı elüsyon problemleri ortaya çıkabilir. Bazı bileşenler kolonda az tutunur, bazıları ise fazla tutunabilir. Bu tip sorunlar, analiz sırasında hareketli faz bileşiminin bir çözücü programlaması ile değiştirilmesi ile çözülebilir. Sıvı kromatografisinde bu şekilde yapılan elüsyonlara gradient elüsyon, analiz boyunca sabit bileşimli bir elüentin kullanılmasıyla yapılan elüsyona ise isokrotik elüsyon denir. Sıvı kromatografisinde yapılan gradient elüsyonun mantığı gaz kromatografisinde yapılan sıcaklık programlaması ile benzerdir. (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.2. Pompalama Sistemleri

Bir YPSK pompalama sistemi için gerekli şartlar oldukça sıkıdır ve şunları içermektedir:

- 400 atm'e kadar basınç üretimi,
- Puls içermeyen basınç çıkışı,
- 0,1-10 mL dakika⁻¹ aralığında akış hızları,
- % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
- Korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık).

YPSK sistemlerinde her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa kullanılmaktadır.

Bunlar;

- Pistonlu pompalar,
- Şırınga veya sürgülü pompalar
- Pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır.

Pistonlu pompalar, ticari olarak satılan YPSK sistemlerinin yaklaşık %90'ında kullanılmaktadır. Bu pompalar motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sürgülü pompalar ise bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan oluşmaktadır.

Pompalama sistemlerinin bir parçası olarak birçok ticari cihaz, bilgisayar ile kontrol edilebilen, pompanın çıkış kısmında geri itme tıkaçı boyunca basınç düşmesini belirleyen akış hızı ölçümü yapabilen sisteme sahiptir. Sinyalin önceden ayarlanmış değerindeki herhangi bir değişme, pompanın motorunun hızını artırmakta veya azaltmakta kullanılır. Birçok cihaz, çözücülerin karışımını ya sürekli veya basamaklı olarak değiştirebilen bir sistemi içerir. Örneğin; Şekil 2.5.'de görülen cihaz, ön program ile ve dört tane çözücüü sürekli değişen oranlarda karıştırabilen bir oranlama musluğu içermektedir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Çoğu zaman, sıvı kromatografisinde ölçümlerin kesinliğinin belirleyici faktörü, numunenin kolon dolgu maddesine sevkini tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklemesi yapılan kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkilemektedir. Bu yüzden, numune enjeksiyonun hacmi, mikrolitrenin birkaç ondalığından belki 500

μL 'ye kadar oldukça küçük olmalıdır. Dahası, sistemin basıncını düşürmeksizin numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

Sıvı kromatografide numune enjeksiyonu için en yaygın kullanılan yöntem numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Bu tipteki numune alma halkaları, 7000 psi basınca kadar, binde birkaç bağıl hata verecek kesinlikle numunenin kolona uygulanabilmesini sağlamaktadır. Hacmi 0.5-5 μL arasında olan halkaları bulunan mikro numune enjeksiyon muslukları da mevcuttur (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4. Sıvı Kromatografi Kolonları

Sıvı kromatografisi sistemlerinde paslanmaz çelik borulardan ve düzgün iç çaplı olarak yapılmış veya nadiren kalın cidarlı cam borulardan yapılan kolonlar kullanılmaktadır.

2.2.3.4.1. Analitik Kolonlar

YPSK'de kullanılan kolonların büyük çoğunluğu boyu 10-30 cm arasında değişmektedir. Kolonlarının iç çapları genellikle 4-10 mm; yaygın olarak kullanılan kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklüğü ise 5-10 μm arasındır. Günümüzde belki de en çok, 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 μm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Bu tip kolonlar 40000-60000 teorik plaka metre^{-1} içerirler.

Son yıllarda, üreticiler daha küçük boyutlarda, yüksek Performanslı kolonlar üretmektedirler. Bu gibi kolonların iç çapları 1-4,6 mm ve 1,7-5 μm tanecik büyüklüğündeki dolgu maddesine sahip olabilir. Çoğu zaman boyları 3-7,5 cm kadar kısadır. Bu gibi kolonlar 100000 teorik plaka metre^{-1} içerirler. Ayrıca hız ve minimum çözücü sarfıyatı avantajları vardır. Son özellik oldukça önemlidir, çünkü sıvı

kromatografi için gerekli olan yüksek saflıktaki çözücüler, temin edilmesi ve daha sonra atılması oldukça pahalıya mal olan çözücülerdir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4.2. Koruyucu Kolonlar

YPSK sistemlerinde kullanılan analitik kolonların kullanım ömürlerini artırmak için, analitik kolonlardan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kısa kolonların görevi, sadece partikül halde bulunan maddeleri ve çözücü içerisindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. İlave olarak, sıvı kromatografide kullanılan koruyucu kolonlar, hareketli fazı sabit faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesine yardımcı olur. Aynı sistem kullanılan koruyucu kolon dolgu maddesindeki bileşim ile analitik kolondaki çok benzer olmalıdır; bununla beraber, basınç düşmesini en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür. Koruyucu kolonlar kirlendiği an tekrardan yeni dolgu maddesiyle doldurulmalı ya da aynı tipteki yeni bir koruyucu kolon ile değiştirilmelidir. Böylece, daha pahalı olan analitik kolonu korumak için emniyet kolonu feda edilmektedir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4.3. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

Sıvı kromatografisinde temelde iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar,

- Film dolgular
- Gözenekli dolgulardır.

Film dolgular, küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerinde oluşurlar. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film

kaplanmıştır. Bazı uygulamalar için, bu yüzeye, absorpsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, sabit bir faz olarak ilave bir katman halinde kaplanır. Alternatif olarak, organik bir yüzey katman oluşturmak üzere kimyasal işleme tabi tutulabilir. Günümüzde, taneler, zarlı dolgular daha çok koruyucu kolonlarda kullanılmakta, analitik kolonlarda kullanılmamaktadır.

Belli boyutlardaki bir partikül için, partikül boyutu aralığını en aza indirmek için, her türlü gayret sarfedilmektedir. Partiküller, silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın olarak kullanılan bir dolgu maddesidir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.5. Dedektörler

Dedektörler, elektromanyetik dalga formundaki enerji akışını ölçülebilir niceliklere çeviren ve kayıt edilmesini sağlayan cihazlardır. Sıvı kromatografi için ideal bir dedektör aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

- Yeterli derecede duyarlılık
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik
- Geniş bir doğrusal çalışma aralığı
- Akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı
- Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı
- Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacimde olmalıdır.

Sıvı kromatografi sistemlerinde kullanılan dedektörler temel olarak iki tiptir (Skoog ve ark., 1998).

- Yığın özelliği dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi analit tarafından değiştirilen yığın özelliklere cevap veren dedektörlerdir.

- Analit özelliği dedektörleri, analitin UV absorbansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

Analit özelliği yani maddeye yönelik dedektörler hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir (Skoog ve ark., 1998):

- Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared)
- Elektrokimyasal dedektörler
- Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
- Radyoaktivite dedektörleri
- Kütle spektrometreleri

Yığın özelliği yani çözeltiye yönelik dedektörler; örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (Skoog ve ark., 1998):

- Refraktif indeks dedektörleri
- Dielektrik sabiti dedektörleri
- İletkenlik dedektörleri
- Yoğunluk dedektörleri

Tez kapsamındaki çalışmalarda Fotodiyot dizi dedektör kullanıldığından bu dedektör için bilgiler verilmiştir.

2.2.3.5.1. UV /GB Dedektör

UV absorpsiyon dedektörleri, ışığı 180 ila 350 nm arasında absorbe eden maddelere cevap verirler. Maddelerin sahip olduğu bir veya daha fazla çift bağ (π elektron) ve bağlanmamış elektronlar dahil olmak üzere çok sayıda madde bu dalga

boyu aralığında ışığı absorbe eder. Dedektör normalde 2 µl ve 5 µl arasında bir kapasiteye sahip kısa bir silindirik hücreden oluşur. UV ışığı da bu hücreden geçer ve bir foto-elektrik üzerine düşer. Hücreden geçen UV ışığı daha sonra uygun bir sinyal değiştirici amplifikatöre oradan da bir kayıt cihazına veya veri toplama sistemine gider.

Bir hücreden (IT) iletilen UV ışığının yoğunluğu ve konsantrasyon arasındaki ilişki (c) Beer'in Yasası tarafından verilir.

$$I_T = I_0 e^{-kcl}$$

$$\ln(I_T) = \ln(I_0) - kcl$$

(I₀) hücreye giren ışığın yoğunluğu

(l) hücrenin yol uzunluğu

(k) çözünenin molar sönüm katsayısı

UV dedektörler ile çözücülerin önemli ölçüde adsorblanmamasını sağlayan gradient elüsyon ile kullanılabilir. Ters faz kromatografisinde kullanılan çözücüler genellikle su, metanol, asetonitril ve tetrahidrofurandır.

Herhangi bir kimyasal bileşik elektromanyetik alanla etkileşime girebilir. Dedektör akış hücresinden geçen elektromanyetik radyasyonun ışını, bu etkileşime bağlı olarak yoğunluğunda bir miktar değişiklik yaşayacaktır. Bu değişikliklerin ölçümü, YPSK dedektörlerinin temelidir.

Radyasyon absorpsiyonu radyasyon dalga boyuna ve kimyasal bileşiğin fonksiyonel gruplarına bağlıdır. Elektromanyetik alanın enerjisine (frekansına) bağlı olarak uyarılmasıyla elektronlarla etkileşime girebilir ve daha yüksek enerjili düzeye aktarılabilir ya da fonksiyonel grubun titreşimine veya rotasyonuna neden olan moleküler bağları harekete geçirebilir. Kirişin yoğunluğu, akış hücresinden geçerken olası geçişlere karşılık gelen enerjiyi azaltacaktır. Lambert-Bear yasasına göre radyasyonun absorpsiyonu hücredeki bileşik konsantrasyonuna ve hücrenin uzunluğuyla orantılıdır (Raymond P.W. Scott, 1996).

Elektromanyetik spektrum geleneksel olarak birkaç bölgeye ayrılmıştır:

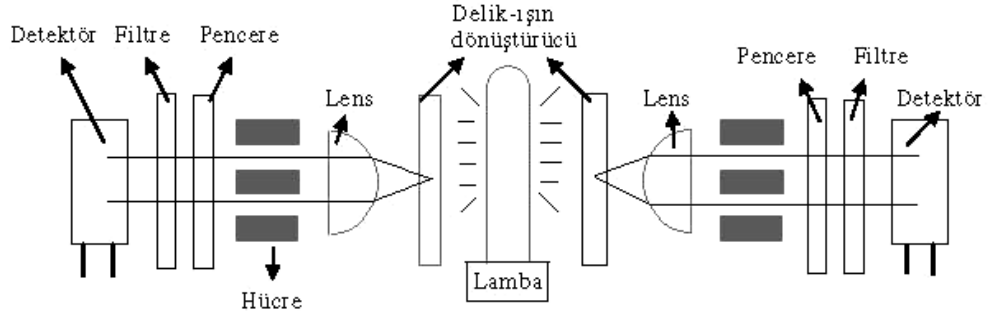
Kızılötesi (IR)	2,500 - 50.000 nm
Yakın kızılötesi	800 - 2.500 nm
Görünür	400 - 800 nm
Ultraviyole (UV)	190 - 400 nm

Spektroskopide üç ana bölge (IR, görünür ve UV) kullanılmaktadır. Sıvı kromatografisinde ise IR spektrofotometreler sadece sınırlı kullanılmaktadır. Öte yandan, (200 - 600 nm) aralığında çalışan spektrofotometreler, sıvı kromatografisi dedektörleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Elektromanyetik radyasyonun UV ve görünür bölgesi, pi-elektronlar veya bazı fonksiyonel grupların çiftleştirilmemiş elektronları gibi nispeten düşük enerji seviyesindeki elektronlarının uyarılmasına karşılık gelir. Örneğin, n-alkanlar UV bölgesinde 180 nm'nin altında absorbe olabilir. Elektronlar, radyasyonun emilimini göstermek için yüksek enerji radyasyonu gerek duyar. Ancak benzen halkasına sahip olan herhangi bir bileşik, 205-225 ve 245-265 nm'de absorbans gösterecektir.

Organik bileşiklerin çoğu UV / VIS dedektörleri ile analiz edilebilir. Yayınlanmış YPSK analizlerinin yaklaşık %70'i UV / VIS dedektörleri ile gerçekleştirilmiştir. Aslında kullanım kolaylığı UV dedektörünü en kullanışlı ve en yaygın kullanılan sıvı kromatografi dedektörü haline getirmiştir (Raymond P.W. Scott, 1996).

Şekil 2.7'de UV/GB dedektörü şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.7. Çift ışın yollu bir UV/GB dedektörü (Raymond P.W. Scott, 1996)

2.2.3.5.2. Fotodiyot Dizi Dedektör (FDD)

Bazı değişken dalga boyu UV dedektörlerinin özelliği, pikin akış hücresinden geçerken, çeşitli dalga boylarında spektroskopik tarama ve kesin absorbands okumalarını gerçekleştirme yeteneğidir. Diyot dizisi, sıvı kromatografiye yeni bir analitik özellik boyutu katmıştır. Çünkü kalitatif bilgilerin, alıkonma süresi ile basit tanımlamaların ötesinde elde edilmesine izin verir.

Diyot dizisi tespitinin iki önemli avantajı vardır. İlk olarak, gerçek analiz için seçilecek en iyi dalga boyunun tespitini sağlar. Bu farklı dalga boylarında molar absorbands hakkında bilgi bulunmadığında özellikle önemlidir. İkinci büyük avantaj, pik saflık problemi ile ilgilidir. Çoğu zaman, kendi içindeki pik şekli aslında iki (veya daha fazla) bileşene karşılık geldiğini ortaya çıkarmaz. Böyle bir durumda, birkaç dalga boyunda absorbands seçimi, pikin tek bir bileşiği temsil edip etmediğine veya aslında bir bileşiğe ait bir pik olduğuna karar verirken özellikle faydalıdır.

Absorbans iki veya daha fazla dalga boyunda ölçülür ve oranlar iki seçilmiş dalga boyu için hesaplanır. Birkaç dalga boyunda eşzamanlı ölçüm, absorbands oranının hesaplanmasını sağlar. Değerlendirme iki şekilde gerçekleştirilebilir:

İlk durumda, seçilen dalga boyundaki oranlar analiz sırasında sürekli olarak izlenir. Eğer pikin tepe noktasındaki bileşik saf ise, cevap kare dalga fonksiyonu (dikdörtgen) olacaktır. Eğer yanıt dikdörtgen değilse, pik saf değildir (Raymond P.W. Scott, 1996).

2.2.3.5.3. Floresans Dedektör

Tek dalgaboyu uyarma floresans dedektörü, genellikle en hassas dedektördür. LC için kullanılabilir. Floresans dedektörün tekli dalgaboyu UV kaynağından gelen ışıkla uyarılan basit bir formu Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Uyarma ışınımını sağlayan UV lambası genellikle düşük basınçlı civa lambasıdır. Civa lambası nispeten ucuzdur ve 253.7 nm'de yüksek yoğunluklu UV ışığı sağlar. Birçok madde bu dalga boyundaki ışıkla, daha az veya daha fazla flüoresan olan ışıkla uyarılır. Işık hücrenin içinde bir kuvarsın merceğiyle ve gelen ışığa normal olan başka bir mercek ile odaklanır. Floresan ışığı bir fotoğraf hücresine odaklar. Basit bir floresan dedektörünün kullanımının örnek karışımının ayrılmasıyla sağlanır.

Floresan dedektörler ile akış hücresinde tek bir analit molekülünün varlığını bile tespit etmek mümkündür. Tipik olarak, floresan hassasiyeti, güçlü UV emici materyaller için UV dedektöründen 10-1000 kat daha yüksektir. Floresan dedektörleri, diğer optik dedektörler arasında çok spesifik ve seçicidir. Bu normalde örneklerde spesifik floresan türlerinin ölçümünde bir avantaj olarak kullanılır.

Spesifik fonksiyonel gruplara sahip olan bileşikler, daha kısa dalga boylu enerji ve floresan olarak adlandırılan daha yüksek dalga boylu radyasyon ile uyarılır. Genellikle emisyon, uyarımın dik açılarında ölçülür.

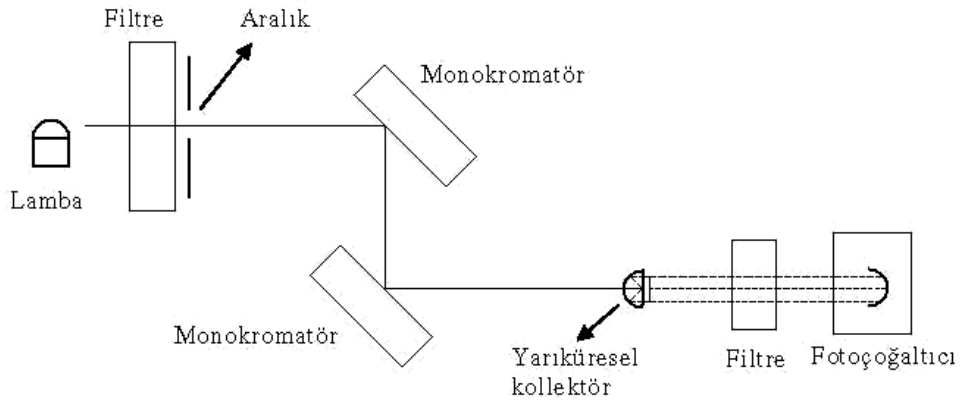
Tüm bileşiklerin yaklaşık %15'i doğal bir flüoresansa sahiptir. Özellikle aromatik bileşenlerde konjuge pi-elektronların varlığı en yoğun floresan aktivitesini verir. Ayrıca alifatik ve alisiklik karbonil grupları ve yüksek konjuge çift bağa sahip bileşikler ile floresan bileşikler bu kategoridedir. Çoğu sübstitüe edilmemiş aromatik

hidrokarbonlar, halka sayısı, yoğunlaşma derecesi ve yapısal sertlikleri ile artan kuantum verimi ile flöres edilir.

Flüoresans yoğunluğu, diğer bileşenlerin emisyonunu baskılayarak bazı bileşenleri seçici olarak algılamaya izin vererek, hem uyarma hem de emisyon dalga boyuna bağlıdır.

Herhangi bir bileşenin algılanması, seçilen dalga boyuna önemli ölçüde bağlıdır ve eğer bir bileşen 280 ex ve 340 em'de algılanabiliyorsa, bir diğeri de gözden kaçırılabilir. Modern dedektörlerin çoğu, karışımındaki tüm bileşenleri algılama olanağı sunan uyarma ve emisyon dalga boyunun hızlı bir şekilde değiştirilmesini sağlar. Örneğin, çok önemli bir polinükleer aromatik kromatogramda, uyarma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 280 ve 340 nm'dir..

Ayrıca floresans dedektörler türevlendirilerek fluoresan özelliği sağlanmış pek çok maddenin saptanmasına olanak sağlar. Genellikle türevlendirmek için; dansil klorür veya flurosein seçilir (Raymond P.W. Scott, 1996).



Şekil 2.8. Floresans dedektör (Raymond P.W. Scott, 1996)

2.2.3.5.4. Elektrokimyasal Dedektör

Elektrokimya, kolayca oksitlenebilen veya büyük seçiciliğe sahip indirgenebilir organik bileşikler tespit etmek için yararlı bir araçtır. Elektrokimyasal dedektörler tespit sınırı olağanüstü derecede düşük ve basit dedektörlerdir. Çalışma ve referans elektrotlar arasındaki potansiyel seçilir. Akım elektrokimyasal reaksiyondan kaynaklanan bir yardımcı elektrot tarafından çizilir, böylece referans elektrot potansiyelini etkilemez. Sıklıkla kullanılan platin elektrot referans olarak kullanılır. Döngüsel voltametri, hangi bileşiklerin bu şekilde tespit edilebileceğini göstermek için kullanılabilir.

Bu yöntem ile kullanılacak en iyi bileşikler aromatik hidroksi bileşikler, aromatik aminler, indoller, fenotiyazinler ve merkaptanlar oksidatif olarak söylenebilir. Çözülmüş oksijen ve ağır metaller (örneğin çelik kılcallardan) problemlere neden olabilir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.4. Kütle Spektrometreleri

Kütle spektrometre sistemlerine ayrıntılı yaklaşırsak özel donanımlarla çevrelenmiş vakum bölgelerinde tutulan iyon kaynağı, analizör ve iyon dedektörlerinin yanısıra bu ekipmanların örnek giriş ve veri sistemi ile de donatılmış olduğunu görürüz. Günümüzde özellikle iyon kaynağı ve iyon dedektörlerine göre farklılaşan çok sayıda kütle spektrometreleri bulunmaktadır. Çizelge 2.7’de kütle spektrometri türleri verilmiştir (Skoog ve ark., 1998).

Çizelge 2.7. Kütle spektrometri türleri

İsim	Kısaltma	Atomik İyon Kaynakları	Tipik Kütle Analizörü
İndüktif eşleşmiş plazma	ICPMS	Yüksek-sıcaklık argon plazma	Kuadrupol
Doğru akım plazma	DCPMS	Yüksek-sıcaklık argon plazma	Kuadrupol
Mikrodalga-uyarımli plazma	MIPMS	Yüksek-sıcaklık argon plazma	Kuadrupol
Kıvılcım kaynağı	SSMS	Radyo-frekans elektrik kıvılcımı	Çift-odaklamalı
Termal iyonlaşma	TIMS	Elektiriksel olarak ısıtılan plazma	Çift-odaklamalı
Akkor boşalımlı	GDMS	Akkor-boşalımlı plazma	Çift-odaklamalı
Lazer mikroprobu	LMMS	Odaklanmış lazer ışını	Uçuş zamanlı
İkincil iyon	SIMS	Hızlandırılmış iyon bombardımanı	Çift-odaklamalı

2.2.4.1. Örnek Giriş Sistemi

Örnek giriş sistemi amacı, az miktarda bulunan gaz, sıvı ya da katı numuneyi kütle spektrometreye ulaştırabilmektir. Kütle spektrometrelerinde gaz halinde bulunan numune, iyonlaşma kısmına doğrudan iletilebilmekte, ancak sıvı veya katı numunelerin gaz fazına geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle, bu kısım vakum altında bulunur ve numune alma esnasında vakum düşürülmez. Numunenin cihaza girişi,

buharlaştırılarak, direkt olarak ya da kromatografik sistemden gelmek üzere üç yolla sağlanabilir.

Buharlaştırma sisteminde; sıvı halindeki örnek, mikrolitre mertebesinde iyonlaşma bölgesiyle arasında çok küçük bir delik olan ısıtılmış kapalı bir bölmeye şırıngayla verilen ve buharlaşan numune kısmı küçük bir delikten geçer ve iyonlaşma bölgesine giriş yapar. Bu sistemle, gaz halindeki ve 500C'ye kadar olan sıcaklıklarda buhar haline getirilebilen numunelerle çalışılabilir. Doğrudan cihaza giriş sisteminde ise; katı ya da buharlaşması düşük sıvılar nanogram ölçeğinde, numune kısmı ya da örneklendirme birimi (prob) yardımıyla alınır. Uç tarafı aniden ısıtılabilen çubuk yardımıyla vakum altındaki numune kısmı katı fazdan gaz fazına geçerken iyonlaşma kısmına iletilir. Prob, iyonlaştırma bölümünün yakınında bulunur ve bu böylece numunenin bozunmaksızın kütle spektrumu alınabilir. Bu sistemde sızdırmazlık sistemi sayesinde örnek girişi esnasında hava kaçağı en düşük seviyede bulunur. Bu sistemde uçuculuğu az olan steroidler, karbonhidratlar ve küçük moleküllü polimerler çalışılabilmektedir. Kromatografik sistemden iletilen ve ayrılan numune bileşenleri helyum ya da hidrojen gazıyla karışık olduğu için yarı geçirgen boruyla ayrılması gerekir. Bu sistem çevre ve biyokimyasal analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Skoog ve ark, 1998).

2.2.4.2 İyon Kaynağı

İyonlaştırma bölümünde, örnek giriş kısmında gaz haline getirilmiş molekül ve yapılar, iyonlaştırılmaktadır. Her bir molekülün iyonlaşabilmesi için değişik enerji değerleri gerekir. Numuneye ve yönteme bağlı olarak iyonlaşma işlemi için gaz fazı (elektron çarpması, kimyasal iyonlaştırma, alan iyonlaştırma) ve desorpsiyon kaynaklı yöntemler (elektrosprey iyonlaştırma, plazma desorpsiyonu, hızlı atom bombardımanı, ikincil iyon kütle spektrometri, termosprey iyonlaştırma) gibi çeşitli iyonlaştırma yöntemleri kullanılır. Gaz fazı kaynaklarında numune önce buharlaştırılır, sonra iyonlaştırma gerçekleştirilir. Desorpsiyon yönteminde, çeşitli şekillerdeki enerji, katı

veya sıvıya verilerek, gaz iyonlarının doğrudan oluşumu sağlanır. Desorpsiyon kaynakları 105 Da gibi yüksek molekül kütleye sahip örnekler de kullanılabilir.

2.2.4.2.1. Elektron Çarpması Yöntemi (EI)

En yaygın kullanılan iyonlaştırma yöntemlerinden biri olan elektron çarpması yönteminde; örnek, buharlaştırıldıktan sonra elektrik alanından geçirilerek hızlandırılan 50-80 eV'luk bir enerjiye sahip elektron demeti ile bombardıman edilmesiyle iyonlaştırılır. Bu yöntem gaz fazındaki molekülleri, iyonlaşma odasında bulunan tungsten veya renyum filamanından yayılan elektron demeti ile bombardıman edilmesiyle iyonlaştırır. Elektronların ve moleküllerin yolları birbirine diktir ve kaynağın merkezinde aşağıda gösterildiği gibi bir çarpışma ve iyonlaşma gerçekleşerek M^+ ile gösterilen moleküler iyonlar oluşur.

Daha sonra elektronlar katottan anoda gerilim farkıyla hızlandırılırlar. İyonlaşma odasından çıkan iyonlar ise iyonlaşma odasının arkasında bulunan itici plakalara uygulanan gerilimle uzaklaştırılarak hızlandırıcı kısma gelir ve moleküler iyonlar kütle analizörüne doğru ilerler. Analit molekülleri ile yüksek enerjili elektronlar arasındaki çarpışma sonucunda elektronlar molekülün uyarılmasını sağlayacak enerjiyi verirler. Uyarılan moleküller durulması daha fazla parçalanma şeklinde gerçekleşir ve daha düşük kütleli iyonlar oluşur. Elektron çarpması yöntemindeki uygulamada oluşan iyonların çoğu yüksek enerjiye sahip olduğundan çarpışma sonucunda moleküller en zayıf yerlerinden koparak kolaylıkla parçalanır. Elektronların enerjisini azalttıkça parçalanma da azalır. Elektron çarpması yöntemi, örneğin gaz fazında bulunması piroliz olasılığını arttırdığı için dezavantajlıdır. Ayrıca pek çok organik molekülün kolayca parçalanması nedeniyle molekül kütlesi ve dolayısıyla molekül formülü duyarlılıkla bulunmaz (Skoog ve ark, 1998).

2.2.4.2.2. Kimyasal İyonlaştırma (CI)

Daha düşük enerjili işlem sayesinde daha az parçalanma gözlemlenir ve daha basit bir spektrum elde edilir. Kimyasal iyonlaştırmada, iyon kaynağında reaktif gaz iyonları ile molekülün gaz haline gelmiş atomlarının çarpışması sonucunda iyonlar oluşur. Reaktif gazı olarak genellikle metan, etan, amonyak ve izobütan kullanılır. Önce reaktif gaz, elektron çarpması yöntemi ile iyonlaştırılır, ardından bu reaktif gaz iyonları ile analit molekülleri (A, BH) olası tepkime oluştururlar ve bu moleküler iyonlara karşılık gelen m/z değerlerinde spektrumda pik gözlenir.

Analit molekülü ile CH_5^+ veya $C_2H_5^+$ arasındaki çarpışmalar sonucunda proton aktarımı reaksiyonu gerçekleştiğinde (M^{+1}) iyonu, hidrür aktarımı reaksiyonu gerçekleştiğinde ise (M^{-1}) iyonu oluşur.

2.2.4.2.3. Elektrosprey İyonlaştırma Yöntemi (ESI)

Oda sıcaklığında ve atmosfer basıncında gerçekleştirilen elektrosprey iyonlaştırma yönteminde numune; polar, uçucu ve matris görevi olan bir çözücüde çözülür ve dar, paslanmaz çelikten yapılmış kapilerden yaklaşık $1 \mu L \cdot dak^{-1}$ akış hızında pompalanır. Bu arada kapiler ucuna 3-4 kV'luk yüksek voltaj uygulanır. Kapilerin dışında sisleştirici (nebulizer) gazın (genellikle azot) geçmesi ile ve ardından kuvvetli elektrik alanının etkisiyle çok küçük ve büyük oranda elektrik yüklü damlacıklar (aerosoller) oluşur. Yüklü damlacıkların büyüklüğü çözücü buharlaşması ile azalır ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunur. Küçülen damlacıklarda yük yoğunlukları artar ve iyonlar gaz fazına desorbe olur. İyonlaşma mekanizmasında alan buharlaşma ve kulomb patlaması etkin olan elektrosprey iyonlaştırma yönteminde çoğunlukla yüklü protonlanmış ve proton uzaklaşmış moleküler iyonlar oluşur. 105 Da gibi büyük kütle aralığında çalışılmasını sağlayan ve yumuşak iyon kaynaklarından olan bu yöntemde nispeten daha az parçalanma oluşur. Ayrıca elektrosprey tipi iyonlaştırma, sıvı kromatografi ve kapiler elektroforez gibi ayırma tekniklerine bağlanabilmektedir (Skoog ve ark. 1998).

2.2.4.2.4. İkincil İyonlaşma Yöntemi (SIMS)

İkincil iyonlaşma yönteminde; He, Ne veya Ar gibi hızlandırılmış birincil iyonlar katı yüzeye çarptırılır ve yüzeye aktarılan kinetik enerji ile yüzeyden iyonlar uzaklaştırılır. Oluşan iyonlara ikincil iyonlar adı verilir. İkincil iyonların ölçümüyle yüzeyin elementel, izotopik ya da moleküler bileşimi tespit edilebilir.

2.2.4.3. Kütle Analizörü

İyonlaştırma kaynaklarından iyonlaşarak çıkan iyon demeti, kütle analizörüne gelir ve m/z oranlarına göre ayrılırlar. Kütle analizörleri optik spektrometrideki monokromatörlere benzemektedir. Ancak, bunların görevleri birbirinden farklıdır. Monokromatörler, ışınları dalga boylarına ayırırken, analizörler; iyonları m/z oranlarına göre demetlere ayırır ve dedektöre gönderir.

2.2.4.3.1. Kuadrupol Ayırıcı (dört kutuplu ayırıcı)

Bu tip analizörlerde, iyon demeti yoluna paralel yerleştirilen ve 0.1-0.3 m uzunluğunda dört adet silindir şeklinde çubuktan oluşan bir sistem kullanılır. Çubuklar karşılıklı olarak birbirine bağlanmıştır. Çubuklara hem doğru hem de radyofrekans (rf) gerilimi uygulanır. Yalnızca belirli m/z oranına sahip iyonlar sabit doğru akımda veya rf geriliminde çubukların arasından geçerek detektöre ulaşır. GK-KS ve YPSK-KS gibi birleştirilmiş sistemlerde bu tip ayırıcı kullanılabilir. Kuadrupol ayırıcı, ayırım gücünün çok yüksek olması gerekmediği analizlerde ve m/z oranı 1000 aralığındaki maddeler için manyetik ayırıcının önemli bir rakibidir. Kuadrupol ayırıcıların ayırım gücü yüksektir, kısa zamanda tarama gerçekleştirilir, ucuz ve kullanımı kolaydır.

2.2.5. Kütle Spektrometri Uygulamaları ve Birleştirilmiş Sistemler

Kütle spektrometrisi kullanımı birçok alanda yaygındır çeşitli bileşik kütle spektrometreleri kullanılmaktadır. Ancak tek başına kullanıldığında, kullanım zorluğu ve karmaşık sonuçlar elde edilmesi nedeniyle son yıllarda özellikle bir gaz, sıvı, veya kapiler kromatografik ayırma ünitesi ardına konuşlanmış kütle spektrometreleriyle hibrit sistemler geliştirilmiştir.

2.2.5.1. Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (SK/KS) Sistemi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi benzer polarlıktaki organik bileşiklerin ayrılması için kullanılan çok iyi bir yöntemdir. Sıvı haldeki veya uçucu olmayan karışımlar önce sıvı kromatografi sistemi ile bileşenlerine ayrıldıktan sonra KS ile ayrılan bileşenler belirlenir ve analitin miktar tayini gerçekleştirilebilir. Bu birleşik sistemde hareketli fazın akış hızı fazla olduğu için sıvı kromatografi sistemi ile KS arasında bulunan ara yüzeyde hareketli fazın uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Hareketli faz, ısıtılan bir bant kısmına doğru püskürtülerek vakumla uzaklaştırılabileceği gibi elektrosprey ve termosprey yöntemlerinin kullanılmasıyla da uzaklaştırılabilir. Elektrosprey ya da termosprey tekniğinin kullanıldığı SK/KS sistemlerinde çözeltide iyonlar oluştuğu için ayrı iyonlaştırıcıya gerek yoktur. Hareketli fazın banda püskürtüldüğü sistemde iyonlaşma için iyonlar elektron iyonlaştırma ya da kimyasal iyonlaştırma iyon kaynağına girerler. Mikrokolon sıvı kromatografi sistemindeki gibi düşük çözücü akış hızlarının (dakikada birkaç mikrolitre akış hızı) kullanıldığı sistemlerde kimyasal ve elektrosprey iyonlaşmanın kullanılması ile doğrudan bağlantı sağlanabilir.

2.2.5.2. Tandem Kütle Spektrometresi (KS/KS) Sistemi

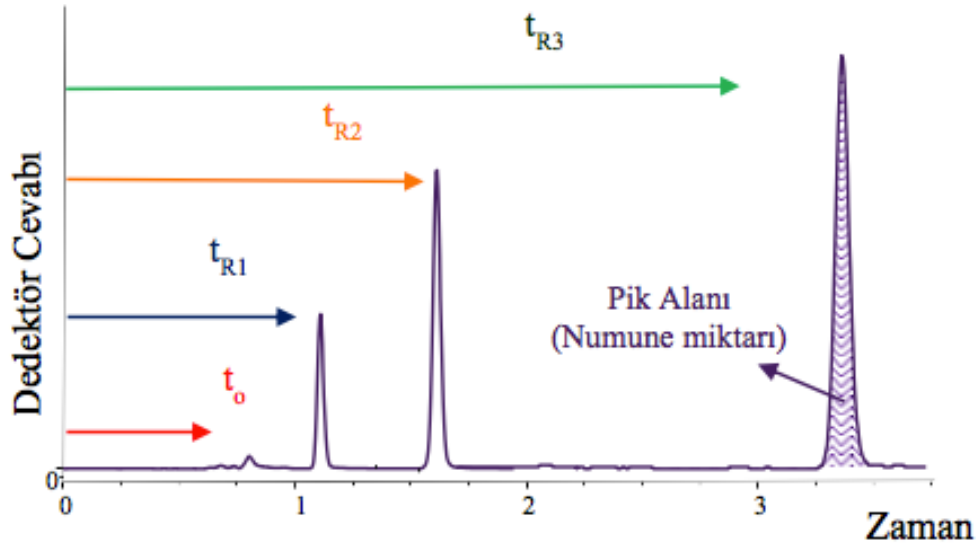
Bu sistem, ardı ardına iki kütle spektrometresinin bulunduğu sistem olarak tasarlanmıştır. İki kütle spektrometresinin bir arada bulunduğu bu birleşik sisteme tandem kütle spektrometri adı verilir ve kısaca KS/KS olarak gösterilir. Bu birleşik sistemdeki ilk KS sisteminde GK/KS ve SK/KS sistemlerinin kromatografi düzeneğindeki gibi ayırım gerçekleşir. GK/KS ve SK/KS sistemindeki kromatografik ayırmayla spektrometreye moleküller gönderilirken, KS/KS sistemindeki ilk spektrometreyle moleküler iyonlar ayrılarak ikinci KS sistemine gönderilir. Bir tandem cihazında, ilk spektrometrede genellikle kimyasal iyonlaştırma gibi yumuşak iyonlaştırma kaynağı kullanılır ve ilk spektrometreden çıkan iyonlar büyük oranda moleküler iyonlar ve protonlanmış molekül iyonlardır. Oluşan iyonlar ikinci spektrometrenin iyonlaşma kaynağına aktarılır. İkinci iyon kaynağı olarak genellikle içinden helyum pompalanan alansız bir çarpışma haznesi kullanılır. Birinci iyonlaştırma kaynağından gelen hızlı iyonlarla helyum atomlarının çarpışması sonucunda küçük iyonik parçalar oluşur. Bu küçük iyonların spektrumu ikinci spektrometreyle ortaya çıkarılır. Tandem kütle spektrometrenin bir diğer türü ise seçilmiş ana iyon KS/KS sistemidir. Bu sistemde ikinci KS daha küçük olan iyonlardan birinin kütlesine ayarlanır ve bileşik birinci KS sisteminden taranır. Tandem kütle spektrometrelerinde manyetik, elektrostatik ve kuadrupol tipi ayırıcıların kombinasyonları kullanılmakla birlikte en yaygın kullanılanı üçlü kuadrupol tipi ayırıcılardır.

KS/KS sistemi GK/KS ve SK/KS sistemleri avantajların yanında, bu sistemlere göre daha hızlı olan (birkaç milisaniye) analiz sistemidir. Bu sistemde ayrıca kromatografi sistemlerinde olduğu gibi hareketli fazın uzaklaştırılması gerekmez. Dolayısıyla; bu yüzden olabilecek bozucu etkiler gözlenmez. Tandem sistemler daha az kimyasal gürültü gösterdiğinden diğer kromatografik sistemlere göre daha duyarlıdır. Ancak bununla birlikte GK/KS ve SK/KS sistemlerine göre daha pahalıdırlar (Skoog ve ark., 1998).

2.2.6. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

YPSK sisteminin analiz sonuçlarında gözle izlenebilen ilk parametreler; alıkonma zamanı, pik alanı, pikin şekli gibi parametrelerdir. Bir kromatogramda ilk izlenen parametre pik şeklindedir. İdeal pik şekli keskin, iki tarafının eşit ve dar olanıdır (Şekil 2.9). Numunenin kolona enjekte edilmesinden sonra, dedektöre gelen cevap sinyali bir pik olarak görülür. Bu sinyalin çıkış zamanı aynı zamanda alıkonma zamanı (t_R) olarak da adlandırılır ve nitel analizlerin belirleyici faktörüdür. Numune içinde bulunan her bir analitin farklı alıkonma zamanları vardır. Hareketli fazdan kaynaklanan piklerin çıktığı zaman ise ölü zaman veya ölü hacim (t_0) olarak adlandırılır (Fanali ve ark., 2013 ve Kromidas, 2005). Ters faz sıvı kromatografik yöntemlerde ölü zamanı belirlemek için urasil, potasyum bromür gibi polarlığı çok yüksek olan bileşikler kullanılmaktadır.

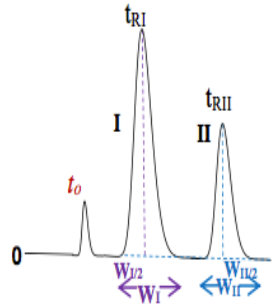
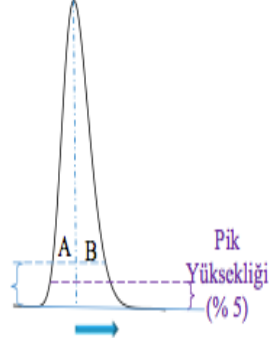
Sistem uygunluk testleri kromatografik ve diğer ayırma yöntemlerinde, yöntemin yeterli doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirlemek için yapılmaktadır ve bu testlerin gerçekleştirilmesiyle kromatografik bir sistemin analize ne ölçüde uygun olduğu kanıtlanmış olur. Bu testler Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation (ICH)) Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) ve Amerikan Farmakopesi (USP) ve diğer farmakopeler tarafından yapılması önerilen testlerdir. Sistemdeki akış hızı, pH, okuma yapılacak dalga boyu, hareketli faz bileşiminden kaynaklı en ufak bir değişiklik için, sistem uygunluk testlerinin yeni sistem için tekrar gözden geçirilmesi gerekmektedir (Gümüştaş, 2016; Chan ve ark., 2004; Grdinic ve Vukovic, 2004; Hajicostas, 2003; Hibbert, 2007; Huber, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Prichard ve Barvick, 2007; Swartz ve Krull, 1997; Torbeck, 2007; US FDA, 1983; US FDA, 2000; USP 37, 2014 ve Werner ve ark., 2006, European Pharmacopoeia, 2014).



Şekil 2.9. YPSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram (Gümüştaş., 2009)

Bir kromatogramın yorumlanması ve SUT parametrelerinin (Çizelge 2.8.) limit değerlerinin içinde olup olmadığının belirlenmesinde temel olarak alıkonma zamanı ve pik genişliği esas alınır. Çizelge 2.8’de Amerikan Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri, bu parametrelerin nasıl hesaplanacağı ve limit değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.8. SUT parametreleri

SUT Parametresi	Sembolü	Formülü	Limit	Açıklama
Kapasite Faktörü	k	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$1 \leq k \leq 10$	
Seçicilik	α	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{r0}}{t_{R1} - t_{r0}}$	$\alpha > 1$	
Ayrım Gücü	R_S	$R_S = 1.18 \times \frac{t_2 - t_1}{W_{10.5} + W_{20.5}}$	$R_S > 1.5$	
Kuyruklanma Faktörü	T	$T = \frac{A + B}{A}$	$2 \leq$	
Pik Asimetresi	A_S	$A_S = \frac{B}{A}$	$0.95 \leq A_S \leq 2$	
Teorik Tabaka Sayısı	N	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	$N > 2000$	
Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği	% BSS	$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$	$\% BSS < 1.5$	

Çizelge 2.8'e bakıldığında, k değeri büyük ise, bileşen sabit fazda iyi tutulmaktadır ve kolon boyunca yavaş ilerlemektedir. k değeri çok küçük ise, analit çözücü pikinden ayıramamaktadır, çok büyük olması ise analiz süresinin uzun olduğunu göstermektedir. Seçicilik (α), sabit faz ve hareketli fazın özelliklerine göre değişiklik göstermektedir ve daima 1'den büyük olmalıdır.

SUT'un en önemli parametresi teorik tabaka sayısıdır. Çünkü bu değer analiz sonucunun verimi ile direkt ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine, akış hızı, sıcaklık, pH ve kolonun ömrü gibi deneysel koşullara bağlıdır.

Kromatografik işlemlerde kolon ve çözücünün ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) olarak ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, etkin tabaka sayısı ve seçicilikten yararlanılmaktadır. Peş peşe gelen iki pik için R_S değeri 1,5 ve üstünde iken ayırım tam olarak gerçekleşmiş demektir.

Kuyruklanma faktörü ve pik asimetrisi parametreleri incelenen analit pikinin eğriliğini, sağ veya sol tarafa dayalı olup olmadığını ve keskinliğini belirleyebilmek için kullanılan parametrelerdir. Uzun süre kullanılmış kolonlarda kuyruklanma daha sık görülmekte ve doğru sonuçlar vermemektedir. Pik asimetrisi, pik taban yüksekliğinin % 10'u, kuyruklanma faktörü ise % 5'i civarından ölçülerek hesaplanmaktadır.

Bir kromatografik yöntemde analizi yapılan madde pikinin alanının ve pik yüksekliğinin, belirlenen koşullardaki tekrar edilebilirliği yöntemin kesinliğinin ifadesidir. Bu parametre analizi yapılan maddenin en az 5-6 defa sisteme peş peşe enjeksiyonunun verilmesinden sonra elde edilen pik alanları ve pik yüksekliklerinin bağıl standart sapması (% BSS) olarak hesaplanır.

2.2.6.1. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri

Araştırma geliştirme faaliyetlerinin yürütüldüğü ve kalite kontrol işlemlerinin uygulandığı her alanda, kullanılan tüm analiz, yöntem ve uygulamaların, doğru, tekrarlanabilir ve belirlenen parametreler içerisinde ölçülebilir olması etkinlik ve güvenilirlik açısından son derece önemlidir. Yöntem geçerliliği (validasyon) ise bu özelliklerin uluslararası standartlarda olduğunu göstermektedir (Gümüştas, 2016; Crowter, 2001; Ermer, 2005; Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Lee, 2004; US FDA, 1983; US FDA, 2000 ve USP 37, 2014).

İlaç etken maddelerin, saf hallerinin, farmasötik dozaj formlarından ve biyolojik numunelerden analizlerinde kullanılan yöntemler analitik yöntemler olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemler kullanılırken ilaçlar saf halde veya çeşitli safsızlıkları ile birlikte bulunabilirler. Bu yöntemlerin kullanılabilir olması için iyi karakterize edilmesi ve güvenilir sonuçların elde edilebildiği tamamen geçerli olan analitik yöntemlerin geliştirilmesi şarttır.

Aşağıdaki çizelgede farklı klavuzlara göre yapılması gereken validasyon parametreleri verilmiştir.

Çizelge 2.9. Validasyon parametreleri

Gerekli Validasyon Parametresi		ICH	USP
Seçicilik		✓	✓
Doğrusallık		✓	✓
Aralık		✓	✓
TS		✓	Sadece sınır testlerinde
TAS		✓	Sadece kantitatif çalışmalarda
Kesinlik	Tekrarlanabilirlik	✓	✓
	Gün için tekrar edilebilirlik	✓	-
	Günler arası tekrar edilebilirlik	✓	-
	Doğruluk	✓	✓
Sağlamlık		Tavsiye edilir	✓
Tutarlılık		Tavsiye edilir	✓
Çözelti Stabilitesi		✓	Tavsiye edilir
Duyarlılık		Tavsiye edilir	✓

2.2.6.2. Validasyonun Genel İşlemleri

Validasyon, herhangi bir analitik yöntemin güvenilirliğini ortaya koymak için de kullanılmaktadır. Ayrıca bir laboratuvarın analitik verilerinin ne kadar güvenilir olduğunu anlamak için o laboratuvarda kullanılan yöntemlerin validasyonlarında şarttır (Ozkan, 2012). Validasyonun geçerliliği için aşağıda belirtilen işlemlerin ve tanımlamaların yapılması gereklidir (Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; Kromidas, 2005; USP 37, 2014; US FDA, 1983; US FDA, 2000; Ozkan, 2012 ve Ozkan ve ark., 2015; Gümüştas, 2016).

- Cihaz/Ekipman Kalite Kontrolü: Bu kontrole bütün cihazların donanımsal veyazılımsal kontrolleri yapılır,
- Rutin analizde kullanılacak bir analizin veya yöntem parametrelerinde herhangi bir değişiklik yapılan metodun validasyonu,
- Ayırma yöntemlerinin validasyonu için gerekli olan ve çalışma sırasında, günler arasında ve numunelerin analizleri sırasında uygulanan Sistem Uygunluk Testleri (SUT) ve ilgili parametrelerinin saptanması.

ICH (International Council on Harmonization: Uluslararası uyum konseyi) ve Farmakopeler tarafından stabilite, işlem analizleri, tanıma, saflık, ilaç etken maddesinin etkinliğini, salım testleri ve kabul testleri gibi basamaklar için detaylı bilgiler verebilen yeni analitik yöntemlere gerekli validasyon parametreleri ve bu parametrelerin sahip olması gereken değerler önerilmiş ve kabul edilmiştir. Validasyon, tek başına bir yöntemin uygulanması için düşünülmemelidir. Bir analitik yöntem kullanımı süresince her zaman ve her yerde geçerliliğini korumalıdır. Bir analiz yöntemi, etkinlik parametreleri ile karakterize edilir. Bu etkinlik değerleri çeşitli kılavuzlar ve farmakopelerde belirtilen değerleri sağlamalıdır (Chan ve ark., 2004; Crowter, 2001; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Lee, 2004; USP 37, 2014; Riley ve Rosanske, 1996; Swartz ve Krull, 1997; Snyder ve ark., 1997; Ahuya ve Scypinski, 2001; Lunte ve Radzik, 1996; Adamovics, 1997; Braggio ve ark., 1996; Shabir, 2003; Papadoyannis ve Samanidou, 2004; Ermer, 2001; Mc Dowell, 1999; Ermer ve Miller, 2005; De Bievre ve Gunzler, 2005 ve Vessman, 1996; Gümüştas, 2016).

2.2.6.2.1. Seçicilik

Seçicilik, analizi yapılan numunede var olan ve analizi yapılan maddeyle girişim yapabilecek ilgili bileşenlerin (safsızlık, bozunma ürünleri veya ortamdan gelebilecek) yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilmesidir. Seçicilik, kromatografik sistemlerin validasyonunun en önemli parametresidir. Çünkü seçiciliğin olmadığı bir yöntemde başka hiçbir parametrenin öneminden bahsedilemez. Seçiciliğin yeterli düzeyde olmaması durumunda, yöntemin doğrusallığı, doğruluğu ve kesinliği hakkında yanlış bilgiler elde edilir.

Seçiciliğin belirlenmesi için birkaç farklı yol vardır:

- Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphelenilen maddeler (benzer maddeler, dozaj formu içindeki yardımcı maddeler gibi) aynı anda kolona enjekte edilir ve geliştirilen yöntemle analiz edilir ve ayırım gücü değerlerine bakılır ($R_s \geq 2,0$ olmalıdır).
- Geliştirilen kromatografik yöntemin şartlarında ufak değişiklikler yapılır, (çözelti bileşimi, tampon çözelti pH'si, sıcaklık gibi) Bu değişikliklerin pik performansına olan etkileri takip edilir.
- Kullanılan FDD dedektörü ile yazılım vasıtasıyla pik saflıkları kontrol edilir. Mevcut sinyalin altında bir sinyal daha olup olmadığından emin olunabilir (Barwick ve Ellison, 2005; Bliener, 2006; Branch, 2005; Casro ve ark., 2005; Chan, 2004; Chan ve ark., 2004; Christian, 2004; Crowter, 2001; Ermer ve Ploss, 2005; Görög, 2007; Grdinic ve Vukovic, 2004; Gumustas ve Ozkan 2011; Haider, 2002; Hartman ve ark., 1998; Hibbert, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Konieczka, 2007; Lee, 2004; Majcen, 2003; Prichard ve Barvick, 2007; Riley ve Rosanske, 1996; Shabir, 2003; Snyder ve ark., 1997; Switaj-Zawadka ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2002 ve Van Locco ve ark., 2002; Gümüştaş, 2016).

2.2.6.2.2. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık analit derişiminin bir fonksiyonudur ve sinyallerin grafiksel olarak yorumlanması ile belirlenir. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon (R^2) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Bu parametreler analit derişiminin ölçülen sinyallere karşı regresyon analizleri kullanılarak matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısının 0,999 ve üzerinde olması durumunda sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirlemek için stok çözeltiden en az 5 farklı derişim hazırlanır ve analiz sonuçları çözelti derişimlerine karşı grafiğe geçirilir. Grafiğe geçirilen noktalar bulunan eğilim çizgisi üzerine denk gelmeli veya çok yakınından geçmelidir. Böylelikle r veya R^2 değerleri de 1'e yaklaşmış olur. Doğrusallık sonuçları raporlanırken eğim ve kesişim değerlerinin % BSS'leri veya standart hataları da hesaplanarak verilmelidir.

Aralık ise doğruluğu ve duyarlılığı yeterli kabul edilen bir yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığı olarak adlandırılmaktadır. Her nicel yöntemde çalışma aralığı mutlaka belirlenmelidir. Genellikle çalışmalarda en iyi performansı veren çalışma aralığı hedeflenen seviyelerin % 50'si ile % 150'si arasındadır (Ozkan, 2012; Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan ve ark., 2015; Gümüştas, 2016).

2.2.6.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)

Bir numune içinde analizi yapılacak bileşenin (analit) teşhis edilebilen, ancak kabul edilebilir bir belirsizlikle miktar tayini yapılamayan en düşük derişimi TS olarak ifade edilir. TAS ise doğru bir şekilde tayin edilebilen cevabı veren en küçük analit derişimini ifade eder. Bu değerler birkaç yolla bulunabilir veya hesaplanabilir. Bunlar, görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve cevabın standart sapması ve eğim kullanılarak hesaplanması yöntemleridir.

Görsel yöntem ile hazırlanabilecek en düşük derişimdeki çözelti hazırlanır ve sisteme enjekte edilir bu işlem bileşenin sinyalinin belirlediği fakat alan okumasının yapılamadığı en düşük seviyenin saptanmasına kadar devam eder.

İkinci yöntem için yapılan deneylerden elde edilen kromatogramlardaki sinyal/gürültü oranları kullanılır. Bunun için analitin bilinen düşük derişimdeki çözeltilerinden elde edilen cevaplar, şahit (kör) çözelti cevapları ile karşılaştırılır. Sinyalin gürültüye oranının 3 olduğu derişim TS ve 10 olduğu derişim TAS olarak kabul edilir.

Eşitlik 2.3. ve eşitlik 2.4'de s standart sapmayı, m ise ilgili kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir. Bu eşitlikler aynı zamanda eğri fonksiyonuna bağlı olarak TS, TAS ve duyarlılık arasındaki ilişkiyi de göstermektedir (Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan, 2012; Gümüştas, 2016).

$$TS = \frac{3,3 \times s}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.3.})$$

$$TAS = \frac{10 \times s}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.4})$$

2.2.6.2.4. Kesinlik

Analiz için geliştirilen yöntemin gerçek çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Kesinlik sonuçları % BSS olarak verilmelidir.

Kesinlik üç aşamada incelenir:

- Enjeksiyonlar arası tekrarlanabilirlik (tekrar edilebilirlik),
- Orta kesinlik,
- Tekrar elde edilebilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa sürelerde aynı numune veya çözeltiler kullanılarak aynı şartlar altında elde edilen kesinlik parametresidir. Ayrıca enjeksiyonun tekrarlanabilirliği olarak da adlandırılır. Elde edilecek % BSS değeri $\leq 1,0$ olmalıdır. Bu değer eser element analizlerinde, biyolojik numunelerde ve safsızlık tayinlerinde % 5'e kadar kabul edilebilir seviyededir.

Orta kesinlik, laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirtmektedir. Çalışmalar arası, deneyler arası veya gün içi kesinlik olarak da tanımlanabilir. Analit çözeltisi aynı günde ve/veya farklı analizciler tarafından hazırlanır. Hazırlanan çözeltilerin her birinden en az 3'er defa ölçüm yapılır. Orta kesinlik sonuçları %BSS kullanılarak ifade edilir ve % BSS ≤ 2 olmalıdır. Eğer biyolojik numunelerle çalışılıyorsa bu kesinlik derecesini veren % BSS değerleri % 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

Tekrar elde edilebilirlik, yöntemlerin farklı şartlarda, farklı günlerde, farklı laboratuvarlardaki kullanımının kesinliğini belirtir. Tekrar elde edilebilirlik kriteri % BSS ≤ 2 olmalıdır. Ancak safsızlık veya eser madde analizlerinde bu oran % 10-15'e kadar kabul edilebilir seviyededir (Gümüştas, 2016).

2.2.6.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, validasyon çalışmalarının en zor ve en önemli parçasıdır. Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek (referans) değere ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür. Doğruluk sonuçları ortalama % geri kazanım cinsinden ifade edilir. Ortama ilave edilen saf maddenin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğinin göstergesidir. Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişimde yapılır; bunlar genellikle hedef değerin % 25, % 50 ve % 100'üne eşdeğer olacak derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen herbir derişim değeri için en az 5 tekrarlı analiz yapılmalıdır ve bunun sonucunda geri kazanım sonuçları % 100'üne kadar yakınsa yöntemin o kadar doğru olduğu düşünülür.

Doğruluk bir takım yaklaşımlarla saptanıp, gösterilebilir. Bunlar:

- Kesin doğrusallık ve seçicilik,
- Elde edilen sonuçların, geçerli ve bağımsız başka bir yöntem ile kıyaslanması,
- Analizi yapılacak gerçek numuneye uygulanması,
- İlaç numunesine veya matris ortamına etken maddeyi standart ekleme ile ilave edip, geri kazanımının bulunmasıdır.

Kör matriks ortamına analizi yapılan maddenin ilavesi: Matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman tercih edilir. Analitin boş ortama farklı derişimlerde eklenmesiyle gerçekleştirilir. Bu analizlere örnek olarak ilaç etken madde analizleri için, etken madde içermeyen fakat yardımcı maddelerin olduğu ortam kullanılabilir. Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her derişim değerinde en az 3'er ölçüm yapılır. Bu işlemlerin sonuçları % geri kazanım olarak ifade edilir ve % BSS ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber raporlanır. Referans standart bir yöntem kullanarak sonuçların kıyaslanması: Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Her iki yönleme ait analiz

sonuçları istatistiksel olarak kıyaslanır. Bu işlem yapılırken Student t ve F testleri kullanılır. t testi ile iki yöntemle elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki farklar, F testi ile de standart sapmalar arasındaki farklar karşılaştırmalı olarak rapor edilir. Bulunan değerler, teorik değerler ile karşılaştırılır, karşılaştırma sonucunda hesaplanarak elde edilen değerler çizelgede yer alan teorik değerlerden küçük veya bu değere yakın ise geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğu kanısına varılır. Sonuçların ortalamaları, aşağıdaki eşitliklerde görülen % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir.

Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi: Boş bir matriks bulunmayan durumlarda bu yöntem sıklıkla tercih edilir. Analizi yapılacak maddenin bilinen ve farklı miktarları matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Genellikle, katkı maddelerinin veyardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % BSS ve/veya % BH ile beraber raporlanır (Gümüştas, 2016).

$$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.5.})$$

$$\% BH = \frac{GD - \bar{X}}{GD} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.6.})$$

2.2.6.2.6. Sağlamlık

Geliştirilen bir kromatografik yöntemin analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden uygulanabilmesinin göstergesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, dalga boyu, akış hızı ve sıcaklık gibi etkenlerdir (Gümüştas, 2016).

2.2.6.2.7. Tutarlılık

Tutarlılık, kullanılan yöntemin gerçek pratik koşullar altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır ve tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik gibi değerlerle de yakından alakalıdır (Heyden ve Massart, 1996). Bunun için çalışma, aynı laboratuvarında bulunan farklı analizciler, farklı cihazlar tarafından gerçekleştirilmelidir. Bunun yanında kullanılan reaktif ve çözücülerin markalarının ve üretim serilerinin değiştirilmesi gibi normal analiz koşullarının değiştirilmesi, aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir. Özellikle yöntemin farklı bir laboratuvarında gerçekleştirildiği durumlarda bu parametre son derece önemlidir ve elde edilen sonuçlar % BSS değeri ile ifade edilir (Ozkan, 2012; Gümüştas, 2016).

2.2.6.2.8. Stabilite

Bu parametre genellikle çalışılan analitlerin kararlılığı ile alakalıdır. Analitin farklı koşullar altında ne kadar süre kararlı kalabildiğini bize gösterir. Stabilite çalışmaları sonucunda yöntemin seçiciliği de tekrar denenmiş olur. Özellikle meydana gelebilecek bozunma ürünlerinin etken madde yanında tayin edilebildiğinin bir göstergesidir. 4 farklı şekilde stabilite çalışmaları yapılabilmektedir:

- Kısa süreli stabilite
- Uzun süreli stabilite
- Dondurma-çözme stabilitesi
- Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları

Kısa süreli stabilite çalışmalarında farklı derişim seviyelerinden alınan örnekler oda sıcaklığında çözülür ve 4-24 saat aralığında bu ortamda kalması sağlanır. Bu işlem sonrasında sonuçlar taze hazırlanmış çözelti ile karşılaştırılır.

Uzun süreli stabilite çalışmalarında kullanılan etken maddenin ne kadar süre kararlı kaldığı ölçülür. 3, 6 ve 12 aylık zaman dilimlerinde ölçümler alınır ve taze çözelti sonuçları ile karşılaştırılır.

Dondurma-çözme stabilitesi üç döngü üzerinden gerçekleştirilir. Üç farklı derişimdeki çözelti istenilen sıcaklıkta 24 saat süre ile dondurulur. Daha sonra kendiliğinden çözülmesi için beklenir ve bu işlem 2 defa daha tekrarlandıktan sonra analiz yapılarak sonuçlar karşılaştırılır.

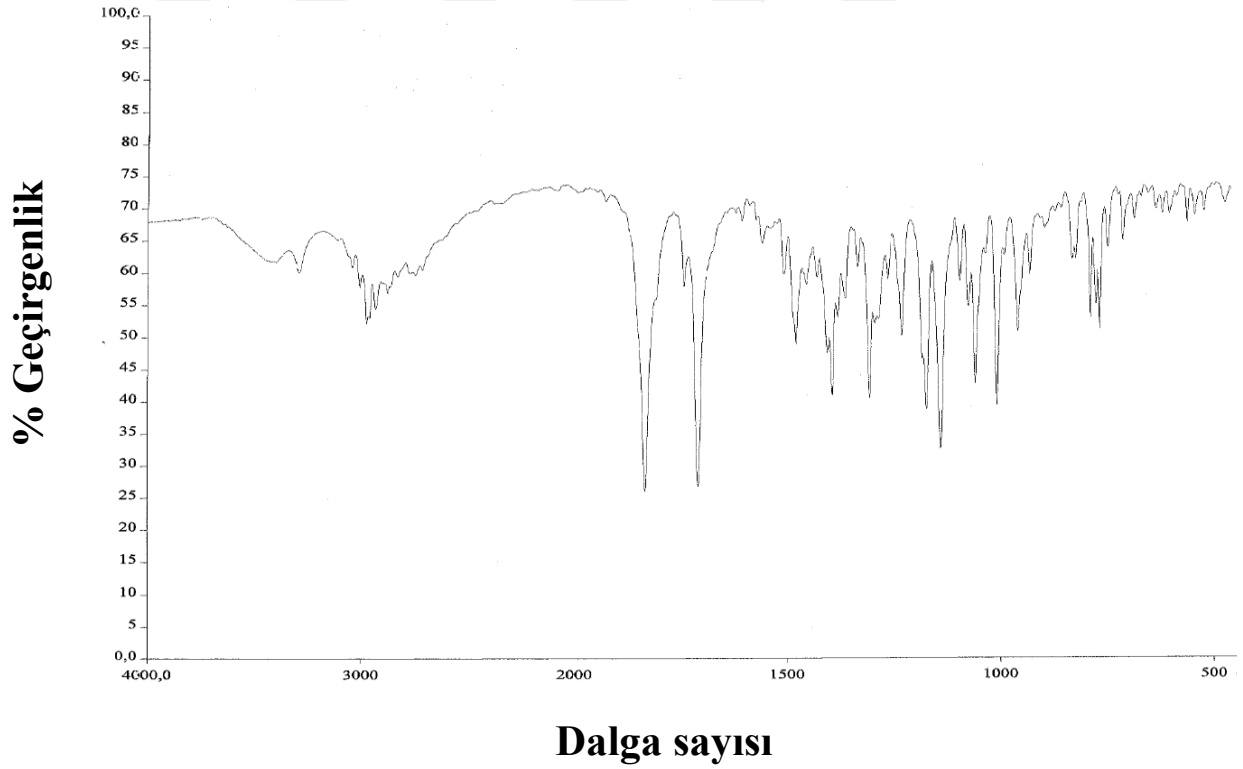
Hızlandırılmış bozunma çalışmaları kullanılarak etken maddenin hızlı bir biçimde bozulması sağlanır ve bu sayede safsızlıkların veya bozunma sonucu oluşan ürünlerin analize etkisi incelenir (Gümüştas, 2016).

3. BULGULAR

3.1. Saflık Kontrolü

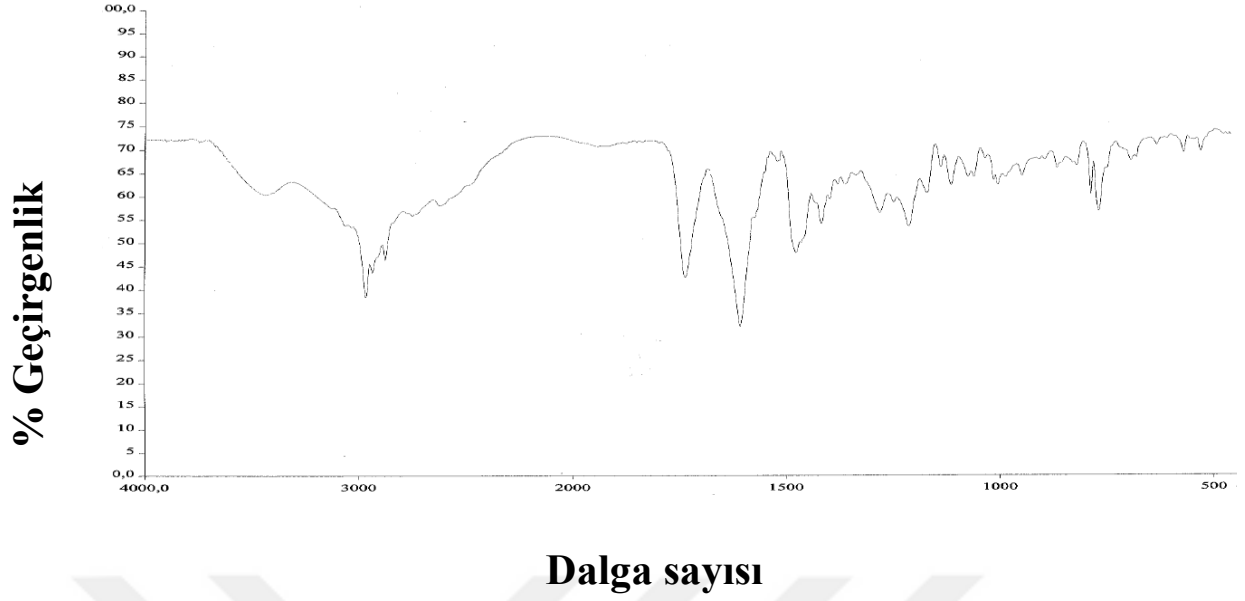
3.1.1. IR Spektroskopisi

Olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipin ve hidroklorotiyazidin saflık kontrollerini yapabilmek için IR (kızıl ötesi) spektroskopisinden yararlanılmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).



Şekil 3.1. Olmesartanın IR spektrumu

Olmesartan için karakteristik pikler $2995,87\text{ cm}^{-1}$ C-H gerilimi (sp^2), $2923,56\text{ cm}^{-1}$ C-H gerilimi (sp^3), 1708 cm^{-1} ve 1832 cm^{-1} C-O gerilimi ve $3300\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ N-H gerilimi şeklindedir.



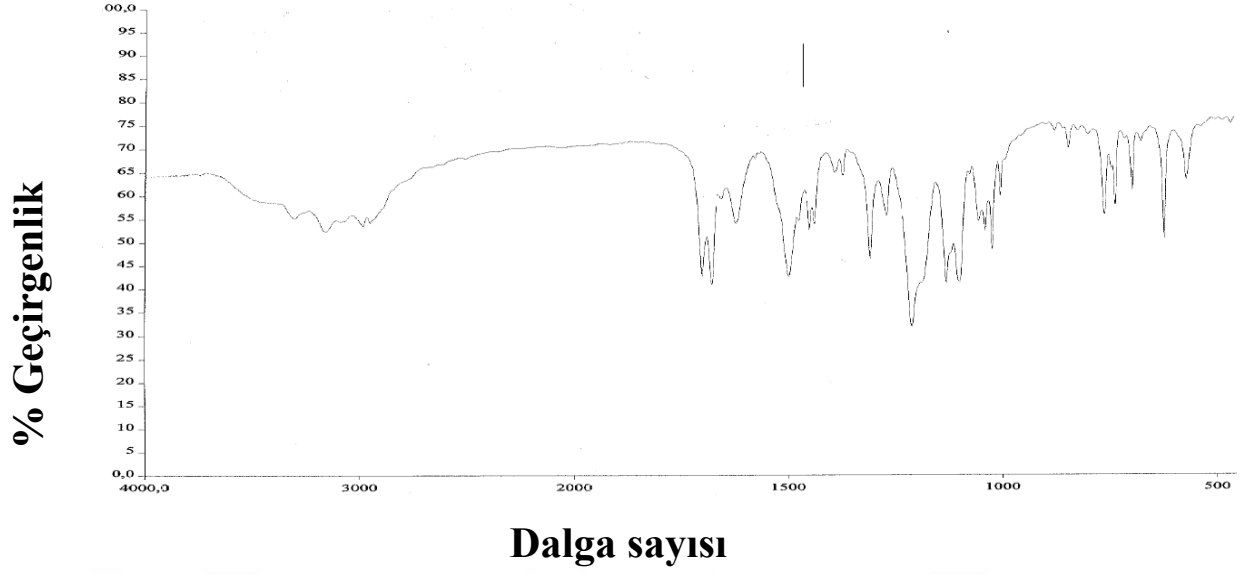
Şekil 3.2. Valsartan'ın IR spektrumu

Valsartan için karakteristik pikler $3035,96\text{ cm}^{-1}$ O-H gerilimi, $2873,94\text{ cm}^{-1}$ C-H gerilimi, $1734,01\text{ cm}^{-1}$ C=O gerilimi (asit), $1602,85\text{ cm}^{-1}$ C=O gerilimi (amide) ve $1570,06\text{ cm}^{-1}$ N-N bükülümü şeklindedir.



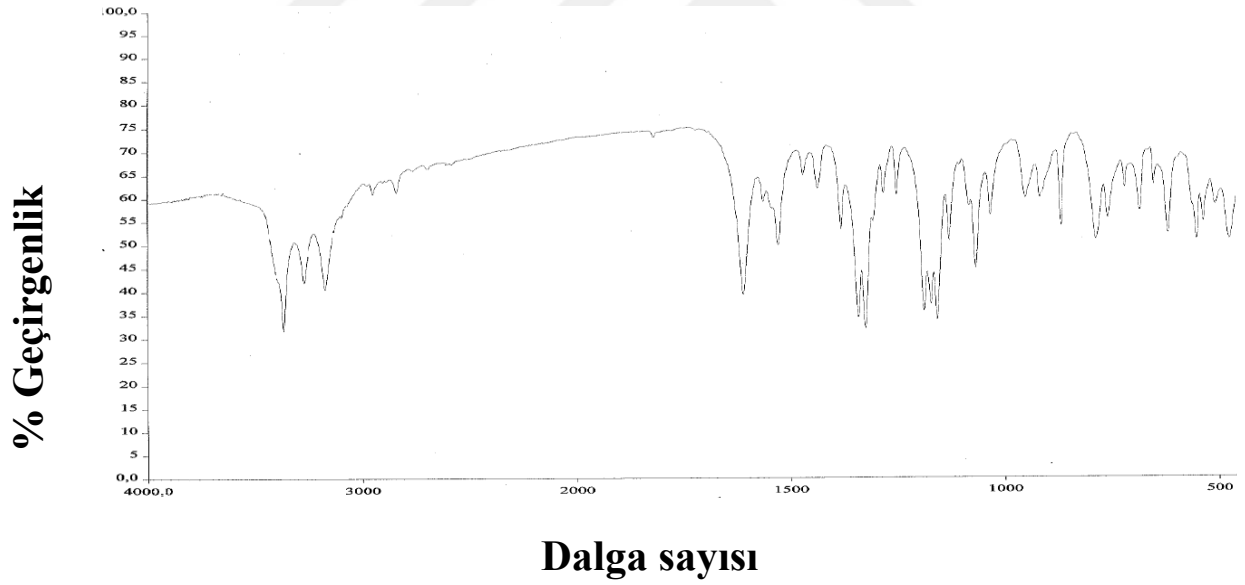
Şekil 3.3. Telmisartan'ın IR spektrumu

Telmisartan için karakteristik pikler $2300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ genel ve 1680 cm^{-1} C=O gerilimi şeklindedir.



Şekil 3.4. Amlodipin Besilatın IR spektrumu

Amlodipin için karakteristik pikler $1730-1715\text{ cm}^{-1}$ C=O gerilimi ve $1160-1120\text{ cm}^{-1}$ S=O gerilimi şeklindedir.

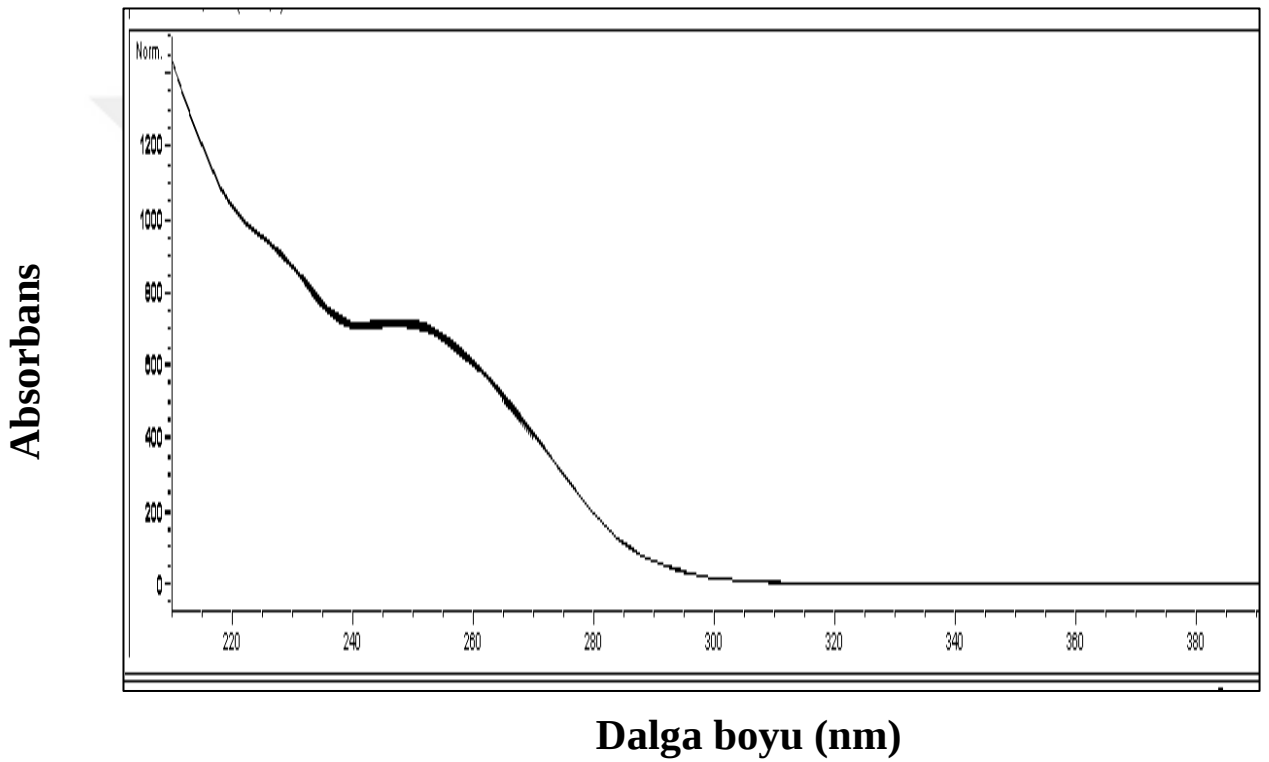


Şekil 3.5. Hidroklorotiyazidin IR spektrumu

Hidroklorotiyazidin için karakteristik pikler $3360,87-3265,11-3167,09\text{ cm}^{-1}$ N-H gerilimi, $1597,45\text{ cm}^{-1}$ aromatik halkanın C=C gerilimi, $1317,08\text{ cm}^{-1}$ C=N gerilimi ve $1243,29\text{ cm}^{-1}$ SO₂ gerilimi şeklindedir.

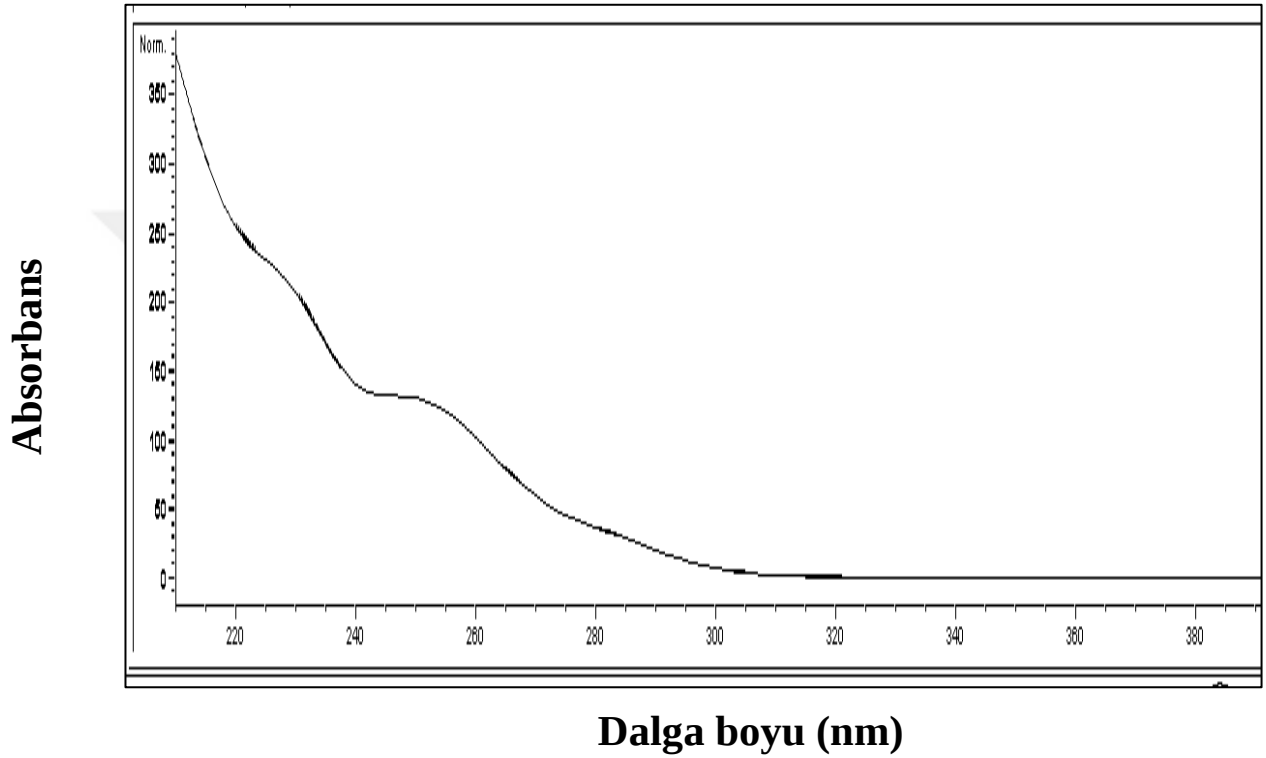
3.1.2. Dalga Boyu Taraması

Olmesartan MeOH ile çözüldükten sonra çözücü olarak belirtilen pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (40:20:40, h\h\h) karışımıyla seyreltme yapılmıştır (20 µg/mL). Bu çözeltiye FDD ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu saptanmıştır (Şekil 3.6).



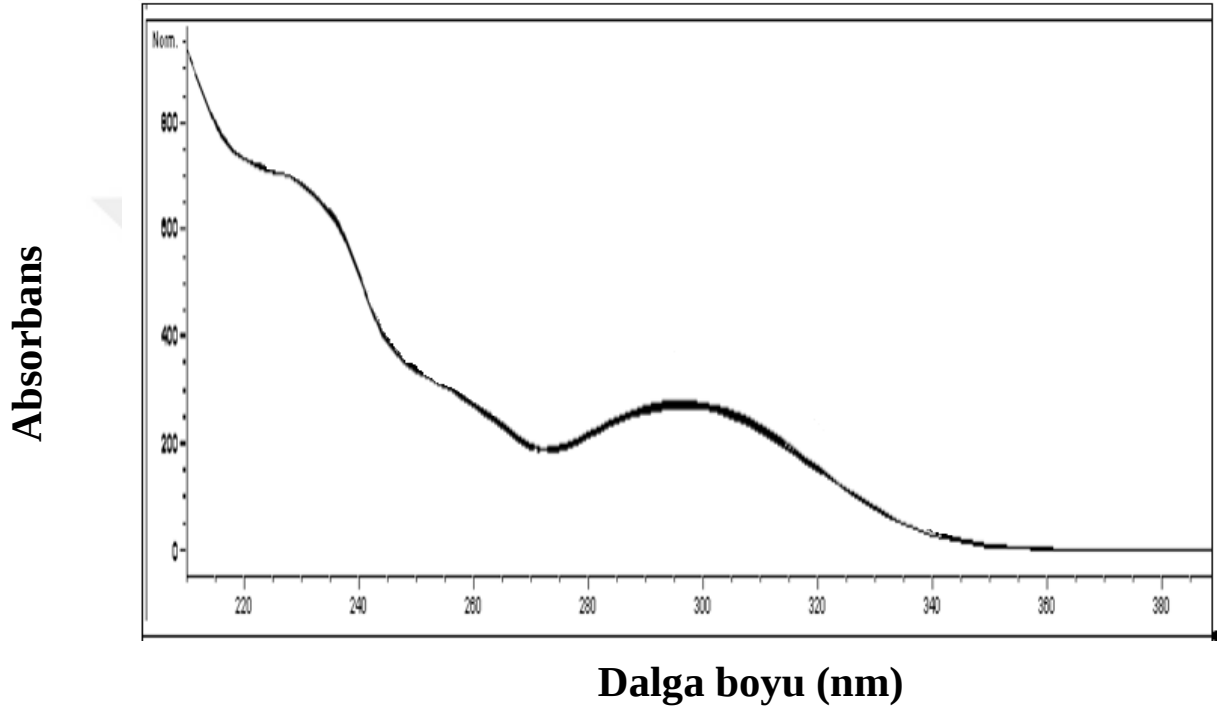
Şekil 3.6. Olmesartanın 20 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu

Valsartan MeOH ile çözüldükten sonra çözücü olarak belirtilen pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (40:20:40, h\h\h) karışımıyla seyreltme yapılmıştır (80 µg/mL). Bu çözeltiye FDD ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu saptanmıştır (Şekil 3.7).



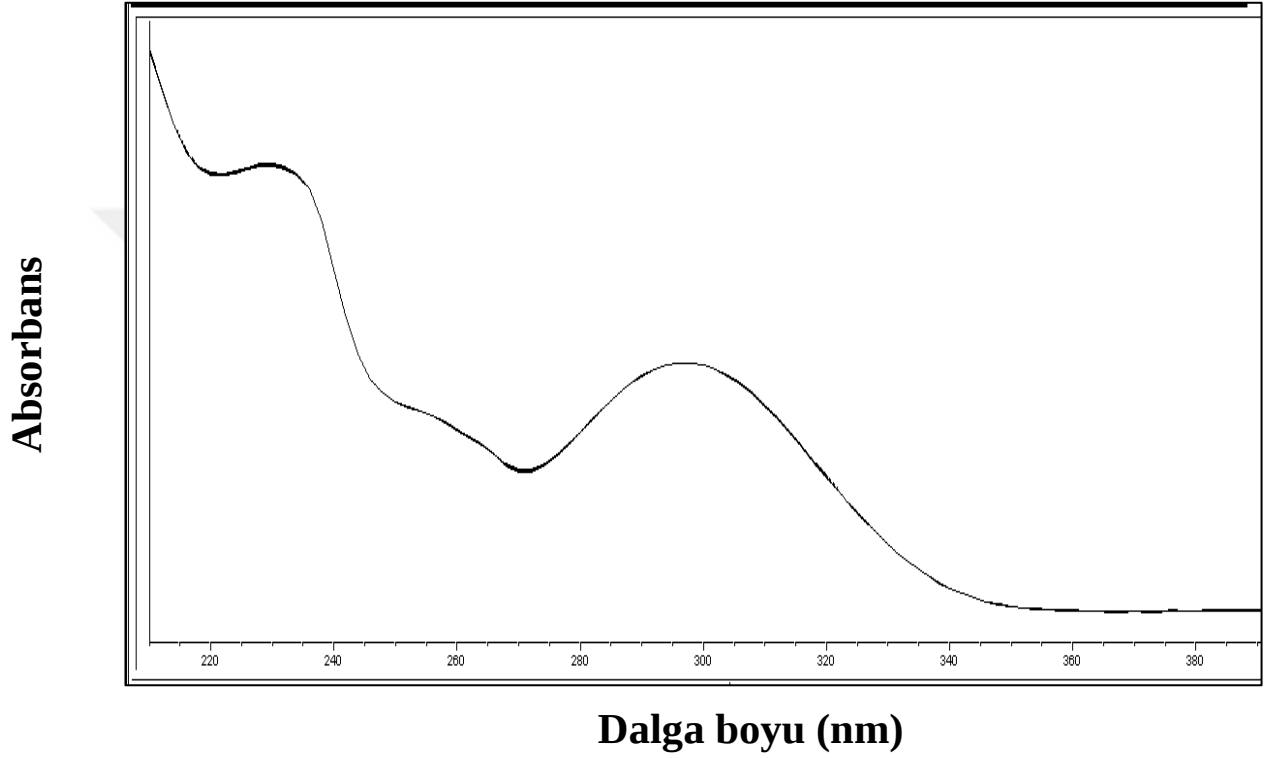
Şekil 3.7. Valsartanın 80 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu

Telmisartan MeOH ile çözüldükten sonra çözücü olarak belirtilen pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (40:20:40, h\h\h) karışımıyla seyreltme yapılmıştır (20 µg/mL). Bu çözeltiye FDD ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu saptanmıştır (Şekil 3.8).



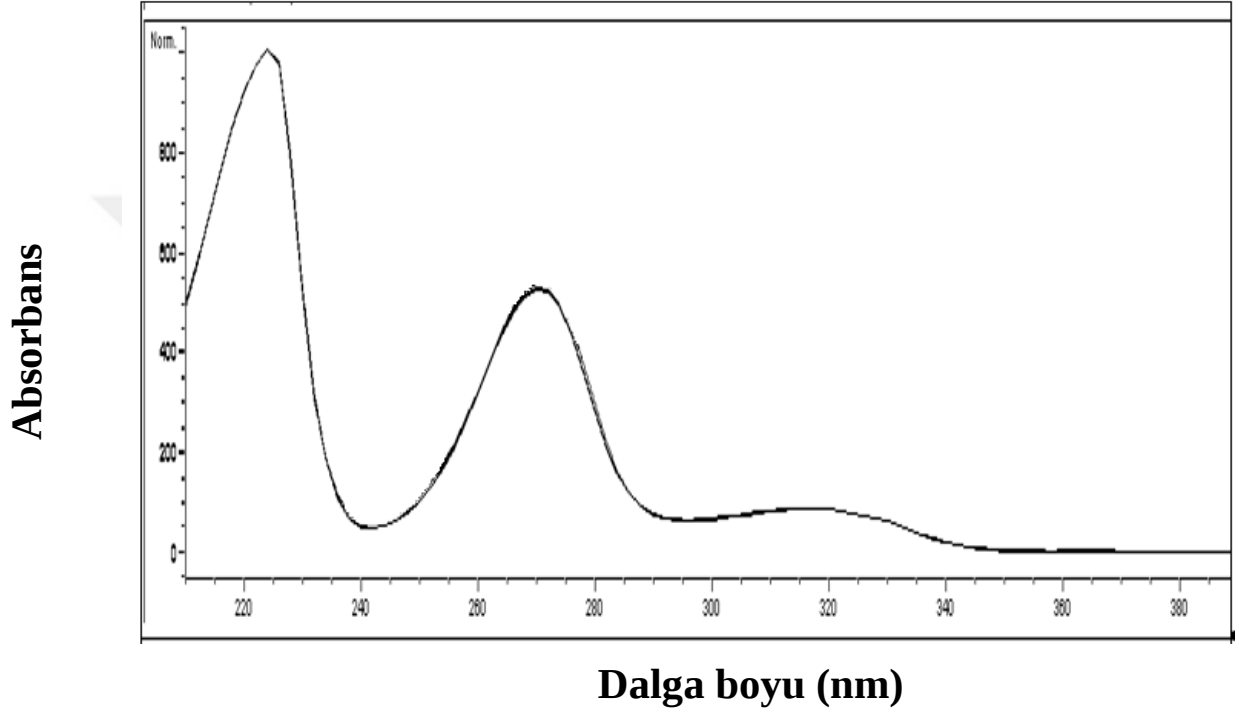
Şekil 3.8. Telmisartanın 20 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu

Amlodipin MeOH ile çözüldükten sonra çözücü olarak belirtilen pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (40:20:40, h\h\h) karışımıyla seyreltme yapılmıştır (5 µg/mL). Bu çözeltiye FDD ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu saptanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Amlodipinin 5 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu

Hidroklorotiyazid MeOH ile çözüldükten sonra çözücü olarak belirtilen pH 3,0 sulu çözelti: asetonitril: MeOH (40:20:40, h\h\h) karışımıyla seyreltme yapılmıştır (12,5 µg/mL). Bu çözeltiye FDD ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu saptanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Hidroklorotiyazidin 12,5 µg/mL derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu

Tüm bu bulgular değerlendirilerek en uygun dalga boyuna karar verilmiştir. Olmesartan, valsartan, amlodipine, hidroklorotiyazid ve telmisartana ait spektrumlar incelendiğinde 220 nm dalga boyunda tekrarlanabilir absorbans verebildiği gözlemlenmiştir. Tez kapsamındaki tüm standartların aynı analiz yöntemi ile miktar tayinin yapılabilmesi için en uygun dalga boyu olan 220 nm seçilmiştir.

3.2. Olmesartan, Valsartan, Telmisartan, Amlodipin ve Hidroklorotiyazid Maddeleri için Geliştirilen YPSK-FDD Yöntemine Ait Analiz Bulguları

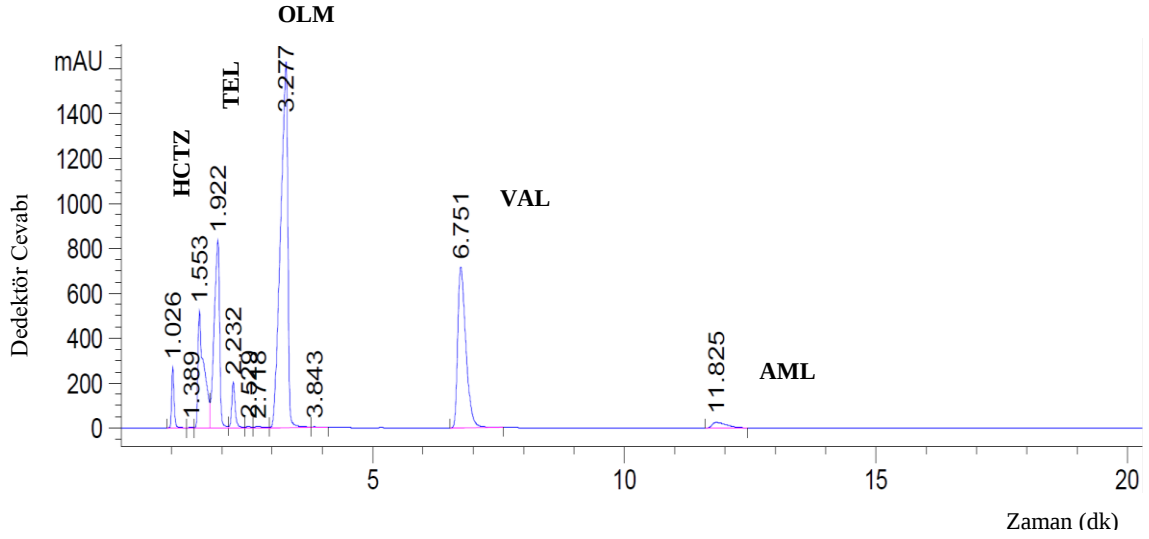
3.2.1. YPSK-FDD Yönteminin Optimizasyonu

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ maddelerinin eş zamanlı olarak YPSK-FDD yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesine hareketli faz bileşiminin denemeleriyle başlanmıştır. Daha sonra hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltinin molarite değişiminin analiz sonucuna etkisini inceleme çalışmaları yapılmıştır. Farklı sabit fazlar denenerek sabit fazın fonksiyonel grubunun ve partikül boyutlarının etkisi incelenmiştir.

3.2.1.1.Hareketli Fazdaki Organik Çözücü ve Sulu Çözeltinin Yüzdelerinin Belirlenmesi

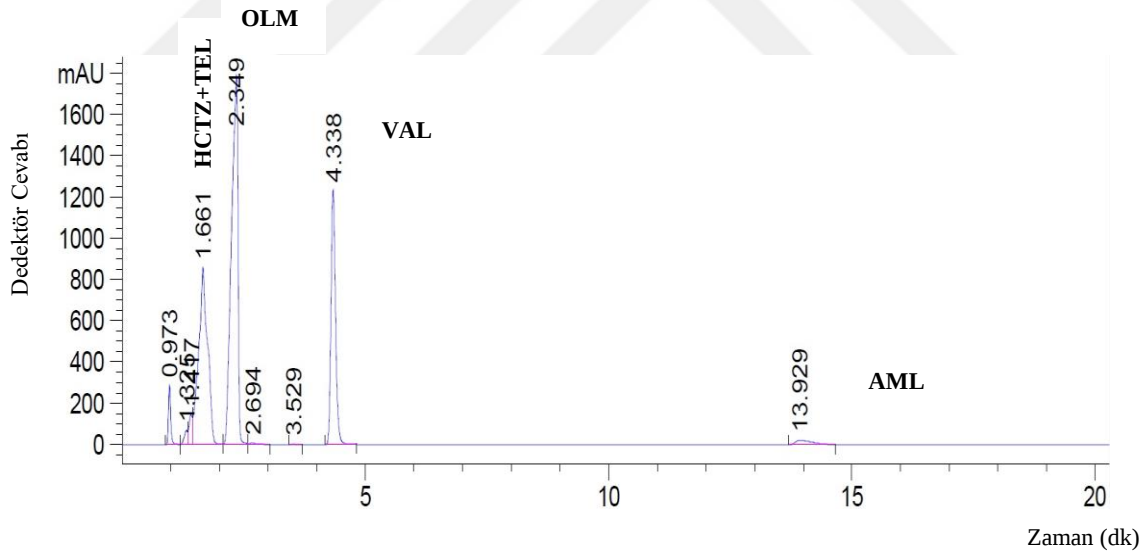
YPSK-FDD yönteminde, OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ maddelerinin SUT parametrelerine bağlı olarak iyi bir ayırım yapılabilmesi için ACN, MeOH ve su yüzdesi son derece önemlidir. En uygun ACN ve MeOH oranının bulunabilmesi için hareketli fazın organik çözücü içeriği hacimce belli oranlarda değiştirilmiştir. Bu çalışmalar Symmetry Shield RP-18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m) kolonda, 25 °C’de, 220 nm dalga boyunda, 1,0 mL dk⁻¹ akış hızı ve 20 μ L enjeksiyon hacmiyle yapılmıştır. Sulu çözelti ise 1000 mL suyun pH değeri 3,0’a ayarlanarak kullanılmıştır.

Organik düzenleyici seçimi için hareketli faz organik düzenleyicisi olarak MeOH ve asetonitril OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ maddelerinin analizine etkisi incelenmiştir. Hareketli fazın asetonitril ve MeOH miktarındaki değişimleri Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14 ve Şekil 3.15’de verilmiştir.



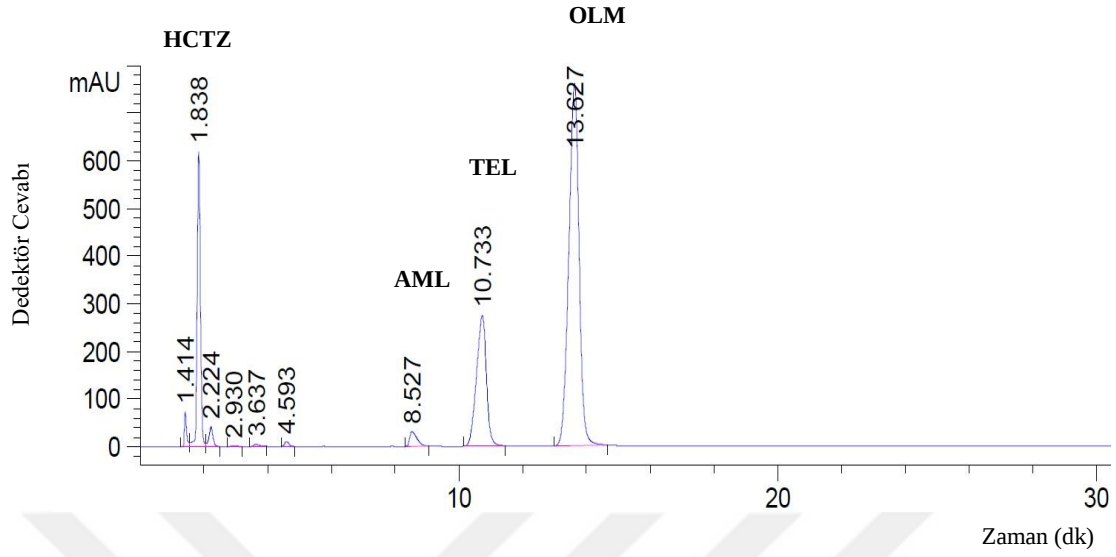
Şekil 3.11. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (35:40:25, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram

pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (35:40:25, h\h\h) hareketli fazı kullanılarak yapılan çalışmalarda HCTZ ve TEL'e ait piklerde ayırım gözlemlenememiştir.



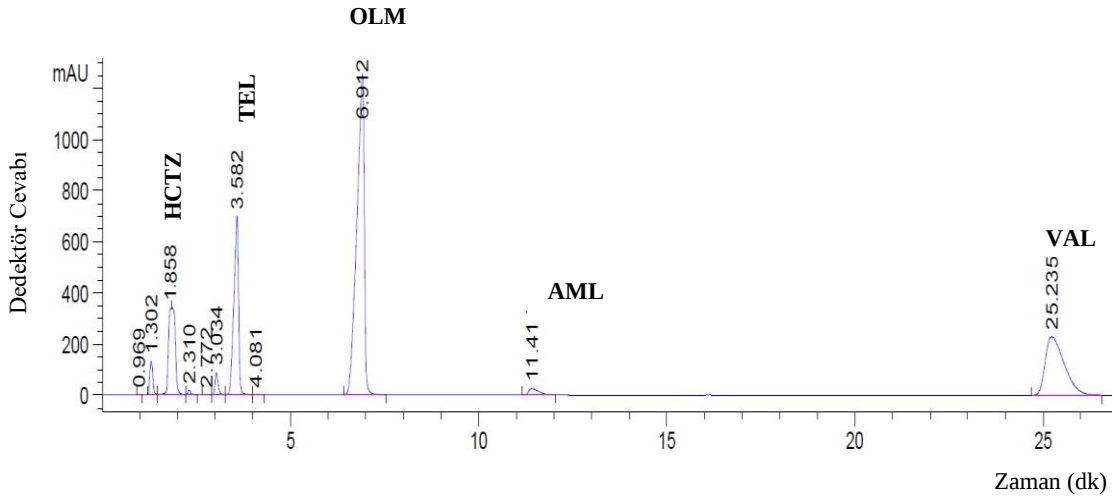
Şekil 3.12. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (35:20:45, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram

pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (35:20:45, h\h\h) hareketli fazı kullanılarak yapılan çalışmalarda HCTZ ve TEL'e ait piklerde ayırım gözlemlenememiştir.



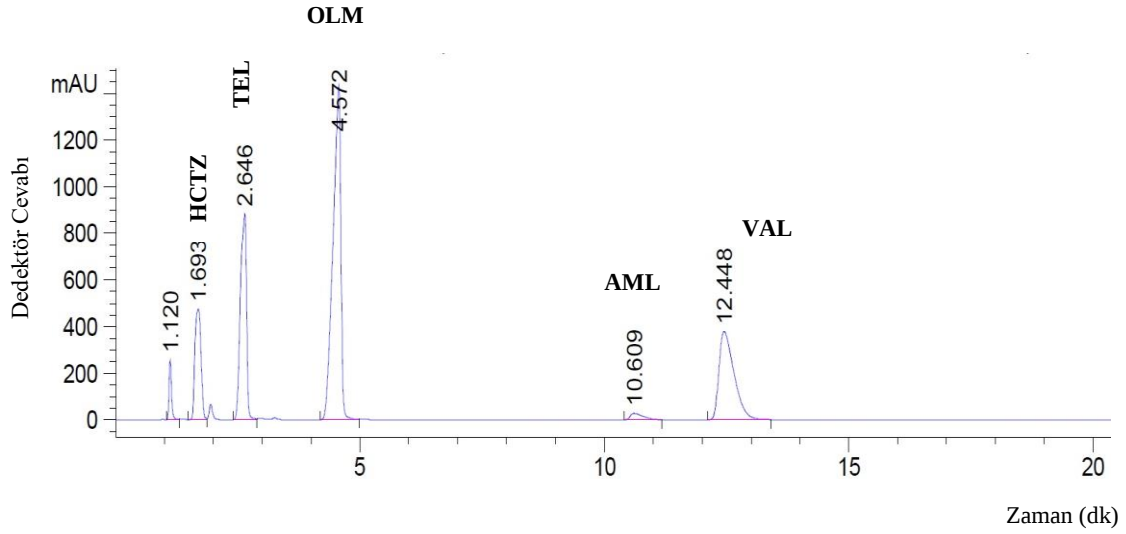
Şekil 3.13. pH 3,0 çözeltisi:MeOH (50:50, h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram

pH 3,0 çözeltisi:MeOH (50:50, h\h) hareketli fazı kullanılarak yapılan çalışmalarda VAL'a ait pikl gözlemlenememiştir. Hareketli fazda ACN olmadığı durumlarda VAL pikinin alıkonulma süresi uzamaktadır.



Şekil 3.14. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (50:25:25, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram

pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (50:25:25, h\h\h) hareketli fazı kullanılarak yapılan çalışmalarda VAL'a ait pik 25. dakikada alıkonmuştur. Analiz zamanı düşünülerek bu hareketli faz karışımı kullanılmamıştır.



Şekil 3.15. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h) ile yapılan çalışmalara ait kromatogram

pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h) hareketli fazı kullanılarak yapılan çalışmalarda tüm piklerde ayırım sağlanmış ve analiz süresi kısaltılmıştır. Bu yüzden tez çalışmasında pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h) hareketli faz olarak kullanılacaktır.

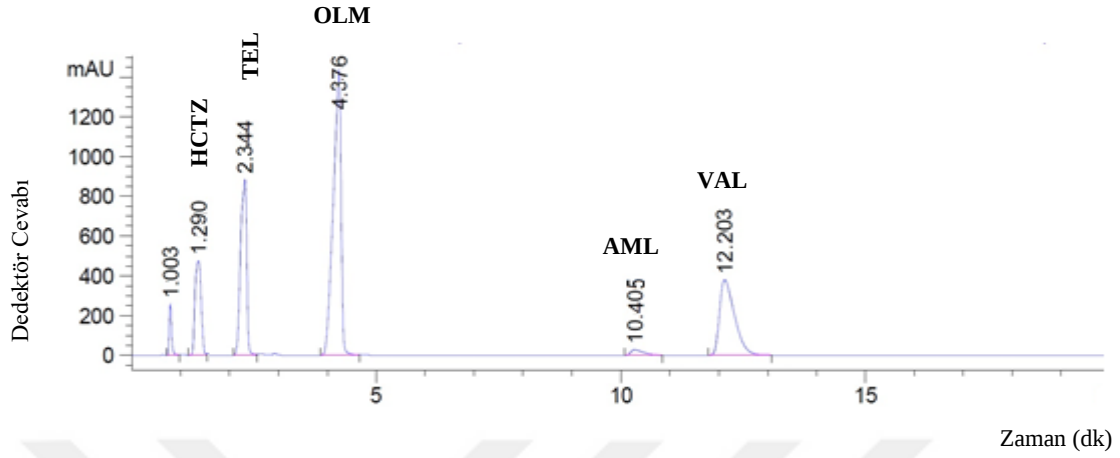
3.2.1.2. Sabit Fazın Seçimi

Hareketli faz bileşimi belirlendikten sonra kolon (sabit faz) sıcaklığı, akış hızı ve enjeksiyon hacimleri sabit tutularak C18 özellikte kolon denemeleri yapılmıştır. Bu kolonların denemeleri sırasında pik simetritlerinde artış gözlemlenmiştir. Piklerin simetrisinin belirli sınırlar içerisinde kalabilmesi için pik simetri özelliği olan Symmetry Shield RP-18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m) tercih edilmiştir.

3.2.1.3. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

YPSK-FDD yönteminin ayırım mekanizmasında sıcaklığın analiz sonuçlarına etkisini incelemek için deneysel tüm parametreler sabit tutularak 30°C sıcaklıkta analiz yapılmıştır (Şekil 3.16). Hidroklorotiyazid etken maddesine ait pikin alıkonma

zamanın düşmesi nedeniyle kapasite faktörü 1'in altına düşmektedir. Bu yüzden 25°C'da çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.16. pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h) ve 30 °C kolon sıcaklığı ile yapılan çalışmalara ait kromatogram

3.2.1.4. Akış Hızı Optimizasyonu

Akış hızı belirlerken HCTZ pikinin alıkonma zamanı, ayırımlar ve kolon basıncındaki artış göz önünde bulundurulmuştur. Akışın 1,5 mL dk⁻¹ olduğu durumda, HCTZ pikinin alıkonma zamanı azalmış olup sistem uygunluk testi parametreleri açısından uygunsuzdur. Akışın 2,0 mL dk⁻¹ olduğu durumda ise, kolon basıncında artış olmuş ve analiz yapılamamıştır. Bu nedenle akış hızı 1,0 mL dk⁻¹ olarak optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda optimize edilen koşullar Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Optimizasyon sonuçları

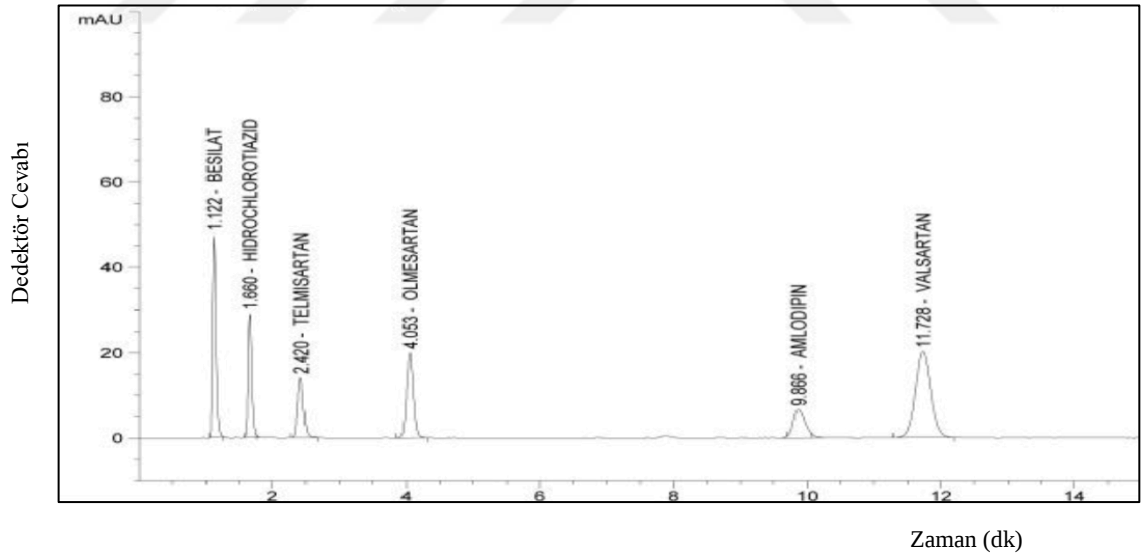
Parametre	Optimize Edilen Koşullar
Kolon	Symmetry Shield RP-18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm)
Hareketli faz bileşimi	pH 3,0 çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h)
Sıcaklık (°C)	25 °C
Akış hızı (mL dk ⁻¹)	1 mL dk ⁻¹
Enjeksiyon hacmi (µL)	20 µL
Dalga boyu (nm)	220 nm

3.2.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları

Geliştirilen sıvı kromatografi yöntemi YPSK-FDD (Fotodiyot dizi dedektörü) sistemine enjekte edilmiştir. SUT parametreleri optimize edilen koşullarda hesaplanmış ve Çizelge 3.2’de verilmiştir (Şekil 3.17).

Çizelge 3.2. SUT parametrelerine ait sonuçlar

Parametre	HCTZ	TEL	OLM	AML	VAL
Alıkonma zamanı (t_R)	1,660	2,420	4,053	9,866	11,728
Kapasite faktörü (k)	1,1	2,0	4,1	11,3	13,7
Ayırım Gücü (R_s)	-	6,11	9,88	24,81	5,29
Kolon etkinliği (N)	4695	4105	8202	18661	12870
Seçicilik (α)	-	1,88	2,01	2,79	1,21
Kuyruklanma faktörü (T)	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1

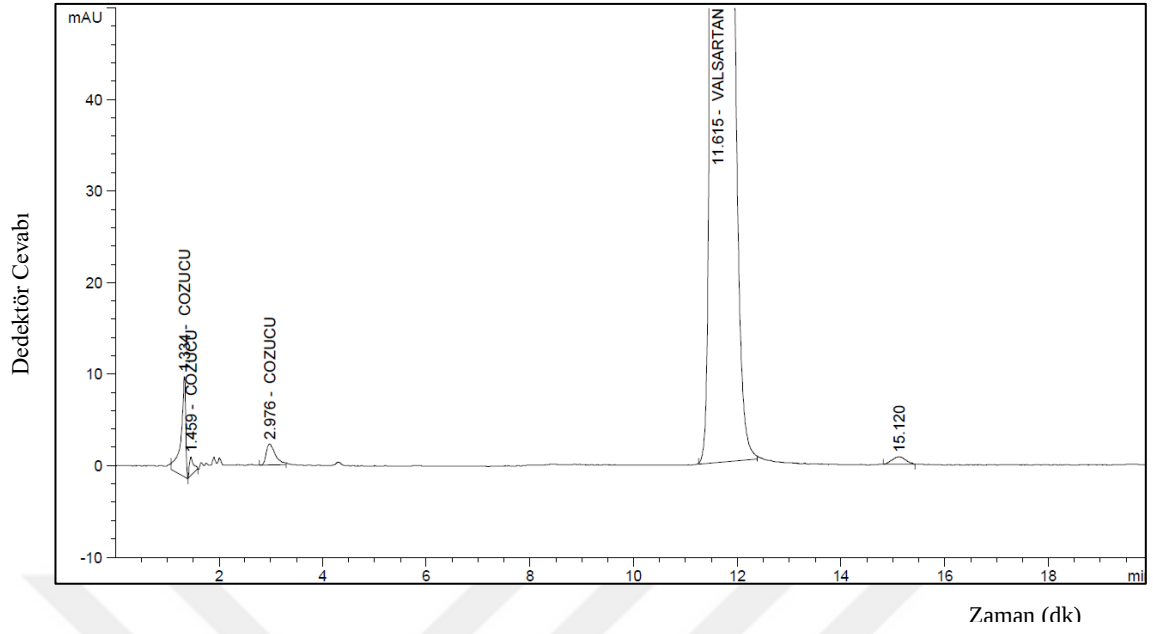


Şekil 3.17. SUT’a ait kromatogram

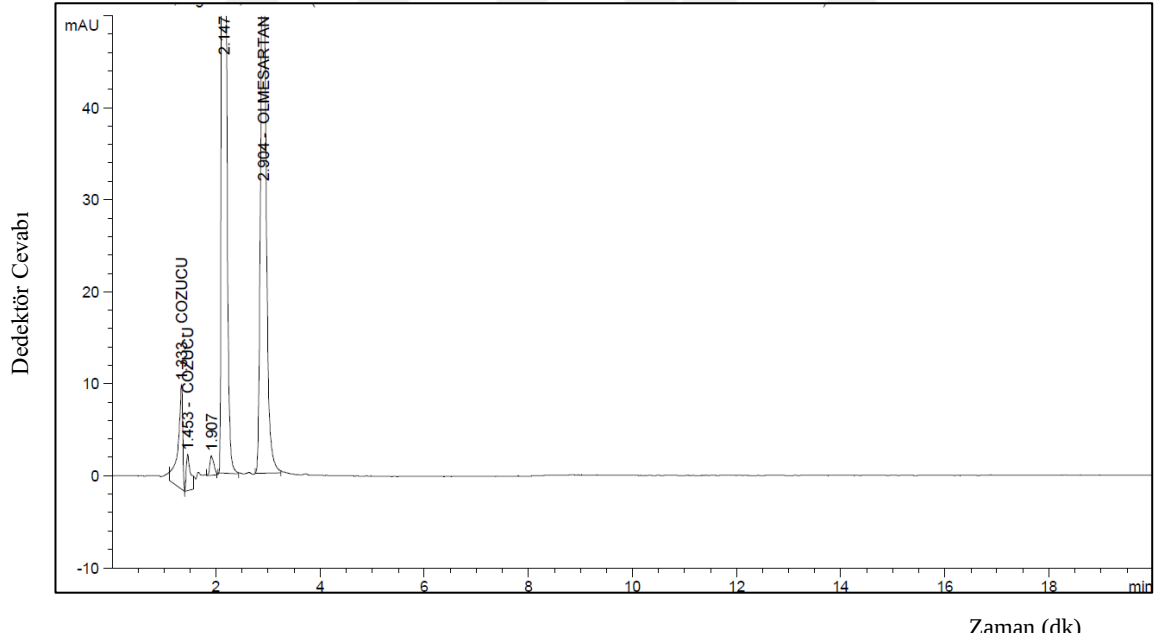
3.2.3. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Yöntem optimizasyonu çalışmalarından sonra geliştirilen yöntemin seçiciliğini belirleyebilmek için herbir etken maddeye ayrı ayrı hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapılmıştır. Bozundurma çalışmalarında OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddeleri doğrusallık çalışmalarındaki konsantrasyonlara eşit olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra belirli koşullara tabi tutularak bozunmaları sağlanmıştır. Bu koşullar etken madde çözeltilerinin 5 saat süre ile 0,1 N HCl ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi, % 0,3' lük H₂O₂ ile oksidasyon ve 90 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesidir. Sonuçlar bozundurulmamış etken madde çözeltileri ile karşılaştırılarak yüzde bozunma hesaplanmış ve pik saflıklarına bakılmıştır.

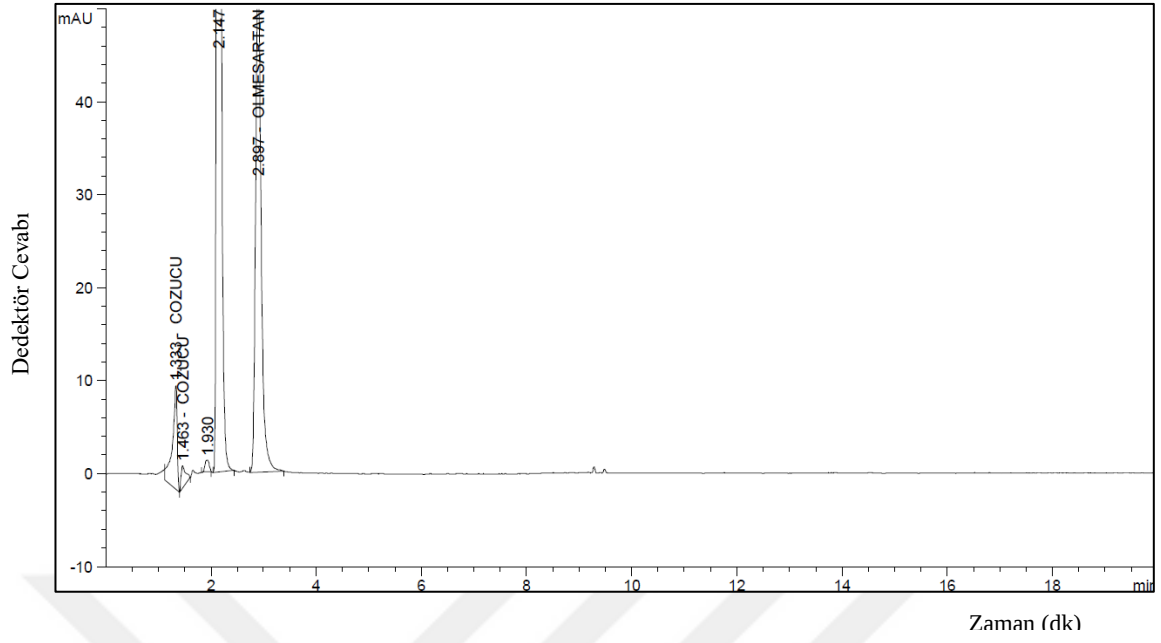
Etken maddeler için bozundurma çalışmaları incelendiğinde AML, HCTZ ve TEL için herhangi bir bozunma gözlemlenmemiştir. VAL için 5. Saat 0,1 N HCl asit hidrolizi ile 15,12. dakikada bir bozunma safsızlığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.18). OLM için ise 90 °C' de sıcak su banyosunda bekletilen standart çözeltilerinde bir bozunma gözlemlenmemiştir. Ancak asit, baz ve hidrojen peroksit ile yapılan çalışmalarda bozunma safsızlığı oluşmuştur. Bu safsızlık hidrojen peroksitte 2,4 dk civarı görülürken, asit ve bazın çözücü etkisi ile 2,1 dk civarında gözlemlenmiştir (Şekil 3.19, Şekil 3.20 ve Şekil 3.21). Olmesartan ait alıkonma zamanında çözücülerin etkisi nedeniyle değişiklik gözlemlenmiş, başlangıç çözeltilerinde de aynı değişim görüldüğü için sonuçlar yaklaşık 2.9 dk civarındaki pik Olmesartan piki olarak değerlendirilip hesaplanmıştır. Oluşan tüm safsızlıklar tablet formlarında yer alan diğer etken maddeler ile aynı alıkonma zamanında görülmediği ve piklerin saflık dereceleri uygun olduğu için miktar tayini analizlerine herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları sonucunda muhtemel bozunma safsızlıkları ile birlikte etken maddelerinin eş zamanlı olarak analizinin yapılabileceği görülmüştür.



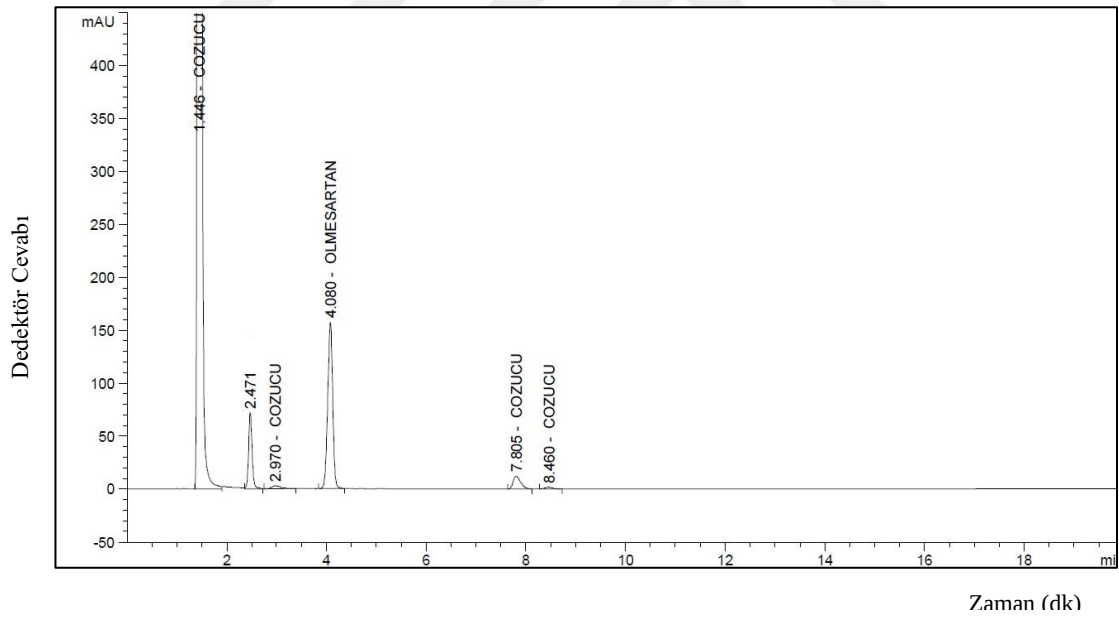
Şekil 3.18. $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ Valsartanın asit bozundurmasına ait kromatogram



Şekil 3.19. $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Olmesartanın asit bozundurmasına ait kromatogram



Şekil 3.20. 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Olmesartanın baz bozundurmasına ait kromatogram



Şekil 3.21. 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Olmesartanın hidrojen peroksit bozundurmasına ait kromatogram

Çizelge 3.3. Hızlandırılmış Bozunmaya Ait Sonuçlar

	Asidik Bozunma			Bazik Bozunma			Oksidasyon			Isıl Bozunma		
	Başlangıç	5.Saat	%Bozunma	Başlangıç	5.Saat	%Bozunma	Başlangıç	5.Saat	%Bozunma	Başlangıç	5.Saat	%Bozunma
HCTZ	%98,2	%98,1	%0,1	%98,2	%96,4	%1,8	%101,1	%99,0	%2,1	%98,4	%99,5	-
TEL	%102,5	%101,3	%1,2	%102,5	%101,9	%0,6	%98,8	%100,5	-	%102,6	%101,6	%1,0
OLM	%103,4	%28,2	%72,7	%103,4	%15,0	%85,5	%100,4	%77,8	%22,5	%99,2	%99,1	%0,1
AML	%99,4	%98,6	%0,6	%99,4	%100,6	-	%98,8	%97,5	%1,3	%101,3	%97,5	%3,8
VAL	%98,5	%98,7	-	%98,5	%97,6	%0,9	%98,5	%97,0	%1,5	%98,4	%99,9	-

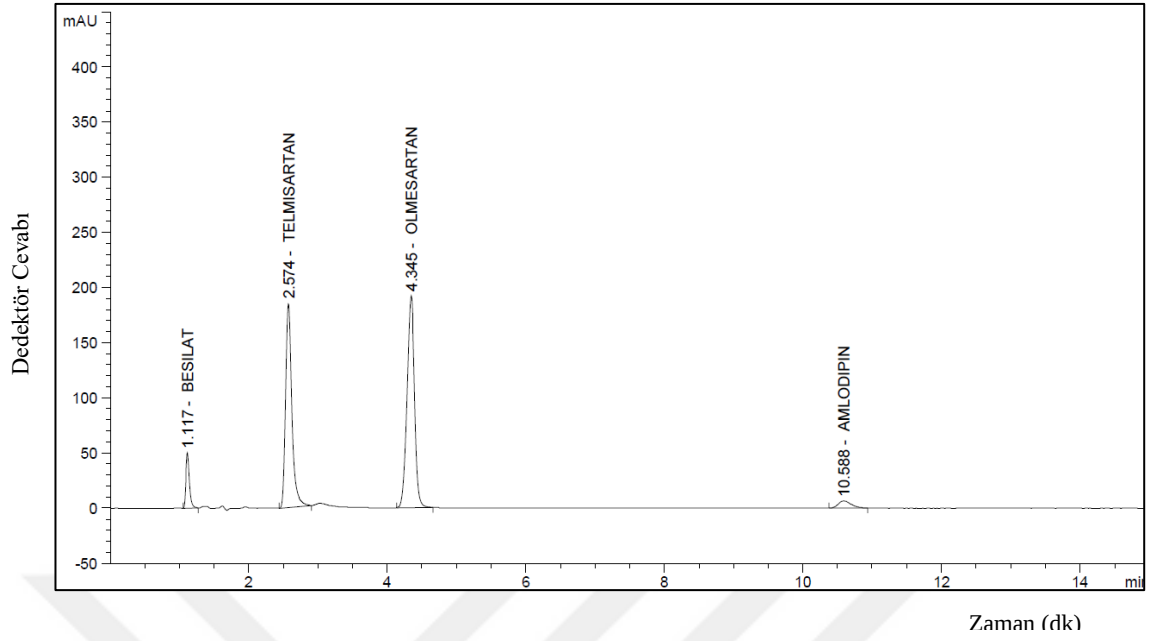
3.2.4. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık

Tez çalışmasının bu aşamasında her bir etken madde için artan konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanıp YPSK-FDD sistemine enjekte edilmiştir. Artan konsantrasyonlara karşı alan oranı değerleri ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve yöntem validasyonunun doğrusallık parametresi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ikili ve üçlü karışımlara ait standart çözeltilerinden ayrı ayrı kalibrasyonlar elde edilmiştir: Çizelge 3.3’de verilen değerler elde edilen kalibrasyon doğrularından birer sonucu içermektedir. Ayrıca kalibrasyon doğrularına ait kromatogramlar Şekil 3.22, 3.23, 3.24, 3.25 ve 3.26’da verilmiştir.

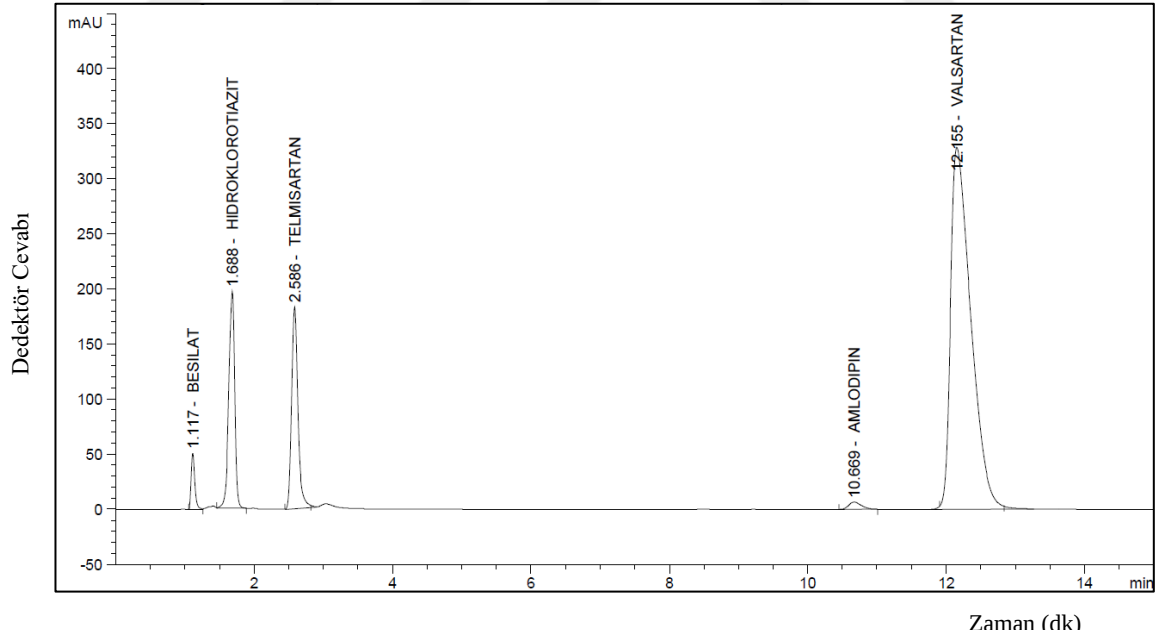
Çizelge 3.4. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri

Validasyon Parametresi	OLM	VAL	TEL	AML	HCTZ
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,0-40	4,0-160	1,0-40	0,25-100	0,63-25
Eğim	0,6266	0,7578	1,4410	0,186	0,7709
Kesişim	0,0027	-0,0070	-0,0034	0,00037	0,0013
Korelasyon katsayısı	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Eğimin standart hatası	0,002	0,001	0,001	0,0007	0,001
Kesişimin standart hatası	0,003	0,012	0,003	0,0004	0,002
Tehşis sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,06	0,06	0,03	0,09	0,04
Gün içi tekrar edilebilirlik % BSS*	0,23	0,20	0,38	0,92	0,15
Günler arası tekrar edilebilirlik % BSS*	0,70	0,48	0,40	1,42	1,10

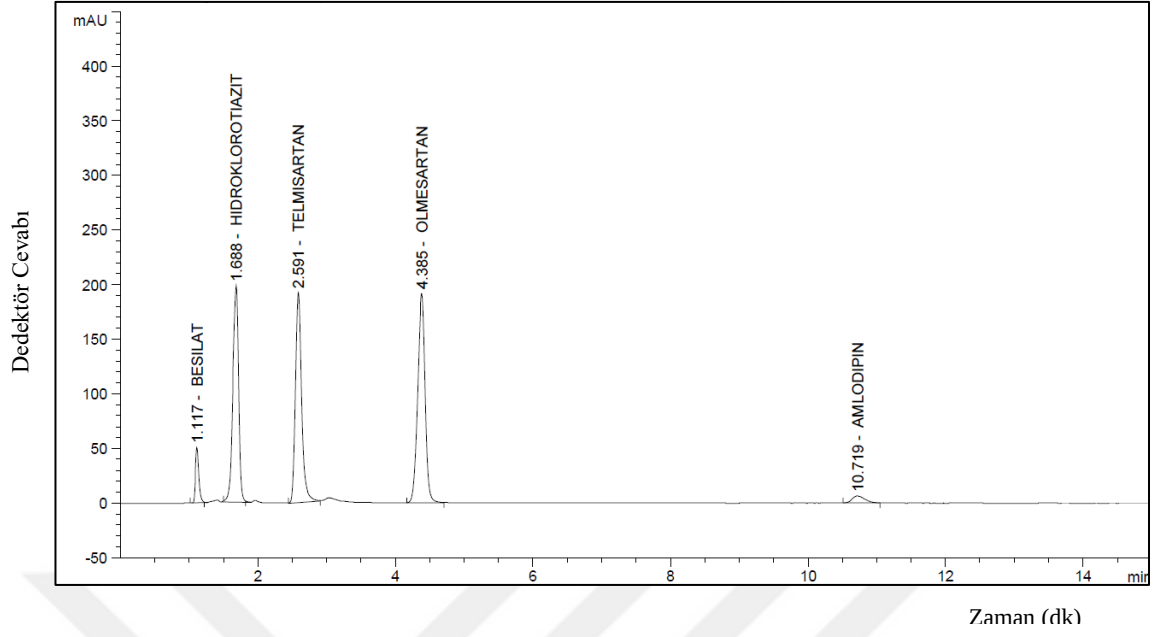
*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır



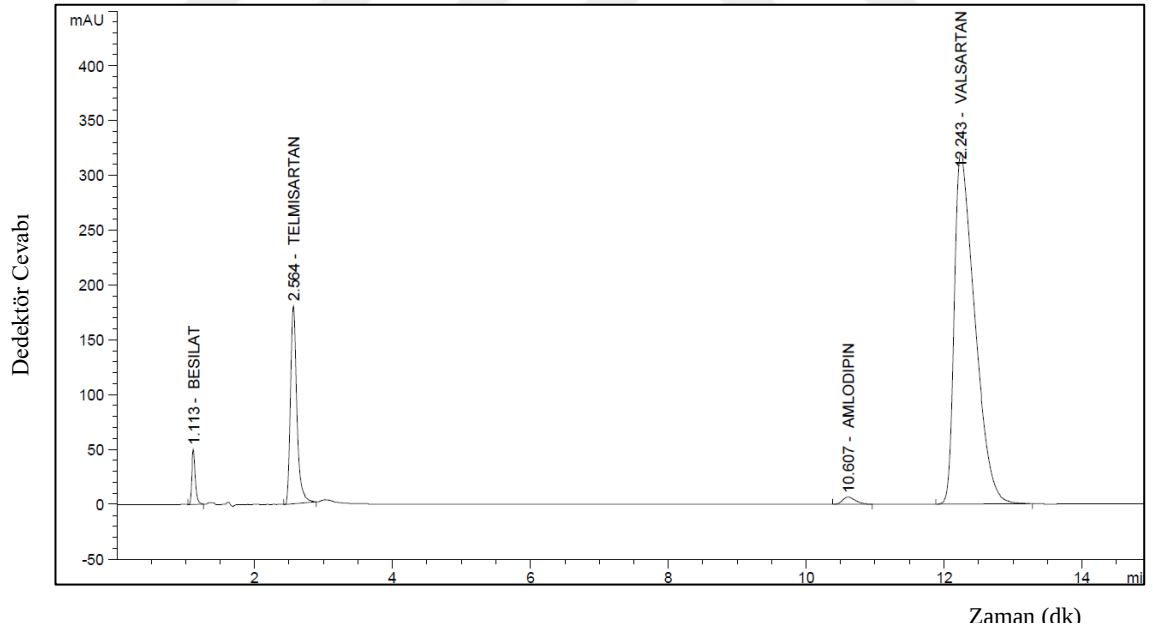
Şekil 3.22. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla TEL (iç standart), OLM ve AML için 10, 20 ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$



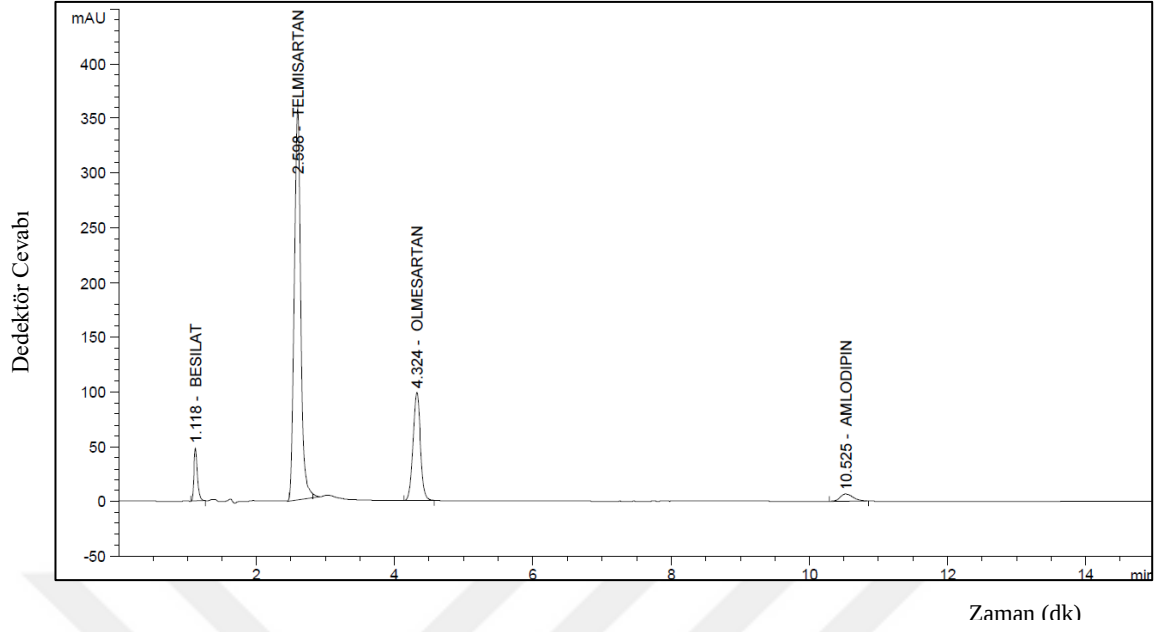
Şekil 3.23. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla HCTZ, TEL (iç standart), AML ve VAL için 12,5, 10, 5 ve 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.24. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla HCTZ, TEL (iç standart), OLM ve AML için 12,5; 10, 20 ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.25. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla TEL (iç standart), AML ve VAL için 10, 5 ve 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.26. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla TEL, OLM (iç standart) ve AML için 20, 10 ve 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.2.5. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddelerinin miktar tayini için geliştirilen YPSK-FDD yöntemi ikili ve üçlü karışım olan piyasa preparatlarına uygulanmıştır.

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 2.1.5.2’de anlatıldığı şekilde tablet çözletileri hazırlanmış ve analizi yapılmıştır. Bu analizlerden okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 ve 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.5. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML
Etiket miktarı (mg)	20	5
Numune 1	20,03	5,14
Numune 2	20,08	5,11
Numune 3	20,05	5,15
Numune 4	20,02	5,07
Numune 5	19,95	5,15
Bulunan ortalama miktar (mg)	20,03	5,12
BSS (%)*	0,25	0,59
BH (%)	-0,2	-2,4

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

Çizelge 3.6. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete (Exforge HCT®) Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları.

	VAL	AML	HCTZ
Etiket miktarı (mg)	160	10	25
Numune 1	160,58	9,94	24,30
Numune 2	160,53	10,15	24,51
Numune 3	161,12	10,01	24,50
Numune 4	159,98	10,14	24,49
Numune 5	160,45	10,04	24,61
Bulunan ortalama miktar (mg)	160,53	10,06	24,48
BSS (%)*	0,26	0,89	0,45
BH (%)	-0,3	-0,6	2,1

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

Çizelge 3.7. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML	HCTZ
Etiket miktarı (mg)	20	5	12,5
Numune 1	19,84	5,09	12,44
Numune 2	19,88	5,09	12,48
Numune 3	19,96	5,11	12,52
Numune 4	20,10	5,16	12,56
Numune 5	19,93	5,05	12,54
Bulunan ortalama miktar (mg)	19,94	5,10	12,51
BSS (%)*	0,50	0,78	0,40
BH (%)	0,3	-2,0	-0,2

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

Çizelge 3.8. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	VAL	AML
Etiket miktarı (mg)	160	10
Numune 1	159,85	10,08
Numune 2	159,15	10,13
Numune 3	160,78	10,05
Numune 4	159,85	10,11
Numune 5	160,02	9,95
Bulunan ortalama miktar (mg)	159,93	10,06
BSS (%)*	0,36	0,7
BH (%)	0,04	-0,6

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

Çizelge 3.9. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	TEL	AML
Etiket miktarı (mg)	40	10
Numune 1	40,16	10,37
Numune 2	40,25	10,21
Numune 3	40,27	10,03
Numune 4	40,27	10,14
Numune 5	40,13	10,07
Bulunan ortalama miktar (mg)	40,22	10,16
BSS (%)*	0,17	1,28
BH (%)	-0,5	-1,6

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

3.2.6. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddelerinin miktar tayini için geliştirilen YPSK-FDD yöntemi ikili ve üçlü karışım olan piyasa preparatlarına uygulanmıştır. Tablet katkı maddelerinin yöntemle bir etkisinin olup olmadığını anlamak için de geri kazanım çalışması gerçekleştirilmiştir.

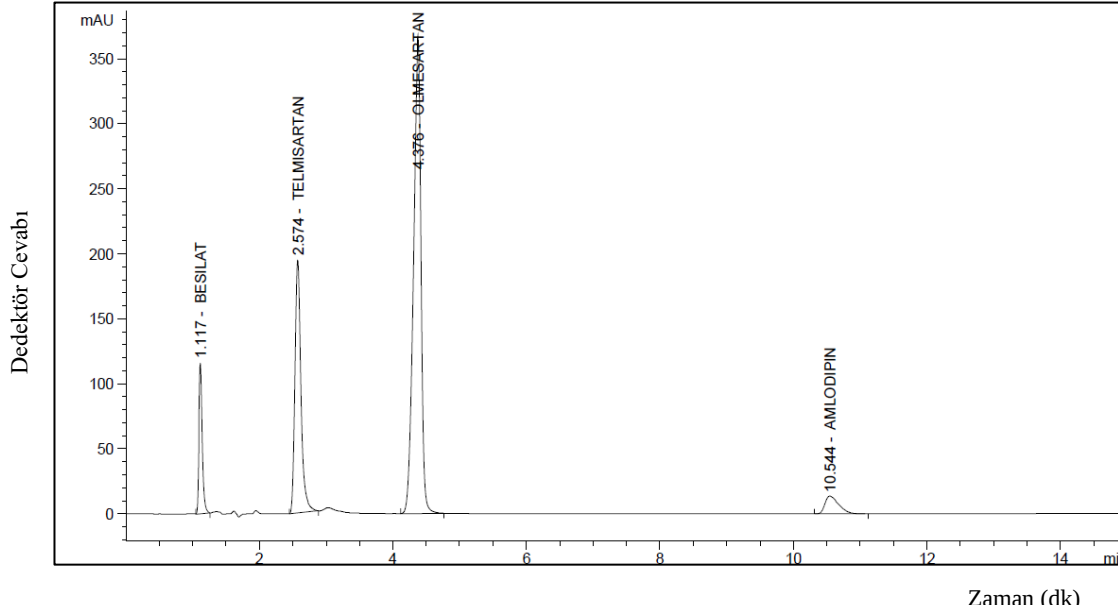
OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 2.1.5.3'te anlatıldığı şekilde tablet çözletileri hazırlanmış ve saf

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddelerini içeren çözeltiler ile aynı anda analizi yapılmıştır. Bu eğrilerden okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.10, 3.11, 3.12, 3.13 ve 3.14'te verilmiştir. Ayrıca geri kazanım çalışmalarına ait kromatogramlar Şekil 3.27, 3.28, 3.29, 3.30 ve 3.31'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait Geri Kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML
Etiket miktarı (mg)	20	5
Bulunan miktar (mg)	20,03	5,12
BSS (%)*	0,25	0,59
BH (%)	-0,2	-2,4
İlave edilen miktar (mg)	19,86	5,02
Bulunan miktar (mg)	19,58	5,02
Geri kazanım (%)	98,6	100,0
Geri kazanıma ait BSS (%)*	0,73	1,10
Geri kazanıma ait BH (%)*	1,4	0,0

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

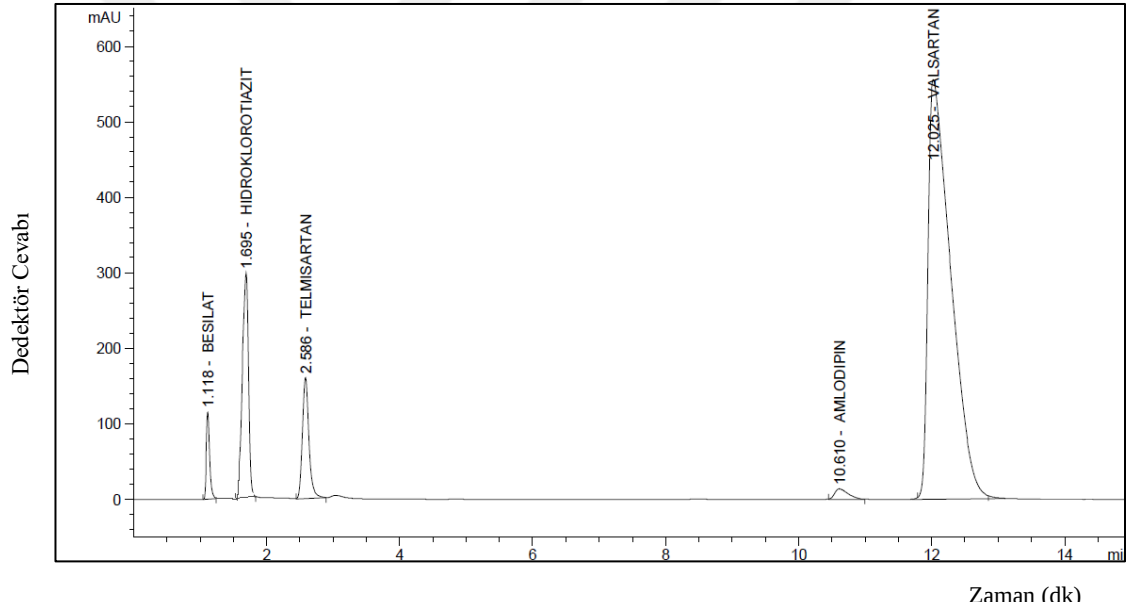


Şekil 3.27. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı

Çizelge 3.11. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete (Exforge HCT®) Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları.

	VAL	AML	HCTZ
Etiket miktarı (mg)	160	10	25
Bulunan miktar (mg)	160,53	10,06	24,48
BSS (%)*	0,26	0,89	0,45
BH (%)	-0,3	-0,6	2,1
İlave edilen miktar (mg)	160,90	10,10	25,10
Bulunan miktar (mg)	163,54	10,11	24,88
Geri kazanım (%)	101,6	100,1	99,1
Geri kazanıma ait BSS (%)*	0,13	1,04	0,59
Geri kazanıma ait BH (%)*	-1,6	-0,1	0,9

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

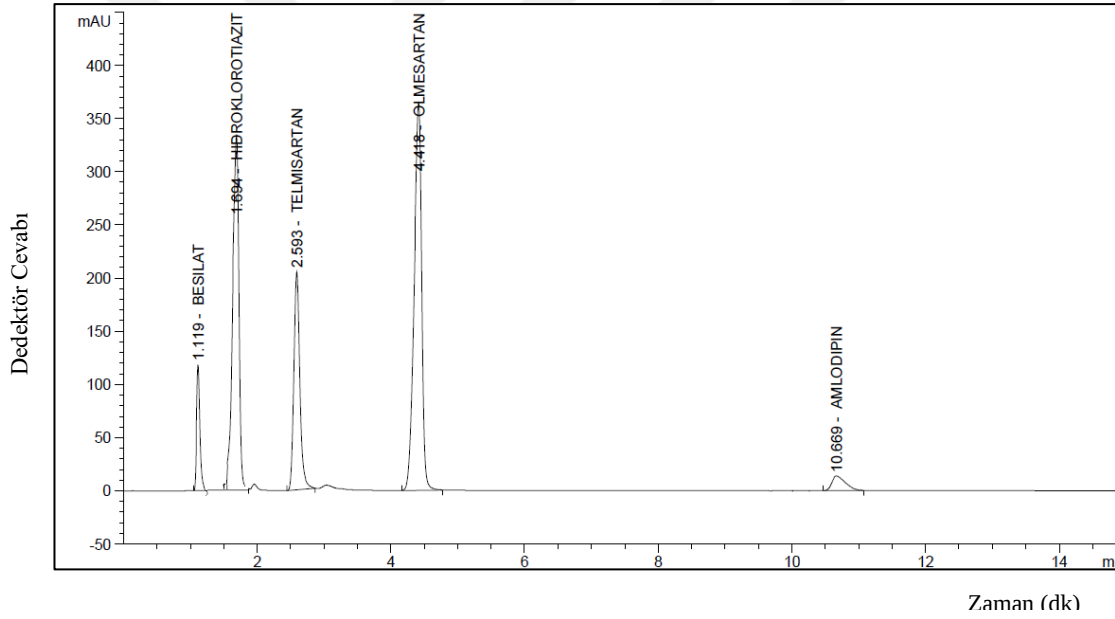


Şekil 3.28. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin Tablete (Exforge HCT®) Ait Geri Kazanım Kromatogramı

Çizelge 3.12. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML	HCTZ
Etiket miktarı (mg)	20	5	12,5
Bulunan miktar (mg)	19,94	5,10	12,51
BSS (%)*	0,50	0,78	0,40
BH (%)	0,3	-2,0	-0,2
İlave edilen miktar (mg)	20,30	10,10	12,64
Bulunan miktar (mg)	20,58	10,11	12,69
Geri kazanım (%)	101,4	100,1	100,4
Geri kazanıma ait BSS (%)*	0,84	1,24	1,26
Geri kazanıma ait BH (%)*	-1,4	-0,1	-0,4

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

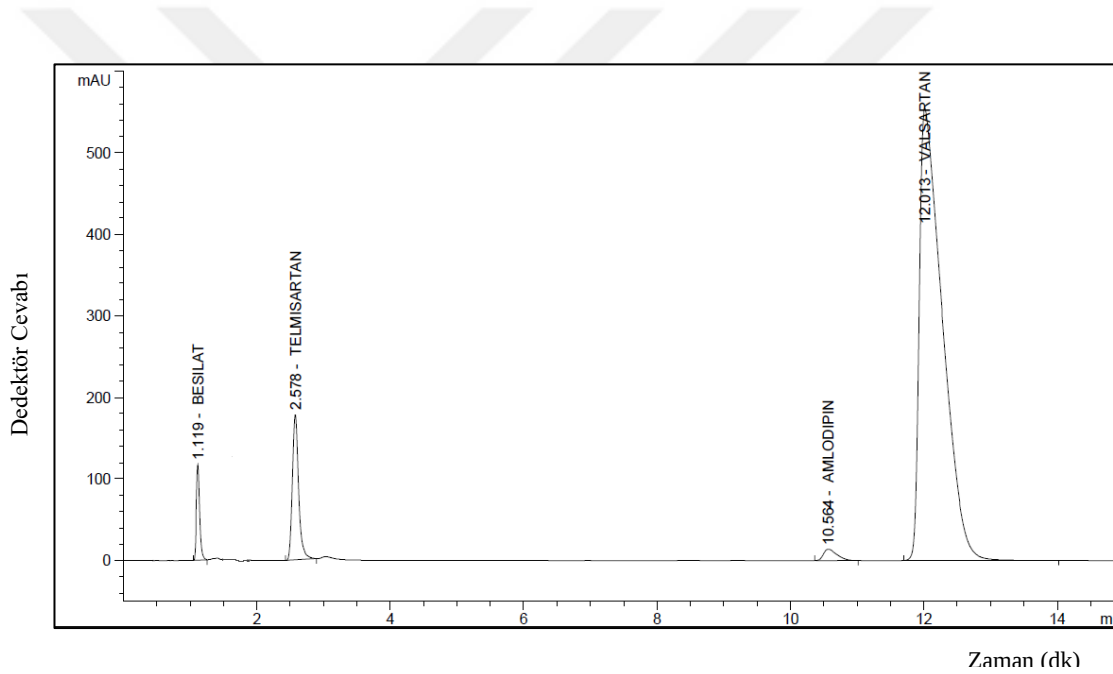


Şekil 3.29. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı

Çizelge 3.13. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	VAL	AML
Etiket miktarı (mg)	160	10
Bulunan miktar (mg)	159,93	10,06
BSS (%)*	0,36	0,7
BH (%)	0,04	-0,6
İlave edilen miktar (mg)	160,10	9,88
Bulunan miktar (mg)	158,61	9,79
Geri kazanım (%)	99,1	99,1
Geri kazanıma ait BSS (%)*	0,36	0,9
Geri kazanıma ait BH (%)*	0,9	0,9

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

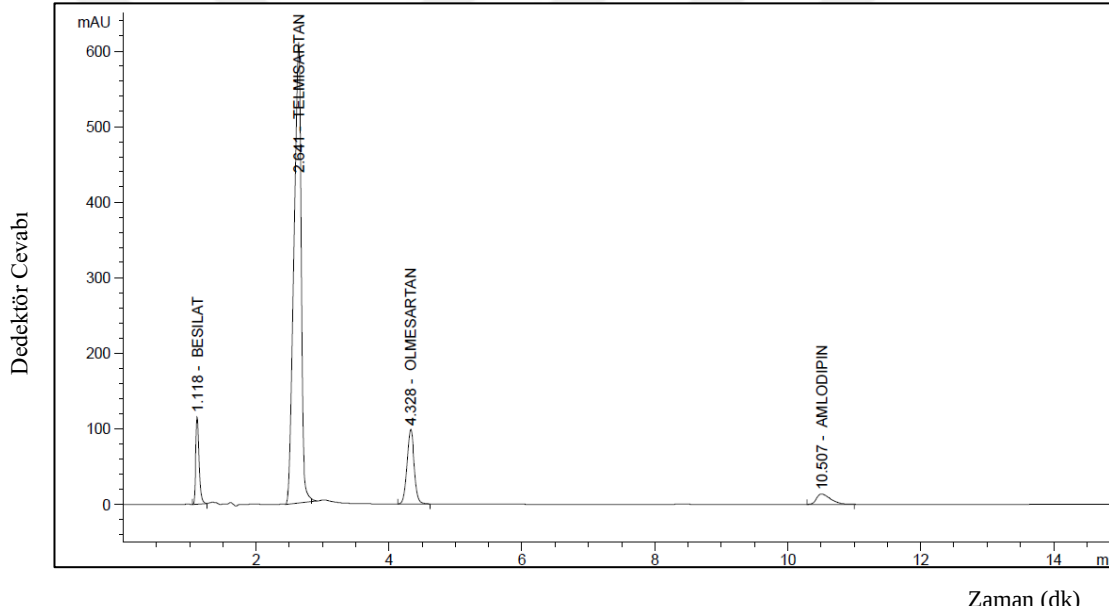


Şekil 3.30. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı

Çizelge 3.14. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	TEL	AML
Etiket miktarı (mg)	40	10
Bulunan miktar (mg)	40,22	10,16
BSS (%)*	0,17	1,28
BH (%)	-0,5	-1,6
İlave edilen miktar (mg)	40,40	9,70
Bulunan miktar (mg)	41,37	9,68
Geri kazanım (%)	102,4	99,8
Geri kazanıma ait BSS (%)*	0,37	0,79
Geri kazanıma ait BH (%)*	-2,4	0,2

*5 tekrarlı analiz sonuçları.



Şekil 3.31. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı

3.3. Olmesartan, Valsartan, Telmisartan, Amlodipin ve Hidroklorotiyazid Maddeleri için Geliştirilen SK-K/KS Yöntemine Ait Analiz Bulguları

3.3.1. SK-K/KS Yönteminin Optimizasyonu

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ maddelerinin eş zamanlı olarak SK-K/KS yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesine hareketli faz bileşiminin denemeleriyle başlanmıştır. Daha sonra hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltinin molarite değişiminin analiz sonucuna etkisini inceleme çalışmaları yapılmıştır.

3.3.1.1. SK-K/KS Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi

SK-K/KS cihaz parametrelerinin belirlenmesinde hareketli faz tamponu olarak 10 mM konsantrasyonda amonyum format reaktifi seçilmiş ve içerisine formik asit eklenmiştir. Optimizasyon çalışması sırasında herbir ilaç etken madde tek tek sisteme verilerek uygun değerlerin bulunması sağlanmıştır. İlk adımda literatür bilgileri ışığında iyonun pozitif ya da negatif iyon olduğu belirlenmiştir. Bu aşama için tarama metodu olarak tanımlanan metot seçilerek hangi iyon türünde daha fazla parçalanma olduğu gözlemlenmiştir. İkinci adımda moleküler iyon pikinin en yüksek iyon şiddeti verdiği voltaj seçilmiştir. Üçüncü adım ise iyonların parçalanmasıdır. Bu kısımda ana iyon ve yan ürün iyonu seçilmiştir. Çarpışma enerjisi iyonu parçalamak için harcanan enerjidir ve en yüksek parçalanmayı sağladığı değer seçilmiştir. Bulunan bu değerler MRM metot olarak adlandırılan metot kısmına yazılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda bulunan edilen MRM koşulları Çizelge 3.15’ de verilmiştir.

Çizelge 3.15. Optimizasyon sonucunda bulunan SK-K/KS cihaz parametreleri

Parametre	Optimize Edilen Koşullar
Kolon	Poroshell 120 EC C-18 2.7 µm 3.0x 5.0 mm (Agilent)
Hareketli faz bileşimi	Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h)
Sıcaklık (°C)	40 °C
Akış hızı (mL dk ⁻¹)	Gradient
Enjeksiyon hacmi (µL)	5 µL
Gaz sıcaklığı (°C)	300 °C
Gaz akış hızı (L dk ⁻¹)	10 L dk ⁻¹
Nebulizer basıncı (psi)	45 psi

Etken Madde	Ana İyon	Yan ürün İyonu	Dwell	Fragment	CE(V)	Cell Acc	Polarite
Olmesartan	559	429	150	130	15	7	Pozitif
Telmisartan	515.3	276.1	150	200	54	7	Pozitif
Valsartan	436.2	235.1	150	110	15	7	Pozitif
Amlodipin	409.2	238	150	110	5	7	Pozitif
Hidroklorotiyazid	296	205	150	165	20	7	Negatif

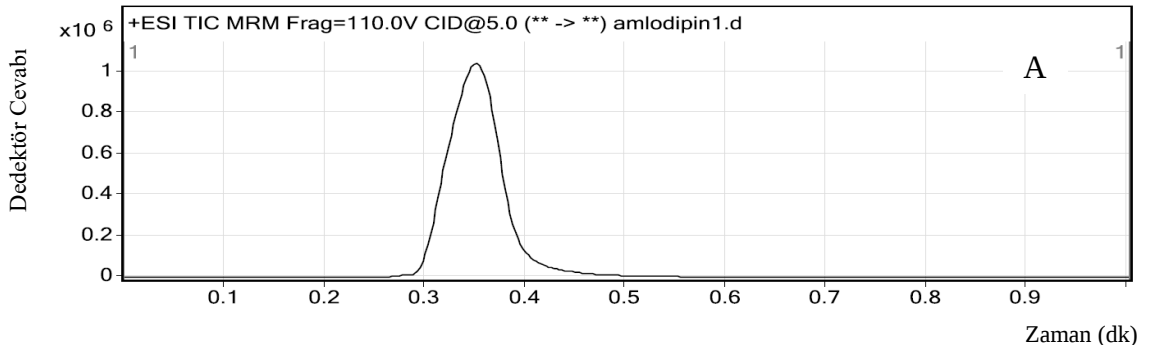
3.3.1.2.Hareketli Fazdaki Organik Çözücü ve Sulu Çözeltinin Yüzdelерinin Belirlenmesi

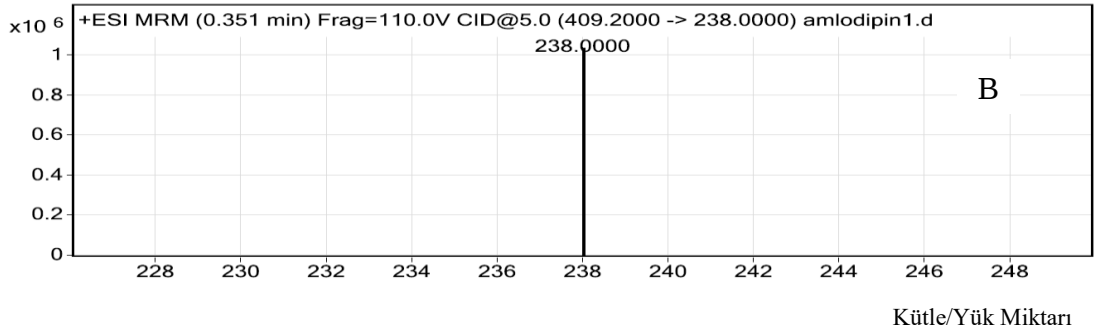
SK-K/KS yönteminde, OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ maddelerinin iyi bir iyonlaşma yapılabilmesi için amonyum asetat, amonyum format ve formik asit gibi uçucu özelliği olan reaktifler kullanmak son derece önemlidir. Fosfat tamponları gibi tamponlar iyonlarla etkileşime girip kompleks oluşturabileceği için FDD’de kullanabileceğimiz tamponlar ile çalışma yapılamaz. Hareketli faz tamponu olarak 10 mM konsantrasyonda amonyum format reaktifi seçilmiş ve içerisine 1,0 mL formik asit eklenmiştir (Hareketli Faz A). En uygun ACN (Hareketli Faz B) oranının bulunabilmesi için hareketli fazın organik çözücü içeriği hacimce belli oranlarda değiştirilmiştir. Bu çalışmalar Poroshell 120 EC C-18 (50 mm x 3,0 mm x 2,7 µm)

kolonda, 40 °C’de, 0,8 mL dk⁻¹ akış hızı ve 5 µL enjeksiyon hacmiyle yapılmıştır. Tampon çözelti ise 1000 mL suyun içerisine 0,63 g amonyum format tartılıp, üzerine 1,0 mL formik asit eklenerek hazırlanmıştır (Hareketli Faz A). Her ne kadar piklerin birbirinden ayrılmasına ihtiyaç duyulmasada kromatografik kalite için hareketli faz oranları değiştirilerek ayırım sağlanmaya çalışılmıştır. Bunun için aşağıda özetlenen metotlar denenmiştir.

Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (80:20) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan metot denemesinde 20 dk boyunca hiçbir pik gözlemlenmemiştir. Bu analiz süresi SK-K/KS miktar tayini metodu için uzun bir süre olduğundan metoda devam edilmemiştir.

Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (40:60) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan metot denemesinde Amlodipine ait standart piki 0,35 dk da geldiği için bu metot ile devam edilmemiştir. Çözücünden tutunmadan gelecek olan piklerin analiz sonuçlarını etkilememesi için moleküllerin geliş 0,35 dk kadar kısa olmamasına dikkat edilmiştir. Bu yüzden bu metot ile devam edilmemiştir. Çalışmaya ait kromatogramlar Şekil 3.32’de gösterilmiştir.

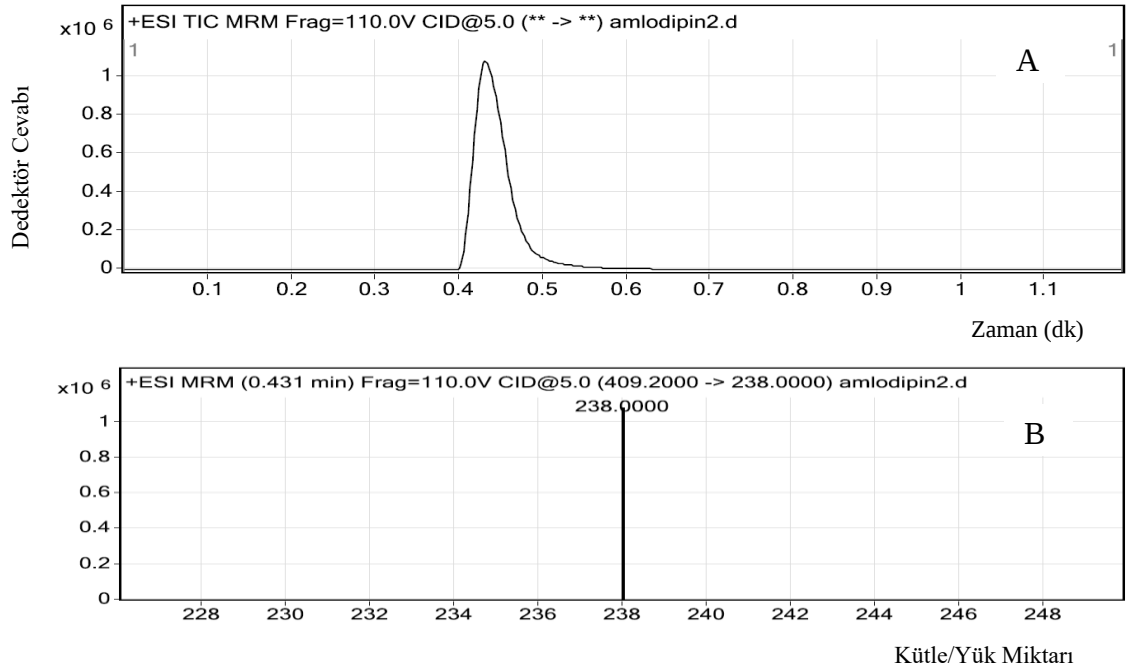




Şekil 3.32. A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (40:60, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Amlodipin kromatogramı

B: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (40:60, h\h) ile yapılan çalışmalara ait MRM spektrumu

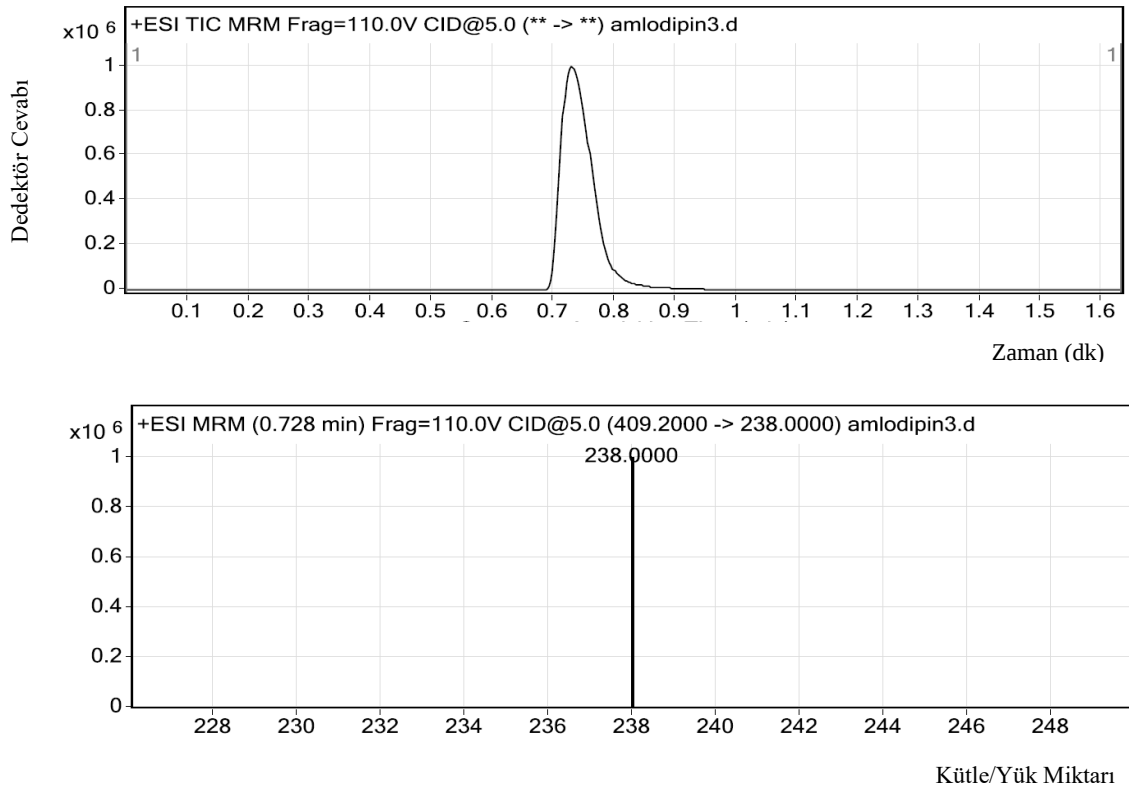
Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (50:50) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan metot denemesinde Amlodipine ait standart piki bu kez 0,43. dk da geldiği için bu metot ile devam edilmemiştir. Çalışmaya ait kromatogramlar Şekil 3.33'te gösterilmiştir.



Şekil 3.33. A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (50:50, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Amlodipin kromatogramı

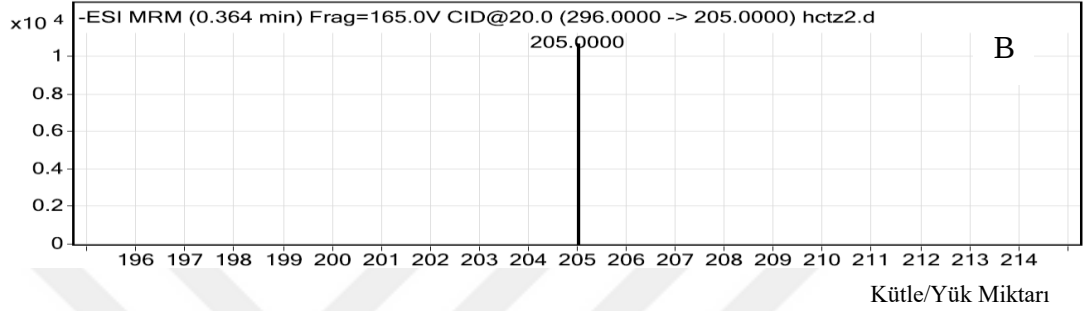
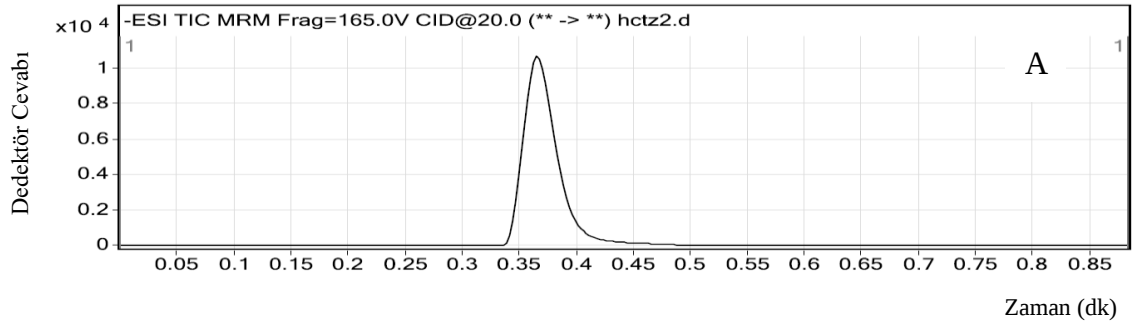
B: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (50:50, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Amlodipin MRM spektrumu

Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan yöntem denemesinde Amlodipine ait standart piki bu kez 0,7. dk da geldiği için ve alıkonma süresi uygun bulunduğu için diğer standartlarda bu yöntem ile analiz edilmiştir. Buna göre Olmesartan 1,47. dk'da, Hidroklorotiyazid 0,35dk'da, Telmisartan 1,95. dk'da ve Valsartan 1,94. dk'da gelmiştir. Telmisartan ve Valsartan molekülleri aynı dozaj formun içerisinde yer almayacağından bir ayırım sağlamak gerekmemektedir. Teorik olarak da ayırmayı ayırmayı sağlamasak bile molekül ağırlıkları farklı olduğu için SK-K/KS metodu ile analiz edilebilmektedir. Burada Hidroklorotiyazid pikinin 0,35. dk'da gelmesi sebebiyle bir sonraki metod geliştirme denemesinde bölüm 3.3.1.4'te anlatılacağı gibi akış gradienti oluşturulmuş ve moleküllerin alıkonma süreleri bir miktar uzatılmıştır. Çalışmaya ait kromatogramlar Şekil 3.34, Şekil 3.35, Şekil 3.36, Şekil 3.37 ve Şekil 3.38'de gösterilmiştir.



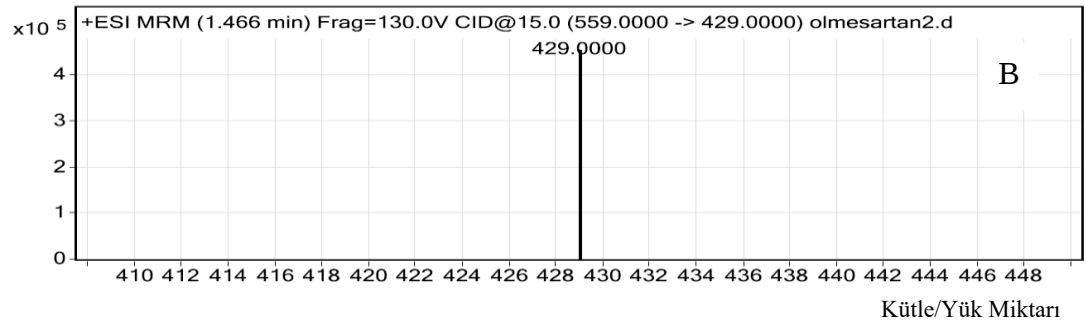
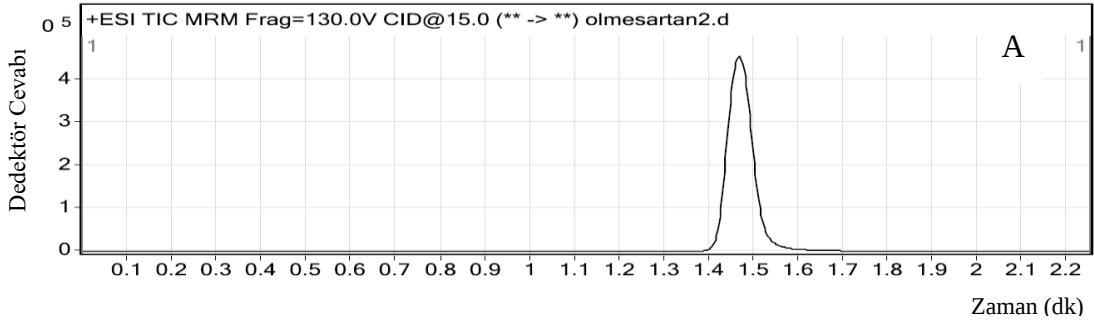
Şekil 3.34. A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Amlodipin kromatogramı

B: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Amlodipin MRM spektrumu



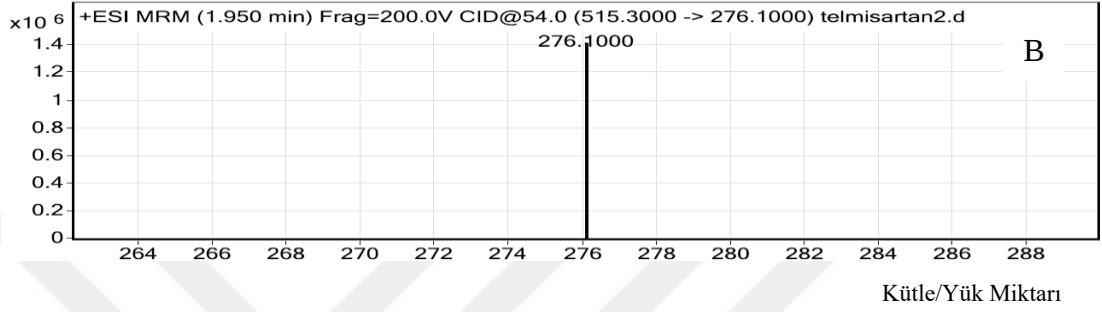
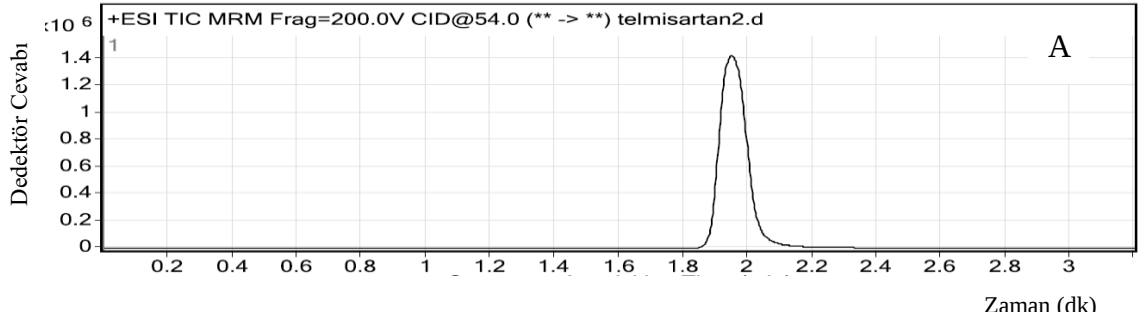
Şekil 3.35. A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Hidroklorotiyazid kromatogramı

A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Hidroklorotiyazid MRM spektrumu



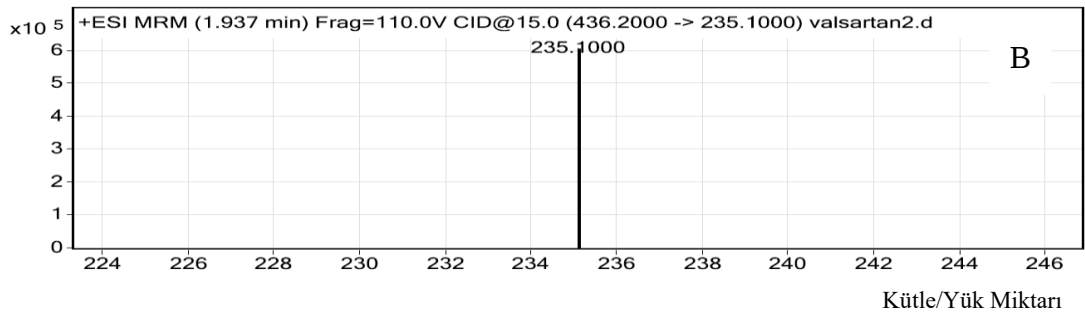
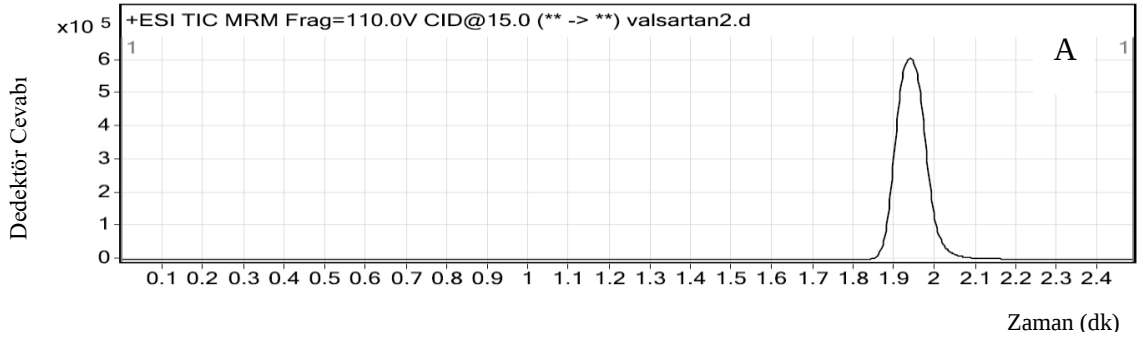
Şekil 3.36. A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Olmesartan kromatogramı

B: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Olmesartan MRM spektrumu



Şekil 3.37. A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Telmisartan kromatogramı

B: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Telmisartan MRM spektrumu



Şekil 3.38. A: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Valsartan kromatogramı

B: Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) ile yapılan çalışmalara ait Valsartan MRM spektrumu

3.3.1.3. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

SK-K/KS yönteminde kullanılan kolonların sabit faz partikül boyutları küçük olması nedeniyle kolondaki basıncı düşük seviyelerde tutmak için kolon fırın sıcaklığı 40°C olarak sabitlemiş ve tüm çalışmalarda bu sıcaklık kullanılmıştır.

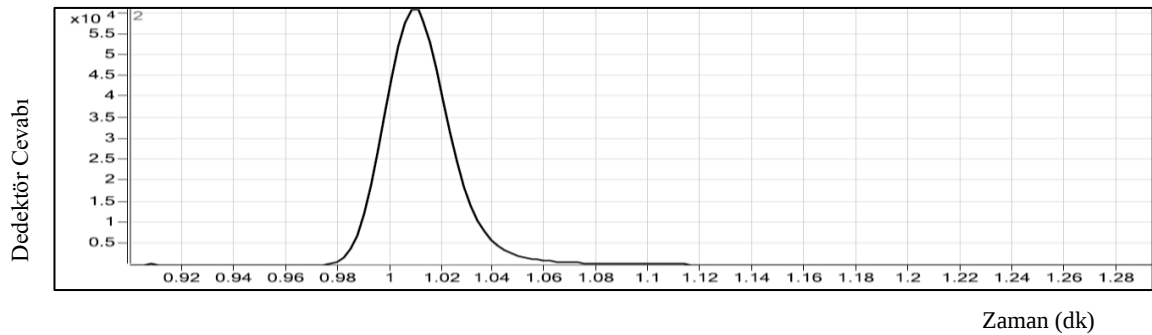
3.3.1.4. Akış Hızı Optimizasyonu

Akış hızı belirlerken HCTZ pikinin alıkonma zamanı, göz önünde bulundurulmuştur. Analiz süresini kısaltabilmek için optimize edilen sisteme Çizelge 3.16’da yer alan akış gradienti uygulanmıştır.

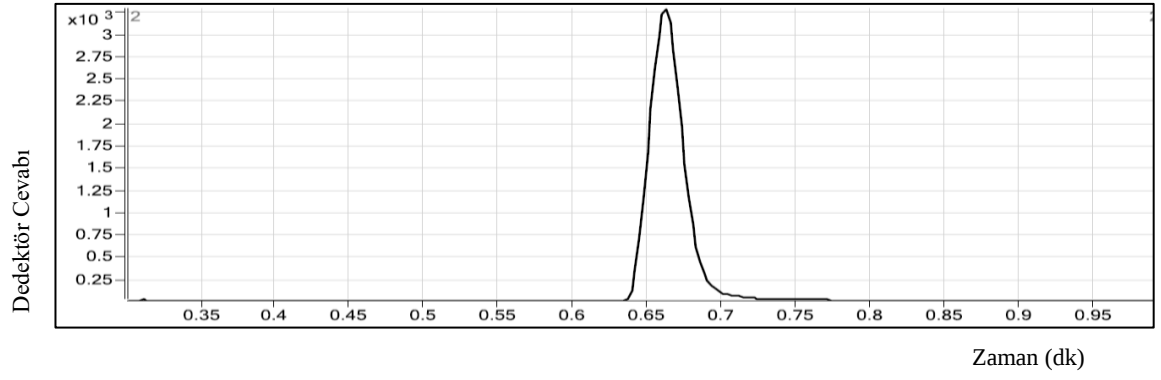
Çizelge 3.16. Optimizasyon sonucunda bulunan SK-K/KS akış gradienti

Zaman(dk)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)	Akış(mL dk ⁻¹)
0.5	60	40	0.4
0.6	60	40	0.8
2.5	60	40	0.8
3.0	60	40	0.4

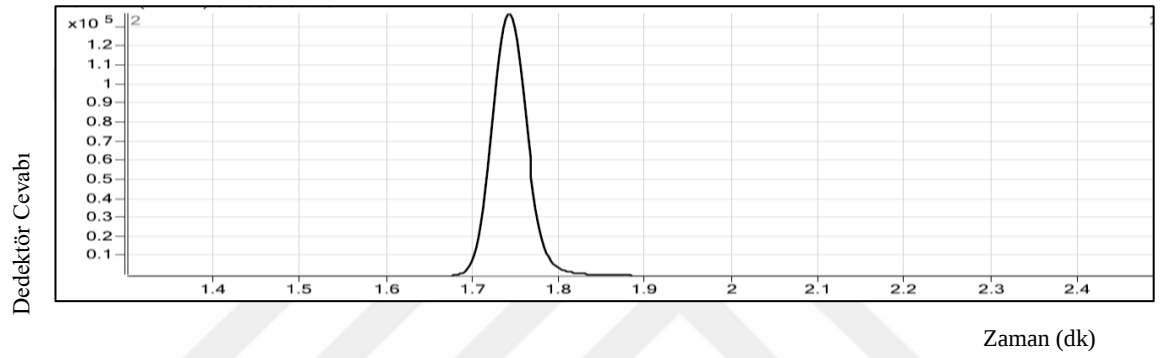
Son olarak akış gradientinin de uygulanmasıyla metod optimizasyon çalışması tamamlanmıştır. Çalışmaya ait kromatogramlar Şekil 3.39, Şekil 3.40, Şekil 3.41, Şekil 3.42 ve Şekil 3.43’te gösterilmiştir.



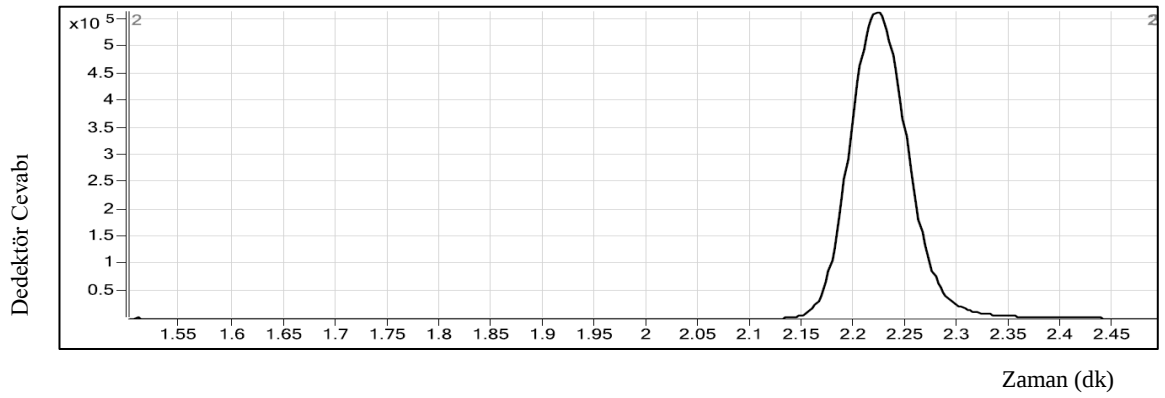
Şekil 3.39. Amlodipin kromatogramı, Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h/h), Konsantrasyon 0,2 µg mL⁻¹



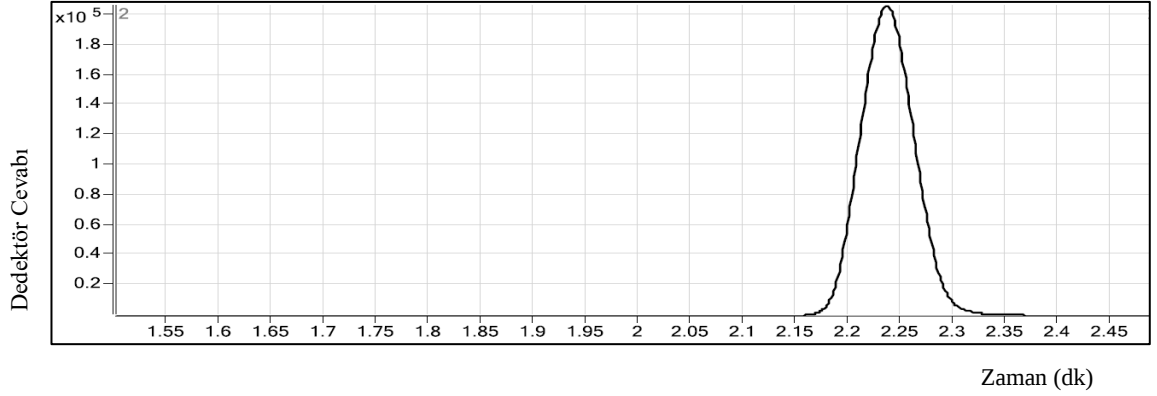
Şekil 3.40. Hidroklorotiyazid kromatogramı, Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h), Konsantrasyon $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.41. Olmesartan kromatogramı, Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h), Konsantrasyon $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.42. Telmisartan kromatogramı, Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h), Konsantrasyon $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.43. Valsartan kromatogramı, Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h/h), Konsantrasyon 3,2 µg mL⁻¹

Optimizasyon çalışmaları sonucunda optimize edilen kromatografik koşullar Çizelge 3.15 ve 3.16’ da verilmiştir.

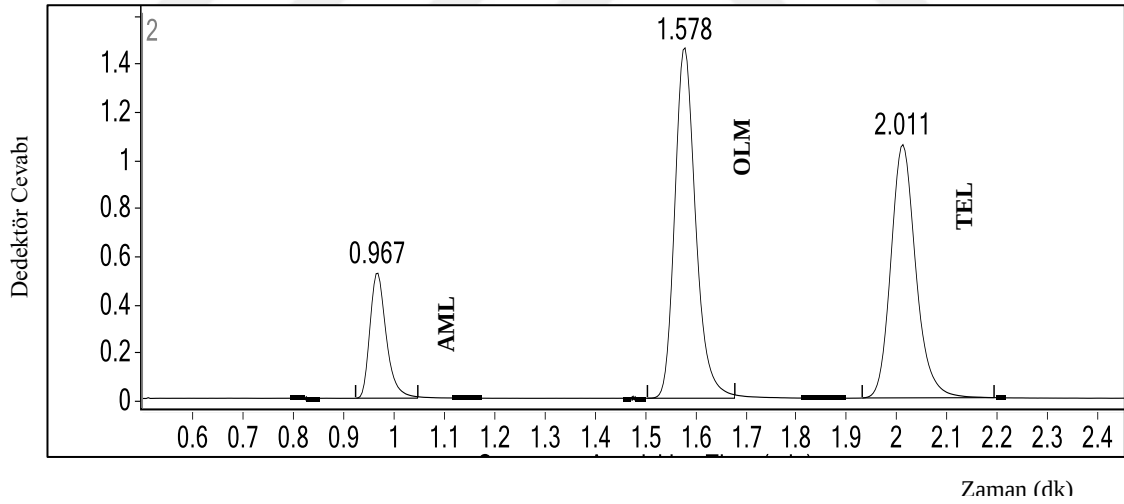
3.3.4. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık

Tez çalışmasının bu aşamasında her bir etken madde için bölüm 2.1.6.1’de anlatıldığı şekilde artan konsantrasyonlarda çözelti hazırlanıp SK-K/KS (LC-MS/MS) sistemine enjekte edilmiştir. Artan konsantrasyonlara karşı alan değerleri ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve yöntem validasyonun doğrusallık parametresi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ikili ve üçlü karışımlara ait standart çözeltilerinden ayrı ayrı kalibrasyonlar elde edilmiştir: Çizelge 3.10’da verilen değerler elde edilen kalibrasyon doğrularından birer sonucu içermektedir. Valsartan ve Telmisartan arasında kromatografik olarak ayırım sağlanamamıştır. Ancak SK-K/KS yönteminin kütle seçiciliği nedeniyle ayırımın olmadığı durumlarda bile ayrı ayrı miktar tayini yapılabilmektedir. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin üçlü karışımı ile 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete ait ikili karışım bu duruma iyi örneklerdir.

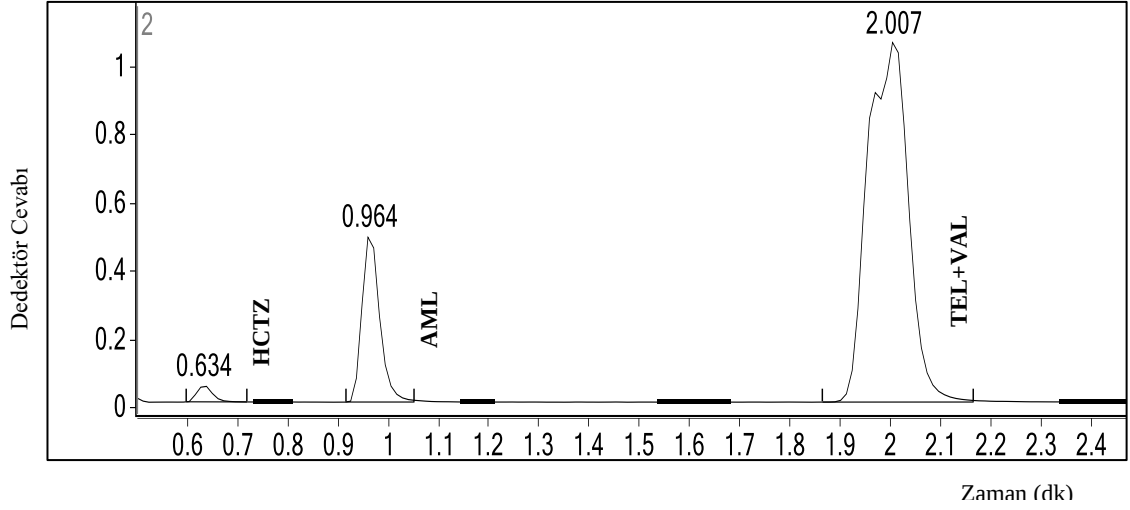
Çizelge 3.17. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri

Validasyon Parametresi	OLM	VAL	TEL	AML	HCTZ
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,12-0,8	0,48-3,2	0,12-0,8	0,03-0,2	0,075-0,5
Eğim	199490000	30408657	179517073	236140000	7853715
Kesişim	1147	-126	-436	-241	36
Korelasyon katsayısı	0,9991	0,9996	0,9993	0,9999	0,9977
Eğimin standart hatası	4913549	524985	3824523	2222401	308852
Kesişimin standart hatası	1026	438	811	118	41
Teşhis sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,007	0,008	0,002	0,006	0,007
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,02	0,025	0,005	0,02	0,022
Gün içi tekrar edilebilirlik % BSS*	0,79	0,87	0,93	2,13	0,82
Günler arası tekrar edilebilirlik % BSS*	1,07	0,96	1,24	2,17	2,10

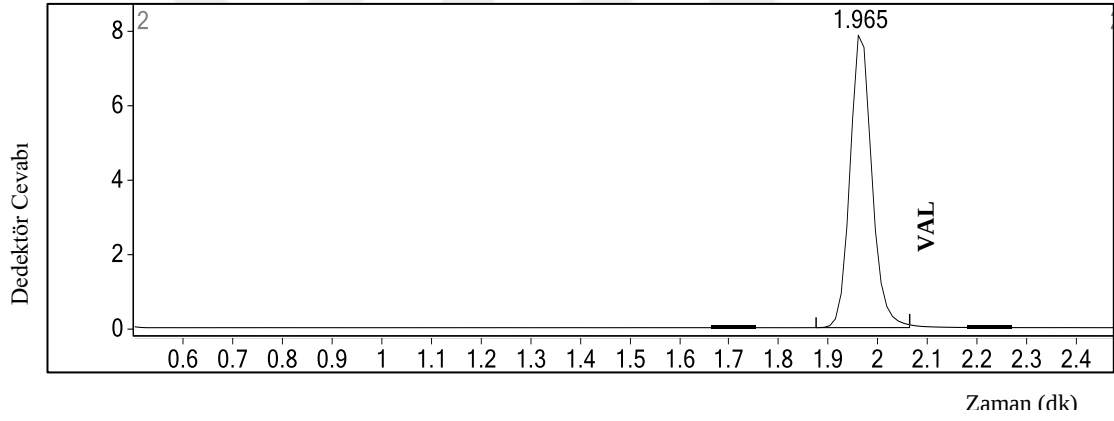
*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır



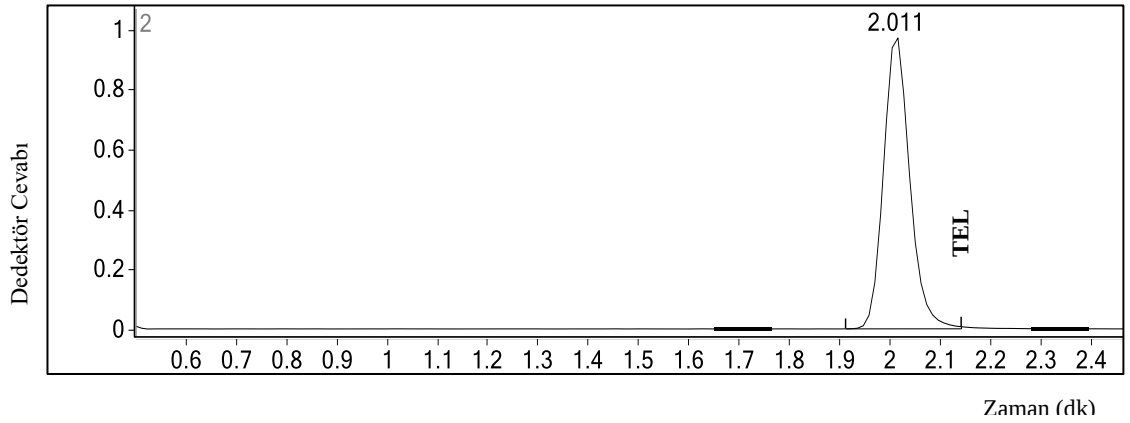
Şekil 3.44. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla AML, OLM ve TEL (iç standart) için 0,05, 0,2 ve 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$



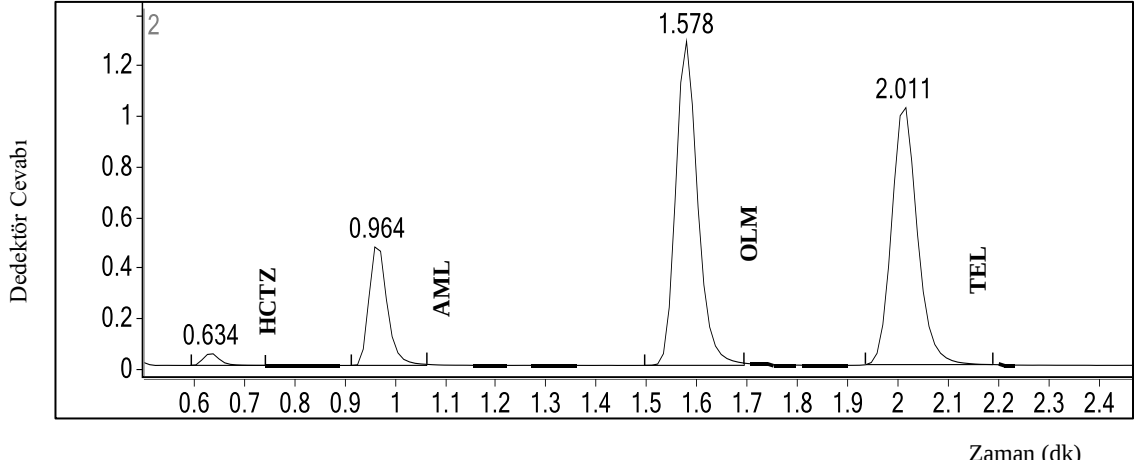
Şekil 3.45. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin (Exforge HCT®) Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla HCTZ, AML, TEL(iç standart) ve VAL için 0,125, 0,05, 0,2 ve 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$



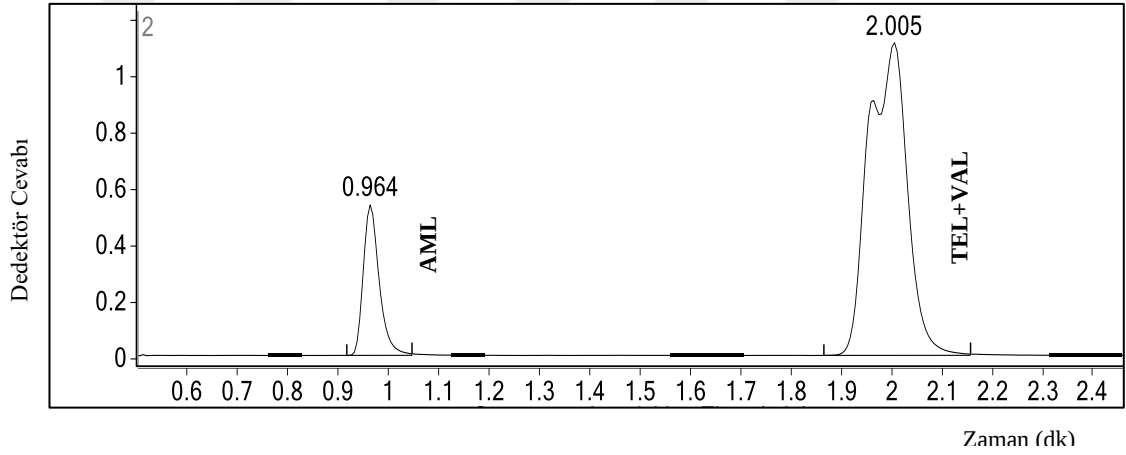
Şekil 3.46. Doğrusallık Standardında Yer Alan Valsartan Piki



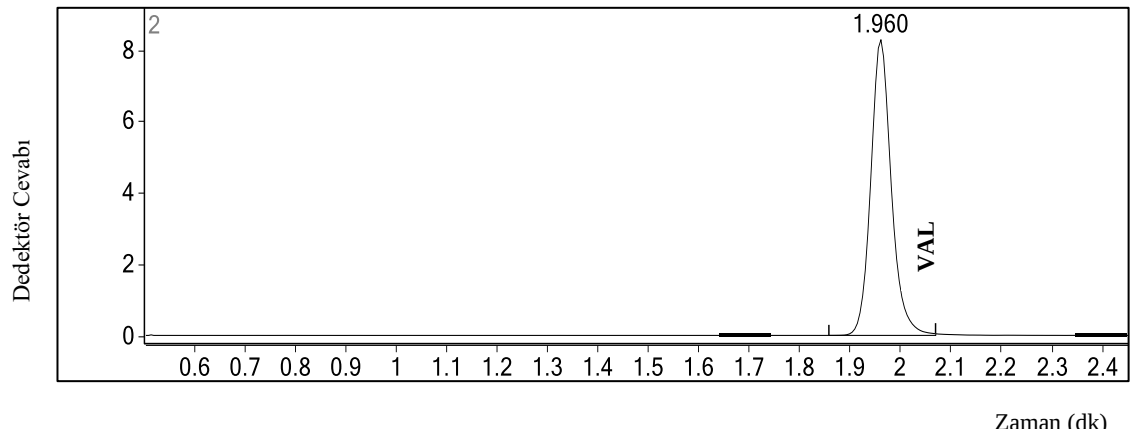
Şekil 3.47. Doğrusallık Standardında Yer Alan Telmisartan Piki



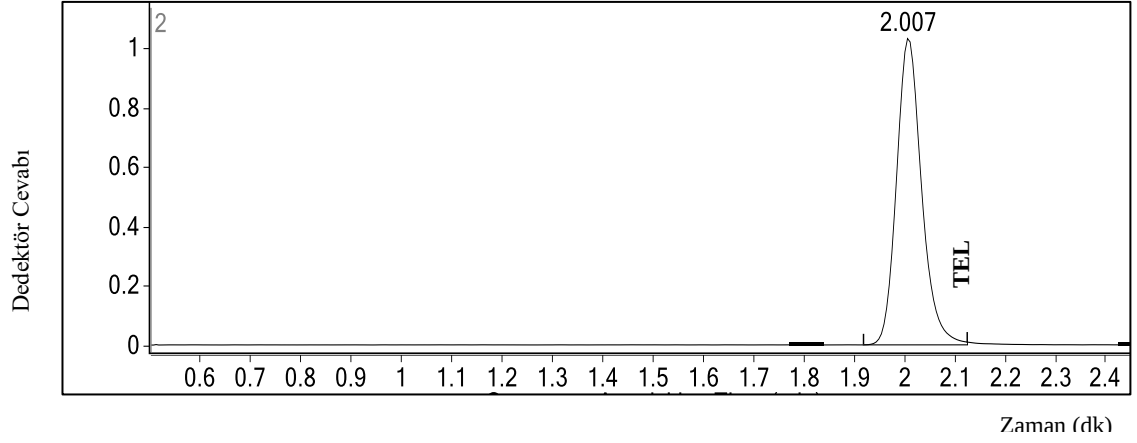
Şekil 3.48. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla HCTZ, AML, OLM ve TEL(iç standart) için 0,125, 0,05, 0,2 ve 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$



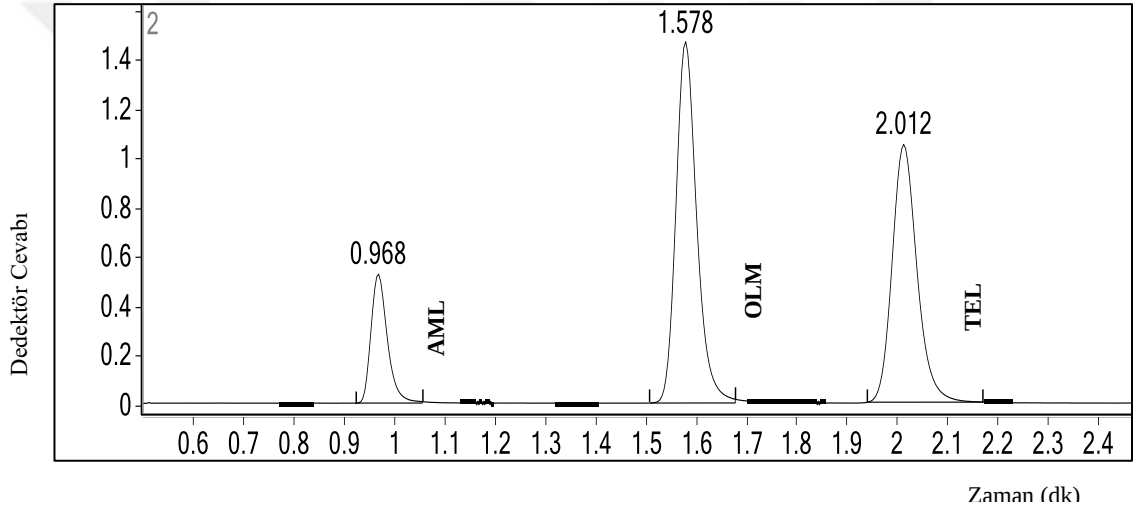
Şekil 3.49. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla AML, VAL ve TEL (iç standart), için 0,05; 0,8 ve 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Şekil 3.50. Doğrusallık Standardında Yer Alan Valsartan Piki



Şekil 3.51. Doğrusallık Standardında Yer Alan Telmisartan Piki



Şekil 3.52. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait Kalibrasyon Sonucu; Piklerin geliş sırasıyla AML, OLM (iç standart) ve TEL için 0,05, 0,2 ve 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.2.5. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddelerinin miktar tayini için geliştirilen SK-K/KS (LC-MS/MS) yöntemi ikili ve üçlü karışım olan piyasa preparatlarına uygunlanmıştır.

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 2.1.6.2’de anlatıldığı şekilde tablet çözletileri hazırlanmış ve analizi

yapılmıştır. Bu analizlerden okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.18, 3.20, 3.22 3.24 ve 3.26’da verilmiştir. Doğrusallık parametresinde belirtildiği gibi Valsartan ve Telmisartan arasında kromatografik olarak ayırım sağlanamamıştır. Ancak SK-K/KS yönteminin kütle seçiciliği nedeniyle ayırımın olmadığı durumlarda bile ayrı ayrı miktarlandırma yapılabilir. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiazit + 10 mg Amlodipin üçlü karışımı ile 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete ait ikili karışım bu duruma iyi örneklerdir.

Çizelge 3.18. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML
Etiket miktarı (mg)	20	5
Numune 1	20,11	5,20
Numune 2	19,97	4,93
Numune 3	19,8	5,02
Numune 4	20,01	5,38
Numune 5	19,86	4,99
Bulunan ortalama miktar (mg)	19,95	5,10
BSS (%)*	0,6	3,53
BH (%)	0,3	-2

Çizelge 3.19. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması

	OLM		AML	
Yöntem	YPSK-FDD	SK-K/KS	YPSK-FDD	SK-K/KS
Numune 1	20,03	20,11	5,14	5,20
Numune 2	20,08	19,97	5,11	4,93
Numune 3	20,05	19,8	5,15	5,02
Numune 4	20,02	20,01	5,07	5,38
Numune 5	19,95	19,86	5,15	4,99
Ortalama miktar (mg)	20,03	19,95	5,12	5,10
F değeri (F _{teorik} : 6,39)	0,15		0,03	
t değeri (t _{teorik} : 2,31)	1,29		0,24	

Çizelge 3.20. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiazit + 10 mg Amlodipin (Exforge HCT®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	VAL	AML	HCTZ
Etiket miktarı(mg)	160	10	25
Numune 1	156,94	9,92	25,45
Numune 2	161,20	9,90	24,66
Numune 3	160,66	10,02	25,14
Numune 4	161,48	9,99	25,27
Numune 5	158,02	9,94	25,40
Bulunan ortalama miktar (mg)	159,66	9,95	25,18
BSS (%)*	1,28	0,5	1,27
BH (%)	0,2	0,5	-0,7

Çizelge 3.21. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiazit + 10 mg Amlodipin (Exforge HCT®) Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması

	VAL		AML		HCTZ	
Yöntem	YPSK-FDD	SK-K/KS	YPSK-FDD	SK-K/KS	YPSK-FDD	SK-K/KS
Numune 1	160,58	156,94	9,94	9,92	24,30	25,45
Numune 2	160,53	161,20	10,15	9,90	24,51	24,66
Numune 3	161,12	160,66	10,01	10,02	24,50	25,14
Numune 4	159,98	161,48	10,14	9,99	24,49	25,27
Numune 5	160,45	158,02	10,04	9,94	24,61	25,40
Ortalama miktar (mg)	160,53	159,66	10,06	9,95	24,48	25,18
F değeri (F _{teorik} : 6,39)	0,04		3,20		4,67	
t değeri (t _{teorik} : 2,31)	0,93		2,24		0,13	

Çizelge 3.22. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiazit + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML	HCTZ
Etiket miktarı(mg)	20	5	12,5
Numune 1	20,08	4,98	12,68
Numune 2	19,97	4,87	12,26
Numune 3	20,79	5,30	13,43
Numune 4	20,64	5,10	12,30
Numune 5	19,83	5,10	12,83
Bulunan ortalama miktar (mg)	20,26	5,07	12,70
BSS (%)*	2,12	3,16	3,78
BH (%)	-1,3	-1,4	-4

Çizelge 3.23. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiazit + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması

	OLM		AML		HCTZ	
Yöntem	YPSK-FDD	SK-K/KS	YPSK-FDD	SK-K/KS	YPSK-FDD	SK-K/KS
Numune 1	19,84	20,08	5,09	4,98	12,44	12,68
Numune 2	19,88	19,97	5,09	4,87	12,48	12,26
Numune 3	19,96	20,79	5,11	5,30	12,52	13,43
Numune 4	20,10	20,64	5,16	5,10	12,56	12,30
Numune 5	19,93	19,83	5,05	5,10	12,54	12,83
Ortalama miktar (mg)	19,94	20,26	5,10	5,07	12,51	12,70
F değeri (F _{teorik} :6,39)	0,05		0,06		0,01	
t değeri (t _{teorik} : 2,31)	1,63		0,41		0,90	

Çizelge 3.24. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	VAL	AML
Etiket miktarı(mg)	160	10
Numune 1	162,47	9,84
Numune 2	160,81	9,71
Numune 3	160,78	9,88
Numune 4	164,51	10,07
Numune 5	164,96	10,03
Bulunan ortalama miktar (mg)	162,71	9,91
BSS (%)*	1,22	1,51
BH (%)	-1,7	0,9

Çizelge 3.25. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması

	VAL		AML	
Yöntem	YPSK-FDD	SK-K/KS	YPSK-FDD	SK-K/KS
Numune 1	159,85	162,47	10,08	9,84
Numune 2	159,15	160,81	10,13	9,71
Numune 3	160,78	160,78	10,05	9,88
Numune 4	159,85	164,51	10,11	10,07
Numune 5	160,02	164,96	9,95	10,03
Ortalama miktar (mg)	159,93	162,71	10,06	9,91
F değeri (F _{teorik} :6,39)	3,01		0,23	
t değeri (t _{teorik} : 2,31)	0,09		2,17	

Çizelge 3.26. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait Numune Çalışmalarının Sonuçları

	TEL	AML
Etiket miktarı (mg)	40	10
Numune 1	41,34	9,97
Numune 2	39,57	10,05
Numune 3	40,68	9,92
Numune 4	40,45	10,14
Numune 5	40,86	9,82
Bulunan ortalama miktar (mg)	40,58	9,98
BSS (%)*	1,6	1,2
BH (%)	-1,5	0,2

Çizelge 3.27. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait SK-K/KS ve YPSK-FDD Yöntemi ile Numune Sonuçlarının Karşılaştırması

	TEL		AML	
Yöntem	YPSK-FDD	SK-K/KS	YPSK-FDD	SK-K/KS
Numune 1	40,16	41,34	10,37	9,97
Numune 2	40,25	39,57	10,21	10,05
Numune 3	40,27	40,68	10,03	9,92
Numune 4	40,27	40,45	10,14	10,14
Numune 5	40,13	40,86	10,07	9,82
Ortalama miktar (mg)	40,22	40,58	10,16	9,98
F değeri ($F_{\text{teorik:6,39}}$)	0,01		1,20	
t değeri ($t_{\text{teorik: 2,31}}$)	1,24		2,27	

Yöntemlerin eşdeğerliğini gösterebilmek amacıyla her bir etken madde için farklı iki dedektör ile analiz edilen numune sonuçları karşılaştırılmıştır. Sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak iki farklı dedektör ile yapılan analizlerin sonuçları karşılaştırıldığında hesaplanan F ve t değerleri sırasıyla F_{teorik} ve t_{teorik} değerlerinden küçük olduğu için her iki metodun birbirine eşdeğer olduğu görülmüştür. Geliştirilen yöntemlerle analizlenen numune sonuçlarının karşılaştırmaları Çizelge 3.19, 3.21, 3.23 3.25 ve 3.27’de verilmiştir.

3.3.6. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar

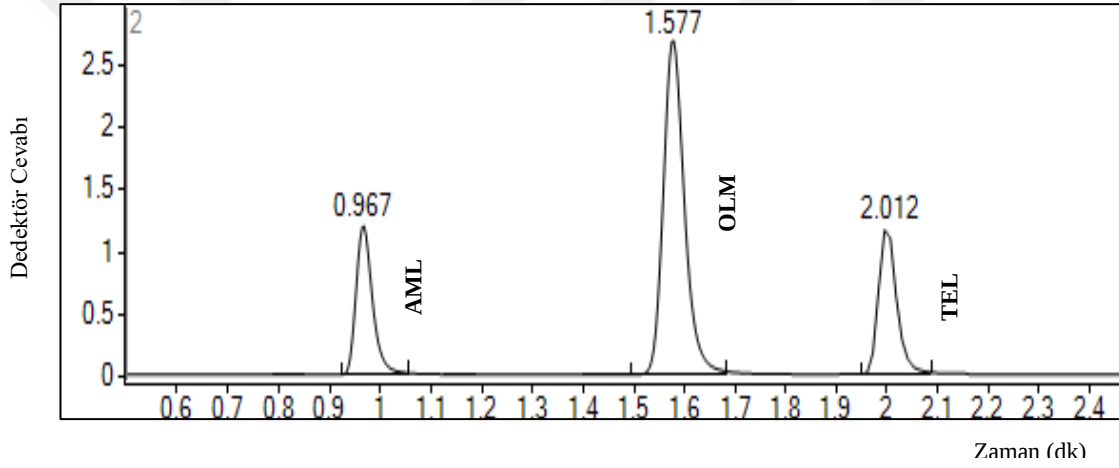
OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddelerinin miktar tayini için geliştirilen SK-K/KS (LC-MS/MS) yöntemi ikili ve üçlü karışım olan piyasa preparatlarına uygunlanmıştır. Tablet katkı maddelerinin yönteme bir etkisinin olup olmadığını anlamak için de geri kazanım çalışması gerçekleştirilmiştir.

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile bölüm 2.1.6.2 ve 2.1.6.3'te anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddelerini içeren çözeltiler ile aynı anda analizi yapılmıştır. Bu eğrilerden okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.28, 3.29, 3.30, 3.31 ve 3.32'de verilmiştir. Doğrusallık parametresinde belirtildiği gibi Valsartan ve Telmisartan arasında kromatografik olarak ayırım sağlanamamıştır. Ancak SK-K/KS yönteminin kütle seçiciliği nedeniyle ayırımın olmadığı durumlarda bile ayrı ayrı miktarlandırma yapılabilmektedir. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiazit + 10 mg Amlodipin üçlü karışımı ile 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin Tablete ait ikili karışım bu duruma iyi örneklerdir.

Çizelge 3.28. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML
Etiket miktarı (mg)	20	5
Bulunan miktar (mg)	19,95	5,10
BSS (%)*	0,6	3,53
BH (%)	0,3	-2
İlave edilen miktar (mg)	19,90	5,14
Bulunan miktar (mg)	19,82	5,11
Geri kazanım (%)	99,6	99,4
Geri kazanıma ait BSS (%)*	1,25	0,80
Geri kazanıma ait BH (%)	0,4	0,6

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

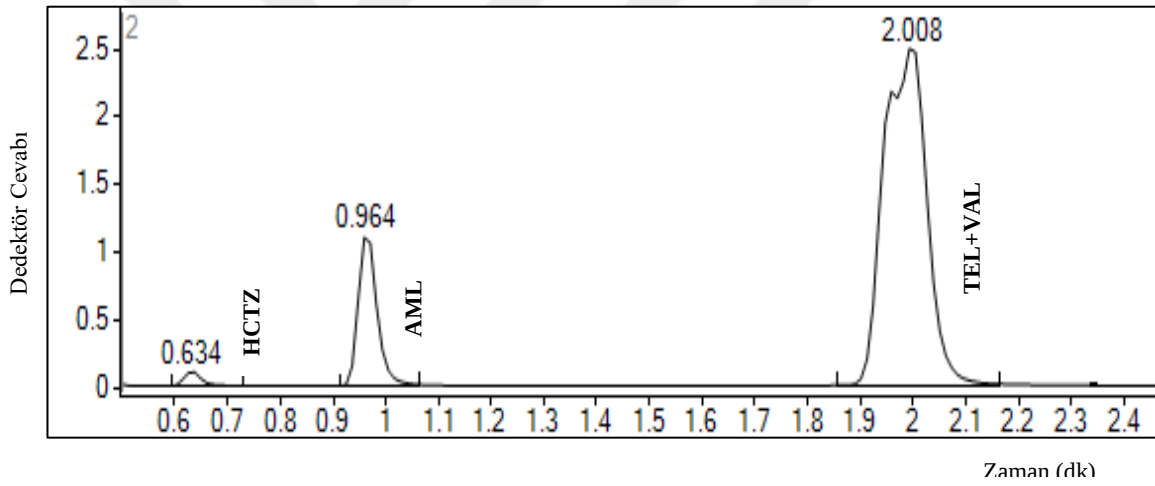


Şekil 3.53. 20 mg Olmesartan medoksomil + 5 mg Amlodipin (Sevikar®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogram

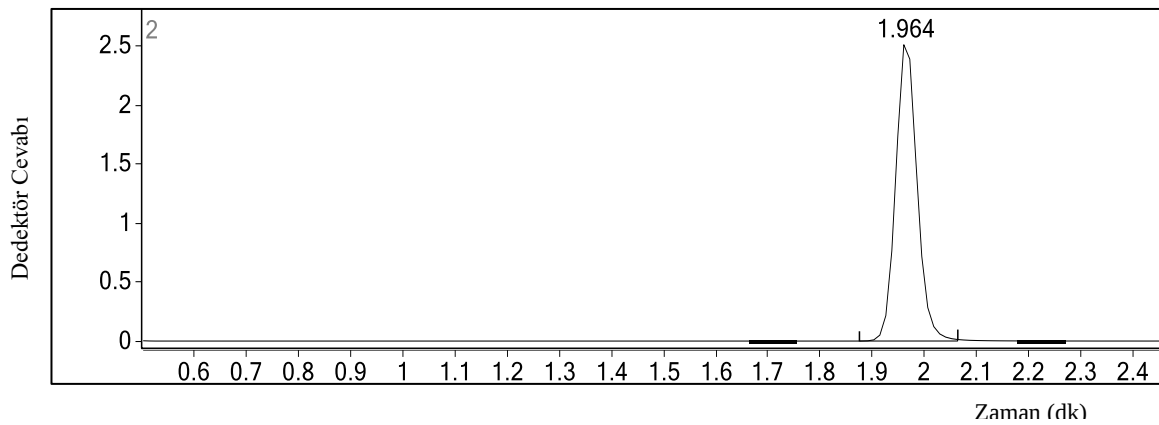
Çizelge 3.29. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin (Exforge HCT®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	VAL	AML	HCTZ
Etiket miktarı (mg)	160	10	25
Bulunan miktar (mg)	159,66	9,95	25,18
BSS (%)*	1,28	0,5	1,27
BH (%)	0,2	0,5	-0,7
İlave edilen miktar (mg)	161,04	10,06	25,42
Bulunan miktar (mg)	162,23	9,91	25,60
Geri kazanım (%)	100,7	98,6	100,7
Geri kazanıma ait BSS (%)*	1,52	2,19	1,59
Geri kazanıma ait BH (%)*	-0,7	1,4	-0,7

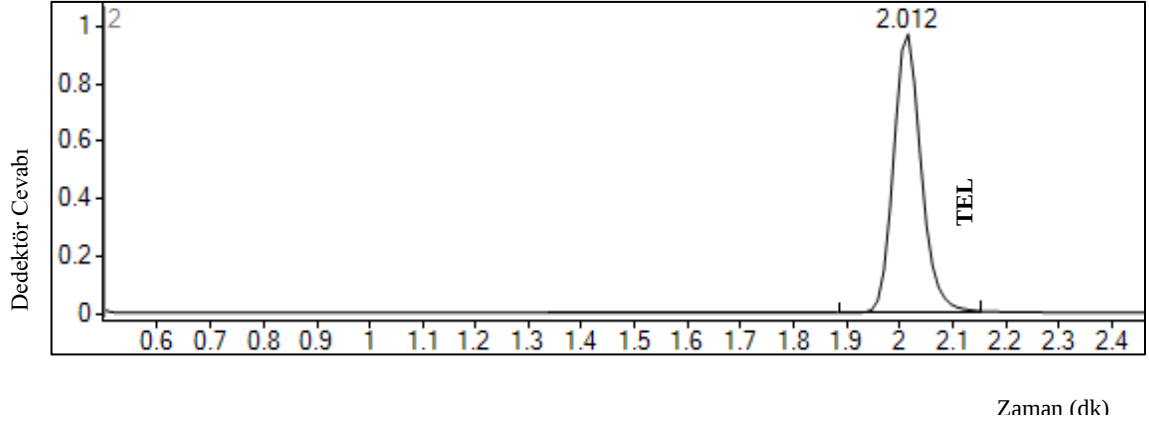
*5 tekrarlı analiz sonuçları.



Şekil 3.54. 160 mg Valsartan + 25 mg Hidroklorotiyazid + 10 mg Amlodipin (Exforge HCT®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı



Şekil 3.55. Geri Kazanım Çözeltisinde Yer Alan Valsartan Piki

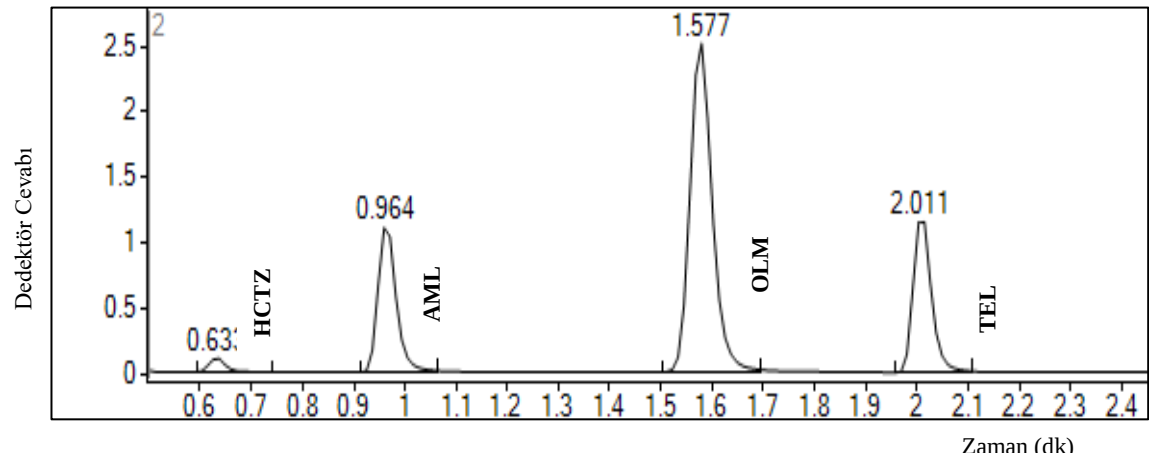


Şekil 3.56. Geri Kazanım Çözeltilisinde Yer Alan Telmisartan Piki

Çizelge 3.30. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	OLM	AML	HCTZ
Etiket miktarı (mg)	20	5	12,5
Bulunan miktar (mg)	20,26	5,07	12,70
BSS (%)*	2,12	3,16	3,78
BH (%)	-1,3	-1,4	-4
İlave edilen miktar (mg)	20,02	5,34	12,92
Bulunan miktar (mg)	19,80	5,33	13,07
Geri kazanım (%)	98,9	99,8	101,2
Geri kazanıma ait BSS (%)*	2,67	2,17	1,09
Geri kazanıma ait BH (%)*	1,1	0,2	-1,2

*5 tekrarlı analiz sonuçları.

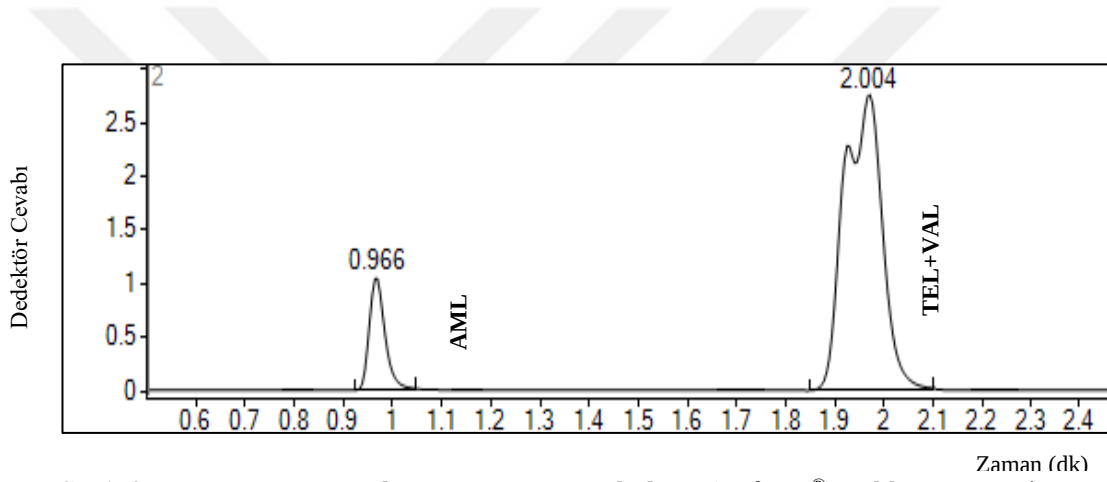


Şekil 3.57. 20 mg Olmesartan medoksomil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid + 5 mg Amlodipin (Sevikar HCT®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı

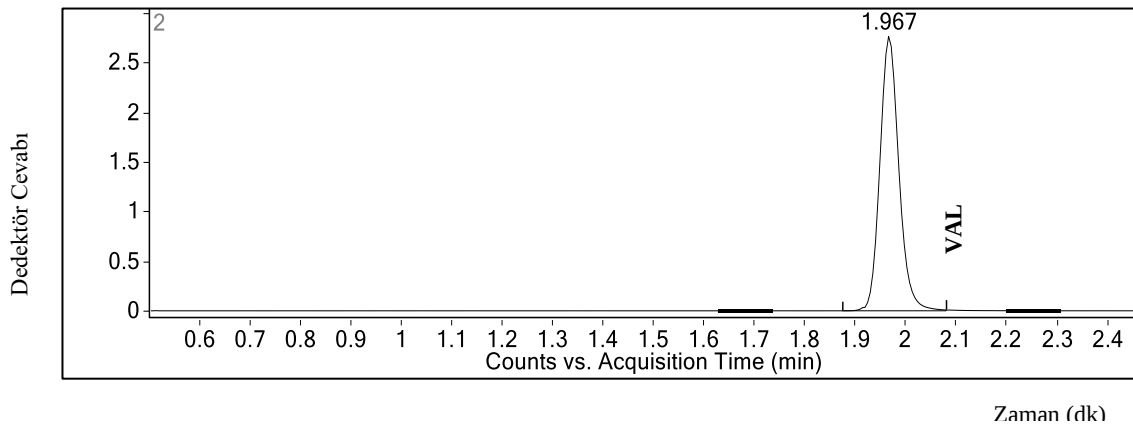
Çizelge 3.31. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	VAL	AML
Etiket miktarı (mg)	160	10
Bulunan miktar (mg)	162,71	9,91
BSS (%)*	1,22	1,51
BH (%)	-1,7	0,9
İlave edilen miktar (mg)	160,12	10,36
Bulunan miktar (mg)	161,03	10,45
Geri kazanım (%)	100,6	100,9
Geri kazanıma ait BSS (%)*	1,89	1,35
Geri kazanıma ait BH (%)*	-0,6	-0,9

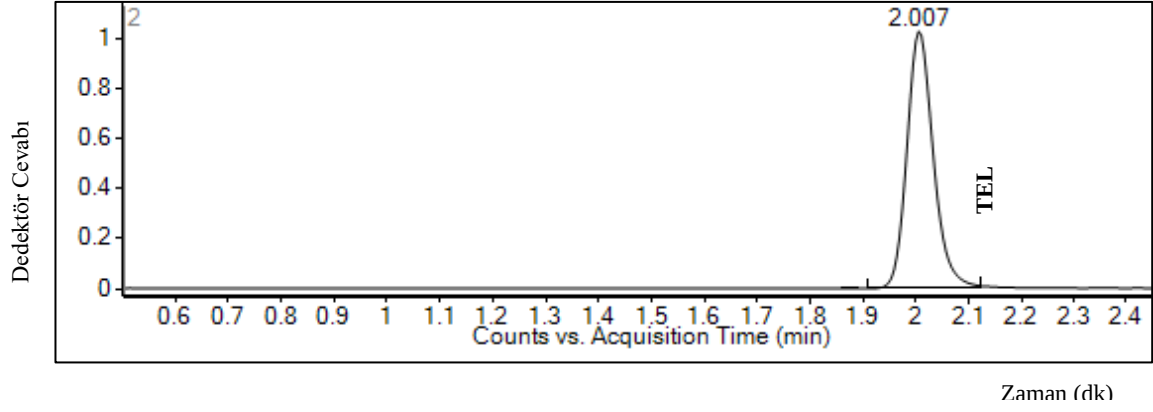
*5 tekrarlı analiz sonuçları.



Şekil 3.58. 160 mg Valsartan + 10 mg Amlodipin (Exforge®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı



Şekil 3.59. Geri Kazanım Çözeltisinde Yer Alan Valsartan Piki

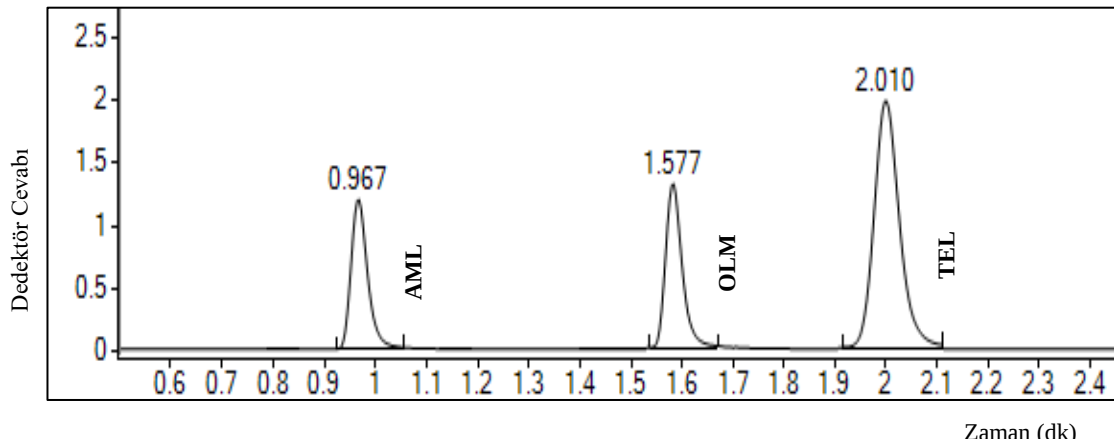


Şekil 3.60. Geri Kazanım Çözeltisinde Yer Alan Telmisartan Piki

Çizelge 3.32. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait Geri kazanım Çalışmalarının Sonuçları

	TEL	AML
Etiket miktarı (mg)	40	10
Bulunan miktar (mg)	40,58	9,98
BSS (%)*	1,6	1,2
BH (%)	-1,5	0,2
İlave edilen miktar (mg)	40,46	10,02
Bulunan miktar (mg)	40,86	9,89
Geri kazanım (%)	101,0	99,5
Geri kazanıma ait BSS (%)*	1,56	1,29
Geri kazanıma ait BH (%)*	-1	0,5

*5 tekrarlı analiz sonuçları.



Şekil 3.61. 40 mg Telmisartan + 10 mg Amlodipin (Twynsta®) Tablete Ait Geri Kazanım Kromatogramı

4. TARTIŞMA

YPSK hareketli fazın polaritesinin sabit fazın polaritesinden daha fazla olduğu kromatografi türüdür. Ters faz sıvı kromatografisinde kimyasal olarak bağlı olan fonksiyonel grupları içeren sabit fazlar (C-18 oktadesilsilan) sıkça kullanılmaktadır. Bu kolonların yanında bir de fonksiyonel grupça daha kısa zincirli olan (C₈, C₂), fenil ve siyano (CN) bağlı sabit fazlar da kullanılmaktadır.

Ters faz sıvı kromatografisinde farklı dedektörler kullanılmaktadır. Analizin amacına göre bu dedektörlerin hassasiyeti değişmektedir. Sıkça kullanılan dedektörlerden biri fotodiyot dizi dedektördür. Diğer dedektör türü ise kütle spektrofotometre dedektörüdür. Bu dedektör son yıllarda kullanım kolaylığı ve hassasiyeti nedeniyle ön plana çıkmıştır.

Olmesartan, telmisartan, valsartan, amlodipin ve hidroklorotiyazid etken maddelerinin analizleri için önce maddelerin kimyasal özelliklerine bakılmıştır. Bu etken maddelerin polarite değerleri (logP) ve pKa değerleri incelendiğinde analizlerinde, ters faz sıvı kromatografisi yönteminin uygulanabileceğine karar verilmiştir. Beş etken maddenin YPSK yöntemiyle eş zamanlı analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesine öncelikle hareketli fazdaki organik çözücü ve tampon yüzdelерinin belirlenmesiyle başlanmıştır. YPSK yöntemi ile çalışılırken iki farklı dedektör kullanılmıştır. Bunlardan ilki fotodiyot dizi dedektör, ikinci ise kütle spektrofotometre dedektörüdür. Her iki dedektör ile geliştirilen yöntemler iki kısımda incelenmiştir. Bunlardan ilki YPSK-FDD ile geliştirilen yöntemdir.

Literatür araştırmaları sonucu tampon çözelti olarak YPSK-FDD pH 3,0'a fosforik asit ile ayarlanmış sulu çözelti ve iyi bir ayırım elde etmek amacıyla organik çözücü olarak asetonitril ve metanolün birlikte kullanılmasına karar verilmiştir. Başlangıçta pH 3,0 olarak hazırlanan sulu çözeltisi ile saf asetonitril ve metanol gradiyent olarak sisteme verilmiştir. pH 3,0 sulu çözeltisi metanol ve asetonitril sırasıyla farklı oranlarında denenmiştir. Analizler sonucu artan asetonitril ve

metanolün değişken oranları ile analiz süresinin, ayırım gücünün ve kolon etkinliğinin arttığı görölmüştür. Ayrıca organik çözücü yüzdesinin artması ile analiz süresinin uzaması arasındaki ilişkinin ters faz sıvı kromatografi yönteminde geçerli olduğu görölmüştür. Değişken oranlar aşığıda belirtilmiştir.

- pH 3,0 sulu çözeltisi:MeOH:ACN (35:40:25, h\h\h)
- pH 3,0 sulu çözeltisi:MeOH:ACN (35:20:45 h\h\h)
- pH 3,0 sulu çözeltisi:MeOH (50:50, h\h)
- pH 3,0 sulu çözeltisi:MeOH:ACN (50:25:25, h\h\h)
- pH 3,0 sulu çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h)

Tampon çözelti pH değeri ve organik çözücüler ile tampon çözelti yüzdelerinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda keskin pik şekilleri elde etmek, kabul edilebilir değerlerde etkin bir ayırım sağlamak amacıyla hareketli faz bileşimi pH 3,0 sulu çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h\h) olarak belirlenmiştir.

Hareketli faz bileşimi belirlendikten sonra kolon (sabit faz) sıcaklığı, akış hızı ve enjeksiyon hacimleri sabit tutularak kolon denemeleri yapılmıştır. Bu denemeler sırasında pik simetrilerinde artış gözlemlenmiştir. Piklerin simetrisinin belirli sınırlar içerisinde kalabilmesi için pik simetri özelliği olan Symmetry Shield RP-18 (150 x 4,6 mm x 3,0 µm) tercih edilmiştir.

YPSK-FDD yönteminin ayırım mekanizmasında sıcaklığın analiz sonuçlarına etkisini incelemek için deneysel tüm parametreler sabit tutularak 25°C sıcaklıkta analiz yapılmıştır. Sıcaklık analiz süresinin kısalması için önemli bir faktördür. Diğer bir taraftan analiz süresi kısalırken piklerin üst üste çakışma durumları da görülebilmektedir. Bu yüzden yapılan denemeler sonucunda kolon sıcaklığı oda koşullarında tutulmuştur.

Akış hızı belirlerken HCTZ pikinin alıkonma zamanı, ayırımlar ve kolon basıncındaki artış göz önünde bulundurulmuştur. Akışın 1,5 mL dk⁻¹ olduğu durumda, HCTZ pikinin alıkonma zamanı azalmış olup uygun bir ayırım gözlenmemiştir. Akışın 2,0 mL dk⁻¹ olduğu durumda ise, kolon basıncında gözlenen yüksek artıştan dolayı analiz yapılamamıştır. Bu nedenle akış hızı 1,0 mL dk⁻¹ olarak optimize edilmiştir. Daha düşük akış hızlarındaki analizlerde de beklenildiği gibi analiz süreleri kabul edilebilir sınırların üzerine çıkmaktadır.

Geliştirilen YPSK-FDD yönteminin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra sistem uygunluk testi parametreleri belirlenmiş olup bulunan parametreler doğrultusunda (Çizelge 3.2) yöntemin uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır ve optimizasyon çalışmaları sonunda yöntem validasyonu aşamasına geçilmiştir.

Optimizasyonlar sonucunda yöntemin seçiciliğini ve stabilitesini belirleyebilmek için herbir etken maddeye ayrı ayrı hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapılmıştır. Bozundurma çalışmalarında OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddeleri doğrusallık çalışmalarındaki konsantrasyonlara eşit olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra belirli koşullara tabi tutularak bozunmaları sağlanmıştır. Bu koşullar etken madde çözeltilerinin 5 saat süre ile 0,1 N HCl ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi, % 0,3' lük H₂O₂ ile oksidasyon ve 90 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesidir. Sonuçlar bozundurulmamış etken madde çözeltileri ile karşılaştırılarak yüzde bozunma hesaplanmış ve pik saflıklarına bakılmıştır.

Etken maddeler için bozundurma çalışmaları incelendiğinde AML, HCTZ ve TEL için herhangi bir bozunma gözlemlenmemiştir. VAL için 5. Saat 0,1 N HCl asit hidrolizi ile 15,12 de bir bozunma safsızlığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.18). OLM için ise 90 °C’ de sıcak su banyosunda bekletilen standart çözeltisinde bir bozunma gözlemlenmemiştir. Ancak asit, baz ve hidrojen peroksit ile yapılan çalışmalarda bozunma safsızlığı oluşmuştur. Bu safsızlık hidrojen peroksitte 2,4 dk civarı görülürken, asit ve bazın çözücü etkisi ile 2,1 dk civarında gözlemlenmiştir (Şekil 3.19, Şekil 3.20 ve Şekil 3.21). Oluşan tüm safsızlıklar tablet formlarında yer alan diğer etken maddeler ile aynı alıkonma zamanında görülmediği ve piklerin saflık dereceleri uygun olduğu için miktar tayinine herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları sonucunda muhtemel bozunma safsızlıkları ile birlikte etken maddelerinin eş zamanlı olarak analizinin yapılabileceği görülmüştür.

Geliştirilen YPSK-FDD yönteminin geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için gerekli olan yöntem geçerlilik testlerinin parametreleri seçilmiş ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Bu amaçla, validasyon çalışmalarının, doğrusal aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri bulunduktan sonra istatistiksel olarak değerlendirilmeleri yapılmıştır.

Geliştirilen YPSK-FDD yöntemin doğruluğunun bulunması için ikişer ve üçer etken maddenin bir arada bulunduğu farmasötik dozaj formu üzerine ilave edilen etken maddeler ile geri kazanım çalışmaları yapılmış ve gerekli parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8).

Geliştirilen ikinci yöntem SK-K/KS ile analiz yöntemidir.

SK-K/KS yönteminde, OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ maddelerinin iyi bir iyonlaşma yapılabilmesi için amonyum asetat, amonyum format ve formik asit gibi uçucu özelliği olan reaktifler kullanmak son derece önemlidir. Fosfat tamponları gibi tamponlar iyonlarla etkileşime girip kompleks oluşturabileceği için FDD’de kullanabileceğimiz tamponlar ile çalışma yapılamaz. Hareketli faz tamponu olarak 10 mM konsantrasyonda amonyum format reaktifi seçilmiş ve içerisine formik asit

eklenmiştir. En uygun ACN oranının bulunabilmesi için hareketli fazın organik çözücü içeriği hacimce belli oranlarda değiştirilmiştir. Bu çalışmalar Poroshell 120 EC C-18 (50 mm x 3,0 mm x 2,7 μ m) kolonda, 40 °C’de, 0,8 mL dk⁻¹ akış hızı ve 5 μ L enjeksiyon hacmiyle yapılmıştır. Tampon çözelti ise 1000 mL suyun içerisine 0,63 g amonyum format tartılıp, üzerine 1,0 mL formik asit eklenerek hazırlanmıştır. Her ne kadar piklerin birbirinden ayırımına ihtiyaç duyulmasada kromatografik kalite için hareketli faz oranları değiştirilerek ayırım sağlanmaya çalışılmıştır. Bunun için aşağıda özetlenen yöntemler denenmiştir.

Hareketli faz tamponu olarak 10 mM konsantrasyonda amonyum format reaktifi seçilmiş ve içerisine 1,0 mL formik asit eklenmiştir (Hareketli Faz A). En uygun ACN (Hareketli Faz B) oranının bulunabilmesi için hareketli fazın organik çözücü içeriği hacimce belli oranlarda değiştirilmiştir.

Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (80:20, h\h) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan yöntem denemesinde 20 dk boyunca hiçbir pik gözlemlenmemiştir. Bu analiz süresi SK-K/KS miktar tayini metodu için uzun bir süre olduğundan metoda devam edilmemiştir.

Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (40:60, h\h) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan yöntem denemesinde Amlodipine ait standart piki 0,35 dk da geldiği için bu yöntem ile devam edilmemiştir. Çözücünden tutunmadan gelecek olan piklerin analiz sonuçlarını etkilememesi için moleküllerin geliş 0,35 dk kadar kısa olmamasına dikkat edilmiştir.

Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (50:50, h\h) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan yöntem denemesinde Amlodipine ait standart piki bu kez 0.43. dk da geldiği için bu yöntem ile devam edilmemiştir.

Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60:40, h\h) oranlarında karıştırılarak hazırlanmış hareketli faz ile yapılan yöntem denemesinde Amlodipine ait standart piki bu kez 0,7. dk da geldiği ve alıkonma süresi uygun bulunduğu için diğer standartlarda bu yöntem ile analiz edilmiştir. Buna göre Olmesartan 1,47. dk'da, Hidroklorotiyazid 0,35. dk'da, Telmisartan 1,95. dk'da ve Valsartan 1,94. dk'da gelmiştir. Telmisartan ve Valsartan molekülleri aynı dozaj formun içerisinde yer almayacağından bir ayırım sağlamak gerekmemektedir. Teorik olarak da ayırımı sağlamasak bile molekül ağırlıkları farklı olduğu için SK-K/KS metodu ile analiz edilebilmektedir. Burada HCTZ pikinin 0,35. dk'da gelmesi sebebiyle akış gradienti oluşturulmuş ve molekülleri alıkonma süreleri bir miktar uzatılmıştır.

SK-K/KS yönteminde kullanılan kolonların sabit faz partikül boyutları küçük olması nedeniyle kolondaki basıncı düşük seviyelerde tutmak için kolon fırın sıcaklığı 40°C olarak sabitlemiş ve tüm çalışmalarda bu sıcaklık kullanılmıştır.

Akış hızı belirlerken HCTZ pikinin alıkonma zamanı, göz önünde bulundurulmuştur. Analiz süresini kısaltabilmek için optimize edilen bulgular kısmında bahsedilen akış gradienti uygulanmıştır.

Son olarak akış gradientinin de uygulanmasıyla metod optimizasyon çalışması tamamlanmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları sonucu beş etken maddeninde eş zamanlı olarak analizinin yapıldığı bir çalışma saptanmamıştır. Literatür çalışmaları kısmında ikili, üçlü veya dörtlü etken maddenin eş zamanlı olarak analizinin yapıldığı çalışmalara yer verilmiş ve yöntem bunlarla kıyaslanmıştır. Geliştirilen YPSK-FDD yönteminin sonucu daha önce yapılmış olan (R.A. Mhaske ve ark, 2011; Santaji Nalwade ve ark, 2011; Kakumani ve ark, 2012; Wankhede SB. ve ark, 2007; Panchumorthy Ravisankar ve ark, 2016; Saurabh K Sinha ve ark, 2012; Filiz Arıöz ve ark, 2014; N Delhiraj ve ark, 2014) çalışmalarıyla kıyaslandığında tez kapsamında daha duyarlı olduğu ve daha düşük konsantrasyon aralığında bir yöntem geliştirildiği görülmüştür. Geliştirilen SK-K/KS yönteminde ise (Vasu Babu Ravi ve ark, 2012; Jaivik V. Shah ve ark, 2017) kullanıldığı

asetonitril oranı açısından kıyaslandığında yöntemin daha çevreci bir yöntem olduğu da düşünülmektedir.

OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ tayini için geliştirilen YPSK-FDD ve SK-K/KS yöntemleri ayrı ayrı bu etken maddeleri içeren beş farklı farmasötik dozaj formuna da uygulanmıştır. Yardımcı maddelerin ve safsızlıkların yöntemle bir etkisinin olup olmadığı incelenmiş ve sonuç olarak bu maddelerin analiz üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ etken maddelerinin eş zamanlı olarak YPSK-FDD yöntemi ile analizi çalışmalar Symmetry Shield RP-18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m) kolonda, sıcaklık 25°C ve 1,0 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılmıştır. Sulu çözelti ise 1000 mL suyun pH değeri 3,0'a ayarlanarak kullanılmıştır. Kullanılan hareketli fazın içeriği bileşimi pH 3,0 sulu çözeltisi:MeOH:ACN (40:40:20, h\h) olarak belirlenmiştir. Çalışma yapılan dalga boyu 220 nm olarak seçilmiş ve enjeksiyon hacmi 20 μ L'dir. Bu koşullarda; OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ'nin alıkonma zamanları sırasıyla 4,05; 11,73; 2,42; 9,87 ve 1,66 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ içinde doğrusal olarak sırasıyla 1,0-40 μ g mL⁻¹; 4,0-160 μ g mL⁻¹; 1,0-40 μ g mL⁻¹; 0,25-100 μ g mL⁻¹ ve 0,63-25 μ g mL⁻¹, teşhis sınırı sırasıyla 0,02; 0,02; 0,01; 0,03 ve 0,01 μ g mL⁻¹, tayin alt sınırı ise sırasıyla 0,06; 0,06; 0,03; 0,09 ve 0,04 μ g mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

SK-K/KS yöntemi ile analiz çalışmalarında ise Poroshell 120 EC C-18 (50 mm x 3,0 mm x 2,7 μ m) kolonda, kolon sıcaklığı 40°C, 0,4 ve 0,8 mL dk⁻¹'lık akış hızı gradienti ile yapılmıştır. Tampon çözelti ise 1000 mL suyun içerisine 0,63 g amonyum format tartılıp, üzerine 1,0 mL formik asit eklenerek hazırlanmıştır. Kullanılan hareketli fazın içeriği bileşimi tampon çözelti:ACN (60:40, h\h) olarak belirlenmiştir. Çalışma yapılan enjeksiyon hacmi 5 μ L, gaz sıcaklığı 300°C, gaz akışı 10 L dk⁻¹ ve nebulizer basıncı 45 psi'dir. Bu koşullarda; OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ'nin alıkonma zamanları sırasıyla 1,58; 1,97; 2,01; 0,97 ve 0,63 dakika olarak bulunmuştur. Optimize edilen diğer koşullar tablolarda sunulmuştur (Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16). Geliştirilen yöntemde OLM, VAL, TEL, AML ve HCTZ içinde doğrusal olarak

sırasıyla 0,1-0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,4-3,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,1-0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,03-0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve 0,08-0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, teşhis sınırı sırasıyla 0,007; 0,008; 0,002; 0,006 ve 0,007 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tayin alt sınırı ise sırasıyla 0,02; 0,025; 0,005; 0,02 ve 0,022 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında hipertansiyon tedavisinde kullanılan olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipin ve hidroklorotiyazid etken maddelerinin iki farklı dedektör kullanılarak YPSK yöntemi ile aynı anda analizleri için gerekli parametreler bulunmuş ve bu parametrelere bağlı olarak da analizleri yapılmıştır. Bu amaçla hareketli faz organik çözücü yüzdesi, kolon, akış hızı ve sıcaklık kullanılarak analizler için en iyi koşullar belirlenmiştir. Ayrıca kullanılan iki farklı dedektörün birbirlerine olan üstünlükleri gözlemlenmiştir.

Tez konusu seçiminden önceki literatür taramalarında olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipin ve hidroklorotiyazid içeren farmasötik preparatların ikili, üçlü ve dörtlü analizi ile ilgili çalışmalar mevcut değilken tez süresince bu çalışmaların yapıldığı görülmüştür. Ancak önceki ve şimdiki çalışmalar incelendiğinde bu maddelerin tümünün aynı anda analizi ile yapılan hiç bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Optimizasyon ve validasyon işlemleri tamamlanarak geliştirilen yöntemlerimizde literatürdeki birçok analiz yöntemine göre daha iyi ve etkin bir ayırım ve daha iyi geri kazanım, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri elde edilmiştir. Hesaplanan validasyon parametreleri doğrultusunda ise geliştirilen yöntemin doğru, duyarlı, kesin, seçici, kararlı bir yöntem olduğu söylenebilmektedir.

Ters faz sıvı kromatografisinde iki farklı dedektör olan FDD ve K/KS karşılaştırıldığında K/KS'nin bileşiklerin analizlerini kısa sürede gerçekleştirerek, tam bir ayırma gerek duyulmaksızın daha hasas tayin sağlamaktadır. Çok daha düşük konsantrasyonlarda doğru sonuçlar elde edilebilmektedir.

Sonuç olarak bulunan veriler doğrultusunda, olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipin ve hidroklorotiyazid etken maddelerinin eş zamanlı analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay uygulanabilir, doğru, ekonomik ve herhangi bir ön ayırma işlemi gerektirmeyen iki farklı dedektör ile analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Geliştirilen analiz yöntemlerinin

farmasötik dozaj formundan bu maddelerin eş zamanlı analizine başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Her iki dedektör ile yapılan analiz sonuçları yorumlanırken student-t ve Fisher (F) testlerinden yararlanılmıştır. Bu istatistiki değerlendirmeler sonucunda çıkan değerler tutarlı olup iki yöntemin de birbiri yerine kullanılabileceği görülmüştür.



ÖZET

Bazı Anjiotensin II Antagonisti İlaç Karışımlarının Fotodiyot Dizi Dedektör ve Kütle Spektrometresi ile Sıvı Kromatografisinde Aynı Anda Analizleri ve Validasyonları

Bu tezin amacı hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaç etken maddelerinden olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipin ve hidroklorotiyazid'in eş zamanlı tayini için iki farklı dedektör olan FDD ve K/KS dedektörleri kullanılarak sıvı kromatografik yöntem geliştirmektir. Bu sebeple, farklı hareketli faz kompozisyonları, farklı sıcaklık, akış hızı etkileri gibi deney şartları optimize edilmiştir. İlk metot FDD, Symmetry Shield (150x4.6; 3.5 μ m) (Waters, ABD) kolon ve MeOH:asetonitril: pH 3,0 çözeltisi (fosforik asit), 40: 40: 20 (h\h\h) hareketli faz kompozisyonu kullanılarak iyi bir kromatografik ayırma ulaşılmıştır. Analizler 25°C, 1mL dk⁻¹ akış hızında ve 220 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. İkinci metot K/KS, Poroshell 120 EC C-18 (50 mm x 3,0 mm x 2,7 μ m) (Agilent, ABD) kolon ve asetonitril: tampon çözelti (10 mM amonyum format; formik asit), 40: 60 (h\h) hareketli faz kompozisyonu kullanılarak iyi bir kromatografik ayırma ulaşılmıştır. Analizler 40°C ve gradient olarak 0,6 ve 0,8 mL dk⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir.

Araştırmalar sonucunda optimum çalışma şartlarında, hızlı, basit, duyarlı, doğru, kesin, çevreci ve tamamen valide edilmiş analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Önerilen hızlı ve duyarlı iki yöntem de olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipin ve hidroklorotiyazid'in eş zamanlı miktar tayinleri için zaman almayan numune hazırlama işlemine sahip olmasından dolayı kalite kontrol laboratuvarlarında kolayca uygulanabilecektir. Geliştirilen yöntemler ilaç numunelerine de uygulanmıştır. Böylece ilaç numuneleri gibi kompleks matrislerde yöntemlerin uygulanabilirliği de gösterilmiştir. Ayrıca geliştirilen her iki yöntemin de birbirine eşdeğer olduğu Student-t ve F testi ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amlodipin, Hidroklorotiyazid, İlaç analizi, Olmesartan, SK-K/KS, Telmisartan, Validasyon, Valsartan, YPSK-FDD.

SUMMARY

Simultaneous Determination and Validation of Some Angiotensin II Antagonist Drug Mixtures By HPLC-DAD and LC-MS/MS Techniques

The aim of this thesis to develop a liquid chromatographic method using two different detectors which are the DAD and MS/MS for simultaneous determination of olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipine and hydrochlorothiazide from the drug active substances used in the treatment of hypertension. For this reason, experimental conditions such as different mobile phase compositions, temperature, flow rate effects are optimized. The first method based on reverse phase liquid chromatography by using Symetry Shield (150x4.6; 3.5 μm) (Waters, ABD) column and methanol: acetonitrile: pH 3.0 solution (phosphoric acid), 40:40:20, v \ v \ v mobile phase composition. The separation was carried out at 25 ° C, a flow rate of 1 mL min⁻¹ and a detection wavelength of 220 nm. The second method involved MS/MS, Poroshell 120 EC C-18 (50 mm x 3,0 mm x 2,7 μm) (Agilent, ABD) column and acetonitrile: buffer solution (10 mM ammonium formate; formic acid), 40:60, v \ v mobile phase composition. The analyses were carried out at 25 ° C, a flow rate of 0,6 and 0,8 mL min⁻¹ as a gradient.

As a result of this study, fast, simple, sensitive, accurate, precise, environmentally and fully validated analysis methods have been developed under optimum working conditions. The proposed rapid and sensitive HPLC-DAD and LC-MS/MS method will be readily applicable in quality control laboratories for simultaneous determination of olmesartan, valsartan, telmisartan, amlodipine and hydrochlorothiazide since they have not a time-consuming sample preparation procedure. The developed methods were also applied to the pharmaceutical dosage forms. Thus, the applicability of the methods in complex matrices such as drug samples have also been demonstrated. Furthermore, student-t and F tests showed that both developed methods were equivalent to each other.

Key Words: Amlodipine, Drug analysis, HPLC, Hydrochlorothiazide, LC-MS/MS, Olmesartan, , Telmisartan, Validation, Valsartan.

KAYNAKLAR

- ARES, M., BERNAL, J., (2012). Hydrophilic interaction chromatography in drug analysis, *Central European Journal Of Chemistry*, **10**: 534-553.
- BIDLINGMEYER, B.A. (1992). Practical HPLC Methodology and Applications. *New York: John Wiley & Sons, Inc.*, 69-200.
- BLIENER, D.M. (2006). Validating chromatographic methods: A practical guide. *Danvers, Wiley-Interscience Pub.*
- BRACH, S.K. (2005). Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**: 798-805.
- BUSZEWSKI, B., NOGA, S., (2012). Hydrophilic liquid chromatography (HILIC) – A powerful separation technique, *Analytical And Bio Analytical Chemistry*, **402**: 231-247.
- ÇAM, M., HIŞI, Y. (2008). Kromatografi tarihi, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **2**: 19-27.
- CASRO, M., BOLFARINE, H., GALEA-ROJAS, M.M., CASTILHO, V. (2005). An exact test for analytical bias detection. *Anal. Chim. Acta*, **538**: 375.
- CHAN, C.C. (Ed.) (2004). Potency Method Validation. In: Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification, Eds.: Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang XM, New Jersey: Wiley- Interscience Pub.
- CHEN, L., CHEN, H. and SHEN, M. (2014).Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem mass spectrometry method for the quantification of tobramycin in human plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, **973**: 39–44.
- CHRISTIAN, G.D. (Eds.) (2004). Analytical chemistry. 6th Ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- CROWTER J.B. (Ed.) (2001). Validation of pharmaceutical methods. In: Handbook of modern pharmaceutical analysis, Eds.: Ahuja S, Scypinski S. San Diego: Academic Press.
- DEMIRCI, A., ÖZCİMDER, M. (2009). Kromatografik Yöntemler. Ankara:Kurban Matbaacılık.
- DUPLAY, D. (2007), Physicians Desk Reference (PDR), 61st Ed., Published by Thomson Medical Economics Company Inc., Electronic Verison, Montvale, NJ.
- ERMER, J. (Ed.) (2005). Fundamentals of Validation in Pharmaceutical Analysis. In: *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Eds.: Ermer J, Miller JH., Wiley: VCH Publishers.
- WEINHEIM. E. J, MILLER, JHMcB (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis. 1st Ed., Weinheim: WileyVCH Publishers.

- ERMER J, PLOSS HJ (2005). Validation in pharmaceutical analysis. Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 859.
- European Pharmacopoeia (2014) 8th Ed. Council of Europe, Strasbourg.
- FANALI S, HADFD PR., POOLE C, SCHOENMAKERS P and LLOYD DK (2013). Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. *Elsevier*, USA.
- FİLİZ ARIÖZ ÖZDEMİR, ATALAY AKYÜZ (2014). Simultaneous Determination of Amlodipine and Aliskren in tablets by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science.*, **52**: 685-690
- GAMA, M. R., da COSTA SILVA, R. G., COLLINS, C. H., and BOTTOLİ, C. B. (2012). Hydrophilic interaction chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **37**, 48-60.
- GÖRÖG S (2007). The changing face of pharmaceutical analysis. *Trac-Trends Anal. Chem.*, **26**: 12-17.
- GRDINIC, V., VUKOVIC, J. (2004). Prevalidation in pharmaceutical analysis, part 1, Fundamentals and critical discussion. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**: 489-512
- GÜMÜŞTAŞ, M (2009). Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü ve kalsiyum kanal blokörü kombinasyonu ilaçların yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile aynı anda analizi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- GÜMÜŞTAŞ, M. (2016). Beta agonist ilaç etken maddelerin kiral davranışlarının incelenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- GÜMÜŞTAŞ, M., USLU, B., OZKAN, S.A., ABOUL-ENEIN, H. (2014B). Validated Stability-Indicating HPLC And UPLC Assay Methods For The Determination Of Entacapone In Pharmaceutical Dosage Forms. *Chromatographia*, **77**: 1721-1726.
- HAJICOSTAS, E. (2003). Validation of Analytical Methods. Springer-Verlag Pub., Berlin.
- HAMILTON, R.J., SEWEL, P.A. (1982). Introduction to HPLC. 2nd Ed., Chapman and Hall, New York. 1-160.
- HARTMANN, C., SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D.L. and McDOWALL, R.D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 193.
- HEMSRTOM, P., IRGUM, K. (2006). Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **29**:1784-1821
- HIBBERT, D.B. (2007). Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory. Oxford University Press, Inc., New York.
- HOFFMANN E., STRTOBANT V. (2007), Mass Spectrometry, 3 rd ed, John Wiley & Sons Ltd., Sussex, 85-100.

- HUBER L (2007). Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd Ed., Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Genova. Q2A (R1)
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Genova. Q2B (R1).
- JAIVIK V. SHAH, JIGNESH M. PAREKH, PRIYANKA A: SHAH, PRIYA V. SHAH, MALLIKA SANYAL and PRANAV S. SHRIVASTAV (2017). Application of an LC/MS-MS method for the analysis of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlorothiazide in polypill for a bioequivalence study. *Journal of pharmaceutical analysis* **7(5)**: 309-316.
- KAWACHI, Y., IKEGAMI, T., TAKUBO, H., IKEGAMI, Y., MIYAMOTO, M., and TANAKA, N. (2011). Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *Journal of chromatography A*, 1218**(35)**: 5903-5919.
- KAYAALP, O. (2012). Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık.
- KONIECZKA, P. (2007). The Role of and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **37(3)**: 173-190.
- KROMIDAS, S. (2008). HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- KROMIDAS, S. (Ed.) (2005). More Practical Problem Solving in HPLC. Weinheim: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Publishers.
- LEENA R. BHAT, RAHUL K. GODGE, ASFAK T. VORA, MRINALINI C. DAMLE (2007), Validated RP-HPLC Method for Simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulation *J. Chromatogr. & Related Tec.*, 3059-3067.
- LINDEN, J.C., LAWHEAD, C.L., (1975). Liquid chromatography of saccharides. *Journal of Chromatography A*, **105**:125-133
- LONG, Z., JIN, Y., LIU, X., GUO, Z., SHEN, A., HU, X., WU, N., (2015). ‘Quantitative Analysis Of Five Antiviral Drugs By Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography- Charged Aerosol Detection’, *Chinese Journal Of Chromatography/ Zhongguo HUA XUE HUI*, **33**: 938-942 .
- MAJCEN, N. (2003). A need for clearer terminology and guidance in the role of reference materials in method development and validation. *Accred. Qual. Assur.*, **8**: 108-122.
- MEYER, R. V. (1988), Practical High Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Toronto, Canada.
- N DELHIJAR, S ANBAZHAGAN, (2014). Validated chromatographical methods for the simultaneous estimation of antihypertensive drugs in multicomponent formulations. *International Journal of Pharmatech Research*, **6**:369-375

- O'NEIL, M.J. (Senior Ed.) (2001), The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th Ed., Merck&Co., Inc., New Jersey.
- OZKAN, S.A. (2012). Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation. USA: HNB Publishers.
- OZKAN S.A., KAUFFMAN, J.M., and ZUMAN, P. (2015). Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications. Springer Heidelberg, New York.
- PANCHUMARTHY RAVISANKAR, KURRA M, V. LAYA SRI, (2016). Quantitative Estimation of Four Sartans in Presence of Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations by High Performance Liquid Chromatography. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4): 1-15
- PRICHARD E BARVICK, V. (2007). Quality Assurance in Analytical Chemistry. UK: John Wiley & Sons Pub.
- RAYMOND P.W. SCOTT (1996). Chromatographic Detectors. Chromatographic Science Series. Volume 73
- RILEY CM, ROSANSKE TW (Eds.) (1996). Development and Validation of Analytical Methods. Oxford: Pergamon Press.
- ROBERT E.A.(2003), Liquid Chromatography-mass Spectrometry, John Wiley & Sons, Inc., West Sussex, England, 1-74.
- RXMEDIA PHARMA (2008), İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Prof.Dr. Levent Üstünes, (Ed.), 2008, Gemaş Yayıncılık.
- SAURABH K SINHA, PRABHAT K SHRIVASTAVA, SUSHANT K SHRIVASTAVA (2012). Development and validation of a HPLC method for the simultaneous estimation of Amlodipine and Telmisartan in pharmaceutical dosage form. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 2, Issue 1: S312-S315.
- SCOTT, P. W. R.(1995), Techniques and Practice of Chromatography, Marcel Dekker, Nc., New York, USA, b:1-5.
- SHABIR GA (2003). Validation high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A.*, **987**: 57-66.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. and CROUCH, S.R. (2007). Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA (1998). Principles of Instrumental Analysis. 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, USA.
- SNYDER LR, KIRKLAND JJ, GLAYCH JL (1997). Practical HPLC Method Development, 2nd Ed., John Wiley & Sons Inc., New York.

- SUZANNE, L. PARKER, JEFFREY LIPMAN, JASON, A. ROBERTS, STEVEN, C. WALLIS, (2015) A simple LC–MS/MS method using HILIC chromatography for the determination of fosfomycin in plasma and urine: Application to a pilot pharmacokinetic study in humans, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **105**: 39–45
- SUTIRTHO MUKHOPADHYAY, KIRAN KADAM, LAXMAN SAWANT, DHANASHREE NACHANE, NANCY PANDITA (2011) Simultaneous determination of related substances of Telmisartan and Hydrochlorothiazide in tablet dosage form by using reversed phase high performance liquid chromatographic method, *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, Volume 3, Issue 3: 375-383.
- SWARTZ, M.E, KRULL, I.S. (1997). Analytical Method Development and Validation. Marcel Dekker, New York.
- SWEETMAN S.C. (2007), Martindale, The Complete Drug Reference, 35th Ed., Pharmaceutical Press, London.
- SEWELL, P. A., CLARKE, B., KEALEY, D.(1987), Chromatographic Separations, John Wiley & Sons, London, UK, s. 13-80.
- SWITAJ-ZAWADKA, A, KONIECZKA, P, PRZYK, E, NAMIESNIK, J (2005). Calibration in metrological approach. *Anal. Lett.*, **38**: 353-376.
- THOMPSON, M., ELLISON, SLR., and WOOD, R. (2002). Harmonized guidelines for validation of. methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, **74**: 835-855.
- TORBECK, L.D. (Ed.) (2007). Pharmaceutical and Medical Device Validation by Experimental Design. New York: Informa Healthcare USA.
- US FDA Technical Review Guide: Development of New Stereoisomeric Drugs (1992).
- US FDA Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (1983). Rockville, MD.
- US FDA,. (2000). Analytical Procedures and Method Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls, Federal Notices 5, 776.
- VASU BABU RAVI, JASWANTH KUMAR INAMADUGU, NAGESWARA RAO PILLI, VUDAGANDLA SREENIVASULU and VENKATESWARLU PONNERI (2012). Simultaneous determination of Telmisatan and Amlodipine in human plasma by LC/MS-MS and its application in a human pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical analysis* **2(5)**: 319-326.
- WANKHEDE SB, TAJNE MR, GUPTA KR, WADODKAR SG (2007), RP-HPLC method for simultaneous estimation of telmisartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. *Indian J Pharm Sci*; 69:298-300
- VAN LOCCO J, ELSKENS M, CROUX C, BEERNAERT H (2002). Linearity of calibration curves: use and misuse of correlation coefficient. *Accred. Qual. Assur.*, **7**: 281-285.
- WERNER, F., VERA D, GERHILD, D. (2006). Quality Assurance in Analytical Chemistry, Applications in Environmental, Food and Materials Analysis, Biotechnology and Medical Engineering. Wiley-VCH, Weinheim.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : TUĞBA
Soyadı : NEMLİOĞLU
Doğum yeri ve tarihi : SAMSUN, 06.09.1981
Uyruğu : TÜRKİYE CUMHURİYETİ
Medeni durumu : EVLİ
İletişim adresi ve telefonu : İSTANBUL EVLERİ HAN 3 A BLOK D: 22
BEYLİKDÜZÜ/İSTANBUL
Elektronik Posta : tugba_kutucu@yahoo.com

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

2006–2008/Yüksek Lisans/ Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık
Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı

1999–2005/Lisans/ Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (İngilizce)

1996–1999/Lise/ Namık Kemal Lisesi (Samsun)

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

Uzman Kimyager

IV- Mesleki Deneyimi

Mustafa Nevzat-Amgen İlaç A.Ş. Ar-ge Proje Takım Lideri(Mart 2018-)
Mustafa Nevzat-Amgen İlaç A.Ş. Ar-ge Yönetici (Mart 2013- 2018)
Mustafa Nevzat-Amgen İlaç A.Ş. Ar-ge Kıdemli Uzman (Mart 2009- 2013)
Nobel İlaç A.Ş. Fargem Ar-ge Uzmanı (Ocak 2006-Mart 2009)
Dopa Kimya –Satış Temsilcisi (8 Ay)

V- Bilimsel İlgi Alanları

Metot Geliştirme, İlaç analizleri, YPSK, Yöntem validasyonu.

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Poster sunumu

Sibel A. Ozkan, Tugba Nemlioğlu, Mehmet Gümüştas, Simultaneous Estimation of Olmesartan, Amlodipine and Hydrochlorothiazide in Their Ternary Mixture by HPLC 8th Black Sea Basin Analytical Chemistry (8th BBCAC), 9-11 May 2018, Istanbul, Turkey

Sibel A. Ozkan, Tugba Nemlioğlu, Mehmet Gümüştas, Simultaneous Estimation of Valsartan, Amlodipine, and Hydrochlorothiazide from their Pharmaceutical Preparation, 29th Pharmaceutical and Biomedical Analysis Conference (PBA 2018), 9-12 September 2018, Leuven, Belgium

Yayın

Kul D., Dogan-Topal, B., Kutucu, T., Uslu, B., Özkan, S.A., High-performance liquid chromatographic and First Derivative of the Ratio Spectrophotometric Determination of Amlodipine and Valsartan in their binary mixtures. Journal of AOAC International. 93(3) 882-890, 2010.

Verdiği Seminerler

“Gaz Kromatografisi ve Uygulamaları” konu başlıklı 2009 tarihinde Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda seminer verilmiştir.

“HPLC’de Karşılaşılan Problemler ve Çözümleri” konu başlıklı 2010 tarihinde Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda seminer verilmiştir.

