



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BİSOPROLOL FUMARAT VE HİDROKLOROTİAZİT'İN AYNI ANDA
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER KULLANILARAK MİKTAR TAYİNİ**

Gözde ÖZCAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

2010 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Tezli Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki, jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 07/10/2010



Prof. Dr. Elmas (GÖKOĞLU) GÖK

Hacettepe Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Göksel ARLI
Anadolu Üniversitesi



Prof. Dr. Oya BOZDAĞ DÜNDAR
Ankara Üniversitesi



Prof. Dr. Nevin ERK
Ankara Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN
Anadolu Üniversitesi
Raportör

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	
1.Giriş ve Amaç	1
1.2. Kullanılan Etken Maddelerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	5
1.2.1. Bisoprolol Fumarat	5
1.2.1.1. Kimyasal Yapı	5
1.2.1.2. Farmakodinamik, Farmakokinetik ve Farmakolojik Özellikleri	6
1.2.1.3. Kullanılışı	7
1.2.1.4. Yan etkileri	7
1.2.2. Hidroklorotiazit	8
1.2.2.1. Kimyasal Yapı	8
1.2.2.2. Farmakodinamik, Farmakokinetik ve Farmakolojik Özellikleri	9
1.2.2.3. Kullanılışı	10
1.2.2.4. Yan etkileri	10
1.3. Bisoprolol Fumarat İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri	11
1.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	11
1.3.2. Voltametri	17
1.4. Hidroklorotiazit İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri	19
1.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	19
1.4.2. Spektrofotometri	31
1.4.3. Kapiller Elektforez	37
1.4.4. Voltametri	38

	39
1.4.5. Dansitometri	
1.5. Kullanılan Yöntemler	41
1.5.1. Spektrofotometri	41
1.5.1.1. Spektrofotometre	44
1.5.2. Türev Spektrofotometri	47
1.5.2.1. Yöntemin Avantajları	49
1.5.2.2. Yöntemin Dezavantajları	50
1.5.2.3. Türev Spektrofotometri Uygulamaları	50
1.5.3. Spektrum Oranları Türev spektrofotometri	51
1.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	54
1.6.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Yönteminin Avantajları	57
1.6.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Yöntemin Dezavantajları	58

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	59
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	59
2.3. Kullanılan Standart Maddeler	59
2.4. Farmasötik Preparatlar	60
2.5. Ortam Şartları ve Hesaplamalar	60
2.6. Sadece Bisoprolol Fumarat İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Analiz Yöntemleri	61
2.6.1. Doğrudan UV Spektrofotometri	61
2.6.1.1. Deneyin Yapılışı	61
2.6.1.1.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	61
2.6.1.1.2. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)	61
2.6.1.1.2.1. Gün İçi Deneyler	61
2.6.1.1.2.2. Günler Arası Deneyler	62
2.6.1.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları	62
2.6.1.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	62
2.6.2. Birinci Türev UV Spektrofotometri	63
2.6.2.1 Deneyin Yapılışı	63
2.6.2.1.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	63
2.6.2.1.2. Tekraredilebilirliğin Araştırılması(Gün içi ve Günler Arası Deneyler)	63
2.6.2.1.2.1. Gün içi Deneyler	63
2.6.2.1.2.2. Günler Arası Deneyler	64
2.6.2.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları	64
2.6.2.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	64
2.6.3. Yüksek Performanslı Kromatografi	65
2.6.3.1. Deneyin Yapılışı	65
2.6.3.1.1. Ortam Koşullarının Ayarlanması	65

2.6.3.1.2. Kromatografik Koşullar	65
2.6.3.1.3. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	66
2.6.3.1.4. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)	67
2.6.3.1.4.1. Gün İçi Deneyler	67
2.6.3.1.4.2. Günler Arası Deneyler	67
2.6.3.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları	68
2.6.3.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	68
2.7. Bisoprolol Fumarat ve Hidroklortiazit'i Birlikte İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Analiz Yöntemleri	69
2.7.1. Spektrum Oranları Birinci Türev UV Spektrofotometri	69
2.7.1.1. Deneyin Yapılışı	69
2.7.1.1.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	69
2.7.1.1.2. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)	70
2.7.1.1.2.1. Gün İçi Deneyler	70
2.7.1.1.2.2. Günler Arası Deneyler	70
2.7.1.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları	71
2.7.1.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	71
2.7.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	72
2.7.2.1. Deneyin Yapılışı	72
2.7.2.1.1. Ortam Koşullarının Ayarlanması	72
2.7.2.1.2. Kromatografik Koşullar	72
2.7.2.1.3. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	73
2.7.2.1.4. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)	74
2.7.2.1.4.1. Gün İçi Deneyler	74
2.7.2.1.4.2. Günler Arası Deneyler	74
2.7.2.1.5. % Geri Kazanım Çalışmaları	75
2.7.3.1.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	75

3. BULGULAR

3.1. Sadece Bisoplorol Fumarat İçeren Farmasötik Preparatlar İçin	76
Analiz Bulguları	
3.1.1. Doğrudan UV Spektrofotometri	76
3.1.2. Birinci Türev UV Spektrofotometri	82
3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	88
3.2. Bisoplorol Fumarat ve Hidroklorotiazit İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Analiz Bulguları	94
3.2.1. Spektrun Oranları Birinci Türev UV Spektrofotometri	94
3.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	103

4. TARTIŞMA	109
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	118
ÖZET	120
SUMMARY	123
KAYNAKLAR	126
ÖZGEÇMİŞ	141

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren farmasötik preparatta etken maddelerin miktar tayini için oran spektrofotometri birinci türev yöntemi ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi önerilmesi ve farmasötik preparatlara uygulanması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar tez kapsamında sunulmuştur.

Bu çalışmanın hazırlanmasında, engin tecrübelerini,değerli görüşlerini, yakın ilgisini ve sonsuz desteğini benden esirgemeyen sevgili hocam Prof.Dr.Nevin ERK'e şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve aileme teşekkür ederim.

ŞEKİLLER

Şekil 1. 5. 1. 1. 1.	Çift Işın yollu Spektrofotometre Cihazı (Yıldız ve ark., 1997)	46
Şekil 1. 5. 2. 1.	A. basit bir orijinal spektrum D ₁ . Orijinal spektrumun 1. dereceden türevi D ₂ . Orijinal spektrumun 2. dereceden türevi D ₃ . Orijinal spektrumun 3. dereceden türevi D ₄ . Orijinal spektrumun 4. dereceden türevi	48
Şekil 1.6.3.1.	Sıvı kromatografinin Uygulamaları (Skoog ve ark.,1997)	55
		56
Şekil 1.6.3.2.	Bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazının şeması (Skoog ve ark.,1997)	76
Şekil 3.1.1.1.	Standart Bisoprolol fumarat'ın metanoldeki a)6.0 µg/mL; b)10.0 µg/mL; c)14.0 µg/mL; d)18.0 µg/mL; e)22.0 µg/mL'lik konsantrasyonlarına ait UV spektrumları	
Şekil 3.1.2.1.	Standart Bisoprolol fumarat'ın metanol içerisindeki a) 6.0 µg/mL; b)10.0 µg/mL ; c)14.0 µg/mL ;d) 18.0 µg/mL ve e)22.0 µg/mL'lik konsantrasyonlarına ait birinci türev UV spektrumları	82

- Şekil 3.1.3.1.** Bisoprolol fumarat'ın (a) metanoldeki 14.0 µg/mL 'lik ve losartan (b) 2.0 µg/mL'lik çözeltisine ait kromatogram 88
- Şekil 3.2.2.1.** Standart bisoprolol fumarat'ın metanol içerisindeki a)6.0 µg/mL; b)10.0 µg/mL; c)14.0 µg/mL; d)18.0 µg/mL; e)22.0 µg/mL'lik oran spektrumları bölücü hidroklorotiazit konsantrasyonu 14.0 µg/mL($\Delta\lambda= 6$ nm) 94
- Şekil 3.2.2.2.** Standart bisoprolol fumarat'ın metanol içerisindeki a)2.0 µg/mL; b) 10.0 µg/mL; c) 14.0 µg/mL; d) 18.0 µg/mL; e) 22.0 µg/mL'lik oran spektrumları birinci türev UV eğrileri bölücü hidroklorotiazit konsantrasyonu 14.0 µg/mL ($\Delta\lambda= 6$ nm) 95
- Şekil 3.2.2.3.** Standart hidroklorotiazit'in metanol içerisindeki a)2.0 µg/mL;b) 6.0 µg/mL; c) 10.0 µg/mL ' lik oran spektrumları bölücü bisoprolol fumarat konsantrasyonu 14.0 µg/mL ($\Delta\lambda= 6$ nm) 96
- Şekil 3.2.2.4.** Standart hidroklorotiazit'in metanol içerisindeki a) 2.0 µg/mL; b)6.0 µg/mL; c) 10.0 µg/mL ' lik oran spektrumlarının birinci türev eğrileri bölücü bisoprolol fumarat konsantrasyonu 14.0 µg/mL ($\Delta\lambda= 6$ nm) 96
- Şekil 3.2.3.1.** Bisoprolol fumarat'ın (a) metanoldeki 10.0 µg/mL, hidroklorotiazit (c) 'in 14.0 µg/mL'lik ve losartan (b) 2.0 µg/mL'lik metanoldeki çözeltilerine ait kromatogram 103

Çizelge 3.1.2.5. Bisoprolol fumaratı tek başına içeren CONCOR® tablet'e Birinci Türev UV spektrofotometrik yöntem uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 10 mg/tab. 'dir. (λ :232.6 nm)	87
Çizelge 3.1.3.1. Bisoprolol fumarat için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem ile elde edilen kalibrasyon verileri (n=6)	89
Çizelge 3.1.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yöntemiyle yapılan bisoprolol fumarat için gün içi deney sonuçları	90
Çizelge 3.1.3.3. Bisoprolol fumarat için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yöntemiyle yapılan günler arası deney sonuçları	91
Çizelge 3.1.3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yöntemiyle bulunan %geri kazanım analiz sonuçları (n=5)	92
Çizelge 3.1.3.5. Bisoprolol Fumaratı tek başına içeren CONCOR® tablet'e Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yönteminin uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (λ : 230.0 nm)	93
Çizelge 3.2.2.1. Karışım halinde bisoprolol fumarat ve	97

hidroklorotiazit miktar tayini için bulunan spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri için kalibrasyon grafik verileri (n=5)

Çizelge 3.2.2.2. Spektrum oranları Birinci Türev UV 98
spektrofotometrik yöntemde bisoprolol ve hidroklorotiazit standartlarının gün içi çalışmalarının sonuçları (n=5)

Çizelge 3.2.2.3. Spektrum oranları Birinci türev UV 99
spektrofotometrik yöntemde bisoprolol ve hidroklorotiazit standartlarının günler arası çalışmaların sonuçları

Çizelge 3.2.2.4. Spektrum oranları Birinci türev UV 100
spektrofotometrik yöntemde bisoprolol ve hidroklorotiazit standartlarının günler arası çalışmaların sonuçları

Çizelge 3.2.2.5. Sentetik olarak hazırlanan bisoprolol fumarat ve 101
hidroklorotiazit karışımlarına yöntemin uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları (275.8 nm 'deki spektrum oranları birinci türev UV absorbens değerleri kullanılmıştır.) (n=5)

Çizelge 3.2.2.6. Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren 102
farmasötik preparata spektrum oranları birinci türev spektrofotometrinin uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları. (Lodoz® tablet üzerinde yazılan miktar; bisoprolol fumarat 2.5 mg/tablet , hidroklorotiazit 6.25 mg/tablet) (n=5)

Çizelge 3.2.3.1. Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için Yüksek 104
performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile elde

edilen kalibrasyon verileri (n=6)

Çizelge 3.2.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit standartlarının gün içi çalışmalarının sonuçları(λ :230 nm)	105
Çizelge 3.2.3.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit standartlarının günler arası çalışmalarının sonuçları (λ :230 nm)	106
Çizelge 3.2.3.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile % geri kazanım çalışması sonuçları (λ :230 nm)	107
Çizelge 3.2.3.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminin farmasötik preparata uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları (LODOZ 2.5 mg bisoprolol fumarat ve 6.25 mg hidrokloorotiazit /tablet)(λ : 230.0 nm)	108
Çizelge 4.1. Bisoprolol fumarat için kullanılan analiz yöntem sonuçları	110
Çizelge 4.2. Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için kullanılan analiz yöntemleri sonuçları	117

1. GİRİŞ

1.1.Giriş ve Amaç

Hipertansiyon, diastolik kan basıncının sürekli olarak 90 mm Hg' dan yüksek olması ve buna yüksek sistolik kan basıncının (>140 mm Hg) eşlik etmesi şeklinde kendini gösteren kalp damar hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Hipertansiyon zamanla arterlerde irreversibl zedelenme yaparak ciddi kardiyovasküler komplikasyonlara yol açar (Kayaalp, 2009, ve [www.ahmetalpman.com/defilacoku.asp?id=1543 - 84k](http://www.ahmetalpman.com/defilacoku.asp?id=1543-84k))

Hipertansiyon başlıca esansiyel (veya primer) ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Esansiyel hipertansiyon nedeni belli olmayan ve hastaların % 90-95 'ini oluşturmaktadır. Hastaların % 10- 5 arasında ise nedeni belli olan sekonder hipertansiyon görülmektedir. Hipertansiyona yol açan hastalıkların önemli kısmı böbrek kaynaklıdır. Hormonal hastalıklar ise önemli diğer bir grubu oluşturmaktadır. Bu hastalıkların önemli bir kısmının tedavi edilebilir nitelikte olması, hastalıkların tedavisi ile de hipertansiyonun kalıcı tedavisinin mümkün olması her hastanın sekonder hipertansiyon açısından değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır (Kayaalp, 2009).

Sekonder hipertansiyonun başlıca nedenleri :

- 1.Böbrek hastalıkları
- 2.Böbrek atar damarında daralma
- 3.Hormonal nedenler
- 4.Sinirsel nedenler
5. Diğer nedenler şeklinde özetlenir.

Hipertansiyon hastaların önemli bir kısmında sinsi bir seyir izler yani hiçbir belirti yoktur. Bu hastalarda hipertansiyon tanısı sadece kan basıncı ölçümü ile mümkündür. Bu nedenle hipertansif olmasa bile tüm hastalar yılda en az 1-2 kez kan basıncını ölçtürmelidir. Ayrıca hipertansiyon 'sessiz katil' olarak da isimlendirilebilir.

Hipertansiyonun başlıca belirtileri baş ağrısı, çarpıntı, nefes darlığı, halsizlik, yorgunluk, burun kanaması, kulaklarda çınlama, yürüme ve merdiven çıkmada zorlanma, bazen çok sık idrara çıkma, gece uykudan uyanıp idrar yapma ve bacaklarda şişliktir. Kan basıncının çok yükseldiği durumlarda çift görme, dilde peltekleşme, yüzde veya vücutta karıncalanma olabilir. Bu belirtilerin hiçbirisi hipertansiyona özgü değildir, başka hastalıklarda da izlenebilir.

Hipertansiyon vücuda zarar vermişse bu zarara ilişkin belirtiler ortaya çıkabilir. Örneğin gözü etkilemişse görme kaybı, kalp damarlarını etkilemişse göğüs ağrısı izlenebilir. Kalp yetmezliği gelişmişse hasta sırt üstü yatamaz, 2-3 yastık kullanmak zorunda kalabilir. Bu belirtilerin ortaya çıkması için genellikle uzun bir süre geçmesi ve hastanın yeterli tedavi olmaması gereklidir. Gerekli tedavi yapılmazsa, bu belirtilerin ortaya çıkması daha hızlı olabilir.

Hipertansiyon tedavisinde temel amaç kalıcı hasar ve ölüm riskini azaltmak ve hastanın kendini daha iyi hissetmesini sağlamaktır. Öncelikle yapılması gereken mevcut olan diğer kardiyovasküler risk faktörlerini düzeltmektir. Hastada yüksek tansiyona bağlı organ yetmezliği varsa tedavi edilmelidir. Hipertansiyonun nedeni bilinen bir hastalık ise o hastalık tedavi edilmelidir. Hipertansiyonun nedeni saptanamaz ise yani hastada primer hipertansiyon varsa hastaların yaşam düzeni değiştirilmeli ve ilaç kullanılmalıdır. Yaşam düzeninin değiştirilmesi (ilaç dışı tedaviler, ilaçsız tedavi) kesinlikle ihmal edilmemelidir. Yaşam düzeninin değiştirilmesine uyulmazsa ilaç kullanılsa bile tedavi başarısız olur.

Hipertansiyon tedavisinde başarısızlık çok sık karşılaşılan bir durumdur. Tedavide başarısızlık oranının yüksek olmasının nedeni hipertansiyonun hiçbir belirtisinin olmaması (sessiz katil) ve hastalığın hastalar tarafından ciddiye alınmamasıdır. Hipertansiyon tedavisinin başarıya ulaşmasında hastanın sorumluluğu hekimden daha fazladır (Kayaalp, 2009).

Hipertansiyon ilaçlarının kan basıncını düşürücü etkileri ve güçleri birbirine benzer. İlaçların etki mekanizması, yan etkisi, doz miktarı, günlük doz sayısı gibi özellikleri ise birbirinden farklıdır. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan antihipertansif etkili ilaçlar başlıca şu sınıflarda toplanır (Kayaalp, 2009, ve <http://www.msxlabs.org/forum>).

- 1- Diüretikler
- 2- Adrenerjik reseptör blokerleri
- 3- Adrenerjik nöron blokerleri
- 4- Santral etkili sempatolitik ilaçlar ve diğer sempatolitikler
- 5- Kalsiyum kanal blokerleri
- 6- Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve reseptör blokerleri
- 7- Direkt etkili vazodilatatörler ve potasyum kanalı açıcı ilaçlar
- 8- Sadece hipertansif kriz tedavinde kullanılan ilaçlar

Bu grup ilaçları kullanmakta asıl hedef antihipertansif tedavi ile kan basıncı düşürüldükçe, kardiyovasküler risk doğru orantılı olarak azalmaktadır. Kan basıncı kesinlikle 140/90 mm Hg'nın altına düşürülmeli ve bu düzeyde tutulmalıdır. Kan basıncı 140/85 mm Hg'ya indirilebilir ancak daha fazla düşürülmesinin yararı belirsizdir. Kan basıncı 180/110 mm Hg olan bir hastanın kan basıncının 160/90 mm Hg'ya indirilmesi kalıcı hasar ve ölüm riskini azaltır ancak yeterli değildir. Pratikte yetersiz kan basıncı tedavisi çok karşılaşılan bir sorundur. Ne yazık ki

yetersiz kan basıncı kontrolü gerek hekim gerek hasta tarafından çoğu kez sorun kabul edilmemektedir.

İlaç rehberleri incelendiğinde antihipertansif etkili ilaçlar listesinde oldukça fazla sayıda ilacın varlığı dikkat çekmektedir. Antihipertansif etkili ilaçların bir kısmının formülünde tek etken madde varken birçoğunun formülü ise iki veya daha fazla etken maddeden oluşmaktadır. Önemli bir kısmı ise hidroklorotiazit adlı etken madde ile kombine olarak kullanılmaktadır.

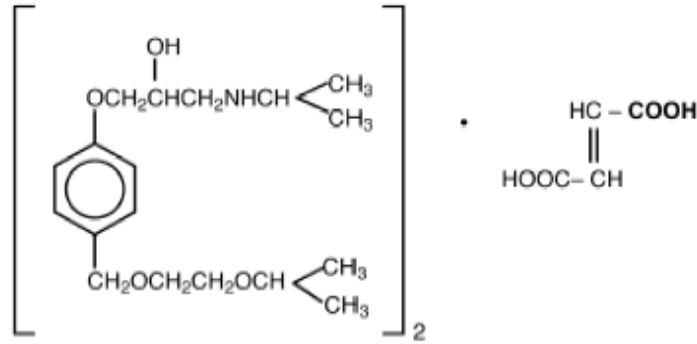
Yüksek lisans tez kapsamında beta blokör etkili bisoprolol fumarat ve diüretik etkili hidroklorotiazit adlı etken madde ile olan kombine preparatlarda etken madde miktar tayini hedeflenmiştir. Bunun için türev spektrofotometri, spektrum oranları türev spektrofotometri ve son yıllarda en çok kullanılan, güvenilirliği, tekraredilebilirliği, doğruluğu ispatlanmış yöntem olan yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1.2. Kullanılan Etken Maddelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

1.2. 1. Bisoprolol Fumarat

1.2.1.1. Kimyasal Yapı (www.rxlist.com/cgi/generic/bishctz.htm - 38k, ve Moffat ve ark., 2003)

Maddenin molekül yapısı:



Bisoprolol Fumarat

Kapalı Formülü: $(C_{18}H_{31}NO_4)_2 \cdot C_4H_4O_4$

Açık Formülü: $(\pm)$ -1-(4-((2-(1-Metiletoksi)etoksi)metil)fenoksi)-3-((1-metiletil)amino)-2-propanol (E)-2-butenedioat (2:1) (tuz).

Elemental Analizi: %62.6 C, %8.6 H, %3.7 N, %25.0 O

Molekül Ağırlığı: 766.97

Erime Noktası: 100°C

Görünüş: Beyaz renkli, kristal yapılı tozdur.

Çözünürlük: Su, metanol, etanol ve kloroformda çözünür.

Polimorfizm: Gösterir.

pK_a : 9.57

log P_(o/w): 2.15

1.2.1.2. Farmakodinamik, Farmakokinetik ve Farmakolojik Özellikleri (RX MediaPharma, 2010; Vademecum 2009)

Bisoprolol fumarat bir beta blokerdir. Beta blokerler kalp, akciğer ve diğer organlardaki beta reseptörleri bloke ederler. Beta reseptörlerin bloke edilmesiyle noradrenalin ve adrenalin salgılanması inhibe edilmiş olur. Bisoprolol çoğunlukla kalpteki beta reseptörleri inhibe eder. Böylece kalp daha az enerji harcar ve daha az oksijene ihtiyaç duymaktadır. Kalbin iş yükü çok fazla arttığı takdirde kalbe yeteri kadar oksijen ulaşamamakta (örneğin egzersiz sırasında) bu da beraberinde anjinal ağrısına sebep olmaktadır. Bisoprolol, kalp vuruşunu yavaşlatır ve kalbin daha az enerjiye gereksinim duymasını sağlar böylece kalbin oksijen ihtiyacını azaltarak bu anjinal ağrısına engel olmaktadır. Bu durum beta blokerlerin kan basıncını azaltmaya yardımcı olduğunu gösteren yollardan birisidir, tüm mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir (www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/health_advice/netdoctor/archive/100003948.html - 44k).

Yüksek kan basıncı (Hipertansiyon): Beta blokerler hipertansiyon tedavisinde tek başına kullanılabilirse de çoğunlukla başka bir ilaçla kombine olarak kullanılır.

Angina (kalbe bağlı göğüs ağrısı) : Angina, kalbe oksijen teminindeki yetersizlik nedeniyle oluşan baskı, rahatsızlık hissidir. Beta blokerler, özellikle kronik stabil angina tedavisinde birinci basamak tedavide düşünülür. Kalp kasılma gücünü azaltarak ve kalp atım sayısını yavaşlatarak kalbin oksijene olan ihtiyacını azaltırlar. Bu hastalarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki, beta blokerler, egzersiz kapasitesinin düzelmesi, angina ataklarının sıklığının azalmasına ek olarak kalp krizi tekrarı ve ölüm riskini azaltabilirler (www.ahmetalpman.com/defilacoku.asp?id=1543 - 84k).

1.2.1.3. Kullanılışı

Esansiyel hipertansiyonun tedavisinde kullanılır.

1.2.1.4. Yan etkileri

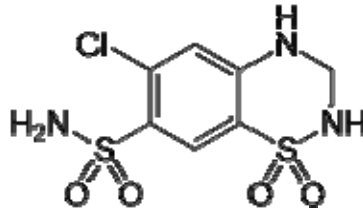
Özellikle tedavinin başlangıcında yorgunluk, baş dönmesi, hafif baş ağrısı, terleme, uyku bozuklukları, canlı rüyalar ve depresif ruh hali görülebilir. Bu semptomlar genellikle hafif şiddettedir ve çoğunlukla tedavi başlangıcından sonraki ilk 1-2 hafta içinde kaybolur. Nadir vakalarda gastrointestinal bozukluklar (diare, konstipasyon, bulantı, karın ağrısı) ve cilt reaksiyonları (örn: eritem, pruritis) olabilir. Tedavi edilmemiş miyokard yetmezliği (dekompanse kalp yetmezliği), yeni geçirilmiş miyokard enfaktüsü, şok, atrioventriküler ileti bozuklukları (II. ve III. derece AV blok), hasta sinüs sendromu, sinoatrial düğüm ve atrium arasında ileti bozukluğu (sinoatrial blok), tedaviye başlama öncesi çok yavaş nabız (dakikada 50 vuruşdan daha az bradikardi), çok düşük kan basıncı (hipotansiyon), bronşial astım ve ilerlemiş dönemlerdeki periferik dolaşım bozuklukları vakalarında kullanılmamalıdır. Adrenal tümör (feokromositoma) vakalarında, ancak a-blokağından sonra verilebilir. Nadir vakalarda hava yolları direncinde artma olabilir (bronkospastik reaksiyonlara eğilim gösteren hastalarda solunumda zorlanma, örneğin bronşiyal astım). Diabetes mellitus'u olan yaşlı hastalarda glukoz toleransı bozulabilir. Düşük kan glukoz seviyesinin belirtileri (örn: artmış kalp hızı) maskelenebilir. Yeterli klinik tecrübe olmadığından, gebelik sırasında, emzirme sırasında ve çocuklar tarafından kullanılmamalıdır. Hayvan deneylerinde fertiliteye veya yavrulara bir zarar vermediği gösterilmiştir (www.ilacabak.com/ilacgoster.php?Id=4248 - 17k).

1.2. 2. Hidroklorotiazit

1.2.2.1.Kimyasal Yapı

(<http://www.medicineonline.com/drugs/;RXMediaPharma,2008>,
<http://tr.wikipedia.org>, *Moffat ve ark.*, 2003)

Maddenin molekül yapısı



Hidroklorotiazit

Kapalı Formülü: C₇H₈ClN₃O₄S₂

Açık Formülü: 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiyazidin-7-sülfonamid
 1,1-dioksit

Elemental Analizi: %28.2 C, %2.7 H, %11.9 Cl, %14.1 N, %21.5 O,
 %21.5 S

Molekül Ağırlığı: 297.74

Erime Noktası: 273.0 - 275.0°C

Görünüş: Beyaz-beyaza çok yakın renkte kristal yapıda çok az kokulu tozdur.

Çözünürlük: Suda güç , etanol ve metanolde ve asetonunda kolayca çözünür.

Polimorfizm: Gösterir.

pK_a: 7.0 ve 9.2

logP_(o/w) : -0.1

1.2.2.2. Farmakodinamik, Farmakokinetik ve Farmakolojik

Özellikleri (RXMediaPharma,2010; Vademecum 2009, Kayaalp ,2009)

Hidroklorotiazit, antihipertansif etkiye sahip olan ilaçlar grubundan tiazid yapılı bir diüretiktir. Diüretik etkili hidroklorotiazit'in antihipertansif etki yapmalarında ilaç kullanımı sonucu hemen gelişen hacim deplesyonu ve vazodilatasyon etki etmektedir. Hidroklorotiazit 'in yaptığı su ve tuz kaybı hipovolemi ve ekstrasellüler sıvı hacmi azalmasına neden olur. Ayrıca tiazit grubu ilaçlardan olan hidroklorotiazit içeren preparatlar diabetes insipidus ve hiperkalsüriye karşıda kullanılmaktadır. Hidroklorotiazitin diüretik etkisi sonucu plazma renin aktivitesi ve aldosteron sekresyonu artar ve serum potasyum düzeyi düşer. Hidroklorotiazit anjiotensin II blokerleriyle kombine olarak kullanıldığında hidroklorotiazitin neden olduğu yan etki olarak gelişen potasyum kaybı etkisi de azalır.

Hidroklorotiazit oral yoldan alındığında diüretik etkisi 2 saat içinde başlar, 4 saat içinde en yüksek düzeye ulaşır ve yaklaşık 6-12 saat sürer. Hidroklorotiazit, metabolize olmadan idrarla atılır. Yarılanma süresi ortalama 6-15 saattir. Plasentadan geçerse de, kan-beyin bariyerine geçemez. İki ilacın birlikte kullanımı, birbirlerinin biyoyararlanım oranını etkilemez. Dolayısıyla bileşiklerin farmakokinetik özelliklerinde, kombine kullanımdan dolayı bir değişiklik meydana getirmemektedir.

1.2.2.3.Kullanılışı

Hidroklorotiazit diüretik etkilidir. Anjiotensin II blokerleriyle kombine kullanılarak hipertansif etkiyi arttırmaktadır. Ayrıca Diabetes insipidus, ödem, hiperkalsiüri, premenstrüal sendromda kullanılmaktadır.

1.2.2.4.Yan Etkileri

Hidroklorotiazit'in başlıca yan etkileri, agranülositoz, anoreksi, aplastik anemi, azotemi, bulanık görme, konstipasyon (kabızlık) ,diyare, baş dönmesi, ekfoliyatif dermatit, hemoliz, hipokalemi, bulantı/kusma, poliüri, toksik epidermal nekroliz vb. genelde hafif ve geçicidir olan etkilerdir.

1.3. Bisoprolol Fumarat İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri

1.3.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Joshi ve ark. (2010), bisoprolol fumarat ve hidrokorotiazidin aynı anda insan plazmasında miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tanımlamıştır. Hareketli faz olarak, 0.1 M potasyum dihidrojen fosfat tamponu : asetonitril (70:30, h/h) akış hızı 1.0 mL/ dak. olarak tespit etmişlerdir. Kolon olarak Intersil ODS 3V (4.6 mm x 250 mm ,5 µ) ve dalga boyu olarak 228.0 nm kullanmıştır. Ayırım 10 dakika içerisinde tamamlanmıştır. Çalışma aralığı bisoprolol fumarat için 50.0-150.0 µg/mL ve hidroklorotiazit için 125.0-375.0 µg/mL olarak bulmuştur.

Peste ve ark. (2010), tarafından insan plazmasında bulunan bisoprolol fumarat'ın miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirmiştir. Yöntemde iç standart olarak metoprolol kullanmıştır. Analitik verileri ise kütle dedektörleri kullanarak incelemiştir.

Tutunji ve ark. (2009), bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazidin aynı anda insan kanında analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem önermiştir. Önerdikleri bu yöntemde iç standart olarak moksifloksasin kullanmışlardır. Hareketli faz olarak amonyum asetat solüsyonu (1mM):formik asit (%0.2):metanol : asetonitril (65:17.5:17.5, h/h/h (%)), akış hızı 0.65 mL/ dak. olarak belirlenmiştir. Sabit faz olarak Purosphere (R) STAR C-8 (125-4 mm,5µ) kullanmışlardır. Yöntem ile 5.0 mg bisoprolol fumarat ve 12.5 mg hidroklorotiazit içeren tabletlerde etken maddelerin aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Vora ve Kadav (2008), yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem ile bisoprolol fumarat ve amlodipin besilat aynı anda insan kanında analizi

yapılmıştır. Hareketli faz olarak 25 mM amonyum asetat (pH 5.0) ve metanol (65:35) , akış hızı 0.8 mL/ dak., dalga boyu 230 nm kullanmışlardır. Kolon olarak Lima C18-2 (3 µm, 50 x 4.6 mm i.d.) dan yararlanmışlardır. Alıkonma zamanları bisoprolol için 1.45 dak. ve amlodipin için 3.91 dak. olarak belirlenmiştir.

Shaikh ve ark. (2008), İnsan plazmasındaki bisoprolol fumarat ve hidrokorotiazit'in aynı anda tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tanımlamışlardır. Hareketli faz olarak, 0.1 M fosfat tamponu:asetonitril : tetrahidrofuran (85:10:5, h/h/h) akış hızı 1.0 mL/ dak. olarak belirlemişlerdir. Sabit faz olarak 25⁰C sıcaklıkta 4.6 mm x 250 mm ,5 µm siyano kolon, ve dalga boyu olarak 225.0 nm kullanılmıştır. Ayırım 10 dakika içerisinde tamamlanmıştır. Çalışma aralığı bisoprolol fumarat için 50.0-150.0 µg/mL ve hidroklorotiazit için 125.0-375.0 µg/mL olarak bulunmuştur.

Bhatt ve ark. (2007), tarafından insan plazmasındaki bisoprolol miktarının tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. İç standart olarak metoprolol kullanılarak sıvı faz ekstraksiyon tekniği ile insan plazmasından etken madde ekstre edilmiştir. Betabasic C₈ kolonu, kütle spektroskopisi ile takip edilen analitin kromatografik ayırımını sağlamıştır. Kütle değişim iyon çifti, bisoprolol için m/z 326.2-->116.1 ve metoprolol için m/z 268.2-->191.0 olarak izlenmiştir. Bu yöntem; basit, çoklu, hızlı bir sıvı faz ekstraksiyonu, basit izokratik kromatografik koşulu ve alt nanogram seviyelerinde ayırma imkan sağlayan kütle spektrometrik ayırımı içermektedir. Önerilen bu yöntem korelasyon faktörü > ya da =0.9991 ile 0.5-70.0 ng/mL doğrusal aralığı için valide edilmiştir. Bisoprolol ve metoprolol için hesaplanan % geri kazanım sırasıyla %93.89 ve % 77.65 'tir. Toplam MS geçiş süresi sadece 0.90 dakikadır. Geliştirilen yöntem, 18 sağlıklı erkek gönüllüde 10 mg bisoprolol içeren bir tabletin oral yolla verilmesini takip ederek bisoprolol'ün farmakokinetik parametrelerinin belirlenmesi için uygulanmıştır.

Ding ve ark. (2007), insan plazmasında bisoprolol tayini için duyarlı bir sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyonu-kütle spektrofotometri metodu tanımlamışlardır. Yöntemde iç standart olarak metoprolol kullanılmış ve yöntemi valide edilmiştir. NaOH ile alkalizasyondan sonra örnekler etilasetat ile ekstre edilmiş ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemde sabit faz olarak ZORBAX SB-C₁₈ kolonu ve hareketli faz olarak %0.1 formik asit : metanol (32:68, h/h) içeren 10 mM amonyum asetat tamponu kullanılmış akış hızı ise 1 mL/dk olarak verilmiştir. Kromatografik ayırma 5 dak. dan kısa sürede yapılmıştır. 0.05-120.0 ng/mL konsantrasyon aralığının üzerinde doğrusallık kurulmuştur. Güniçi ve günlerarası parametrelerin standart sapması sırasıyla %3.8 ve %7.5'den azdır. Bu metot, sağlıklı çinli gönüllülerde bisoprolol fumarat tabletlerinin biyoyararlılık çalışmasında başarıyla uygulanmıştır. Referans ve test tabletlerinin farmakokinetik parametreleri karşılaştırmıştır.

Liu ve ark. (2007), tarafından insan plazmasında bisoprolol'un belirlenmesi için, sıvı kromatografisi ve bununla birlikte kütle spektrometri temeline dayanan bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Yöntemde iç standart difenhid-ramin kullanılmıştır. Hareketli faz olarak metanol :10 mm amonyum asetat: formik asit (70:30:0.1 h/h/h) kullanılarak ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ayrılma sağlanmışlardır. Yakalama, bir LC-MS/MS sistemi üzerinden çoklu reaksiyon izleme tarafından yürütülmüş ve 2.5 dakikada tamamlanmıştır. Çalışma, 0.5 ng/mL kantitatif limit ile 0.5-100.0 ng/mL aralığında lineerdir. Güniçi ve günlerarası doğrusallık seviyeleri sırasıyla %5.54 ve %9.95 içerisindeyken kesinlik %89.4 ve %113.0 aralığı içindedir. Bu yöntem, 5 mg bisoprolol içeren tek oral doz ile sağlıklı gönüllülerin tedavisi için yapılan farmakokinetik bir çalışmada kullanılmıştır.

Hefnawy ve ark. (2007), duyarlı bir enantiyoselektif , yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi, insan plazmasında S-(-) ve R -(+)- bisoprolol fumarat belirlenmesi için geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Baseline resolüsyonu, kriyobiotik

T olarak bilinen teikoplanin makrosiklik antibiyotik kiral stasyonier fazı (CPS) ile metanol: glasiyal asetik asit: trietilamin (100.0:0.02 :0.025 h/h/h) içeren polar bir iyonik hareketli faz kullanılarak 1.5 mL/dk akış hızında ve floresans dedektör absorpsiyon dalga boyu için 275.0 nm ve emisyon dalga boyu için 305.0 nm'ye ayarlanarak başarılmıştır. S-(-)- atenolol ile yapılan tüm analizler iç standart gibi ortam sıcaklığında yürütülmüştür. Bu çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografik analizden önce insan plazma örnekleri için sıvı faz ekstraksiyon prosedürünün kullanımını içermektedir. C₁₈ kolonu (kartuşu) herhangi bir engel olmaksızın her iki enantiyomer için iyi düzeltilmiş oranlar vermiştir. Bu yöntem, her bir enantiyomer konsantrasyonu için 20.0-200.0 ng/mL aralığının üzerinde valide edilmiştir. S-(-)- ve R-(+)- bisoprolol enantiyomerleri için düzeltilmiş oranlar %95.0-102.0 aralığındadır. Bu yöntemde bağıl standart sapma değerleri %1.0 -%6.2 aralığındadır . İnsan plazmasındaki herbir enansiomer için yakalama sınırı ve alt tayin sınırı sırasıyla 20.0 ve 5.0 ng/mL 'dır.

Caudron ve ark. (2004), tarafından insan plazmasında kardiyovasküler ilaçların (seliprolol, bisoprolol ve irbesartan) miktar tayini için basit, hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem önerilmiştir. Önerilen yöntemin ayırt edici iki ana özelliğinden ilki, zayıf bir şekilde temel β blokerler türevlerinin ve zayıf asidik özellikteki irbesartanın eş zamanlı sıvı faz ekstraksiyonudur; ikinci olarak da gelişmiş bir seçicilik sağlamak için diyot düzen deteksiyonunu kullanarak bir absorbans gözlemlenmiştir. Ayırım, C₁₈ Kromasil 4.6 mm x 150 mm kolonu üzerinden doğrusal bir gradiyent kullanarak uygulanmıştır, bu etken maddelerin tam bir ayırımı 20 dakikadan daha kısa bir sürede başarılmıştır. Tam analitik validasyon, endüstri için biyoanalitik yöntem validasyonu için uygulanmıştır. Cevabın doğrusallığı her bir ilaç için belirtilen plazma seviyelerinin aralığının tamamlanması için gösterilmiştir, örneğin seliprolol, bisoprolol ve irbesartan için sırasıyla 10.0-500.0, 5.0-250.0 ve 20.0-1000.0 ng/L olarak bulunmuştur. Güniçi ve günlerarası bağıl standart sapmaları bütün bileşikler için %11.0 'den azdır ve

bu yöntem uygun bir doğruluk meydana getirmiştir. (Bağıl hata yüzdesi her bir ilaç için %6.0'dan azdır.)

Eastwood ve ark. (1990), tarafından insan serumunda bisoprolol'ün miktar tayini için basit yüksek performanslı sıvı kromatografi tanımlanmıştır. Örnek (200 µL), 2 M Tris çözeltisi (50 µL), iç standart (benzimidazol, 2.0 mg/L, 50 µL) ve metil t-butil eter (200 µL) ile 30 sn vortekste karıştırılmıştır. Santrifüjden sonra (9950 x g, 2 dak.) bir miktar sonuç çözeltisi, bir mikropartikül (5µ) silika kolonda hareketli faz olarak metanol içinde 1mM kamforsülfonik asit kullanılarak analiz edilmiştir. Deteksiyon, 215 nM eksitasyon dalga boyunda floresans ile yapılır. Çalışma için doğru ölçümün en düşük limiti, 5.0 µg/mL'in deteksiyonun en düşük limiti ile 10.0 µg/mL (CV %=8.9, n=9) olarak verilmiştir.

Bühning ve Garbe (1986), İdrar ve insan plazmasında bisoprolol, atenolol, metoprolol ve propranolol'ün belirlenmesi için Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tanımlamışlardır. Yöntemde fluorimetrik dedektör kullanılmıştır. Bisoprolol, metoprolol ve propranolol, n-butanol-diklorometan ile diklorometan, atenolol (25:75) ile alkali pH 'da ekstre edilmiştir. Organik çözücülerin buharlaşmasından sonra bileşikler, elüent olarak %3-7 asetonitril içeren (pH 4) sulu fosfat tamponu kullanılarak silica gel Si-60 kolonlarında (normal faz) ayırım sağlanmıştır. Yakalama sınırları, bisoprolol ve metoprolol için plazmada 2.0 ng/mL ve idrarda 10.0 ng/mL'dir. Atenolol için yakalama sınırları plazmada 5.0 ng/mL ve idrarda 50.0 ng/mL bulunmuştur.

Li ve ark.(2007), tarafından basit, kesin ve seçici yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi, 10 adet antiaritmik ilacın (diltizem, amiodaron, meksiletin, propranolol, sotalol, verapamil, bisoprolol, metoprolol, atenolol, karvedilol) ve bir metabolitin (norverapamil) insan plazmasında eşzamanlı ölçümü için geliştirilmiştir. Plazma örnekleri ,deproteinizasyon için asetonitrille muamele edilmiştir. Kromatografik ayırım, bir Capcell C₁₈ kolonu (50 mmx2.0

mm, 5 μ m) ile hareketli faz olarak asetonitril ve suyun gradient karışımı (her ikisi de % 0.02 formik asit içerecek) kullanılarak 0.3 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Analit, pozitif elektrosprey iyonizasyon interfazında protonlanmış ve çoklu reaksiyon izleme modunda ortaya çıkarılmıştır. Kalibrasyon eğrileri, bütün analitler için plazmada terapötik konsantrasyon alttan üste doğru geniş bir aralık üzerinde doğrusaldır. Valide edilmiş bu yöntem, rutin klinik uygulamalarda antiaritmik ilaçların izlenmesinde başarıyla kullanılmıştır.

Zhang ve ark. (2003), Metoprolol ve bisoprolol'ün enantiyomerlerinin direkt likit kromatografik ayırımlarını, kiral durgun faz olarak (R)-1-naftilglisin ve 3,5-dinitrobenzonik asit kullanılarak geliştirilmiştir. Ayırımlar, n-hekzan, 1,2-dikloroetan ve metanol içeren bir hareketli faz kullanılarak normal bir faz sisteminde başarılmıştır. Kolon etkenliği, hareketli fazın kompozisyonuna güçlü olarak bağlıdır. Metanol ve 1,2-dikloroetanın elüsyon içeriği, akış hızı ve kolon sıcaklığıyla birlikte optimize edilmiştir. Optimal koşulların altında, (R)-metoprolol ve (S)-metoprolol için yakalama sınırları sırasıyla 0.008 ve 0.002 mg/mL'nin çalışma aralığı ise 0.079 -1.38 ve 0.015-5.80 mg/mL aralığında sağlanmıştır. Bisoprolol için, (R) izomer ve (S)- izomerin yakalama sınırları sırasıyla 0.001 ve 0.008 mg/mL'nin (R) izomer ve (S)- izomerin çalışma aralığı 0.079-1.38 ve 0.015-5.80 mg/mL olarak saptanmıştır. Herbir enantiyomerin bağlı standart sapmasının %90.0 'nı aşmadığı belirlenmiştir. Bu yöntem, farmasötik preparatlardan enantiyomerlerin belirlenmesinde başarıyla uygulanmıştır.

Braza ve ark. (2002), tarafından bu çalışmada, insan plazmasında bisoprolol ve metoprololün belirlenmesi için iki yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tanımlanmıştır. Analitik yöntemler, benzer bir Nucleosil C₁₈ ters-faz kolon ile çiftleşmiş metoprolol için diklorometan ile ve bisoprolol için dietileter ile insan plazmasının iki farklı sıvı-sıvı ekstraksiyonunu içermektedir. Fluorimetrik deteksiyon, her iki beta blokerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Alıkonma zamanları, bisoprolol ve metoprolol için sırasıyla 8.7 ve 3.2 dakikadır.

Kalibrasyon eğrileri için çalışma konsantrasyon aralığı 6.25-200.00 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Gün içi ve günler arası varyasyon katsayısı her iki ilaç için bütün aralığın üzerinde (%15 içinde) kabul edilmiştir. Ortalama düzelme, metoprolol için %89.0 ve bisoprolol için %98.0' dir. Yöntemler valide edildiğinde, analitik hata fonksiyonları standart sapma olarak bisoprolol ve metoprolol için sırasıyla (SD; ng/mL) = $2.216 + 3.608 \times 10^{-4}C$ (C = teorik konsantrasyon değeri) ve SD-(ng/mL) = $0.408 + 0.378 \times 10^{-1}C$ bulunmuştur. Eğer bu ilaçların ilaç miktarlarının bireyleştirilmesine ihtiyaç varsa, yöntem gelişimi ve onların birleşmiş analitik hata fonksiyonları, farmakokinetik çalışmalar ve plazma konsantrasyonlarının belirlenmesi için uygun olduğu bildirilmiştir.

1.3.2. Voltametri

Goyal ve ark. (2008) farmasötik preparatlar ve insan idrarında bulunan bisoprolol fumarat'ın miktar tayini için modifiye camı karbon elektrot kullanarak voltametrik yöntem önermişlerdir. Optimum pH değerini 7.2 olarak belirlemiştir. Korelasyon katsayısını ise 0.9789 ve yakalama limitini 8.27×10^{-7} M olarak vermişlerdir. Yöntemin tüm validasyon parametrelerini ayrı ayrı incelemişlerdir.

Ramadan ve Zaazaa (2007) β blokerlerden, atenolol , bisoprolol fumarat , timolol maleat, ve levobutanolol hidroklorür duyarlı beş tane polivinil klorür (PVC) matriks membran elektrodu geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. PVC matriksinde , atenolol , bisoprolol fumarat , timolol maleat ve levobutanolol hidroklorür katyonları ile bir elektroaktif materyal olarak amonyum raynekat ile bir çökelme temelli teknik, sırasıyla elektrodlerden 1, 2, 3, 4'ün yapımı için kullanılmıştır. Elektrot 5'in yapımı, levobutanolol hidroklorür katyonun elektroaktif materyal olarak tuzstofosfat anyonu ile çökmesi temeline dayanmıştır. Hızlı ve stabil Nernstian cevabı $1 \times 10^{-2} \times 10^{-7}$ M'da farklı β blokerler için IUPAC 'ın tavsiyelerine göre değerlendirilen bu elektrodlerin pH aralığı 2-8

üzerinde bulunmuştur. Bu yöntem farmasötik formülasyonlarda β blokerlerin belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır. Kalite güvenliği standartlarına göre yöntemin doğruluğu, bu ilaçların kalite kontrol değerlendirilmesinde kullanıldığı için önerilen elektrodların yeterliğini göstermiştir. Bu yöntemde verilen ilaçların referans yöntemler ile sağlanan sonuçlar arasında istatistiksel bir karşılaştırma yapılmış ve önemli bir fark bulunmamıştır.

1.4. Hidroklorotiazit İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri

Yapılan kaynak araştırmalarımızda gerek tek başına ve gerekse ikili karışım halinde bulunan hidroklorotiazit'in miktar tayini için oldukça fazla kaynak bulunmaktadır. Yüksek lisans tez kapsamında 2000 yılından sonra günümüze kadar olan kaynaklardan bazıları seçilerek incelenmiştir.

1.4.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Gowda ve ark. (2009), tarafından diüretik etkili hidroklorotiazit ve antihipertansif etkili nebivolol 'ü birlikte içeren preparatlarda etken maddelerin miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik ve spektrofotometrik yöntem tanımlamışlardır. Tanımladıkları bu yöntemde Phenomenex-Luna RP-18(2) 250 x 4.6 mm, 5 µm kolonu, asetronitril : % 0.03 formik asit (65:35 h/h) fazları ve UV dedektör kullanmışlardır. Analiz süresini yaklaşık 4 dak. olarak vermekte olup etken maddelerin alıkonma sürelerini ise nebivolol için 2.13 ve hidroklorotiazit için ise 2.87 dakika olarak hesaplamışlardır. Yöntemde hareketli fazın akış hızını 1.0 mL/dk. olarak belirlemişlerdir. Tanımladıkları diğer yöntem olan spektrofotometride ise absorban değerlerini ve konsantrasyon verilerini kemometrik olarak değerlendirmişlerdir. Tanımladıkları tüm yöntem verilerini birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırmışlardır.

Vujic ve ark. (2009), tarafından insan idrarında bulunan hidroklorotiazit + silazapril ve silazapril'in aktif metaboliti olan silazaprilat'in aynı anda miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem önerilmiştir. Önerilen bu yöntem parametreleri metanol : 10 mM fosfat tamponu (pH 2.3) (20:60 h/h) ve Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolon, enalapril maleat iç standart ve akış hızı ise 1.0 mL/dk olarak verilmiştir. Yakalama sınırları ise hidroklorotiazit için 2.4 µg/mL, silazapril için 1.6 µg /mL ve silazaprilat için 1.8 µg /mL olarak hesaplanan bu

yöntemde analitik doğrusal çalışma aralığı hidroklorotiazit için 2.4-30.0 µg/mL, silazapril için 1.6-15.0 µg/mL ve silazaprilat için 1.8-20.0 µg/mL olarak tanımlanmıştır.

Obando ve ark. (2008), tabletlerde aynı anda losartan potasyum ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tanımlanmıştır. Yöntemde monolitik C₁₈ kolonu (25 mm x 4.6 mm i.d.) sabit faz olarak kullanılmıştır. Hareketli faz ise 0.8 mL/ dak. akış hızında 10 mmol/L potasyumdihidrojen fosfat (pH 3.1):asetonitril:metanol (65:33:2 h/h/h) dir. UV dedektörün 226.0 nm 'deki ölçümlerinden yararlanmışlardır. Analiz süresi yaklaşık 400 saniyedir. Bu yöntem,tabletlerde her iki bileşenin rutin analizleri için uygulanabilir bulunmuştur.

Kumar ve ark.(2008), atenolol, lisinopril ve hidroklorotiazit içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri, ters faz C₈ kolonu ve asetonitril:fosfat tamponu(pH 2.3) içeren hareketli faz kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem parametrelerini akış hızı, 1mL/dk ;deteksiyon dalga boyu, 210.0 nm; kolon sıcaklığı 60 °C ve enjeksiyon hacmi 5.0 µl olarak vermişlerdir.

Li ve ark. (2007), tarafından insan plazmasında bulunan valsartan ve hidroklorotiazit miktarının belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi geliştirilmiştir. Ayırım için Zorbax SB-Aq C₁₈ kolonu hareketli faz olarak ise asetonitril :10mM amonyum asetat (60:40, h/h, pH 4.5) kullanılarak 1.2 mL/dak. akış hızı kullanmışlardır. Alıkonma süreleri valsartan için 2.08 dak. ve hidroklorotiazit için ise 1.05 dak. olarak tespit edilmiştir. Yöntemde çalışma aralıkları valsartan için 4.0-3600.0 ng/mL ve hidroklorotiazit için ise 1.0- 900.0 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem, 20 sağlıklı gönüllünün her biri için 12.5 mg hidroklorotiazit ve 80.0 mg valsartan içeren dağılmış tabletlerin oral yoldan alımından sonra farmakokinetik bir çalışmaya da başarıyla uygulanmıştır.

Valizadeh ve ark.(2006), Furosemit ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için hızlı ve basit yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik yöntemde UV dedektör kullanmışlar ve hareketli fazı ise asetonitril: su: trietilamin: glasiyal asetik asit (41.5 : 57.4 : 0.1 : 0.9 ,h/h/h/h) olarak belirlemişlerdir. Çalışma aralığı her üç etken madde için de 7.93-125.0 µg/mL' dir.Yöntemde yakalama sınırlarını ise furosemit için 7.2 µg/mL ve hidroklorotiazit için ise 8.9 µg/mL olarak hesaplamışlardır.

Salvadori ve ark. (2009), tarafından insan plazması içinde losartan ve hidroklorotiazit'in aynı anda tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi geliştirilmiştir. İç standart madde olarak losartan için valsartan,hidroklorotiazit için ise klortalidon kullanılmıştır.Yöntemde losartan'ın çalışma aralığı 4.0-800.0 ng/mL, hidroklorotiazit'in ise 4.0-500.0 ng/mL olarak kabul edilmiştir.Hem losartan için hem de hidroklorotiazit için alt tayin limiti 4.0 ng/mL olarak kabul edilmiştir.Validasyon için yapılan günüçi ve günlerarası değerlendirmelerde bulunan sonuçlar Losartan için %91.5 ile %107.6 ve hidroklorotiazit için ise %91.5 ile 105.0 aralığında bulmuşlardır.

Rao ve ark. (2009), tarafından farmasötik dozaj formlarında yer alan losartan potasyum, atenolol ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Su : asetonitril : trietilamin: ortofosforik asit (60:40:0.1:0.1 h/h/h/h) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Yöntemin uygulamasında 0.7 mL/dak. akış hızında çalışılmıştır. 225.0 nm absorbans değerinden yararlanmışlardır. Analitik yöntemin tüm validasyon parametrelerini incelemişlerdir. Toplam analiz süresi 3.0 dakika olarak bulunmuştur.

Elshanawane ve ark. (2009), tarafından bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi kullanılarak insan idrarında bulunan amilorit hidroklorür ve hidroklorotiazit 'in aynı anda miktar tayini için geliştirilmiştir. İç standart olarak

klortalidon kullanılmıştır. Kolon olarak oda sıcaklığında kullanılan bir siyanopropil kolonu, 1.0 mL/dak. akış hızında ve 214.0 nm 'deki absorbans değerlerinden yararlanmışlardır. Toplam analiz süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir. Hareketli faz olarak 10mM KH_2PO_4 çözeltisi (pH 4.5) : metanol (75:25 h/h) kullanılmıştır. Amilorit hidroklorür, hidroklorotiazit ve klortalidon için çalışma aralıkları sırasıyla, 2.0-10.0 $\mu\text{g/mL}$, 20.0-200.00 $\mu\text{g/mL}$ ve 10.0-100.0 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Amilorit hidroklorür ve hidroklorotiazit için yakalama sınırı değerleri ise sırasıyla 0.100 ng/mL ve 1.00 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin kullanılması sonucunda doğruluk, tekrarlanabilirlik ve seçicilik açısından çok iyi sonuçlara ulaşılmıştır. Yöntemde idrar numunelerindeki etken madde dışındaki maddelerin hiçbir etkisinin olmadığından bahsetmişlerdir.

Yan ve ark. (2008), hızlı ve duyarlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi insan plazmasında yer alan telmisartan ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayini için kullanılmıştır. Sabit faz olarak bir Venusil XBP- C_8 kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril, 10 mM amonyum asetat ve formik asitle gradiyent elüsyon kullanılırken 1.2 mL/dak akış hızında ve kütle dedektörleri kullanılarak ayırım sağlanmıştır. Gönüllülere verilen farmasötik preparatların içerisinde 80.0 mg telmisartan ve 12.5 mg hidroklorotiazit bulunduğu bahsetmişlerdir.

Tian ve ark. (2008), farmasötik preparatlarda yer alan valsartan ve hidroklorotiazit'in yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem kullanılarak aynı anda miktar tayini gerçekleştirmişlerdir. Hareketli faz olarak izokratik modda metanol :asetonitril : su : izopropil alkol (22: 18: 68: 2 ; h/h/h/h) kullanılırken 1.0 mL/dak akış hızında ve 270.0 nm 'de UV ayırım sağlanmıştır. Valsartan ve hidroklorotiazit için çalışma aralıkları sırasıyla, 5.0-150.0 $\mu\text{g/mL}$ ve 78.0-234.0 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Alıkonma sürelerini valsartan için 3.42 ve hidroklorotiazit için ise 8.43 dak olarak vermişlerdir. Kullandıkları bu yöntemin etken maddeleri içeren farmasötik preparatlardaki etken maddelerin aynı anda tayinleri için kullanılabilineceğinden bahsetmişlerdir.

Grag ve ark. (2008), basit ve ekonomik UV spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem bir tablette birlikte bulunan metoprolol tartarat ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayinleri için geliştirilmiştir. Spektrofotometrik yöntem de metoprolol tartarat ve hidroklorotiazit'in metanolle hazırlanan çözeltilerinin sırasıyla 223.0 nm ve 271.0 nm dalga boylarında absorpsiyonları ölçmüştür. Çalışma aralığı spektrofotometrik yöntemde metoprolol tartarat ve hidroklorotiazit için sırasıyla 4.0-24.0 µg/ mL ve 2.0-16.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemin de ise sabit faz olarak C₁₈ kolonu ve hareketli faz olarak metanol : su (95 : 5; h/h) karışımı kullanmıştır. Kolon sıcaklığı 27±2 °C olacak şekilde ayarlanmış ve 225.0 nm 'de UV deteksiyon sağlanmıştır. Analiz süresi 10.0 dakika olarak bulunmuştur. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde iç standart olarak parasetamol kullanılmıştır. Çalışma aralığı yüksek performanslı sıvı kromatografik yönteminde metoprolol tartarat ve hidroklorotiazit için sırasıyla 5.0-50.0 µg/ mL ve 2.0-20.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiş ve iki yöntem arasında önemli bir fark görülmemiştir.

Shah ve ark.(2008), birinci türev spektrofotometri ve yüksek performanslı kromatografik bir yöntemi, aynı anda miktar tayini için nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiazit'in bir arada bulunduğu preparatlarda geliştirilmiştir. Çalışmada çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Birinci türev spektrofotometri de nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiazitin bir arada bulunduğu tabletlerin metanolde olan çözeltilerinden hareketle 294.6 ve 334.6 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Çalışma aralığı spektrofotometrik yöntemde nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiazit için sırasıyla 8.0-40.0 µg/ mL ve 10.0-60.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yönteminde sabit faz olarak Phenomenex Gemini C₁₈ kolonu (250 x4.6 mm, 5µ) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 0.05 M KH₂PO₄ : asetronitril : metanol (30:20:50 h/h/h; pH 4)

karışımı kullanılmış, 1.0 mL/dak. akış hızında çalışılmış ve 220.0 nm'de UV ayırım sağlanmıştır. Çalışma aralığı yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiazit için sırasıyla 1.0-14.0 µg/mL ve 0.3-28.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiazitin bir arada bulunduğu preparatlarda her iki yöntem başarılı bir şekilde ayırım sağlanmıştır. Geliştirdikleri her iki yöntem verilerinin de birbirleriyle istatistiksel açıdan karşılaştırmışlardır.

Dhandapani ve ark. (2008), Nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiazitin kombine olarak bulunduğu preparatlarda basit bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi etken maddelerin aynı anda miktar tayini için geliştirilmiştir. Hareketli faz olarak, %0.4 (h/h) trietilamin tamponu (pH 3.0) : asetonitril (70:30 h/h) karışımı kullanılmıştır. Sabit faz olarak Phenomenex C₁₈ kolonu ile 1.4 mL/dak akış hızında, 282.0 nm 'de ayırım sağlanmıştır. Çalışma aralığı nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiazit için sırasıyla 5.0-25.0 µg/mL ve 12.5-62.5 µg/mL olarak belirlenmiştir. Atorvastatin iç standart olarak kullanılmıştır. Analiz sonuçları istatistiksel olarak doğrulanmıştır.

Sultan (2008), İki basit ve seçici analiz yöntemi karvedilol ve hidroklorotiazit 'in kombine olarak yer aldığı preparatlarda kullanılmıştır. Yöntemlerden biri UV spektrofotometridir. Bu yöntemle karvediol ve hidroklorotiazit için sırasıyla 248.0 nm ve 285.0 nm dalga boylarında absorban değerleri ölçülmüştür. Çalışma aralığı karvediol ve hidroklorotiazit için sırasıyla 0.05-1.5 µg/mL ve 0.5-15.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Karvediol ve hidroklorotiazit için yakalama sınırı değerleri ise sırasıyla 0.005 ng/mL ve 0.1 ng/mL olarak bulunmuştur. Bu yöntemlerde diğeri olan yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde sabit faz olarak Nucleosil C₁₈ kolonu (25 cm x4.6 mm), hareketli faz olarak ise asetonitril : 10 mM KH₂PO₄ (pH 3.0) (30:70 h/h) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 mL/dak' dır. İç standart olarak losartan kullanılmıştır. 230.0 nm' de UV ayırım sağlanmıştır. Çalışma aralığı karvediol ve hidroklorotiazit için sırasıyla 0.05 –

1.00 µg/mL ve 0.1 – 1.0 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu yöntemlerin farmokokinetik çalışmalar için elverişli bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır.

Liu ve ark. (2008), hızlı ve seçici yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi insan plazmasında bulunan valsartan ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayini için geliştirilmiştir. İç standart olarak irbesartan kullanılmıştır. Bu yöntemde sabit faz olarak Phenomenex Kromasil C₈ kolonu kullanılırken hareketli faz olarak su : metanol (27:73 h/h) karışımı kullanılmıştır. Analitik değerlendirmede kütle dedektöründen yararlanılmıştır. Çalışma aralıkları valsartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 11.72 – 3000.00 ng/mL ve 3.13 – 800.00 ng/mL olarak bulunmuştur. Bu yöntem farmasötik preparatlarda her iki maddenin miktar tayininde başarıyla kullanılmıştır.

Tagliari ve ark. (2008), basit ve hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi farmasötik dozaj formlarında hidroklorotiazit içeren preparatlarda miktar tayini için kullanılmıştır. Sabit faz olarak C₁₈ kolonu, hareketli faz olarak 0.1 M sodyum fostat tamponu (pH 3.0):asetonitril (70:30 h/h) karışımı akış hızı olarak 1.3 mL/dak kullanılmıştır. İncelenen validasyon parametrelerine göre bu yöntemin yeni ilaç formülasyonlarında kalite kontrol laboratuvarları için başarı ile kullanılabileceğini belirmişlerdir.

Parekh ve ark. (2008), Hızlı ve duyarlı bir sıvı kromatografik yöntemi, insan plazmasında hidroklorotiazit, quinapril ve quinapril metabolitlerinin aynı anda miktar tayini için geliştirilmiştir. Bir Hypurity C₁₈ (100 mm x 2.1 mm i.d., 5µm partikül büyüklüğü) kolonunda, 2 µL enjeksiyon hacminde ,2.8 dak. yürütme süresi ile kromatograflanmıştır. %0.5 (h/h) formik asit:asetonitril (25:75, h/h) içeren izokratik bir hareketli faz bütün bu ilaçların ayırımı için kullanılmıştır. Analitik çalışma aralığı hidroklorotiazit ve quinapril ile quinaprilat için sırasıyla 5.0-500.0 ng/mL ve 5.0-1500.0 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntem de ayrıca kütle dedektörü de kullanılmıştır.

Qutab ve ark. (2007), farmasötik preparatlarda kombine halde bulunan hidroklorotiazit ve kandesartan'ın aynı anda miktar tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Hareketli faz olarak 0.02 M potasyum dihidrojen fostat : metanol : trietilamin (25:75:0.2 h/h/h) karışımı ve fenil-2 kolonu kullanılarak 271.0 nm de UV dedektör ile ayırım sağlanmıştır. Çalışma aralıkları hidroklorotiazit ve kandesartan sileksetil için sırasıyla 5.0 – 45.0 µg/mL ve 12.0 – 56.0 µg/mL olarak verilmiştir. Yöntemde analiz süresi en fazla 5.0 dak. olarak verilmiştir. Hidroklorotiazit ve kandesartan sileksetil için korrelasyon katsayıları sırasıyla 0.9993 ve 0.9991 olarak bulunmuştur. Bu yöntem her iki bileşeni içinde bulunduran tabletlerin rutin analizlerinde kolaylıkla kullanılmıştır.

Song ve ark. (2007), insan plazmasında amilorit ve hidroklorotiazit'in birlikte bulunduğu ortamlarda hızlı ve ekonomik bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi aynı anda miktar tayinleri için kullanmıştır. Yöntemde iç standart olarak Rizatriptan, sabit faz olarak Phenomenex Curosil-PFP (250 x 4.6 mm, 5µ) kolonu, hareketli faz olarak % 0.23 amonyum asetat: % 0.15 formik asit karışımı kullanmıştır. Yapılan analiz sonuçları 1.0 mL/dak akış hızı ve kütle dedektörleri kullanılarak incelenmiştir. İncelenen validasyon parametrelerine göre yöntemin farmasötik preparatlarda kolaylıkla uygulanacağı gözlenmiştir.

Bhat ve ark. (2007), aynı anda telmisartan ve hidroklorotiazit içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin kantitatif tayinleri için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi uygulamıştır. İç standart olarak rabepirazole kullanılmıştır. Ayrımlar metanol : asetonitril (70:30h/h) karışımı ile 1.0 mL/dak akış hızı ile sağlamıştır. Telmisartan, hidroklorotiazit ve rabepirazole için alıkonma zamanları sırasıyla 1.79 dak, 2.80 dak ve 3.19 dak olarak bulunmuştur. Bu yöntemden elde edilen sonuçlar incelendiğinde kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilecek bir yöntem olabileceği söylemiştir.

Ivonovic ve ark. (2007), tarafından basit, seçici ve duyarlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi hidroklorotiazit ve lisinopril içeren preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için geliştirmiştir. Yöntemde asetonitril : 25 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH:5) (7:93 h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılırken akış hızı 1.0 mL/dak olarak verilmiştir. Sabit faz olarak 4.6 mm x 20 mm, 3.5 μ , C₁₈ kolonu kullanmıştır. İç standart olarak metil paraben belirtmiştir. Farmakokinetik çalışmalara analiz verilerin ışık tutacağı belirtmiştir.

Liu ve ark. (2007), insan plazmasında birlikte bulunan hidroklorotiazit miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tanımlanmıştır. Su : metanol (27:73, h/h) karışımı hareketli faz olarak Phenomenex kromasil C₈ kolonu ayırım için kullanılmıştır. Yöntemde iç standart olarak Irbesartan kullanılmıştır. 0.78-200.0 ng/mL çalışma aralığı olarak saptanmıştır. 20 adet gönüllüde hidroklorotiazit içeren tablet formu başarıyla uygulanmıştır.

Sağırlı ve ark. (2007), tarafından olmesartan medoksomil ve hidroklorotiazit'in kombine halde bulunduğu tabletlerde duyarlı ve basit bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için geliştirilmiştir. 260.0 nm dalga boyunda UV ayırım sağlanmıştır. Sabit faz olarak siyano kolonu (4.6 mm LD x 200 ml, 5 pm) hareketli faz olarak ise metanol : 10 mM fosforik asit (%0.1 trietilaminle pH 2.5' e ayarlanır), (50:50 h/h) karışımı kullanmıştır. Yöntemde olmesartan medoksomil ve hidroklorotiazit için korelasyon katsayıları sırasıyla 0.9998 ve 0.9999 olarak bulmuştur. Olmesartan medoksomil ve hidroklorotiazit için çalışma aralığı sırasıyla 0.2 – 6.0 μ g / mL ve 0.1 – 4.0 μ g/mL olarak kullanmıştır. Yardımcı maddelerin etkisi olmadan bu yöntemle farmasötik preparatlarda etken maddelerin miktar tayinleri başarıyla yapmıştır.

Kolocouri ve ark. (2007), tarafından yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi plazmada yer alan losartan ve majör metaboliti ile hidroklorotiazit'in aynı

anda miktar tayini için geliştirilmiştir. Bir C₈ kolonu sabit faz olarak kullanılırken iç standart olarak furosemit'ten yararlanmıştır. Losartan ve major metaboliti için çalışma aralığı 1.00 – 400.0 ng / mL ve hidroklorotiazit için 0.5 – 200.00 ng / mL olarak hesaplanmıştır. Ayırım sırasında kütle dedektöründen faydalanılmıştır.

Wei ve ark. (2006), klorojenik asit ve hidroklorotiazit'in birlikte bulunduğu Zhenju Jiangya tabletlerinin içerisinde etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri bir yüksek performansla sıvı kromatografik yöntem kullanılarak yapılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril : %0.4 fosforik asit (13:87, h/h) karışımı kullanılmıştır. Klorojenik asit ve hidroklorotiazit için çalışma aralıkları sırasıyla 0.64 – 6.40 ng / mL ve 0.08 – 0.16 ng/mL olarak bahsetmiştir. Klorojenik asit ve hidroklorotiazit için % geri kazanım değerleri sırasıyla %96.5-99.3 ve % 97.7-101.0 olarak bulunmuştur. Validasyon parametrelerinin hepsi başarıyla incelenmiştir.

Li ve ark. (2006), hidroklorotiazit içeren insan plazmasında yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi kullanılarak hidroklorotiazit'in miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Etil asetat ile numunelere ön işlem yapmıştır. Ekstraktlar, su : asetonitril (68:32,h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılırken bir C₁₈ kolonu ile ayırım sağlamıştır. Çalışma aralığı ve alt tayin sınırı sırasıyla 2.5 – 200.0 ng/mL ve 1.0 ng/mL olarak bulmuştur.

Baing ve ark. (2006), Basit ve hızlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi, preparatlarda kombine halde bulunan losartan potasyum, ramipril ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayinleri için bulunmuştur. Kromatografik ayırımda 0.025 M sodyum perklorat :asetonitril (62:38 h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılırken, hareketli faz akış hızı ise 1.0 mL/dak. olarak kullanmıştır. Sabit faz Cosmosil C₁₈ (150 mm x4.6 mm i.d.,5µ) kolonu kullanmıştır. Losartan potasyum, ramipril ve hidroklorotiazit için çalışma aralıkları sırasıyla 35.0-65.0 µg/mL , 1.75-3.25 µg/mL ve 8.75-16.25 µg/mL olarak bulmuştur. Ayırım UV

dedektörle sağlanmıştır. Elde edilen veriler, referans yöntemle istatistiksel açıdan kıyaslanmıştır.

Vonaparti ve ark. (2006), yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi plazmada yer alan benazepril, benazeprilat ve hidroklorotiazit'in eş zamanlı miktar tayini çalışmalarında kullanılmıştır. Ön işlem olarak sıvı katı ekstraksiyonu Oasis HLB kartuşları ile numunelerin ekstre edilmesiyle yapılmıştır. Elde edilen ekstratlar hareketli faz olarak su ile hazırlanmış % 55' lik asetonitril karışımı kullanılıp PGC (2.1x125.0 mm i.d) sabit fazına enjekte edilmiştir. Yöntemde iç standart olarak klortalidon kullanılmıştır. Tüm etken maddeler için çalışma aralığı 5.0-500.0 ng / mL olarak söylenmiştir.

Huang ve ark. (2006), valide edilmiş hızlı, basit ve duyarlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi plazmada yer alan kaptopril ve hidroklorotiazit'in eş zamanlı miktar tayini için geliştirilmiştir. Yöntemde hareketli faz olarak asetonitril:trifluoroasetik asit : su karışımı kullanılırken , Diamonsil C₁₈ (150 mm x 4 mm i.d,5µ) kolonundan 1.2 mL/dak akış hızında hareketli fazı geçirilmiştir. Ayırım UV dedektörü ile sağlanmıştır. Kaptopril ve hidroklorotiazit için alıkonma zamanları sırasıyla 4.2 ve 16.9 dak. olarak bulunmuştur. Kaptopril ve hidroklorotiazit için yakalama sınırı sırasıyla 3.3 ng/mL ve 7.0 ng/mL olarak verilmiştir. Yöntemde çalışma aralığı kaptopril ve hidroklorotiazit için sırasıyla 20.0 – 4000.0 ng/mL ve 10.0 – 1200.0 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde validasyon parametrelerin tamamı gözden geçirilmiştir.

Ertürk ve ark. (2003), farmasötik formülasyonlarda moeksipril hidroklorür ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayinleri için iki yeni, basit ve seçici yöntem uygulamıştır. Birinci yöntem, moeksipril hidroklorür ve hidroklorotiazit'in için sırasıyla 215.0 ve 234.0 nm 'daki ikinci türev absorbans değerlerinden yararlanmıştır. Diğer yöntem de , hareketli faz olarak asetonitril-20 mM fosfat tamponu (pH 4.0) (50:50,h/h) ve iç standart olarak lisinopril kullanılmış ve maddeler 212.0 nm'de ayrılmıştır. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla,

moeksipril hidroklorür için 0.100 - 0.010 µg/mL ve hidroklorotiazit için 0.025 - 0.005 µg/mL olarak bulmuştur. Önerilen yöntemler, ticari olarak kullanılan tabletler ve sentetik karışımlarda bu etken maddelerin aynı anda tayini için başarıyla kullanmıştır.

Zecević ve ark. (2001), farmasötik preparatlardaki metildopa, hidroklorotiazit ve amilorit klorür aynı anda analizi için yeni geliştirilen bir yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi tanımlamıştır. Yöntemde sabit faz olarak C₁₈ kolonu, hareketli faz olarak pH'sı 3.60 ve su:metanol (75:25) karışımı ve 286 nm 'deki sinyaller incelenerek değerlendirme yapmıştır.

Satana ve ark. (2001), birinci türev spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi, kombine farmasötik dozaj formlarında aynı anda valsartan ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için kullanmıştır. Valsartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 270.6 ve 335.0 nm'deki türev absorbans değerlerini kullanmıştır. Kalibrasyon grafikleri, valsartan için 12.0-36.1 µg/mL ve hidroklorotiazid için 4.0-12.1 µg/mL aralıklarında doğrusaldır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde hareketli faz olarak 0.02 M fosfat tamponu (pH3.2)-asetonitril (55:45 h/h) ve 225.0 nm 'deki absorbans değerlerinden yararlanılarak valsartan ve hidroklorotiazit'in ayırımı yapılmıştır. Önerilen yöntemler, ticari tabletlerde ve laboratuvarında hazırlanan karışımlarda bu iki ilacın miktar tayini için başarıyla uygulamıştır.

Zecevic ve ark. (2000), amilorit hidroklorür ve hidroklorotiazit içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tanımlamıştır. Tanımlanan yöntemde sabit faz olarak bir C₁₈ kolonu, hareketli faz olarak pH 3.2'de (pH 3.2'ye CH₃COOH ile ayarlanır.) ve 280.0 nm'de ayırım sağlamıştır. Yöntemi etken maddeleri içeren farmasötik preparatlara uygulamıştır.

1.4.2. Spektrofotometri

Hajian ve ark. (2009), eş zamanlı olarak hidroklorotiazit ve propanolol içeren ilaç formlarında bu iki maddenin miktar tayini için spektrofotometrik H-point standart katma (HPSAM) yöntemi kullanmıştır. Çalışmada hidroklorotiazit ve propanolol numuneleri su ile hazırlanmıştır. Bu yöntem hidroklorotiazit ve propanolol içeren preparatlarda ve plazma idrar gibi bazı biyolojik sıvılarda ve sentetik karışımlarda oldukça rahat kullanılmıştır.

Kaya ve ark. (2009), hiçbir ayırma işlemi olmadan telmisartan ve hidroklorotiazit'in kombine halde bulunduğu ilaç formlarında miktar tayinlerini kemometrik metodlar kullanarak yapmışlardır. Çalışma aralıkları telmisartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 1.0 – 26.0 µg/mL ve 1.0 – 17.0 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Toral ve ark. (2009), bir türev spektrofotometrik yöntemi losartan ve hidroklorotiazit'i birlikte bulunduran ilaç numunelerinde etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için kullanmışlardır. Rutin kontrol laboratuvarlarında da bu yöntem başarıyla uygulanmıştır.

Abdel-Hay ve ark.(2008), bir spektrofotometrik yöntem hiçbir ön işlem olmadan amilorit hidroklorür, hidroklorotiazit ve timolol maleat bulunduran ilaç formlarında etken maddelerin eş zamanlı miktar tayini için kullanılmıştır. Böylece iki adet yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri türev spektrofotometri iken diğeri spektrum oranları türev spektrofotometridir. Türev spektrofotometri ile hidroklorotiazit ve amilorit hidroklorür'ün sırasıyla 365.0 ve 385.0 nm' lerdeki absorbans değerleri ölçmüştür. İkinci yöntemde ise hidroklorotiazitin spektrumlarının amilorit spektrumlarına bölünmesiyle elde edilen oran spektrumları 299.4 ve 311.0 nm lerde değerlendirilerek hidroklorotiazit'in miktar tayininin yapılmasında kullanılmıştır. Amilorit hidroklorür'ün spektrumlarının

hidroklorotiazit'in spektrumlarına bölünmesiyle elde edilen oran spektrumlarında 264.2 ve 290.0 nm'lerde türev absorpsiyon değerleriyle amilorit hidroklorür'ün miktar tayini yapılmıştır. Her iki yöntem de sentetik karışım ve tablet formlarında kolaylıkla kullanılmıştır.

Maggio ve ark.(2008), en az ön işlem yapılarak 220.0-274.0 nm aralığında PLS tekniği kullanılarak losartan ve hidroklorotiazit'in birlikte bulunduğu tabletlerde miktar tayini yapmışlardır. Çalışma aralıkları losartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 4.0 – 22.2 mg/mL ve 1.06 – 5.70 mg/ mL bulunmuştur. % geri kazanım değeri % 99.3 – 100.4 olarak hesaplamışlardır. Losartan ve hidroklorotiazit için bağıl standart sapma değerleri sırasıyla %1.0 ve %1.7 olarak belirlemişlerdir. Bu teknikte elde edilen sonuçlar yüksek performanslı sıvı kromatografi ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır.

Stolarczyk ve ark. (2008), tarafından bir türev spektrofotometrik yöntemi; enalapril maleat, hidroklorotiazit, kandesartan ve valsartan kombine halde bulunduğu antihipertansif etkili tabletlerde eş zamanlı miktar tayinleri için geliştirilmiştir. Türev absorpsiyon değerleri triamteren ve hidroklorotiazit teşhisi için sırasıyla 240.9 – 278.2 nm ve 255.7 – 288.2 nm'lerde hesaplanmıştır. Triamteren ve hidroklorotiazit için çalışma aralıkları sırasıyla 2.40 – 12.00 µg/mL ve 1.25 – 6.25 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Dinç ve ark.(2007), herhangi bir ayırma işlemi yapılmadan spektrum oranları türev spektrofotometri ve kemometrik yöntemleri ile ilaç formlarında yer alan quinapril ve hidroklorotiazitin eş zamanlı miktar tayinleri yapılmıştır. Spektrum oranları türev spektrofotometri yöntemi ile quinapril ve hidroklorotiazit için çalışma aralıkları sırasıyla 4.0 – 20.0 µg/mL ve 2.5 – 12.5 µg/mL olarak tanımlanmışlar, tesbit edilen çalışma spektrum bölge aralığı 210.0 – 350.0 nm olarak belirtilmiştir. Her iki yöntemde istatistiksel olarak kıyaslanmıştır.

Vignaduzzo ve ark.(2006), İki yeni yöntem, farmasötik formülasyonlarda hidroklorotiazit ve propanolol hidroklorür aynı anda belirlenmesi için uygun ve kullanışlı alternatif yöntemler olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemler, 250.0-350.0 nm bölgesinde örneklerin ultraviyole absorpsiyon spektrumlarının analizlerinde oran spektrumlarının birinci türevi temeline dayanmıştır. Asimetrik tam faktöriyel dizayn ve dalga boyu seçimi (hidroklorotiazit için 277.0-294.0 nm ve propanolol hidroklorür için 297.0-319.0 nm), sırasıyla hidroklorotiazit ve propanolol hidrokloridin için oran spektrumlarının birinci türevi yönteminde kullanılan 276.0 ve 322.0 nm 'de işaret yoğunluğu ve PLS yöntemi için kullanılmıştır.

Bebawy ve ark.(2005), dört duyarlı yöntem, ön ayırım yapılmaksızın kombine dozaj formlarında telmisartan ve hidroklorotiazitin doğrudan belirlenmesi için tanımlanmıştır. İlk yöntem, sırasıyla telmisartan ve hidroklorotiazit için 241.6 ve 227.6 nm 'de ölçümlerin bir sıfır geçiş tekniği kullanılarak yapılan birinci türev spektrofotometridir . İkinci yöntem, hidroklorotiazit ve telmisartan için ölçülen dalga boylarının sırasıyla 274.9 ve 242.7 nm olduğu yerde oran spektrumlarının birinci türevidir. Üçüncü yöntem, telmisartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 295.0 ve 225.0 nm'de noktaların dansitometrik ölçümleri ile iki ilacın izlenen TLC ayırımı temeline dayanmıştır. Ayırım için, hareketli faz olarak butanol:%25'lik amonyak (8:2 h/h) kullanılarak silika jel 60 F254'te yapılmıştır. Dördüncü yöntem, 365.0 nm emisyon ve 230.0 nm eksitasyonda 1 M sodyum hidroksitte ilaçların doğal floresans ölçümü temeline dayanan telmisartan 'nın spektrofotometrik tayinidir. Önerilen yöntemler, farmasötik formülasyonlarda ve ara ürün tozunda iki ilacın belirlenmesi için başarıyla kullanılmıştır. Spektrofotometrik yöntem, insan plazmasında telmisartan'ın analizi için kullanılmıştır.

Dinç ve ark. (2004), Haar ve Mexican tek boyutlu devamlı dalga boyu dönüşümü temeline dayanan bir grafik yöntemi geliştirmiştir ve bunu, şiddetli kesişen sinyallerin varlığında hidroklorotiazit ve spironolakton'un karışımı için kullanmıştır. Haar ve Mexican yöntemleri, sinyal analizleri için kullanmıştır.

Hidroklorotiazit ve spironolakton içeren farklı sentetik karışımların analizleri ile yapmıştır. Bu yöntem, hızlı, kolay uygulanabilir, ucuz ve kimyasal ön işlem yapmaksızın karışımlardaki bileşiklerin kesişen sinyallerinin analizi için uygun bulmuştur.

Kowalczyk ve Hopkala (2004), iki bileşenli karışımlarda kuinapril ve hidroklorotiazit'in miktarını ikinci türev spektrofotometri ile gerçekleştirmiştir. Bu yöntem, örneklerden ön işlem yapılmaksızın ayırımına izin vermiştir. Kuinapril, 211.6 nm dalga boyundaki türev absorbanlarında yararlanmıştır (hidroklorotiazit'in sıfır geçişli dalga boyu noktası). Aynı şekilde hidroklorotiazit, 270.8 nm 'deki türev absorbanları ölçmüştür (kuinapril'in sıfır geçişli dalga boyu noktası). Önerilen yöntem, kuinapril-hidroklorotiazit tabletlerinde her iki etken maddenin miktar tayini için başarıyla uygulamıştır.

Ferraro ve ark. (2004), amilorit hidroklorür, atenolol, hidroklorotiazit and timolol maleatı içeren karışımlarının miktarının aynı anda tayini için değerlendirilen klasik en küçük alanlar (CLS), temel komponentler regresyonu (PCR) ve bağlı bir değişken ile parsiyal en küçük kareler (PLS-1) gibi farklı kemometrik yöntemler tanımlamış. Etken maddeleri içeren farmasötik preparatlara başarıyla uygulamıştır.

Erk (2003), kandesartan sileksetil ve hidroklorotiazit'in karışımlarında etken maddelerin aynı anda tayini için spektrofotometrik yöntem önermiştir. Birinci türev sinyalleri 270.1 ve 255.5 nm 'de sırasıyla (kandesartan sileksetil ve hidroklorotiazit) kullanmıştır. İkinci yöntem, komponentlerin birinin normal bir spektrumu ile ikili karışımların absorbsiyon spektrumlarının bölümleri ile oran spektrumunun birinci türevine ve oran spektrumunun birinci türev hesaplanmasına dayanmıştır. Oran birinci türev sinyalleri 236.0, 250.0, 232.0, 267.0 ve 280.0 nm'lerde sırasıyla kandesartan sileksetil ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için seçmiştir.

Dinç ve Üstündağ (2003), tabletlerde hidroklorotiazit ve spironolakton'un aynı anda miktar tayini için spektrofotometrik değerlendirme yapmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonlar, çalışma grubu kullanılarak 220.0 nm'den 290.0 nm 'ye kadar 15 noktada sıfır derece ve birinci türev absorbansları ölçülmesi ile sağlamıştır. Çok değişkenli yöntemlerin validasyonunu, spironolakton ve hidroklorotiazit'in sentetik karışımlarının analizi ile yapmıştır. Kemometrik analiz yöntemleri, farmasötik tablet formülasyonunda spironolakton ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayini için uygun olduğundan bahsetmiştir.

Erk (2003), ikili karışımlarda hidroklorotiazit ve irbesartan'ın aynı anda miktar tayini için kullanmıştır. 231.0, 266.0, 279.0, 238.0 ve 248.0 nm'lerde oran spektrumunun birinci türevinde sinyalleri, ikili karışımlarda irbesartan ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için seçmiştir. Spektrum oranları birinci türev yöntemi hidroklorotiazit ve irbesartan'ın miktar tayini için önermiştir. Bu yöntemde 272.0 nm, 241.0 nm ve 263.0 nm'lerde okunan absorbansları kullanmıştır. Bu üç yöntemin, basit, doğru ve hızlı, hiç bir ön ayırma işlemine ihtiyaç olmaksızın kullanılan bunun yanısıra kalite kontrol laboratuvarlarında her iki ilacın rutin analizleri için de uygun olduğundan bahsetmiştir.

Ferraro ve ark. (2002), hidroklorotiazit ve amilorit hidroklorür içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayini için çok çeşitli spektrofotometrik kalibrasyonu kullanmıştır. Kullanılan bu yöntem verilerini referans yöntem olarak kabul edilen yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntem verileriyle istatistiksel açıdan karşılaştırıp aralarında anlamlı bir farkın olmadığını saptamıştır.

Dinç ve Baleanu (2002), dört adet kemometrik yöntem, aynı anda tabletlerde silazapril ve hidroklorotiazit miktar tayini için kullanmıştır. Tüm kemometrik kalibrasyonlar için 0.1 M HCl ve metanolde (1:1) iki etken maddenin rastgele karışımlarını içeren konsantrasyon hazırlamıştır. Hazırlanan karışımların UV-Vis spektrumlarındaki absorbans verilerini değerlendirmiştir. Kemometrik

yöntemlerin sonuçları, yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile istatistiksel olarak karşılaştırmıştır.

Erk (2002), fosinopril ve hidroklorotiazit'in aynı anda belirlenmesi için üç yeni spektrofotometrik yöntem tanımlamıştır. İlk yöntem, türev-fark spektrofotometridir, etken maddelerin hazırlanan çözeltilerinin fark spektrumları alınarak türev eğrileri çizdirilmiş ve 227.6 ve 276.4 nm'deki türev absorbans değerlerinden yararlanmıştır. İkinci yöntem, oran spektrum türev spektrofotometrik yöntemidir, spektrumların üst üste kesişmesini engelleyerek ayırma temeline dayanmıştır. Analitik sinyaller, metanolde karışım çözeltilerinin oran spektrumlarının birinci derece türevinde ikili karışımlarda hidroklorotiazit için 262.4, 269.3 ve 278.6 nm ve fosinopril için 237.9 ve 243.8 nm'de ölçmüştür. Üçüncü yöntem, absorbas oran yöntemidir, fosinopril ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için karışımın sıfır derece spektrumunda 210.0, 219.5 and 271.7 nm'de absorbas değerleri okunarak yapmıştır. Geliştirilen yöntemler, absorbas oran yöntemi ile karşılaştırmıştır.

Kargosha ve Sarrafi (2001), karışımlarda aynı anda triamteren ve hidroklorotiazit'in spektrofotometrik miktar tayini için kullanmıştır. Kemometrik işlemlerin parametreleri, farmasötik ürünlerde bu ilaçların analizi için uygulamıştır. Korelasyon katsayılarını 0.9994 ve 0.9992 olarak hesaplamıştır. Sonuçlar, İngiliz Farmakopesi'nde (BP) verilenlerle karşılaştırmıştır.

El-Gindy ve ark. (2001), farklı spektrofotometrik yöntemler, farmasötik tabletlerde aynı anda benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için geliştirmiştir. İkinci türev absorbans sinyalleri 214.8 ve 227.4 nm 'deki, sırasıyla benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazit'in için seçmiştir. İkinci yöntem, benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazit için sırasıyla 241.2 ve 273.2 nm 'de sinyallerin ölçümü ile oran spektrumunun ikinci derece türevine dayanmıştır. Kemometrik yöntemler, klasik en küçük kare ve temel bileşik regresyonu karışım analizleri için uygulamıştır.

El-Gindy ve ark. (2001), aynı anda hidroklorotiazit ve benazepril hidroklorür miktar tayini için tanımlamıştır. İlk yöntem, benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazit için sırasıyla 238.0 ve 275.0 nm 'de dansitometrik ölçümleri ile iki etken maddenin ayrımının izlenmesi temeline dayanmıştır. Ayrım da, hareketli faz olarak etil asetat-metanol-kloroform (10:3:2 h/h/h) kullanılarak silika jel 60 F(254) Merck HPTLC alüminyum levhalar kullanmıştır. İkinci yöntem, hareketli faz olarak asetonitril:su (35:65 h/h)(pH 3.3 asetik asitle ayarlanır) kullanılarak, ortam sıcaklığında ters faz ODS kolonunda iki ilacın yüksek performanslı sıvı kromatografik analizine dayanmıştır. Önerilen iki yöntem, ticari tabletlerde ve laboratuvar da hazırlanan karışımlarda her iki etken maddenin miktar tayini için başarıyla uygulamıştır.

1.4.3. Kapiller Elektroforez

Zheng ve ark. (2008) tarafından idrarda indapamid, hidroklorotiazit ve butenamid gibi diüretiklerin belirlenmesi için kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Üç analit, H_3BO_3 - $Na_2B_4O_7$ (BB) tampon çözeltisi (pH 8.98) ile kaplanmış bir bileşik silika kapilerde 10 dakika içinde iyi bir ayırım yapılabilmektedir. Önerilen yöntem, kolonsuz örnek ön konsantrasyonu olmaksızın insan idrar örneklerindeki diüretiklerin analizlerinde başarıyla uygulanmaktadır.

Wang ve ark. (2003), insan idrar örneklerinde ve bileşik çin bitki ilaçlarında rutin ve hidroklorotiazit'in aynı anda miktar tayini için ilk olarak kullanmıştır. Bu iki analit, 12 dakika içinde başarıyla analiz edilmiş ve optimum koşullar altında karbon elektrotta önemli kesin cevaplar göstermiştir. Sonuçlar şunu göstermiştir; bu yöntem yüksek duyarlılığa, iyi tekrarlanabilirliğe, yüksek seçiciliğe sahiptir ve ilaçların metabolik kinetik çalışmalarında kullanmıştır. Memnun edici sonuçlar, bu yöntemin insan idrar örneklerinde ve genel bir bileşik çin bitkisel ilacı olan

Zhen Ju jiang Ya Pian'da rutin ve hidroklorotiazit'in miktarlarının aynı anda analizinde kullandığı zaman elde etmiştir.

Hillaert ve Van den Bossche (2003), kapiler zon elektrokinetik ve miseller elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemlerinin aynı anda hidrokolorotiazit ve 6 anjiyotensin –II- reseptör antagonistinin : kandesartan, eprosartan, mesilat, irbesartan, losartan potasyum, telmisartan ve valsartan ayrımı için kullanmıştır. Farmasötik formülasyonlarda hidrokolorotiazit ve anjiyotensin –II- reseptör antagonistinin kombinasyonunun analizlerinin belirlenmesi için uygun bulmuştur.

Hillaert ve ark. (2001), kapiler elektroforez yöntemi, aynı anda hidroklorotiazit ve çeşitli anjiyotensin geri dönüştüren enzim inhibitörleri : enalapril, lisinopril, kuinapril, fosinopril, ramipril ve silazapril'in miktar tayini için geliştirmiştir. En kritik parametre tamponun pH'sı olarak gözlemiştir. Ayrımı, erimiş silika kapilerde (52 cm toplam uzunluk x 75 µ i.d.) sodyum fosfat tamponu (pH 7.25;100 mM) kullanılarak yapmıştır. Bu yöntem, ilgili bileşiklerin farmasötik formülasyonlarında bu bileşiklerin kantitatif belirlenmesi için başarıyla uygulamıştır.

1.4.4. Voltametri

Rezaei ve Damiri (2008) adsorptif sıyırma voltametrik yöntemle hidroklorotiazit içeren ilaç formlarında etken madde tayini için uygulanmıştır. Çalışma elektrodu olarak modifiye edilmiş çok duvarlı karbon nanotüp camı karbon elektrot kullanılmıştır. Ortam taraması pH 2.0 – 9.5 siklik voltametri kullanılmıştır. Çalışma aralığı ve yakalama sınırı sırasıyla 2.0 – 20.0 nM ve 0.8 nM olarak bulunmuştur.

1.4.5. Dansitometri

Stolarczyk ve ark. (2008), ilaç formlarında yer alan valsartan, kandesartan ve enalapril maleatın miktar tayini için kromatografik ve dansitometrik yöntemler kullanılmıştır. Yöntemde hareketli faz olarak etil asetat : tetrahidrofuran : asetik asit (8:2:0.5 h/h/h) hidroklorotiazit + valsartan ve hidroklorotiazit + kandesartan karışımı için kullanılırken butan-1-ol-buzlu asetik asit : su (12:3:5 h/h/h) hareketli fazı hidroklorotiazit + enalapril karışımı için hazırlanmıştır. Sabit faz olarak TLC F-254 plağı kullanılmıştır. 252.0 nm, 274.0 nm ve 208.0 nm’lerde dansitometrik ölçümler yapılarak ayırım sağlanmıştır. Yöntemlerin oldukça duyarlı ve seçici olduğu belirtilmiştir.

Sathe ve Bari (2007), tarafından basit ve seçici bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntemi losartan potasyum, atenolol ve hidroklorotiazitin birlikte bulunduğu tabletlerde eş zamanlı miktar tayini için geliştirilmiştir. Metanol numune ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Toluen : metanol : trietilamin (6.5:4:0.5 h/h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. 274.0 nm de dansitometrik ölçüm sağlanmıştır. Losartan potasyum, atenolol ve hidroklorotiazit için R_f değerleri sırasıyla 0.60,0.43 ve 0.29 olarak bulunmuştur. Losartan potasyum ile atenolol ve hidroklorotiazit için çalışma aralıkları sırasıyla 1000.0 – 5000 ng/mL, 250.0 – 1250.0 ng/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen korelasyon katsayıları losartan potasyum, atenolol, hidroklorotiazit için sırasıyla 0.9994, 0.9993 ve 0.9994 olarak verilmiştir.

Bhavar ve ark.(2008), tarafından bir yüksek performanslı ince tabak kromatografisi yöntemi preparatlarda birlikte bulunan quinapril hidroklorür ve hidroklorotiazitin eş zamanlı miktar tayinleri için geliştirilmiştir. Kromatografik ayırımlar sabit faz olarak silika jel 60 F-254 plakları ve uygun hareketli faz karışımları kullanılarak sağlanmıştır.

Kadam ve Bari (2007), preparatlarda yer alan valsartan ve hidroklorotiazitin yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntemi ile eş zamanlı miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak kloroform:etil aset : asetik asit (5:5:0.2 h/h/h) karışımı, sabit faz olarak silika jel G 60 F-254 plakları kullanılmıştır. 248.0 nm de dansitometrik ölçüm yapılmıştır. Bu yöntemle elde edilen korelasyon katsayıları valsartan ve hidroklorotiazitin sırasıyla 0.9998 ve 0.9988 olarak bulunmuştur. Tüm validasyon parametreleri gözden geçirilmiş ve yöntem valsartan ve hidroklorotiazit içeren tabletlere kolaylıkla uygulanmıştır.

1.5. Kullanılan Yöntemler

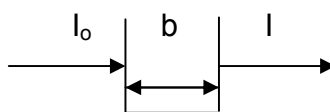
1.5.1. Spektrofotometri:

Spektroskopi : Atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi sonuçlarını analitik amaçlara yönelik olarak inceleyen bir terimdir. Kuantum teorisine göre maddelerin temel taşı olan atomlar ancak belirli potansiyel enerji düzeyinde bulunurlar . Bir atomun potansiyel enerjisi elektronik konfigürasyonu ve dış elektronlarının belirli enerji düzeyleri arasındaki geçişlere bağlıdır. Bu geçişler sırasında absorplanan ışımının enerjisi, atomun potansiyel enerjisindeki değişim ile orantılıdır. Moleküllerde atomlarda olduğu gibi uygun enerjideki fotonlarla etkileştiklerinde bu fotonları absorblayarak uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış moleküller bu kararsız durumdan fazla enerjilerini yayarak tekrar temel hale geçerler. Moleküllerdeki elektronik enerji düzeyleri gibi titreşim,ötelenme ve dönme enerji düzeyleride mevcuttur. Yani bir molekülün toplam enerjisi;

$$E_{\text{Top.}} = E_{\text{Ele.}} + E_{\text{Tit.}} + E_{\text{Öte.}} + E_{\text{Dön.}}$$

formülüyle verilmektedir. UV ve görünür bölge fotonunun absorplanması sonucu molekülün elektronik enerji seviyesi ile birlikte diğer enerji seviyelerinde değişme meydana gelmektedir.

Kantitatif absorbsiyon yöntemleri iki ışın gücü ölçümüne ihtiyaç göstermektedir. Tek dalga boyundaki ve I_0 şiddetindeki ışın demeti, kalınlığı b cm olan bir kaptaki bulunan atom veya moleküller arasındaki etkileşimin sonucu şiddeti azalarak numune kabını I şiddetinde terk eder.



Işının şiddetindeki azalmanın konsantrasyon ile doğru orantılı olduğu Lambert-Beer Kanunu ile açıklanmıştır. Lambert-Beer kanuna göre örnek kabına giren ve kabı terk eden ışın şiddetlerinin logaritmaları farkı, kabın içindeki çözelti konsantrasyonları (g/L) ve ışının numune içinde aldığı yol (cm) ile orantılıdır :

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot C = A \quad (\text{Lambert –Beer Eşitliği})$$

I_0 =Numune üzerine gönderilen ışının şiddeti

I = Numuneyi terkeden ışının şiddeti

C = Çözeltinin konsantrasyonu (g/L)

b =Işının numune içinde aldığı yol (cm olarak)

A = Absorbans

a = Absorpsiyon katsayısı, verilen dalga boyunda, belli bir atom, iyon veya molekül için sabit bir değerdir ve genellikle maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boyları için hesaplanır.

Yukarıdaki eşitlikte yer alan absorpsiyon katsayısı absorptivite olarak kullanılmaktadır. Absorbsiyon katsayısının büyüklüğü ,ışının numune içinde aldığı yol ve çözelti konsantrasyonu için kullanılan birimlerle ilgilidir. Işının numune içinde aldığı yol çoğunlukla 1 cm olarak ve çözelti konsantrasyonu ise g/L olarak kullanılır. Eğer Lambert-Beer kanunu ifadesi $A = \varepsilon \cdot b \cdot C$ şeklinde yani absorpsivite yerine molar absorptivite kullanılırsa; ışın yolu uzunluğu cm ve numune konsantrasyonu mol/L olarak kullanılır. Lambert-Beer Kanunu spektrofotometri yöntemi için esas kabul edilir. Bu kanunun geçerliliği ancak aşağıdaki koşulların kullanılması ile mümkün olmaktadır (Gündüz, 1988; Skoog ve ark. 1997; Yıldız ve ark. 1997).

1) Absorpsiyon olayının ve örneğin homojen olması, birden fazla bileşenin absorplama olayında yer alması durumunda her bir bileşenin, diğerlerinin absorpsiyonunu etkilememesi, ayrıca kullanılacak ışının sadece monokromatik yani tek dalga boyu kullanılmalıdır.

2) Analiz sırasında maddenin özelliklerini değiştiren durumlar olan disosiasyon, asosiasyon, polimerleşme kompleks oluşumu incelenen örnekte gerçekleşmemelidir.

3) Analiz sırasında meydana gelen parazit olaylardan kırılma, yansıma ve difüzyon gibi durumlar oluşmamalıdır.

4) Konsantrasyonu 1.0-0.01 M'den küçük olan çözeltiler için Beer - Lambert kanunu geçerlidir (Gündüz, 1988; Skoog ve ark. 1997; Yıldız ve ark. 1997). Analizi yapılan çözeltinin konsantrasyonu < 0.01 M olduğu halde özellikle iyonların konsantrasyonu yüksek olduğunda ve ortamda yabancı bileşik varlığında bağıntıdan sapma olmaktadır. Analiz sırasında kullanılan ışının monokromatik olmaması ve analizi yapılan çözelti üzerine ayrıca kaçak ışın gelmesi durumunda da çeşitli sapmalar görülmektedir. Analizi yapılan çözeltiye iki ayrı dalga boyunda I_0 ve I_0' şiddetlerindeki ışın gönderildiğinde ve analizi yapılan çözeltinin bu ışınları absorpladığı koşullarda aşağıdaki eşitlikler kullanılır;

$$A = \log \frac{I_0 + I_0'}{I + I'} = \log \frac{I_0 + I_0'}{I_0 10^{bC} + I_0' 10^{bC}}$$

eşitliği ile ifade edilebilir (Yıldız ve ark. 1997). Bu eşitlik ele alınırsa üç koşul değerlendirilmelidir.

i) $\epsilon = \epsilon'$ ise ; analizi yapılan çözelti tarafından her iki dalga boyundaki ışında aynı miktarda absorpluyorsa yani; eşitlik tek dalga boyuna göre düşünülür ve doğrusallıktan sapma olmaz.

ii) $\epsilon > \epsilon'$ ise ; analizi yapılan çözelti tarafından her iki dalga boyundaki ışında ölçülen A tek dalga boyu için olması beklenen değerden çok daha küçük bir değer oluşur ve doğrusal durumdan negatif bir değer gözlenir.

iii) $\epsilon < \epsilon'$ ise; analizi yapılan çözelti tarafından her iki dalga boyundaki ışında ise sapma pozitif bir değerde gözlenir. (Yıldız ve ark. 1997).

Kantitatif Spektrofotometrik çalışmalar için ; bilinen değişik konsantrasyonlardaki etken madde içeren çözeltiler hazırlanır ve spektrumları elde edilir. Çalışma grafikleri, çözeltilerin absorbansları (çoğunlukla maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boylarındaki değerlerdir) bulunup, konsantrasyonlarına karşılık grafiğe geçirilmesi ile oluşturulur. Bilinmeyen konsantrasyondaki etken maddenin, absorbansı bulunup kalibrasyon denklemlerinde yerine konulup etken maddenin konsantrasyonu bulunmuş olur.

1. 5. 1. 1. Spektrofotometre

Spektrofotometre; molekül ve iyonların ışını absorplamasını incelemek için kullanılan bir cihazdır. Spektrofotometrenin bölümleri şunlardır (Yıldız ve ark.1997) :

1) *Işık Kaynağı*

Spektrofotometrik çalışmalarda kullanılacak ışın kaynağı kolayca belirlenebilecek ve ölçülebilecek ışın demeti oluşturan kaynaklar olmalıdır. Bunun için , UV bölgede döteryum lambası görünür bölgede ise Xe ark, civa buhar ve tungsten lambalarıdır.

2) Monokromatör (Dalga boyu seçiciler)

Monokromatörler spektral taramaları yapabilmek için tasarlanmış sistemlerdir. Monokromatörler yapılarında slitler, mercekler, pencereler ve optik ağı veya prizmalar içerirler.

3) Numune veya Çözücü kısmı

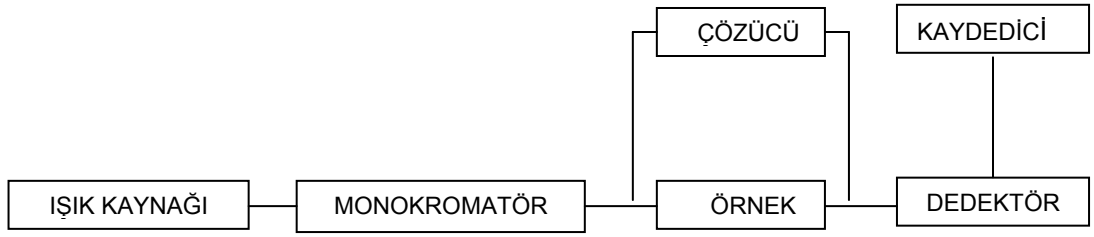
Analizi yapılacak çözeltinin konulacağı kap çalışılan dalga boyu aralığındaki ışınlar için geçirgen olmalıdır. Kuartz veya erimiş silis küvetler , ultraviyole bölgesinde (200.0-400.0 nm arasında) çalışılıyorsa; cam ve kuartz küvetler görünür bölge (400.00-800.00 nm arasında) çalışılıyorsa numune kabı olarak kullanılmaktadır. Işığın yansımalarını azaltmak için numune kaplarının yüzeyleri ışığın geliş yönüne dik olacak şekilde konulmalıdır. Ölçüm sonuçlarının doğruluğu hücrelerin kullanım şekli ve bakımına bağlıdır. Ölçüm sonuçlarını değiştiren ve hücrelerin geçirgenliğini etkileyen diğer parazit faktörlerden bazıları ise yüzeylerdeki parmak izleri, yağ ve diğer birikintilerdir, hücrelerin pencere yüzeylerine dokunulmamalıdır ve analiz edilecek çözelti konulmadan önce hücre yüzeyleri temizlenmelidir.

4) Dedektörler

Dedektörler yüksek duyarlık göstermeli, sinyal/gürültü oranı yüksek olmalı ve geniş bir dalga boyu aralığında sabit orantılı cevap verme özellikleri gösterebilmelidir. Analizler sırasında çoğunlukla kullanılan dedektörler: **1-** Fototüpler, **2-**Fotoçoğaltıcı tüpler , **3-** Silisyumlu fotodiodlar, **4-** Fotovoltaiik hücreler, **5-** Fotoiletken hücreler ve **6-** Yük aktarım düzenekleri olmak üzere 6 grupta toplanabilir.

5)Kaydedici

Dedektör aracılığıyla alınan sinyalleri kağıt üzerine aktarabilmeyi sağlar.



Şekil 1.5.1.1.1. Çift Işın yollu Spektrofotometre Cihazı
(Yıldız ve ark. 1997).

1.5.2. Türev Spektrofotometri

Absorbans değerlerinin dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesi işlemine spektrum denir. (Onur ve Yücesoy, 1983; Levillain ve Fompeydie, 1986). Absorbans (A) ve dalga boyu (λ) değerleri spektrumun belli noktasındaki eğimi için başlıca değişkenlerdir. $A=f(x)$ fonksiyonu, absorbans ve dalga boyu değişkenleri kullanılarak hesaplanır. $A=f(x)$ fonksiyonun her bir noktasındaki teğetinin eğimi yani türev ifadesi dy/dx şeklinde tanımlanmaktadır. $A=\epsilon.b.C$ eşitliğinin dalga boyuna göre birinci dereceden türevi Lambert-Beer kanununa göre:

$$dA/d\lambda = -C.b.d\epsilon/d\lambda \quad (1.\text{dereceden türev eğrisi})$$

Eşitliğin 2. dereceden türev eğrisi :

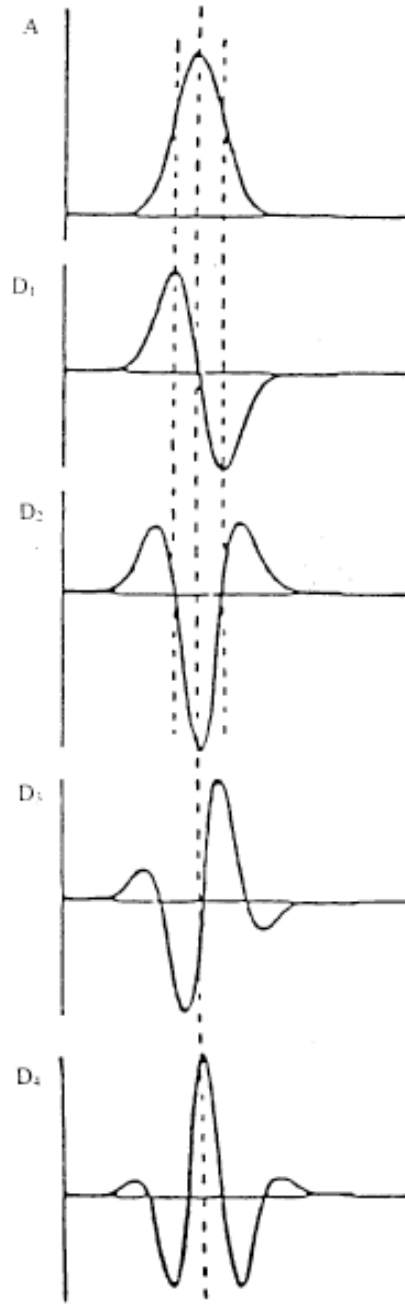
$$d^2A/d\lambda^2 = -C^2.b^2.(d\epsilon/d\lambda)^2 - C.b.(d^2\epsilon/d\lambda^2)$$

Eşitliğin 3. dereceden türev eğrisi :

$$d^3A/d\lambda^3 = -C.b.(d^3\epsilon/d\lambda^3) + 3 C^2.b^2.(d\epsilon/d\lambda)(d^2\epsilon/d\lambda^2) - C^3.b^3.(d\epsilon/d\lambda)^3$$

şeklinde ifade edilir.

Türev eğrilerinin hazırlanması için elle yapılması oldukça güç olan matematiksel eşitlikler kullanılmaktadır. Bu nedenle spektrum eğrilerinin her bir noktasındaki türevinin hesaplanması ve sonra bunların grafiğe geçirilerek türev eğrilerinin hazırlanması bilgisayar ortamında yapılabilmektedir. Türev Spektrofotometri, türev spektrumlarının analitik olarak kullanılması temeline dayanan bir analiz yöntemidir.



Şekil 1.5.2.1. A. basit bir orijinal spektrum

D_1 . Orijinal spektrumun 1. dereceden türevi

D_2 . Orijinal spektrumun 2. dereceden türevi

D_3 . Orijinal spektrumun 3. dereceden türevi

D_4 . Orijinal spektrumun 4. dereceden türevi (Onur ve Yücesoy, 1983)

Şekil 1.5.2.1 ' de basit bir orijinal spektrumun 1., 2., 3. ve 4. türev spektrumları verilmiştir. Yukardaki grafiklerde gözlendiği gibi orijinal spektrumun birinci türevi alındığında bandın yükselen bölgesinde pozitif, inen bölgesinde ise negatif pikler görülmüştür. Türev derecesi arttıkça geniş piklerin küçülüp dar piklerin belirginleştiği izlenmektedir. Örneğin pik genişliği 2. türev spektrumunda normal spektrumun %53 'üne, ve 4. türev spektrumunda ise normal spektrumun % 41'ine düşmektedir. Bu durum üst üste gelen bantların birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır. Her bir pike karşılık n. türev spektrumunda n+1 adet pik yer almaktadır (Onur ve Yücesoy, 1983).

1.5.2.1. Yöntemin Avantajları (Onur ve Yücesoy, 1983)

1) Türev spektrofotometri teğetlerin eğimidir. Dönüm noktalarının tespiti ve spektrumun eğimleri hakkında bilgi veren bir yöntemdir

2) Orijinal spektrumlar üst üste gelen spektrumlardan meydana gelmiştir. Sıfırıncı derece spektrumların türevi alınarak piklerin belli oranda birbirlerinden ayrılması sağlanır.

3) Orijinal spektrumların türevleri alınarak başka bir işlem yapılmaksızın karışım içinde bulunan etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri yapılabilir.

4) Etken maddelerin miktar tayini preparat içerisinde bulunan diğer matriks bileşenlerin varlığında da yapılabilir.

5) Etken maddenin bozulma ürününün yanında tayini yapılabilir.

6) Spektrofotometride bulanık çözeltilerin normal spektrumları büyük olasılıkla hata nedenidir. Bulanıklığın neden olduğu negatif etki türev spektrumları alınarak yok edilmiş olur.

1.5. 2. 2. Yöntemin Dezavantajı

Türev spektrofotometri yönteminde, türev dereceleri artırıldıkça Sinyal/Gürültü (S/G) oranları bozulmakta ve bu değişim bu piklerin sayısının artmasına yol açmaktadır. Bu durum ayrımın tam sağlanması için pahalı spektrofotometreler kullanılmasına yol açmaktadır.

1.5.2.3. Türev Spektrofotometri Uygulamaları

Türev spektroskopisi yönteminin uygulama alanları; analitik kimya ağırlıklı kalite kontrolü ile ilgili alanlarda biyoloji, biyokimya, toksikoloji ve klinik biyokimya ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Spektrofotometri bölümü Gündüz, 1988; Skoog ve ark., 1997 , Yıldız ve ark. 1997 , Onur ve Yücesoy, 1983 ve Uyguner 2010 dönem projesi kaynakları kullanılarak hazırlanmıştır.

1. 5. 3. Spektrum Oranları Türev Spektrofotometri

Yöntem ilk olarak 1987 yılında Blanco ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem (Blanco ve ark., 1987) 1992 yılında ise Berzas Nevado ve arkadaşları tarafından daha da geliştirmiştir. (Berzas Nevado ve ark. 1992). A ve B gibi iki etken maddeden oluşan bir ikili karışım numunesi kullanıldığı varsayılmıştır (Salinas ve ark., 1990). Kullanılan dalga boyu aralığında her iki etken maddenin de karışımlarının absorpsiyonu, her iki etken maddenin absorpsiyon değerlerinin ayrı ayrı toplamına eşittir (Toplanabilirlik kuralı). Bu durum aşağıdaki eşitlikle gösterilmiştir (Salinas ve ark., 1990):

$$A_{Ai} = \epsilon_{Ai} \cdot C_A + \epsilon_{Bi} \cdot C_B \quad (I) \text{ şeklinde ifade edilmiştir.}$$

A_{Ai} = Karışımın i dalga boyundaki absorpsiyonu

ϵ_{Ai} ve ϵ_{Bi} = A ve B' nin molar absorpsiyon katsayıları

C_A ve C_B = A ve B'nin molar konsantrasyonlarıdır.

- (I) Eşitliği A 'nın standart çözeltisinin absorpsiyon spektrumuna (C_A^0)'a bölünecek olursa aşağıdaki eşitlik yazılabilir (Salinas ve ark., 1990):

$$\frac{A_{\lambda i}}{\epsilon_{\lambda i} C_A^0} = \frac{C_A}{C_A^0} + \frac{\epsilon_{B\lambda i} \cdot C_B}{\epsilon_{\lambda i} C_A^0} \quad (II)$$

Bu eşitlik daha yalın haliyle;

$$\frac{A_{\lambda i}}{\epsilon_{\lambda i}} = C_A + C_B \cdot \frac{\epsilon_{B\lambda i}}{\epsilon_{\lambda i}} \quad (III)$$

$A_{\lambda i} / \epsilon_{\lambda i}$, $\epsilon_{B\lambda i} / \epsilon_{\lambda i}$ bu oranlar grafiğe geçirildiği zaman bir doğru denklemi elde edilir. Bu $y = mx + n$ şeklindeki doğru denklemindeki n kesim noktası ise C_A ve m eğim ifadesi C_B , ile gösterilmiştir.

Her bir dalga boyundaki $\epsilon_{B\lambda i} / \epsilon_{\lambda i}$ oranını hesaplamak için B ve A 'nın ekimolar standart çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları alınır her bir dalga boyu için absorpsan oranlarının tek tek hesaplanması gerekmektedir (III) nolu ifadeden görüldüğü gibi) A 'nın varlığında B'nin tayin edilmesi için (II) eşitliğinin türevi alınırsa;

$$\frac{d}{d\lambda} \left(\frac{A_{\lambda i}}{\epsilon_{\lambda i} C_A^0} \right) = \left(\frac{C_B}{C_A^0} \right) \frac{d}{d\lambda} \left(\frac{\epsilon_{B\lambda i}}{\epsilon_{\lambda i}} \right)$$

yukarıdaki denklem elde edilir. Eşitlik ele alındığında türev oran spektrumu sadece C_B ve C_A^0 değerlerine bağlı, C_A 'in karışımdaki miktarına bağlı olmadığı düşünülebilir. C_A^0 değeri sabittir buna göre karışım içindeki C_B değeri kolayca bulunabilir.

Anlatılan yöntemin uygulanması için; B+A 'den oluşmuş bir karışımda B analiz edilecekse , analiz edilecek numunenin (B) farklı bilinen konsantrasyonlardaki çözeltileri spektrofotometre ile spektrumları alınır. Bu işlem sonrasında C_A^0 konsantrasyonunda sadece A' nin yer aldığı standart çözeltisi hazırlanır ve hazırlanan C_A^0 konsantrasyonundaki çözeltinin absorpsiyon spektrumu kayıt edilir. Kayıt edilen B'nin her bir spektrumu ayrı ayrı C_A^0 nin spektrumuna bölünerek oran spektrumu oluşturulur. Elde edilen oran spektrumlarının türev spektrumları çizdirilerek belirlenen dalga boyunda oran türev absorbans değerleri okunur. Okunan oran türev absorbans değerleri C_B 'e karşı grafiğe geçirilerek çalışma grafiği hazırlanır. Sonra işlem A + B karışımına uygulanıp daha önce B için hazırlanan çalışma grafiği yardımıyla karışımda B'nin miktarı tayin edilir. Karışımdaki A'nın miktarının tayini içinde bu defa C_B^0 'da hazırlanan konsantrasyondaki B çözeltisi bölücü olarak kullanılmaktadır . Diğer işlemler yukarıda anlatıldığı gibidir.

Bu bölüm Blanco ve ark., 1987, Berzas Nevado ve ark. 1992, Salinas ve ark., 1990, Dinç, E. 1996 , Uyguner 2010 , ve kaynakları kullanılarak hazırlanmıştır.

1.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine ya da seçici etkileşmelerine dayanarak ayrılmalarını sağlayan aynı zamanda bu maddelerin nitel ve nicel analizlerini gerçekleştirebilen temel bir işlemdir. Tüm kromatografik yöntemlerde temelde, maddelerin birbirinden ayrılmasını sağlayan iki farklı faz bulunur. Bu fazlar sırasıyla sabit ve hareketli fazdır. Bu fazlardan sabit faz, bir kolon veya düzlemde durgun olan fazdır. Hareketli faz ise sabit faz üzerinden analitleri taşıyarak geçen ve genellikle sabit fazla karışmayan fazdır. Kromatografik ayırım, sabit faz ile daha fazla tutulan bileşenler daha yavaş ayrışırken, sabit faz ile zayıf tutulan bileşenler ise daha hızlı ayrışırlar (Skoog ve ark., 1997).

Çoğunlukla kromatografik yöntemler şöyle bölümlere ayrılır (Skoog ve ark., 1997);

1- Kolon kromatografisi

a- Sıvı kromatografisi

- i- Sıvı-sıvı veya dağılma
- ii- Sıvı-bağlı faz
- iii- Sıvı-katı veya adsorpsiyon
- iv- İyon değişimi
- v- Boyut eleme

b- Gaz kromatografisi

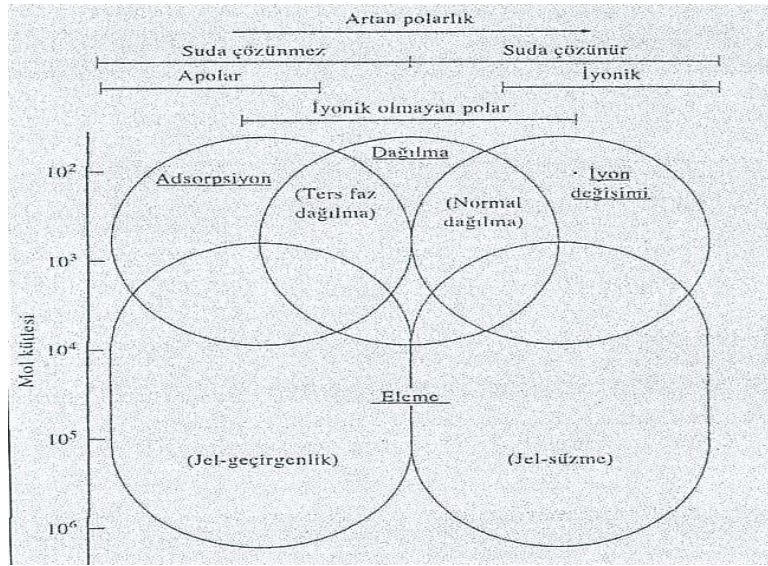
- i- Gaz-sıvı
- ii- Gaz-bağlı faz
- iii- Gaz-katı

c- Süper kritik akışkanlı kromatografi .

2- Düzlemsel kromatografi

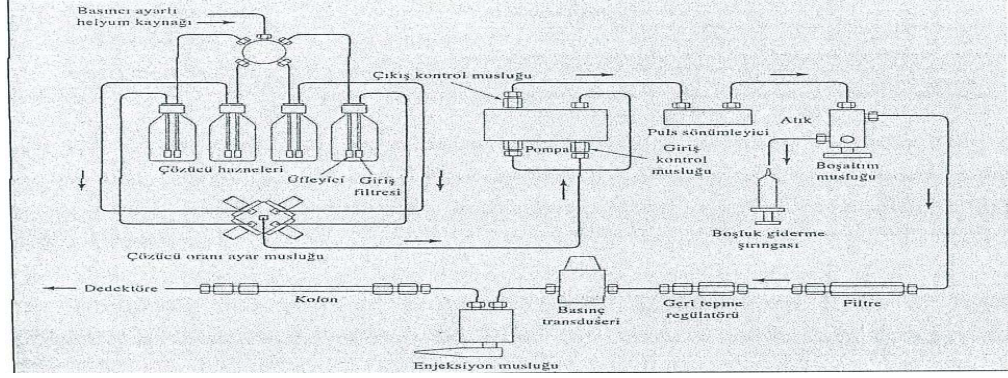
Yüksek performanslı sıvı kromatografi'de, hareketli faz sıvıdır. İyi bir ayırım için sıvıya belli bir basınçta sabit fazdan geçirilmelidir (Skoog ve ark., 1997).

Yüksek performanslı sıvı kromatografi'nin ilişkilendirildiği diğer ayırım yöntemleri şunlardır; dağılma, adsorpsiyon (sıvı-katı), iyon değişirme ve boyut eleme (jel) kromatografisidir (Şekil 1.6.3.1.) (Skoog ve ark., 1997).



Şekil 1.6.3.1. Sıvı kromatografinin Uygulamaları (Skoog ve ark., 1997).

Dolgu maddeleri çoğunlukla 2-10 μm tanecik boyutuna sahiptir; böylece uygun sıvı akış hızı için, yüzlerce atmosferlik pompa basıncına ihtiyaç vardır (Skoog ve ark., 1997). Şekil 1.6.3.2.'de yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı bulunmaktadır.



Şekil 1.6.3.2. Bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şeması (Skoog ve ark., 1997).

Bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazındaki kısımlar şunlardır (Skoog ve ark., 1997).

1-Hareketli faz hazneleri ve çözücü muamele sistemleri

2-Pompa sistemleri

- a- Pistonlu pompalar
- b- Sürgülü pompalar
- c- Pnömatik pompalar

3-Numune enjeksiyon sistemleri

4-Sıvı kromatografi kolonları

- a- Analitik kolonlar
- b- Emniyet kolonları
- c- Kolon termostatları

5-Dedektör

- a. Absorbans dedektörleri
 - I. Filtreli ultraviyole absorbans dedektörleri
 - II. Monokromatörlü ultraviyole absorbans dedektörleri
 - III. İnfrared absorbans dedektörleri
- b. Floresans dedektörler
- c. Karılma indisi dedektörü
- d. Buharlaştırmak ışık saçma dedektörleri
- e. Elektrokimyasal dedektörler
- f. Kütle spektrometrik dedektörler
- g. NMR

Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazında bulunan bir ya da daha fazla çözücü haznesi içinde kolon ve dedektörün negatif olarak etkilenmesine neden olacak gazların ortamdan ayrılmasını sağlayan cihazlar yer almaktadır (Skoog ve ark., 1997).

İki çeşit elüsyon vardır: Bunlardan biri; izokratik elüsyon yani sabit olarak tek çözücü ile gerçekleşir. Diğer çeşidi ise gradiyent ayırımıdır. Gradiyent elüsyonda ayırım sırasında oranları değişen iki ya da ikiden fazla hareketli faz kullanılarak yapılmaktadır (Skoog ve ark., 1997).

Bir pompa sistemi 400 atm'e kadar basınç üretebilen sistemler olup her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa vardır. Başlıcaları 1- Pistonlu pompalar ; 2- Sürgülü pompalar ; 3- Pnömatik pompalardır (Skoog ve ark., 1997).

Sıvı kromatografi kolonları genel olarak düzgün iç çapa sahip paslanmaz çelik boru olup uzunlukları genelde 10-30 cm, iç çapları 4-10 mm ve dolgu maddelerinin boyutları 3-10 μ m büyüklüğündedir. Normalde kolonlar düzdür ve gerektiği yerlerde iki veya daha fazla kolonun birbirine eklenmesi ile kolonun boyu artırılabilir. Günümüzde en çok kullanılan kolon boyu 25 cm boyunda 4.6 mm iç çapında ve 5 μ m tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi içeren kolonlardır (Skoog ve ark., 1997).

1.6.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Yönteminin Avantajları

1. Kullanılan sabit fazın rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir olması
2. Duyarlı ve doğru, kantitatif tayinlere kolayca uygulanabilir yöntem olması.
3. Uçucu olmayan, sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrımı için uygun olması.

4. Pek çok maddeye geniş şekilde uygulanabilmesi ve analiz süresinin çok kısa olması
5. Aynı sabit faz kullanılarak farklı hareketli faz sistemleriyle aynı anda birçok maddenin duyarlı olarak miktar tayininin yapılmasına olanak sağlaması.
6. Numunedeki maddelerin, bozulma ürünlerinin yanında miktar tayinlerine olanak sağlaması.
7. Biyolojik sıvılardan gerek ilaç etken maddelerinin, gerekse metabolitlerinin analizi için geniş bir kullanım alanına sahip olması (Skoog ve ark., 1997).

1.6.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Analiz Yönteminin Dezavantajları

1. Sabit faz ve hareketli faz sistemlerinin pahalı olması
2. Kullanılan hareketli faz sistemlerinin pahalı membran sistemlerinden süzülmesinin gerekliliği.
3. Numune kaplarının pahalı olması

Bölüm Skoog ve ark., 1997 ve Çiloğlu 2008 tezinden yararlanılarak hazırlanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

- Spektrofotometre : Shimadzu UV 1601
- Duyarlı Terazi : Shimadzu, Libor AEG-220
- Manyetik Karıştırıcı : Electro-Mag Type MS,
- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı: HP 1100 Series
G1379 Degasser, G1311 Quat Pump, G1313A ALS,
G1315BDAD, G1316A COLCOM
- Ultrasonik Banyo : Selectra, Ultrasons
- pH metre : Mettler Toledo MP 220

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Metanol (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Asetonitril (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Distile su

2.3. Kullanılan Standart Maddeler

- Bisoprolol Fumarat (Sandoz İlaç San. ve Tic. A.Ş) (USP standartıdır: %100)
- Hidroklorotiazit (Sandoz İlaç San. ve Tic. A.Ş) (USP standartıdır: %100)

2.4. Farmasötik Preparatlar

Türkiye’de piyasaya yeni sürülen preparat şekilleri aşağıdaki gibidir.

I) Lodoz® 2.5 mg/6.25 mg 30 Film Tablet (Merck İlaç)

Bisoprolol Fumarat 2.5 mg
Hidroklorotiazit 6.25 mg / tablet

II) Concor® 10 mg Lak Tablet (Solvay)

Bisoprolol Fumarat 10 mg / tablet

2.5. Ortam Şartları ve Hesaplamalar

Stok çözeltiler firmadan temin edilen saf bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit’in metanol içerisinde çözülmesiyle hazırlanır. Bu stok çözeltilerden hareketle belli seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanır. Standart çözeltilerden hareketle gerek spektrofotometri de ve gerekse yüksek performanslı sıvı kromatografide analitik olarak doğrusal olan konsantrasyonlar tespit edilip en küçük kareler yöntemleriyle kalibrasyon denklemleri hesaplanmıştır.

2.6. Sadece Bisoprolol Fumarat İçeren Preparatlar İçin Analiz Yöntemleri

2.6.1. Doğrudan UV Spektrofotometri

2.6.1.1. Deneyin Yapılışı

2.6.1.1.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

Stok olarak hazırlanan bisoprolol fumarat'ın metanoldeki çözeltilerinden hareketle farklı konsantrasyon aralıklarında (2.0-22.0 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler Shimadzu UV 1601 spektrofotometre kullanılarak 200.0-285.0 nm arasındaki spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 3.1.1.1.) . En yüksek absorbens değerinin okunduğu dalga boyu 224.6 nm olarak tespit edilmiş ve bu dalga boyunda hazırlanan tüm standart çözeltilerin absorbens değerleri okunmuştur. Konsantrasyon değerlerine karşı okunan absorbens değerleri x-y grafiğine yerleştirilmiştir. Bu grafikten yararlanılarak kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (Çizelge 3.1.1.1.).

2.6.1.1.2. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)

2.6.1.1.2.1. Gün İçi Deneyler

Çalışma konsantrasyon aralığında olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda ve üçer paralel standart çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), ½ ., 1., 1.5., 2., 3., 4., ve 5. saatlerde; spektrumları alınmış ve absorbens değerleri okunmuştur. Okunan bu değerler ilgili denklemlerde yerine konularak Çizelge 3.1.1.2.'de özetlenen veriler elde edilmiştir.

2.6.1.1.2.2. Günler Arası Deneyler

Çalışma konsantrasyon aralığında olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda ve üçer paralel standart çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., 4., ve 5. günlerde ; spektrumları alınmış ve absorbens değerleri okunmuştur. Okunan bu değerler ilgili denklemlerde yerine konularak Çizelge 3.1.1.3.'de özetlenen veriler elde edilmiştir.

2.6.1.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları

Kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması sonucu hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.4.'de verilmiştir.

2.6.1.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Herbiri 10 mg bisoprolol fumarat içeren 10 tablet hassas terazide tartılır ve ortalama tablet ağırlığı bulunur. Tartılan tabletler eczacı havanları içerisinde iyice toz edilir. 13.8 mg bisoprolol fumarat'a eşdeğer tablet tozu hassas terazide tartılarak 25 ml'lik balonjoeye yeteri kadar metanol ilave edilerek alınmıştır. Bu çözelti önce ultrasonik banyoda 15 dakika kadar tutulur. Karışım Whatman 42 süzgeç kağıdından süzülür. Elde edilen süzüntülerden çalışma aralığı içerisinde olacak şekilde dilüsyonlar yapılır. Maksimum absorbensin elde edildiği dalga boyu 224.6 nm'dir. Kaydedilen bu değerler Çizelge 3.1.1.1.'de gösterilen kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen kalibrasyon denklemlerinde absorbens değerleri yerine konularak, her bir tabletteki bisoprolol fumarat miktarları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.1.1.5.'te verilmiştir.

2.6.2. Birinci Türev UV Spektrofotometri

2.6.2.1. Deneyin Yapılışı

2.6.2.1.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

Metanol içerisinde hazırlanan bisoprolol fumarat standart çözeltilerinden hareketle 209.0-250.0 nm dalga boyu aralıklarında alınan spektrumların birinci türev eğrileri bilgisayarlar kullanılarak çizdirilmiştir (Çizelge 3.1.2.1.). Elde edilen birinci türev UV spektrumlarında 232.6 nm'deki türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri kaydedilmiştir. Bu değerler konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 3.1.2.1.'de yer almaktadır.

2.6.2.1.2. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)

2.6.2.1.2.1. Gün İçi Deneyler

Çalışma konsantrasyon aralığında olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda ve üçer paralel standart çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), $\frac{1}{2}$., 1., 1.5., 2., 3., 4., ve 5. saatlerde; spektrumları alınmış ve türev eğrileri çizdirilerek türev absorbans değerleri okunmuştur. Okunan bu değerler ilgili denklemlerde yerine konularak Çizelge 3.1.2.2.'de özetlenen veriler elde edilmiştir.

2.6.2.1.2.2. Günler Arası Deneyler

Çalışma konsantrasyon aralığında olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda ve    er paralel standart çözelti hazırlanmıştır. Bu   zeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., 4., ve 5. günlerde; spektrumları alınmış ve türev eğrileri çizdirilerek türev absorbans değerleri okunmuştur. Okunan bu değerler ilgili denklemlerde yerine konularak  izelge 3.1.2.3.'de özetlenen veriler elde edilmiştir.

2.6.2.1.3. % Geri Kazanım  alışmaları

Elde edilen birinci türev UV spektrumlarında 232.6 nm 'deki türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri okunmuş ve kaydedilmiştir. Bu   zeltilerin hazırlanan ve olması gereken konsantrasyonlarından hareketle “% geri kazanım değerleri” hesaplanmıştır. Elde edilen veriler  izelge 3.1.2.4. verilmiştir.

2.6.2.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Bölüm 2.6.1.1.4.' de açıklandığı gibi elde edilen UV spektrumlarının türev spektrumları alınmıştır.Elde edilen birinci türev UV spektrumlarında 232.6 nm'deki türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri okunmuştur. Okunan bu türev absorbans değerleri  izelge 3.1.2.1.'de gösterilen kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak her bir tabletteki bisoprolol fumarat miktarları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar  izelge 3.1.2.5.'te verilmiştir.

2.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

2.6.3.1. Deneyin Yapılışı

2.6.3.1.1. Ortam Koşullarının Ayarlanması

Sabit faz olarak C₁₈ kolonu ve hareketli faz olarak ise asetoneitril, su ve metanol'den oluşan karışım ile izokratik ayırım yapılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz seçiminde farklı oranlar ve farklı fazlar denenmiş olup en uygun olan hareketli fazın asetoneitril:su:metanol (20:60:20 h/h/h) karışımının olduğu tespit edilmiştir. Hareketli faz olarak seçilmiştir. Hazırlanan bu hareketli faz, kolon sıcaklığı 20-50°C arasında değiştirilerek farklı sıcaklıklarda denenmiş ve ; en uygun sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir. Etken maddenin 200.0–260.0 nm'lerde çizdirilen spektrumları incelenerek maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boyu 230.0 nm olarak belirlenmiştir. Bu dalga boyunda çalışılmaya karar verilmiştir. İç standart olarak çalışmalarımızda losartan kullanılmıştır. Geliştirdiğimiz yöntemde bisoprolol fumarat, ve iç standartın birbirinden ayrılmasına ve kolon basıncının 200 bar'ı geçmemesine dikkat edilerek, hareketli faz kolondan farklı akış hızlarında geçirilmiş ve en uygun akış hızının 0.5 mL/dk olduğuna karar verilmiştir.

2.6.3.1.2. Kromatografik Koşullar

Cihaz : HP 1100 Series ,yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

Kolon : Supelcosil BDS C₁₈ ,150 mm x 4.6 mm, 5µ

Hareketli Faz: Asetoneitril-su-metanol (20:60:20, h/h/h).

Akış Hızı: 0.5 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi: 5.0 μ L

Kolon Sıcaklığı: 25°C

Dalga Boyu: 230.0 nm

Çalışmalarımızdan önce kromatografik koşullar ayarlandıktan sonra hareketli faz 0.5 mL/dk akış hızıyla iki saat boyunca kolondan geçirilerek kolonun dengeye getirilmesi sağlanmıştır.

2.6.3.1.3. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

İç standart olarak, losartanın metanoldeki 0.2 μ g/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür.

Yaklaşık 25 mg bisoprolol fumarat standartı tartılarak, 100 mL'lik balonjojeye konulmuştur. 10 mL metanol konularak bir süre ultrasonik banyoda tutulmuştur. Yine metanolle hacme tamamlanmıştır (bisoprolol fumarat konsantrasyonu 250 μ g/mL). Hazırlanan çözelti Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür. Böylece stok bisoprolol fumarat çözeltisi hazırlanmıştır. Süzöntüden hareketle değişen bilinen konsantrasyonlarda (2.0 – 22.0 μ g/mL) standart çözeltiler hazırlanarak içerisine iç standart stok çözeltisi ilave edilerek gerekli hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan bu standart çözeltiler, Bölüm 2.6.3.1.1.'de anlatıldığı şekilde dengelenmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kaydedilmiştir (her bir çözeltiliden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır) (Şekil 3.1.3.1.). Alınan bu tüm kromatogramlarda aynı integrasyon parametreleri kullanılarak hesaplanan pik alanı/iç standardın pik alanı konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve verilerden hareketle kalibrasyon denklemleri hazırlanmıştır. İstatistiksel veriler Çizelge 3.1.3.1.'de gösterilmiştir.

2.6.3.1.4. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)

2.6.3.1.4.1. Gün İçi Deneyler

Bölüm 2.6.3.1.3.'de belirtildiği gibi iç standart ve stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle, bisoprolol fumarat ve iç standart olarak losartan içerecek üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), ½ ., 1., 1.5., 2., 3., 4., ve 5. saatlerde; Bölüm 2.6.3.1.1. 'de belirtildiği şekilde dengeye gelmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kayıt edilmiştir (her bir çözeltilerden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Elde edilen istatistiksel verileri Çizelge 3.1.3.2.'de verilmiştir.

2.6.3.1.4.1. Günler Arası Deneyler

Bölüm 2.6.3.1.3.'de belirtildiği gibi iç standart ve stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle, bisoprolol fumarat ve iç standart olarak losartan içerecek üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., 4., ve 5. günlerde; Bölüm 2.6.3.1.1. 'de belirtildiği şekilde dengeye gelmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kayıt edilmiştir (her bir çözeltilerden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Elde edilen istatistiksel verileri Çizelge 3.1.3.3.'de verilmiştir.

2.6.3.1.5. % Geri Kazanım Çalışmaları

Kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması sonucu hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.4.'de verilmiştir.

2.6.3.1.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

10.0 mg bisoprolol fumarat içeren 10 tablet tartılarak ortalama bir tablet ağırlıkları saptanmıştır. Daha sonra bu tabletler havanda iyice toz edilmiştir. Elde edilen tablet tozundan, 1 tablet ağırlığına eşdeğer tablet tozu 25 mL 'lik balonjojeye alınmıştır. Balonjojeye yeteri kadar metanol ilave edilmiş ve ultrasonik karıştırıcıda yarım saat boyunca karıştırılmıştır. Süre sonunda bu çözelti sıcaklığının oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve metanol ile hacme tamamlanmıştır. Bu çözelti manyetik karıştırıcıda yarım saat boyunca karıştırılmıştır. Numune Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür. Süzöntüden konsantrasyon aralığı içerisinde olacak kadar süzöntü alınıp içerisine iç standart stok çözeltiden ilave edilmiştir. Su ile hacme tamamlanmıştır. Daha sonra dengelenmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kaydedilmiştir (her bir çözeltiden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Tüm kromatogramlarda aynı integrasyon parametreleri kullanılarak hesaplanan etken maddenin pik alanı/iç standart alanı oranı, doğru denklemine yerine konulmuş; böylece tabletteki bisoprolol fumarat ve miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 3.1.3.5.'de verilmiştir.

2.7. Bisoprolol Fumarat ve Hidroklorotiazit'i Birlikte İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Analiz Yöntemleri

2.7. 1. Spektrum Oranları Birinci Türev UV Spektrofotometri

2.7.1.1. Deneyin Yapılışı

2. 7. 1. 1.1. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

Stok çözeltilerden hareketle bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit değişik konsantrasyonlarda ayrı ayrı bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren çözeltiler hazırlanır ve bu çözeltilerin UV spektrumları çizdirilerek bilgisayarın hafızasına kayıt edilir. İki etken madde içeren preparatlardan miktar tayini yapılmak istenen maddeye göre örneğin bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit 'i birlikte içeren preparattan bisoprolol fumarat'ın miktarı spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri ile tayin edilmek isteniyorsa, hidroklorotiazit'in bölücü olarak kullanılmasıyla spektrum oranları spektrumları elde edilir (Şekil 3.2.2.1.). Bilgisayara kayıt edilen bu spektrumların daha sonra birinci türev UV spektrumları çizdirilir (Şekil 3.2.2.2.) ($\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$). Çizdirilen spektrum oranları birinci türev UV eğrilerinde, bisoprolol fumarat'ın miktar tayini için 244.6 nm'deki spektrum oranları birinci türev absorbans değerleri kayıt edilir. Elde edilen spektrum oranları birinci türev absorbans değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon grafikleri çizilir. Elde edilen bu kalibrasyon grafiklerinde spektrum oranları birinci türev absorbans değerleri ve konsantrasyonlar kullanılarak en küçük kareler yöntemi yardımıyla kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir (Çizelge 3.2.2.1.).

İkili karışım içerisinde bulunan hidroklorotiazit'in miktarı spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometriyle tayin edilmek isteniyorsa, bisoprolol fumarat'ın bölücü olarak kullanılmasıyla elde edilen spektrum oranları spektrumlarının (Şekil 3.2.2.3.) bilgisayara kayıtları yapılır. Daha sonra bilgisayara kayıt edilen bu spektrum oranların birinci türev eğrileri çizdirilir (Şekil 3.2.2.1) ($\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$). Çizdirilen spektrum oranları birinci türev eğrilerinde, hidroklorotiazit'in miktar tayini için 275.8 nm'deki spektrum oranları birinci türev absorbands değerleri kayıt edilir. Elde edilen spektrum oranları birinci türev absorbands değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon grafikleri elde edilir (Çizelge 3.2.2.1.). Kalibrasyon grafiklerinden hareketle kalibrasyon denklemleri hazırlanmaktadır.

2.7.1.1.2. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)

2.7.1.1.2.1. Gün İçi Deneyler

Stok çözeltilerden hareketle, bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), ½ ., 1., 1.5., 2., 3., 4., ve 5. saatlerde; spektrumları alınarak spektrum oranları türev eğrileri çizdirilmiştir. Belirlenen dalga boylarındaki oran türev absorbands değerleri kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak Çizelge 3.2.2.2.'de verilen değerler elde edilmiştir.

2.7.1.1.2.2. Günler Arası Deneyler

Stok çözeltilerden hareketle, bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., 4., ve 5. günlerde; spektrumları

alınarak spektrum oranları türev eğrileri çizdirilmiştir. Belirlenen dalga boylarındaki oran türev absorbans değerleri kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak Çizelge 3.2.2.3.'de verilen değerler elde edilmiştir.

2.7.1. 1. 3. % Geri Kazanım Çalışmaları

Bilinen miktarlarda sentetik olarak bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren ikili karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışımlara yöntem uygulanmıştır. Kalibrasyon denklemleri kullanılarak bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için elde edilen sonuçlar (Çizelge 3.2.2.4.)'de verilmiştir.

2.7.1.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Her biri 2.5 mg bisoprolol fumarat ve 6.25 mg hidroklorotiazit içeren 10 tablet hassas terazide tartılmış ve ortalama tablet ağırlığı bulunmuştur. Tartılan tabletler porselen bir havan içerisinde iyice toz edilmiştir. Bir tablet ağırlığına eşdeğer tablet tozu hassas terazide tartılarak 25 mL'lik balonjoeye yeteri kadar metanol ilave edilerek alınmıştır. Bu çözelti önce ultrasonik banyoda 10 dakika kadar tutulmuştur. Daha sonra metanolle 25 mL'ye tamamlanmıştır. 25 mL'lik balon joenin içine magnet atılarak magnetik karıştırıcıda 20 dakika kadar karıştırılmıştır. Karışım Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür. Elde edilen süzöntülerden çalışma aralığı içerisinde olacak şekilde dilüsyonlar yapılmıştır. Belirlenen dalga boyu aralığında spektrumlar alınarak yöntem uygulanmıştır. Saptanan dalga boylarında absorbans değerleri okunarak bu değerler kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak, her bir tabletteki bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit miktarları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.2.2.5.'te verilmiştir.

2.7.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

2.7.2.1. Deneyin Yapılışı

2.7.2.1.1. Ortam Koşullarının Ayarlanması

Sabit faz olarak C₁₈ kolonu ve hareketli faz olarak ise asetonytril, su ve metanol'den oluşan karışım ile izokratik ayırım yapılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz seçiminde farklı oranlar ve farklı fazlar denenmiş olup en uygun olan hareketli fazın asetonytril:su:metanol (20:60:20 h/h/h) karışımının olduğu tespit edilmiştir. Hareketli faz olarak seçilmiştir. Hazırlanan bu hareketli faz, kolon sıcaklığı 20-50°C arasında değiştirilerek farklı sıcaklıklarda denenmiş ve; en uygun sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir. Etken maddenin 200.0–260.0 nm’lerde çizdirilen spektrumları incelenerek maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boyu 230.0 nm olarak belirlenmiştir. Bu dalga boyunda çalışılmaya karar verilmiştir. İç standart olarak çalışmalarımızda losartan kullanılmıştır. Geliştirdiğimiz yöntemde bisoprolol fumarat, hidroklorotiazit ve iç standartın birbirinden ayrılmasına ve kolon basıncının 200 bar’ı geçmemesine dikkat ederek, hareketli faz kolondan farklı akış hızlarında geçirilmiş ve en uygun akış hızının 0.5 mL/dak. olduğuna karar verilmiştir.

2.7.2.1.2. Kromatografik Koşullar

Cihaz : HP 1100 Series ,yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

Kolon : Supelcosil BDS C₁₈ ,15 x 4.6 mm, 5µ

Hareketli Faz: asetonytril-su-metanol (20:60:20, h/h/h).

Akış Hızı: 0.5 mL/dak.

Enjeksiyon Hacmi: 5.0 µL

Kolon Sıcaklığı: 25⁰C

Dalga Boyu: 230.0 nm

Çalışmalarımızdan önce kromatografik koşullar ayarlandıktan sonra hareketli faz 0.5 mL/dak. akış hızıyla iki saat boyunca kolondan geçirilerek kolonun dengeye getirilmesi sağlanmıştır.

2.7.2.1.3. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

İç standart olarak, losartanın metanoldeki 0.2 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür.

Yaklaşık 25.0 mg bisoprolol fumarat ve 25.0 mg hidroklorotiazit standartları ayrı ayrı tartılarak, 100 mL'lik balonjojeye konulmuştur. 10 mL metanol konularak bir süre ultrasonik banyoda tutulmuştur. Yine metanolla hacme tamamlanmıştır (bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit konsantrasyonu 250 µg/mL). Hazırlanan çözelti Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür. Böylece stok bisoprolol fumarat stok çözeltisi hazırlanmıştır. Süzöntüden hareketle değişen bilinen konsantrasyonlarda bisoprolol fumarat için (2.0 – 22.0 µg/mL) ve hidroklorotiazit için (2.0 – 22.0 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanarak içerisine iç standart stok çözeltisi ilave edilerek gerekli hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan bu standart çözeltiler, Bölüm 2.7.3.1.1.'de anlatıldığı şekilde dengelenmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kaydedilmiştir (her bir çözeltilerden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır) (Şekil 3.2.3.1.). Alınan bu tüm kromatogramlarda aynı integrasyon parametreleri kullanılarak hesaplanan pik alanı/iç standardın pik alanı oranları konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve verilerden hareketle kalibrasyon denklemleri hazırlanmıştır. İstatistiksel veriler Çizelge 3.2.3.1.'da gösterilmiştir.

2.7.2.1.4. Tekraredilebilirliğin Araştırılması (Gün içi ve Günler Arası Deneyler)

2.7.2.1.4.1. Gün İçi Deneyler

Bölüm 2.7.3.1.3.'de belirtildiği gibi iç standart ve stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle, bisoprolol fumarat, hidroklorotiazit ve iç standart olarak losartan içerecek üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), ½ ., 1., 1.5., 2., 3., 4., ve 5. saatlerde; Bölüm 2.7.3.1.1. 'de belirtildiği şekilde dengeye gelmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kayıtedilmiştir (her bir çözeltiden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Elde edilen istatistiksel verileri Çizelge 3.2.3.2.'de verilmiştir.

2.7.2.1.4.1. Günler Arası Deneyler

Bölüm 2.7.3.1.3.'de belirtildiği gibi iç standart ve stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle, bisoprolol fumarat, hidroklorotiazit ve iç standart olarak losartan içerecek üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., 4., ve 5. günlerde; Bölüm 2.7.3.1.1. 'de belirtildiği şekilde dengeye gelmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kayıtedilmiştir (her bir çözeltiden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Elde edilen istatistiksel verileri Çizelge 3.2.3.3.'de verilmiştir.

2.7.2.1.5. % Geri Kazanım Çalışmaları

Bilinen miktarlarda sentetik olarak bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren ikili karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışımlara yöntem uygulanmıştır. Kalibrasyon denklemleri kullanılarak bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için elde edilen sonuçlar (Çizelge 3.2.3.4.)’de verilmiştir.

2.7.2.1.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

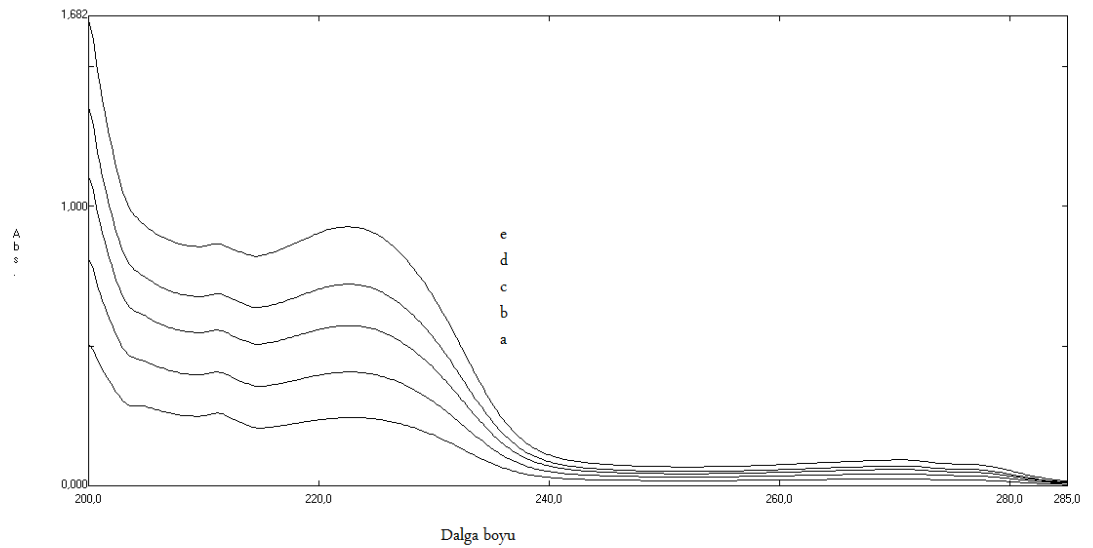
Her biri 2.5 mg bisoprolol fumarat ve 6.25 mg hidroklorotiazit içeren 10 tablet hassas terazide tartılır ve ortalama tablet ağırlığı bulunur. Tartılan tabletler porselen bir havan içerisinde iyice toz edilir. Bir tablet ağırlığına eşdeğer tablet tozu hassas terazide tartılarak 25 mL’lik balonjojeye yeteri kadar metanol ilave edilerek alınmıştır. Bu çözelti önce ultrasonik banyoda 10 dakika kadar tutulur. Daha sonra metanolle 25 mL’ye tamamlanır. 25 mL’lik balon jojenin içine magnet atılarak magnetik karıştırıcıda 20 dakika kadar karıştırılmıştır. Karışım Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür. Süzöntüden konsantrasyon aralığı içerisinde olacak kadar süzöntü alınıp içerisine iç standart stok çözeltiden ilave edilmiştir. Su ile 25 mL’ye tamamlanmıştır. Daha sonra dengelenmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kayıt edilmiştir (her bir çözeltiden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Tüm kromatogramlarda aynı integrasyon parametreleri kullanılarak hesaplanan etken maddenin pik alanı/iç standart alanı, doğru denkleminde yerine konularak; böylece tabletteki bisoprolol fumarat ve miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 3.2.3.5.’de verilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Sadece Bisoprolol Fumarat İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Analiz Bulguları

3.1.1. Doğrudan UV Spektrofotometri

Şekil 3.1.1.1.'de bisoprolol fumarat'ın metanoldeki farklı konsantrasyonlarda UV spektrumları gösterilmiştir.



Şekil 3.1.1.1. Standart Bisoprolol fumarat'ın metanoldeki a) 6.0µg/mL; b) 10.0 µg/mL ; c) 14.0 µg/mL; d) 18.0 µg/mL; e) 22.0 µg/mL'lik konsantrasyonlarına ait UV spektrumları

Hazırlanan standart bisoprolol fumarat çözeltileri kullanılarak elde edilen UV spektrumlarından maksimum absorbansın olduğu 224.6 nm'de okunan absorbans değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiş ve Çizelge 3.1.1.1. 'de kalibrasyon grafikleri denklem verileri elde edilmiştir.

Yakalama sınırı ve tayin alt sınırları şu formüller ile hesaplanmıştır (Sarby ve ark., 2000);

$$\text{Yakalama Sınırı} = 3SS/m$$

$$\text{Tayin Alt Sınırı} = 10SS/m$$

Burada m , kalibrasyon denkleminin eğimi; SS , kesimin standart sapmasıdır.

Çizelge 3.1.1.1. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntem ile bisoprolol fumarat için elde edilen kalibrasyon grafik denklem verileri (n=5)

$\lambda(\text{nm})$	m	n	r	Çalışma Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	YS ($\mu\text{g/mL}$)	TAS ($\mu\text{g/mL}$)
224.6	0.0406	-0.0036	0.9983	2.0-22.0	0.008	0.027

λ : Dalga boyu

m : Kalibrasyon grafiğinin eğimi

n : Kalibrasyon grafiğinin y-eksenini kestiği nokta

r : Korelasyon katsayısı

YS: Yakalama sınırı

TAS: Tayin alt sınırı

Yöntemin kesinliğinin araştırılması için sadece bisoprolol fumarat içeren standart çözeltiden hareketle yapılan gün içi ve günler arası deneysel bulguları Çizelge.3.1.1.2.ve 3.1.1.3. verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.2. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemiyle yapılan bisoprolol fumarat için gün içi deney sonuçları (λ :224.6 nm)

Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Süre	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	BH (%)	SS	BSS (%)
15.30	0.saat	15.25	0.327	0.035	0.231
	15.dak.	15.22	0.525	0.056	0.370
	30. dak.	15.19	0.724	0.077	0.510
	45.dak.	15.25	0.327	0.035	0.231
	1. saat	15.15	0.990	0.106	0.696
	1.5.saat	15.13	1.123	0.120	0.790
	2.saat	15.25	0.327	0.035	0.231
	3.saat	15.25	0.327	0.035	0.231
	4.saat	15.17	0.856	0.091	0.603
	5.saat	15.22	0.525	0.056	0.370

BH: Bağıl hata

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma

Çizelge 3.1.1.3. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemiyle yapılan bisoprolol fumarat için günler arası deney sonuçları (λ :224.6 nm)

Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Süre (gün)	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	BH (%)	SS	BSS (%)
15.30	1.	15.50	1.31	0.01	0.93
	2.	15.70	2.59	0.02	1.86
	3.	15.40	0.66	0.03	0.46
	4.	15.19	0.67	0.01	0.47
	5.	15.30	0.00	0.00	0.00

BH: Bağıl hata

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için % geri kazanım deneyleri sonuçları hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.4. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım değerleri ile elde edilen analiz sonuçları (n=5) (λ :224.6nm)

Numune No	Konulan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
1	2.40	2.32	96.7
2	6.40	6.31	98.6
3	10.40	10.08	96.9
4	18.40	18.44	100.2
5	20.80	20.92	100.6
X_{ort}			98.6
SS			1.82
BSS(%)			1.84

X_{ort} : Ortalama

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma (%)

Yöntem etken maddeyi tek başına içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.5. 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.1.5. Bisoprolol fumaratı tek başına içeren CONCOR® tablete ait UV spektrofotometrik yöntem uygulanması sonucunda elde edilen tablet sonuçları (Tabletin üzerinde yazılı miktar 10 mg/tab.'dir.) (λ : 224.6 nm)

Numune No	mg/Tablet
1	9.94
2	9.89
3	10.00
4	10.04
5	10.02
X_{ort}	9.98
SS	0.06
p :0.05 için GA	9.98±0.008

X_{ort} : Ortalama

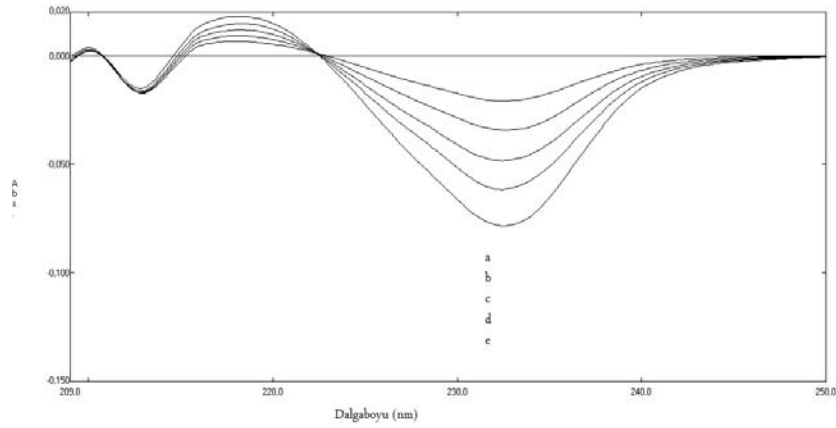
SS: Standart sapma

p: Hata (0.05)

GA: Güven aralığı ($X_{ort} \pm t.SS/\sqrt{n}$; mg/tablet; t:tablodaki teorik t değeri)

3.1.2. Birinci Türev UV Spektrofotometri

Standart bisoprolol fumarat içeren çözeltilerden hareketle alınan doğrudan UV spektrumlarının birinci türev eğrileri alınmış ve spektrumlar Şekil 3.1.2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1.2.1. Standart bisoprolol fumarat’ın metanol içerisindeki a) 6.0 µg/mL; b)10.0 µg/mL ; c)14.0 µg/mL d) 18.0 µg/mL ve e)22.0 µg/mL’lik konsantrasyonlarına ait birinci türev UV spektrumları

Birinci Türev UV spektrumunda, elde edilen türev eğrilerinin 232.6 nm’lerdeki türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerlerinin, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi elde edilen kalibrasyon grafik denklem verileri Çizelge 3.1.2.1. ’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.2.1. Birinci türev UV spektrofotometri ile bisoprolol fumarat'ın elde edilen kalibrasyon grafik verileri (λ :232.6 nm, n=5)

λ (nm)	m	n	r	Çalışma Aralığı (μ g/mL)	YS (μ g/mL)	TAS (μ g/mL)
232.6	-3×10^{-4}	9×10^{-6}	0.9995	2.0-22.0	0.013	0.043

λ : Dalga boyu

m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

n: Kalibrasyon grafiğinin y-eksenini kestiği nokta

r: Katsayısı

YS: Yakalama sınırı

TAS: Tayin alt sınırı

Yöntemin kesinliğinin araştırılması için sadece bisoprolol fumarat içeren standart çözeltilerden hareketle yapılan gün içi ve günler arası deneysel bulguları Çizelge.3.1.2.2.ve 3.1.2.3. verilmiştir.

Çizelge 3.1.2.2. Birinci Türev UV Spektrofotometrik yöntemiyle yapılan bisoprolol fumarat için gün içi deney sonuçları (λ :232.6 nm)

Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Süre	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Bağıl Hata (%)	SS	BSS (%)
15.30	0.saat	15.29	0.038	0.004	0.027
	15.dak.	15.17	0.813	0.087	0.568
	30. dak.	15.05	1.601	0.170	1.110
	45.dak.	15.29	0.038	0.004	0.027
	1. saat	15.05	1.601	0.170	1.110
	1.5.saat	15.11	1.206	0.128	0.839
	2.saat	15.29	0.038	0.004	0.027
	3.saat	15.29	0.038	0.020	0.785
	4.saat	15.27	0.192	0.033	0.243
	5.saat	15.25	0.308	0.170	1.110

BH: Bağıl hata

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma

Çizelge 3.1.2.3. Birinci Türev UV Spektrofotometrik yöntemiyle yapılan bisoprolol fumarat için günler arası deney sonuçları (λ :232.6 nm)

Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Süre (gün)	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Bağıl Hata (%)	SS	BSS (%)
15.30	1.	15.50	1.31	0.01	0.93
	2.	15.60	1.96	0.02	1.40
	3.	15.50	1.31	0.01	0.93
	4.	15.40	0.66	0.01	0.46
	5.	14.99	2.04	0.02	1.42

BH: Bağıl hata

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için % geri kazanım deneyleri sonuçları hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.2.4. 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1.2.4. Birinci Türev UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım değerleri ile elde edilen analiz sonuçları (n=5) (λ :232.6 nm)

Numune No	Konulan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
1	2.40	2.36	98.5
2	6.40	6.34	99.2
3	10.40	10.04	96.6
4	18.40	18.31	99.6
5	20.80	21.08	101.4
X_{ort}			99.1
SS			1.74
BSS(%)			1.75

X_{ort} : Ortalama

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma (%)

Birinci Türev UV spektrofotometri bisoprolol fumaratı tek başına içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.2.5 . de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.2.5. Bisoprolol Fumaratı tek başına içeren CONCOR® tablet'e Birinci Türev UV spektrofotometrik yöntem uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 10.0 mg/tab. 'dir. (λ :232.6 nm)

Numune No	mg/Tablet
1	10.01
2	10.01
3	10.01
4	10.62
5	9.71
X_{ort}	10.07
SS	0.33
p :0.05 için GA	10.07±0.045

X_{ort} : Ortalama

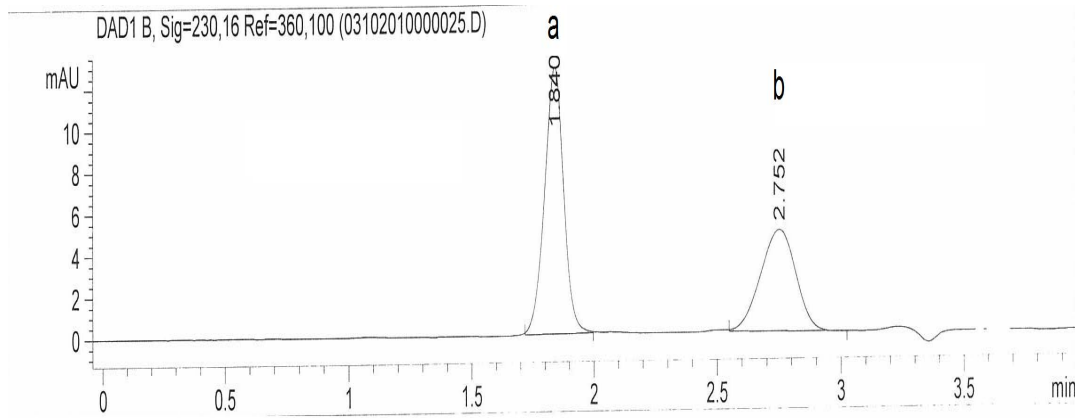
SS: Standart sapma

p: Hata (0.05)

GA: Güven aralığı ($X_{ort} \pm t.SS/\sqrt{n}$; mg/tablet; t:tablodaki teorik t değeri)

3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Standart bisoprolol fumarat ve iç standart olarak kullanılan losartan içeren çözelti kullanılarak alınan kromatogram Şekil 3.1.3.1. gösterilmiştir.



Şekil 3.1.3.1. Bisoprolol fumarat'ın (a) metanoldeki 14.0 µg/mL 'lik ve losartan (b) 2.0 µg/mL'lik çözeltisine ait kromatogram

DAD dedektör kullanılarak 230.0 nm dalga boyunda kaydedilen kromatogramlarda bisoprolol fumarat'a ait pik alanları losartana ait pik alanlarına bölünmüş istatistiksel olarak kalibrasyon grafikleri ve kalibrasyon denklem verileri Çizelge 3.1.3.1. verilmiştir.

Çizelge 3.1.3.1. Bisoprolol için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem ile elde edilen kalibrasyon verileri (n=6)

m	n	r	Çalışma Aralığı (µg/mL)	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
0.0809	0.0536	0.9903	2.0-22.0	0.211	0.703

λ: Dalga boyu

m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

n: Kalibrasyon grafiğinin y eksenini kestiği nokta

r: Korelasyon katsayısı

YS: Yakalama sınırı

TAS: Tayin alt sınırı

Yüksek performanslı sıvı kromatografide yöntem kesinliği için yapılan gün içi ve günler arası deneylerin sonuçları Çizelge 3.1.3.2. ve 3.1.3.3. 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemle yapılan bisoprolol fumarat için gün içi deney sonuçları

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre (saat)	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH (%)	SS	BSS (%)
18.20	0.	18.22	0.10	0.01	0.01
	0.5.	18.34	0.76	0.09	0.54
	1.	18.36	0.87	0.11	0.61
	1.5.	18.20	0.00	0.00	0.00
	2.	18.33	0.70	0.09	0.50
	3.	18.27	0.38	0.04	0.27
	4.	18.23	0.16	0.02	0.11
	5.	18.21	0.05	0.01	0.03

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma (%)

BH: Bağıl hata (%)

Çizelge 3.1.3.3. Bisoprolol fumarat için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemiyle yapılan günler arası deney sonuçları

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre (saat)	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH (%)	SS	BSS (%)
18.20	1.	18.25	0.27	0.03	0.19
	2.	18.28	0.43	0.05	0.31
	3.	18.26	0.32	0.04	0.23
	4.	17.97	1.27	0.16	0.89
	5.	17.95	1.39	0.17	0.97

BH: Bağıl hata

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik yöntem doğruluğunun belirlenmesi için laboratuvar şartlarında sentetik olarak hazırlanan çözeltilerden hareketle yapılan % geri kazanım çalışma sonuçları Çizelge 3.1.3.4. verilmiştir.

Çizelge 3.1.3.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemiyle bulunan % geri kazanım analiz sonuçları (n=5)

Numune No	Konulan Miktar (µg/mL)	Bulunan Miktar (µg/mL)	Geri Kazanım %
	Bisoprolol	Bisoprolol	Bisoprolol
1	2.20	2.20	100.1
2	6.20	6.25	100.9
3	10.20	10.17	99.8
4	18.20	18.21	100.1
5	21.20	21.22	100.1
X _{ort}			100.2
SS			0.41
BSS(%)			0.41

Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminin tek başına bisoprolol fumarat içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.1.3.5. gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.3.5. Bisoprolol Fumaratı tek başına içeren CONCOR® tablet'e yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminin uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (λ : 230.0 nm)

Numune No	mq/Tablet
1	10.05
2	10.04
3	9.98
4	9.81
5	9.94
X_{ort}	9.97
SS	0.09
p :0.05 için GA	9.97±0.12

SS: Standart sapma

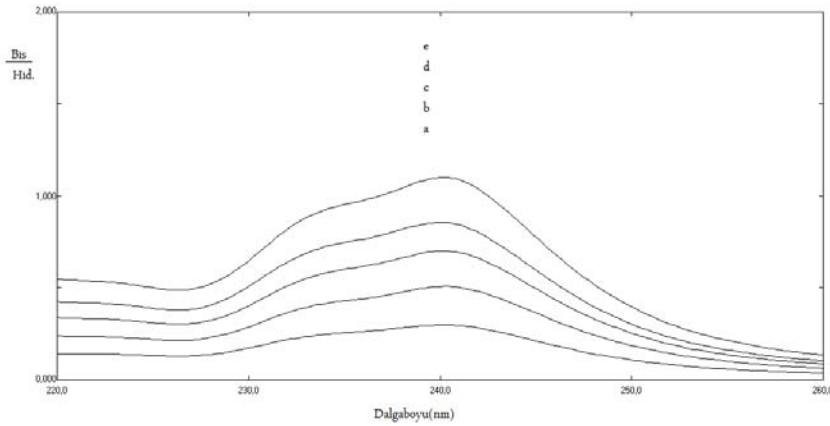
p: Hata (0.05)

GA: Güven aralığı ($C_{ort} \pm t.SS/\sqrt{n}$; mq/tablet; t:tablodaki teorik t değeri, n:deney sayısı)

3.2. Bisoprolol fumarat ve Hidroklorotiazit İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Analiz Bulguları

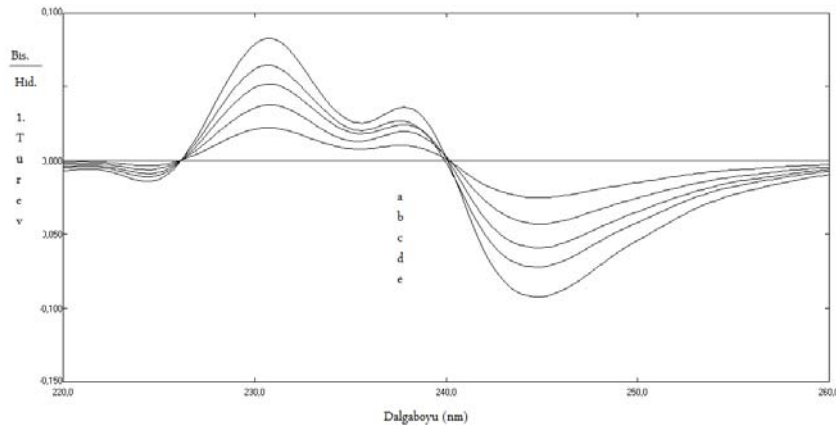
3.2. 1. Spektrum Oranları Birinci Türev UV Spektrofotometri

Spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri ile bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit'i birlikte içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayini için bisoprolol fumarat'ın miktar tayini için bölücü olarak hidroklorotiazit'in kullanılmasıyla elde edilen oran spektrumları Şekil 3.2.2.1 'de gösterilmiştir. Oran spektrumlarının bilgisayarlar yardımıyla elde edilen türev eğrileri ise Şekil 3.2.2.2 ' de gösterilmiştir.



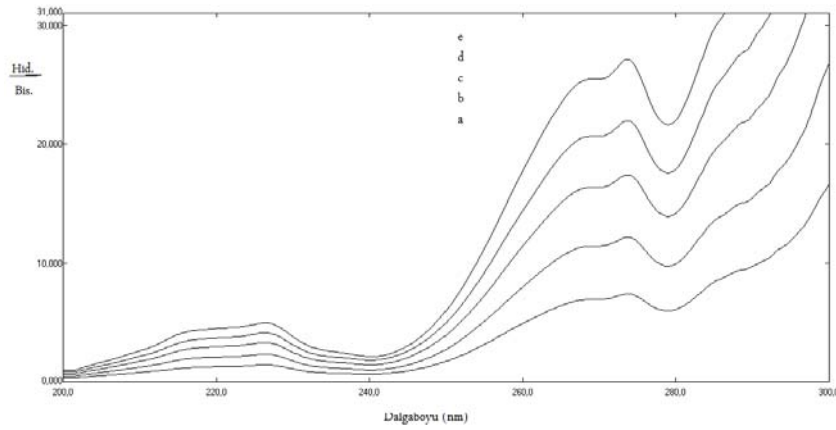
Şekil 3.2.2.1. Standart bisoprolol fumarat'ın metanol içerisindeki

- a) 6.0 µg/mL; b) 10.0 µg/mL; c) 14.0 µg/mL; d) 18.0 µg/mL;
e) 22.0 µg/mL'lik oran spektrumları bölücü hidroklorotiazit konsantrasyonu 14.0 µg/mL ($\Delta\lambda = 6$ nm)

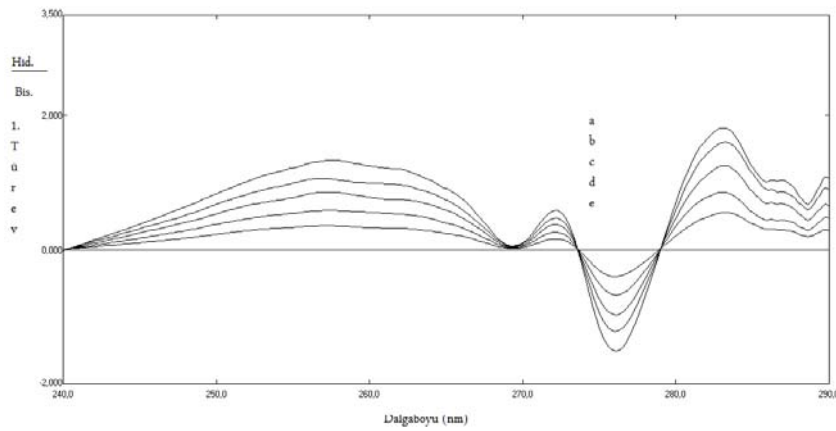


Şekil 3.2.2.2. Standart bisoprolol fumarat'ın metanol içerisindeki a) 6.0 µg/mL; b) 10.0 µg/mL; c) 14.0 µg/mL; b) 18.0 µg/mL; c) 22.0 µg/mL'lik oran spektrumları birinci türev UV eğrileri bölücü hidroklorotiazit konsantrasyonu 14.0 µg/mL ($\Delta\lambda = 6$ nm)

Karışım içerisinde yer alan diğer etken madde olan hidroklorotiazit'in miktar tayini için bisoprolol fumarat'ın bölücü olarak kullanılmasıyla elde edilen oran spektrumları Şekil 3.2.2.3 ve bu oran spektrumları kullanılarak elde edilen birinci türev spektrumları Şekil 3.2.2.4'de gösterilmiştir.



Sekil 3.2.2.3. Standart hidroklorotiazit'in metanol içerisindeki a) 2.0 µg/mL; b)6.0 µg/mL; c) 10.0 µg/mL ' lik oran spektrumları bölücü bisoprolol fumarat konsantrasyonu 14.0 µg/mL ($\Delta\lambda= 6$ nm)



Sekil 3.2.2.4. Standart hidroklorotiazit'in metanol içerisindeki a) 2.0 µg/mL; b)6.0 µg/mL; c) 10.0 µg/mL ' lik oran spektrumlarının birinci türev eğrileri bölücü bisoprolol fumarat konsantrasyonu 14.0 µg/mL ($\Delta\lambda= 6$ nm)

Yöntemde bisoprolol fumarat'ın miktar tayini için 244.6 nm'deki spektrum oranları birinci türev absorbens değerlerinden hidroklorotiazit için ise 275.8 nm'deki spektrum oranları birinci türev absorbens değerlerinden yararlanılarak hazırlanan kalibrasyon grafik verileri Çizelge 3.2.2.1 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.2.1. Karışım halinde bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit miktar tayini için bulunan spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri için kalibrasyon grafik verileri (n=5)

	m	n	r	Çalışma Aralığı (µg/mL)	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
244.6	-0.0041	-0.0013	0.9978	2.0-22.0	0.102	0.340
275.8	-0.0674	-0.0013	0.9996	2.0-22.0	0.098	0.326

Spektrum oranları 1. Türev UV spektrofotometride kesinliğin tayini için yapılan gün içi ve günler arası deneylerin sonuçları Çizelge 3.2.2.2. ve 3.2.2.3.'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.2.2.2. Spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrik yöntemde bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit standartlarının gün içi çalışmalarının sonuçları

Konulan Miktar (µg/mL)		Süre	Bulunan Miktar (µg/mL)		BH (%)		SS		BSS (%)	
Bis.	Hid.		Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.
244.6 nm	275.8 nm		244.6 nm	275.8 nm	244.6 nm	275.8 nm	244.6 nm	275.8 nm	244.6 nm	275.8 nm
15.30	12.30	15.dak.	15.17	12.79	0.813	0.43	0.087	0.07	0.568	0.30
		30. dak.	15.05	12.22	1.601	0.60	0.170	0.09	1.110	0.42
		45.dak.	15.29	12.83	0.038	0.12	0.004	0.02	0.027	0.09
		1. saat	15.05	12.19	1.601	0.82	0.170	0.13	1.110	0.57
		1.5.saat	15.11	12.28	1.206	0.12	0.128	10.02	0.839	0.09
		2.saat	15.29	12.28	0.038	0.12	0.004	0.02	0.027	0.09
		3.saat	15.29	12.30	0.038	0.00	0.020	0.00	0.785	0.00
		4.saat	15.27	12.32	0.192	0.17	0.033	0.02	0.243	0.12
		5.saat	15.25	12.32	0.308	0.17	0.170	0.02	1.110	0.12

Çizelge 3.2.2.3. Spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrik yöntemde bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit standartlarının günler arası çalışmaların sonuçları

Konulan Miktar (µg/mL)		Süre (gün)	Bulunan Miktar (µg/mL)		BH (%)		SS		BSS (%)	
Bis.	Hid.		Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.
244.6 nm	275.8 nm		244.6 nm	275.8 nm	244.6 nm	275.8 nm	244.6 nm	275.8 nm	244.6 nm	275.8 nm
15.30	12.30	1.	15.81	12.37	3.22	0.56	0.03	0.04	2.31	0.40
		2.	15.60	12.37	1.96	0.56	0.02	0.04	1.40	0.40
		3.	15.50	12.35	1.31	0.40	0.01	0.03	0.93	0.28
		4.	15.40	12.33	0.66	0.24	0.01	0.02	0.46	0.17
		5.	14.99	12.30	2.04	0.00	0.02	0.00	1.42	0.00

Spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrinin sentetik olarak hazırlanan karışımlara uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.2.4 - 3.2.2.5 'de gösterilmiştir .

Çizelge 3.2.2.4. Sentetik olarak hazırlanan bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit karışımlarına yöntemin uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları (244.6 nm 'deki spektrum oranları birinci türev absorbands değerleri kullanılmıştır.) (n=5)

	Bisoprolol			Hidroklorotiazit
Numune No	Konulan Kons. (µg/mL)	Bulunan Kons. (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Konulan Kons. (µg/mL)
1	14.00	13.87	99.10	2.00
2	14.00	14.02	100.1	6.00
3	14.00	13.85	98.9	10.00
4	14.00	13.90	99.3	14.00
5	14.00	14.00	100.0	22.00
X_{ort}			99.5	
SS			0.54	

Çizelge 3.2.2.5. Sentetik olarak hazırlanan bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit karışımlarına yöntemin uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları (275.8 nm 'deki spektrum oranları birinci türev UV absorbands değerleri kullanılmıştır.) (n=5)

	Hidroklorotiazit			Bisoprolol fumarat
Numune No	Konulan Kons. (µg/mL)	Bulunan Kons. (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Konulan Kons. (µg/mL)
1	17.20	17.20	100.0	2.00
2	17.20	17.22	100.1	6.00
3	17.20	17.22	100.1	10.00
4	17.20	17.26	100.3	14.00
5	17.20	17.33	100.8	18.00
X_{ort}			100.2	
SS			0.32	

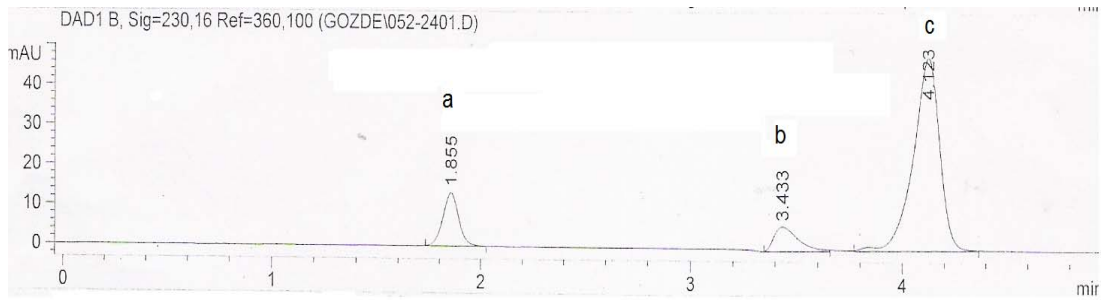
Spektrum oranları birinci türev spektrofotometride bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit'i birlikte içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.2.6 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.2.6. Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren farmasötik preparata spektrum oranları birinci türev spektrofotometrinin uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları. (Lodoz® tablet üzerinde yazılan miktar; bisoprolol fumarat 2.5 mg/tablet, hidroklorotiazit 6.25 mg/tablet) (n=5)

Numune No	Bisoprolol (mg/Tablet)	Hidroklorotiazit (mg/Tablet)
	244.6 nm	275.8 nm
1	2.47	6.16
2	2.41	6.21
3	2.50	6.23
4	2.51	6.25
5	2.52	6.25
X_{ort}	2.48	6.22
SS	0.04	0.03
(p= 0.05 için) GA	2.48±0.05	6.22±0.04

3.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Standart bisoprolol fumarat, standart hidroklorotiazit ve iç standart olarak kullanılan losartan içeren çözeltiler kullanılarak alınan kromatogram Şekil 3.2.3.1. gösterilmiştir.



Şekil 3.2.3.1. Bisoprolol fumarat'ın (a) metanoldeki 10.0 $\mu\text{g/mL}$, Hidroklorotiazit (c) 'in 14.0 $\mu\text{g/mL}$ 'lik ve losartan (b) 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 'lik metanoldeki çözeltilerine ait kromatogram

DAD dedektör kullanılarak 230.0 nm dalga boyunda kaydedilen kromatogramlarda bisoprolol fumarat, hidroklorotiazit 'e ait pik alanları ayrı ayrı losartana ait pik alanlarına bölünmüş istatistiksel olarak kalibrasyon grafikleri ve kalibrasyon denklem verileri Çizelge 3.2.3.1. verilmiştir.

Çizelge 3.2.3.1. Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemle elde edilen kalibrasyon verileri (n=6)

	m	n	r	Çalışma Aralığı (µg/mL)	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
Bis.	0.0536	0.0809	0.9903	2.0-22.0	0.161	0.537
Hid.	0.133	0.6597	0.9996	2.0-22.0	0.081	0.270

λ: Dalga boyu

m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

n: Kalibrasyon grafiğinin y-eksenini kestiği nokta

r: Korelasyon katsayısı

YS: Yakalama sınırı

TAS: Tayin alt sınırı

Yüksek Performanslı sıvı kromatografide yöntem kesinliği için yapılan gün içi ve günler arası deneylerin sonuçları Çizelge 3.2.3.2. ve 3.2.3.3. 'da özetlenmiştir.

Çizelge 3.2.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit standartlarının gün içi çalışmalarının sonuçları (λ : 230.0 nm)

Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)		Süre	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)		BH (%)		SS		BSS (%)	
Bis.	Hid.		Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.
18.20	17.00	0.saat	18.22	16.98	0.10	0.11	0.01	0.01	0.01	0.08
		1. saat	18.34	16.91	0.76	0.53	0.09	0.06	0.54	0.37
		1.5.saat	18.36	16.95	0.87	0.29	0.11	0.03	0.61	0.20
		2.saat	18.20	16.96	0.00	0.23	0.00	0.02	0.00	0.16
		3.saat	18.33	16.75	0.70	1.49	0.09	0.17	0.50	1.04
		4.saat	18.27	16.92	0.38	0.47	0.04	0.05	0.27	0.33
		5.saat	18.23	16.74	0.16	1.55	0.02	0.18	0.11	1.08

BH: Bağıl hata

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma (%)

Çizelge 3.2.3.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde bisoprolol ve hidroklorotiazit standartlarının günler arası çalışmalarının sonuçları (λ : 230.0 nm)

Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)		Süre (gün)	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)		BH (%)		SS		BSS (%)	
Bis.	Hid.		Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.
18.20	17.00	1.	18.25	16.94	0.27	0.35	0.03	0.04	0.19	0.25
		2.	18.28	17.13	0.43	0.75	0.05	0.09	0.31	0.53
		3.	18.26	16.96	0.32	0.23	0.04	0.02	0.23	0.16
		4.	17.97	16.89	1.27	0.65	0.16	0.07	0.89	0.45
		5.	18.25	16.85	0.27	0.89	0.03	0.10	0.19	0.62

BH: Bağıl hata

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma (%)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için laboratuvar şartlarında sentetik olarak hazırlanan çözeltilerden hareketle yapılan % geri kazanım çalışma sonuçları Çizelge 3.2.3.4.verilmiştir.

Çizelge 3.2.3.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi ile % geri kazanım çalışması sonuçları

Numune No	Konulan Miktar (µg/mL)		Bulunan Miktar (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.
1	3.40	2.40	3.40	2.41	100.1	100.4
2	5.20	7.60	5.24	7.65	100.9	100.7
3	11.20	12.40	11.17	12.47	99.8	100.5
4	17.10	17.50	17.12	17.48	100.1	99.9
5	17.60	21.50	17.61	21.79	100.1	101.4
X_{ort}					100.2	100.6
SS					0.41	0.54
BSS(%)					0.41	0.54

Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit'i birlikte içeren iki etken maddeli farmasötik preparata yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi uygulandığında elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.2.3.5. gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.3.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemin farmasötik preparata uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları (LODOZ 2.5 mg bisoprolol fumarat ve 6.25 mg hidroklorotiazit /tablet) (dalga boyu: 230.0 nm)

Bulunan miktarlar (mg/tablet)	
Bis.	Hid.
2.49	6.27
2.45	6.14
2.51	6.13
2.48	6.29
2.53	6.25
X _{ort} 2.49	6.22
SS: 0.02	0.47
p=0.05 için GA 2.49±0.33	6.21±0.65

TARTIŞMA

Çağımızın hastalığı halinde olan hipertansiyon tedavisi için kullanılan ilaçların sayısı her geçen gün büyük bir hızla artmaktadır. Yüksek lisans tezimiz kapsamında hipertansiyon tedavisinde kullanılan bisoprolol fumarat içeren farmasötik preparatlar üzerinde rutin kullanıma uygun kantitatif analiz yöntemleri geliştirmeyi amaçladık. Bu amaç çerçevesinde iki farklı formülasyon seçerek gerek spektrofotometrik gerek yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirdik. Çalışmalara başlamadan önce yaptığımız kaynak taraması sırasında bisoprolol fumaratı tek başına içeren farmasötik preparatlarda etken madde tayinine yönelik oldukça sınırlı sayıda kaynağa rastladık. Hidroklorotiazit için yapılan kaynak taramasında ise oldukça fazla kaynak bulunduğunu tespit ettik bu kaynaklardan sadece 2005 senesinden sonra olanları seçtik.

Bisoprolol fumarat etken maddesi Sandoz İlaç San. ve Tic. A.Ş. 'den tedarik edilmiştir. Analizlere başlarken ilk olarak etken maddelerin kolay çözüldüğü çözücü tespit edilmiş ve metanol seçilmiştir.

Tez kapsamında ilk olarak bisoprolol fumarat adlı etken maddeyi tek başına içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayini için doğrudan UV yöntemi incelenmiştir. Bisoprolol fumarat'ın metanolde hazırlanan çözeltilerinin çalışma aralığı 2.0-22.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Hazırlanan bu farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler Shimadzu UV 1601 spektrofotometrede 200-285 nm arasındaki spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 3.1.1.1.). UV spektrumlar incelendiğinde maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boyu 224.6 nm olarak kaydedilmiştir. Hazırlanan standart çözeltilerinin konsantrasyon değerlerine karşı okunan maksimum absorbans değerleri x-y kalibrasyon grafiğine yerleştirilmiştir. Bu kalibrasyon grafikten yararlanılarak bir kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. (Çizelge 3.1.1.1). 224.6 nm'ler için hesaplanan yakalama sınırı 0.008 µg/mL ve tayin alt sınırının 0.027 µg/mL gibi küçük olmaları, ve kalibrasyon denklemlerinden elde edilen korelasyon

katsayılarının da 1'e yakın olması geliştirilen yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir. Yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmış olup sonuçlar Çizelge 3.1.2.2. ve 3.1.2.3. 'de verilmiştir. Tez kapsamında bisoprolol fumaratı tek başına içeren preparatlarda etken madde miktar tayini için geliştirdiğimiz yöntemin % geri kazanım çalışması kapsamında ortalama % geri kazanım değeri %98.6 standart sapma değeri ise 1.82 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1.2.4.).

Çizelge 4.1. Bisoprolol fumarat için kullanılan yöntemlerin sonuçları

	Doğrudan UV Spekt.	Birinci Türev UV Spekt.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
Çalışılan Dalga Boyu (nm)	224.6	232.6	230.0
Çalışma Denklemi (y=mx+n)	$y=0.0406x-3.6 \times 10^{-3}$	$y=-0.0003x+9 \times 10^{-6}$	$y=0.089+0.0536$
Çalışma Aralığı (µg/mL)	2.0-22.0	2.0-22.0	2.0-22.0
Yakalama Sınırı (µg/mL)	0.008	0.013	0.211
Tayin Alt Sınırı (µg/mL)	0.027	0.043	0.703
%Geri Kazanım	98.6	100.4	100.2
Korelasyon katsayısı	0.9997	0.9995	0.9989
Tablet ortalamaları (mg/tablet)	9.98±0.008	10.07±0.045	9.97±0.12

Bu tez kapsamında önerilen diğer yöntem ise birinci türev UV spektrofotometridir. Standart bisoprolol fumarat çözeltileri kullanılarak elde edilen UV spektrumlarının bilgisayarlar yardımıyla birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü türev eğrileri çizdirilmiş kantitatif amaçlı birinci türev eğrilerinin kullanılmasının uygun olduğu saptanmıştır. Elde edilen birinci türev spektrumlarında 232.6 nm'deki türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri standart bisoprolol fumarat konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri elde edilmiş veriler kullanılarak kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon denklem değerleri Çizelge 3.1.2.1. özetlenmiştir. Çizelge 3.1.2.1.'de görüldüğü gibi, yöntemde çalışma aralığı 2.0-22.0 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Çizelge 3.1.2.1. incelendiğinde hesaplanan yakalama sınırları ve tayin alt sınırlarının küçük olması, kalibrasyon denklem verilerinden elde edilen korelasyon katsayısının birden küçük olması önerilen yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir. Yöntemde hesaplanan geri kazanım verileri incelendiğinde ortalama ve standart sapma değeri 0.85 olarak belirlenmiştir.

Sadece bisoprolol fumarat içeren preparatlarda kullanılan bu tez kapsamındaki üçüncü yöntem ise yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemidir. Ortam koşullarının belirlenmesinde herhangi bir referans kaynaktan yararlanılmamıştır. Tamamıyla tarafımızdan geliştirilmiş olan orijinal bir yöntemdir.

C₁₈ kolonda Asetonitril, su ve metanolden oluşan hareketli faz kullanılarak, izokratik ayırım yapılmasına karar verilmiştir. 220.0-260.0 nm aralıklarındaki dalga boylarında yapılan denemelerde etken maddelerin en iyi sonuç verdiği dalga boyu 230.0 nm olarak bulunmuştur. Bu dalga boyunda çalışılmaya karar verilmiştir. Asetonitril, metanol ve su değişik oranlarda karıştırılmış ve en uygun hareketli faz oranının asetonitril: su: metanol (20:60:20 h/h/h) olduğuna karar verilmiştir.

Hazırlanan bu hareketli faz, kolon sıcaklığı 20-50°C arasında değiştirilerek farklı sıcaklıklarda denenmiş ve; en uygun sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir.

Bisoprolol fumarat ve iç standartın birbirinden ayrılmasına ve kolon basıncının 200 bar'ı geçmemesine dikkat ederek, hareketli faz kolondan farklı akış hızlarında geçirilmiş ve en uygun akış hızının 0.5 mL/dak. basıncın ise 40 bar olduğuna karar verilmiştir.

İç standart olarak çalışmalarımızda losartan, telmisartan, atorvastatin, efedrin hidroklorür vb. çeşitli etken maddeler kullanılmış olup losartan seçilmiştir. İç standart olarak, losartanın metanoldeki 0.2 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür.

Sabit faz olarak kullanılan C₁₈ kolonu yanı sıra C₈ kolonu kullanılarak da çalışmalar yapılmış. Bizim için uygun olan kolonun C₁₈ olduğuna karar verilmiştir.

Bisoprolol fumarat için çalışma aralığı 2.0-22.0 µg/mL olarak bulunmuştur. Standart bisoprolol fumarat çözeltilerine iç standart ilave edilerek kromatogramlar kaydedilmiştir. Belirlenen dalga boyunda alınan kromatogramlar kullanılarak etken madde pik alanı/iç standart pik alanı oranlarından korelasyon katsayılarının 1'e yakın olması, önerilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermektedir. Yöntemde laboratuvar şartlarında sentetik olarak hazırlanan çözeltiler kullanarak geri kazanım verileri incelendiğinde 230.0 nm'de için ortalama %100.2 ve standart sapma değeri ise 0.41 olarak hesaplanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi için yakalama sınırı 0.211 µg/mL, tayin alt sınırı ise 0.703 µg/mL 'dir. Gerek yakalama sınırı gerek tayin alt sınırı değerlerinin düşük olması; geliştirdiğimiz yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir. Yöntemde elde edilen korelasyon katsayısının 1'e yakın olması önerdiğimiz yöntemin hassasiyetinin çok

yüksek olduğunu göstermektedir. Yöntemin kesinliği için yapılan gün içi ve günler arası deneylerin sonuçları Çizelge 3.1.3.2. ve 3.1.3.3. 'te verilmiştir.

Tez çalışmamızın ikinci aşamasında ise bisoprolol fumarat ile hidroklorotiazit'i birlikte içeren farmasötik preparattada etken maddelerin aynı anda miktar tayini için rutin kullanıma uygun iki farklı hiç bir kaynakta rastlanmayan yöntemler geliştirilmiştir

Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit'i birlikte içeren preparatlarda için önerdiğimiz ilk yöntem Spektrum oranları birinci türev spektrofotometridir. Bu yöntemde bisoprolol fumarat miktar tayini yapılmak istendiğinde standart bisoprolol fumarat çözeltilerinin UV spektrumlarını hidroklorotiazit'in UV spektrumuna bölünmüş ve spektrum oranları UV spektrumlarını elde edilmiştir. Elde ettiğimiz oran spektrumlarının bilgisayarlar yardımıyla spektrum oranları birinci türev spektrumlarını çizdirilmiştir. Bölücü hidroklorotiazit konsantrasyonunun yöntemde uygun olanını belirlemek için beş farklı derişim çalışılmış, en uygun olanının 14.0 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Aynı karışım da hidroklorotiazit'i miktar tayini yapılmak istendiğinde standart hidroklorotiazit çözeltilerinin UV spektrumlarını bisoprolol fumarat'ın UV spektrumuna bölünmüş ve spektrum oranları UV spektrumları elde edilmiştir. Elde edilen oran spektrumlarının bilgisayarlar yardımıyla spektrum oranları birinci türev spektrumlarını çizdirilmiştir. Bölücü bisoprolol fumarat konsantrasyonunu yöntemde uygun olanının belirlemek için beş farklı derişim çalışılmış, en uygun olanının 14.0 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Çizdirilen spektrum oranları birinci türev eğrilerinde, bisoprolol fumarat'ın miktar tayini için 244.6 nm'deki ve hidroklorotiazit'in miktar tayini için 275.8 nm spektrum oranları birinci türev UV absorbans değerleri bulunmuştur. Elde edilen spektrum oranları birinci türev absorbans değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Elde edilen bu kalibrasyon grafiklerinde spektrum oranları birinci türev absorbans değerleri ve konsantrasyonlar kullanılarak en küçük kareler

yöntemi yardımıyla kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir (Çizelge 3.2.2.1.).

Bu verilerden hareketle korelasyon katsayıları incelendiğinde bu değerlerin 1' e çok yakın olması bahsedilen etken maddelerin miktar tayini için geliştirdiğimiz yöntemin hassasiyetinin analitik çalışmalar için uygun olduğunu göstermektedir. Geliştirdiğimiz yöntemde hesaplanan yakalama sınırları ve alt tayin sınırları bisoprolol fumarat için 244.6 nm'de sırasıyla 0.102 µg/mL, 0.340 µg/mL olarak hesaplanırken hidroklorotiazit için ise 275.8nm 'de 0.098 µg/mL , 0.326 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen bu yakalama sınırı ve alt tayin sınırı değerleri önerilen yöntemin duyarlı olduğu ispatlamaktadır. Geliştirilen yöntemlerin doğrulunun tespiti için ayrıca sentetik olarak hazırlanan iki etken maddeyide değişik oranlarda içeren karışımlar için % geri kazanım deneyleri yapılmıştır. Elde edilen % geri kazanım ve standart sapma değerleri bisoprolol fumarat için 244.6 nm 'de %98.2 ve 1.92 olarak hesaplanmış olup hidroklorotiazit için ise 275.8 nm 'de %100.2 ve 0.32 olarak belirtilmiştir. Yöntemin kesinliği için yapılan gün içi ve günler arası deneylerin sonuçları Çizelge 3.2.1.2. ve 3.2.1.3. 'te verilmiştir.

Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren iki etken madde içeren preparatlarda etken maddelerin aynı anda tayini için geliştirilen diğer bir yöntemde yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemidir. Ortam koşullarının belirlenmesinde herhangi bir referans kaynaktan yararlanılmamıştır. Tamamıyla tarafımızdan geliştirilmiş olan orijinal bir yöntemdir.

C₁₈ kolonda asetronitril, su ve metanolden oluşan hareketli faz kullanılarak, izokratik ayırım yapılmasına karar verilmiştir. 220.0-260.0 nm aralıklarındaki dalga boylarında yapılan denemelerde etken maddelerin en iyi sonuç verdiği dalga boyu 230 nm olarak bulunmuştur.Bu dalga boyunda çalışılmaya karar verilmiştir. Asetonitril, metanol ve su değişik oranlarda

kariştırılmış ve ve en uygun hareketli faz oranının asetonnitril:su:metanol (20:60:20 h/h/h) olduğuna karar verilmiştir.

Hazırlanan bu hareketli faz,kolon sıcaklığı 20-50°C arasında değiştirilerek farklı sıcaklıklarda denenmiş ve ; en uygun sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir.

Bisoprolol fumarat, hidroklorotiazit ve i standartın birbirinden ayrılmasına ve kolon basıncının 200 bar'ı geçmemesine dikkat ederek, hareketli faz kolondan farklı akış hızlarında geirilmış ve en uygun akış hızının 0.5 mL/dk olduğuna karar verilmiştir.

Elde edilen kromatogramlarda bisoprolol fumarat, hidroklorotiazit'in alıkonma zamanları sırasıyla 1.8 ve 3.7 dak. olarak bulunmuştur. Analiz süresi 5 dak. olarak kaydedilmiştir.

Sabit faz olarak kullanılan C₁₈ kolonu yanı sıra C₈ kolonu kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Geliştirdiğimiz yöntem için uygun olan kolonun C₁₈ olduğuna karar verilmiştir.

Bisoprolol fumarat pik alanı/iç standart pik alanı oranı ve hidroklorotiazit pik alanı /iç standart pik alanı oranı konsantrasyonlara karşı grafiğe geirilmış; en küçük kareler yöntemi kullanılarak izelđe 3.2.2.1. 'de verilen kalibrasyon denklemine ulaşılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde bisoprolol fumarat için 2.0-22.0 µg/mL hidroklorotiazit için ise 2.0-22.0 µg/mL analitik çalışma aralığında doğrusallık tespit edilmiştir. Yöntemde yakalama sınırı bisoprolol fumarat için 0.161 µg/mL, tayin alt sınırı ise 0.537 µg/mL hidroklorotiazit için ise 0.081 µg/mL, tayin alt sınırı ise 0.270 µg/mL'dir. Gerek yakalama sınırı gerek tayin alt sınırı değerlerinin düşük olması; geliştirdiğimiz yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir. Yöntemde elde edilen korelasyon katsayısının 1'e yakın olması geliştirdiğimiz yöntemin hassasiyetinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Yöntemin kesinliği için

yapılan gün içi ve günler arası deneylerin sonuçları Çizelge 3.2.2.2. ve 3.2.2.3. 'te verilmiştir. Geliştirilen yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminin doğruluğunun tespiti için sentetik olarak hazırlanan farklı oranlarda bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit çözeltileri kullanılarak ; elde edilen ortalama % geri kazanım bisoprolol fumarat için %100.2 ve hidroklorotiazit için %100.6 olarak bulunurken; BSS % değeri ise ortalama bisoprolol fumarat için %0.41 ve hidroklorotiazit için ise %0.54 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler yöntemin doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir.

Geliştirdiğimiz tüm yöntemlerde yapılan geri kazanım deneylerinin sonuçlarının uygun olması, tablet içerisinde bulunan yardımcı maddelerin (titanyum dioksit, sarı demiroksit vb.) yöntemleri etkilemediğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için kullanılan yöntem sonuçları

	Spektrum Oranları		Yüksek Performanslı Sıvı	
	Birinci Türev UV Spekt.		Kromatografi	
	Bis.	Hid.	Bis.	Hid.
Çalışılan Dalga Boyu (nm)	244.6	275.8	230.0	230.0
Çalışma Denklemi ($y=mx+n$)	$y = -0.041x - 0.013$	$y = -0.0674x - 0.0013$	$y = 0.0536x + 0.0809$	$y = 0.6597x + 0.133$
Çalışma Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	2.0-22.0	2.0-22.0	2.0-22.0	2.0-22.0
Yakalama Sınırı ($\mu\text{g/mL}$)	0.102	0.098	0.161	0.081
Tayin Alt Sınırı ($\mu\text{g/mL}$)	0.340	0.326	0.537	0.270
%Geri Kazanım	99.5	100.2	100.2	100.6
Korelasyon katsayısı (r)	0.9978	0.9996	0.9903	0.9996
Tablet ortalamaları (mg/tablet)	2.48	6.24	2.49	6.21

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bisoprolol fumarat'ı tek başına içeren farmasötik preparatlardaki etken madde tayini için geliştirdiğimiz doğrudan UV spektrofotometri CONCOR® tablet adlı farmasötik preparata uygulandığında 224.6 nm'de standart sapma değeri 0.06 olup p:0.05 için ise güven aralığı 9.98 ± 0.008 mg/tablet olarak saptanmıştır.

Ayrıca etken maddeyi tek başına içeren CONCOR® tablet adlı preparata uygulanan bir diğer yöntem ise birinci türev UV spektrofotometri olup standart sapma değeri 0.33 olup p:0.05 için ise güven aralığı 232.6 nm için 10.07 ± 0.045 mg/tablet olarak belirlenmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde CONCOR® tablet adlı farmasötik preparata uygulandığında 230.0 nm'de p:0.05 için güven aralığı 9.97 ± 0.12 mg/tablet olarak hesaplanmıştır .

Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit içeren farmasötik formül için geliştirilen ilk yöntem spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri'dir. Bu yöntem farmasötik formülasyona uygulandığında p:0.05 için güven aralığı ve standart sapma değerleri bisoprolol fumarat için 224.6 nm'de 2.48 ± 0.05 mg/tablet; 0.04; olarak hidroklorotiazit için ise 6.22 ± 0.04 mg/tablet; 0.03 olarak bulunmuştur.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde LODOZ® tablet adlı farmasötik preparata uygulandığında 230.0 nm'de p:0.05 için güven aralığı ve standart sapma sırasıyla bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit 9.97 ± 0.12 mg/tablet ve 6.21 ± 0.65 ; 0.24 ve 0.47 olarak hesaplanmıştır .

Yüksek lisans tezimiz kapsamında yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurularak tüm yöntemlerin hızlı, doğru, basit, hiçbir ayırma işlemine gerek duyulmadan konu olan etken maddelerin aynı anda tayini için uygulanabilen ve fazla zaman kaybına gerek duyulmayan tüm araştırma ve geliştirme laboratuvarlarında kullanılabilecek yöntemler olduğunu düşünmekteyiz.

ÖZET

Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit'in aynı anda spektrofotometrik yöntemler kullanılarak miktar tayini

Spektrofotometrik yöntemler ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi yüksek lisans tezimiz kapsamında; bisoprolol fumarat'ı tek başına içeren ve bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit'i birlikte içeren preparatlarda etken madde miktar tayinleri için önerilmiştir.

Bisoprolol fumarat'ı tek başına içeren preparatlarda etken madde miktar tayini için doğrudan UV spektrofotometri, birinci türev UV spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemleri önerilmiştir.

Doğrudan UV spektrofotometri de 224.6 nm'deki absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Doğrudan UV spektrofotometride, standart ve numunelerin metanoldeki çözeltilerinin 224.6 nm 'deki absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Yöntemde doğrusal çalışma aralıkları bisoprolol fumarat için 2.0-22.0 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.9983 olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla 0.008 µg/mL ve 0.027 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğrudan UV spektrofotometride yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 224.6 nm'deki BSS % değeri 1.84 ve geri kazanım değeri %98.6 olarak bulunmuştur.

Birinci türev UV spektrofotometride standart ve numunelerin metanoldeki çözeltilerinin 232.6 nm'de türev absorpsiyon ($dA/d\lambda$) sinyalleri ölçülmüştür. Birinci türev UV spektrofotometride doğrusal çalışma aralıkları bisoprolol fumarat için 2.0-22.0 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.9995 olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla 0.013

$\mu\text{g/mL}$ ve $0.043 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Birinci türev UV spektrofotometride yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 232.6 nm 'deki BSS % değeri 1.75 ve geri kazanım değeri $\%99.1$ olarak bulunmuştur.

Önerilen üçüncü yöntem olan yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemde ise 230 nm 'de çalışılmış, çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Çalışma aralığı $2.0-22.0 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.9903 olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla $0.211 \mu\text{g/mL}$ ve $0.703 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 230 nm 'deki BSS % değeri 0.41 ve geri kazanım değeri $\%100.2$ olarak bulunmuştur.

Bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit 'i birlikte içeren preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için iki yöntem önerilmiştir.

İlk önerilen method spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometridir. Yöntemde standart ve numune metanoldeki çözeltilerinin bisoprolol fumarat için 244.6 nm 'deki ve hidroklorotiazit için ise 275.8 nm 'deki türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri ölçülmüştür. Yöntemde bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için çalışma aralığı $2.0 -22.0 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayıları bisoprolol fumarat için 0.9978 ve hidroklorotiazit için ise 0.9996 olarak hesaplanmıştır. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla bisoprolol fumarat için sırasıyla $0.102 \mu\text{g/mL}$ ve $0.340 \mu\text{g/mL}$ bulunurken hidroklorotiazit içinse sırasıyla $0.098 \mu\text{g/mL}$ ve $0.326 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri yönteminin doğruluğunun belirlenmesi için 230 nm 'deki BSS % değeri 0.41 ve geri kazanım değeri $\%100.2$ olarak bulunmuştur.

İkinci olarak önerilen yöntem yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemidir. Yöntemde standart ve numune metanoldeki çözeltilerinin bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için 230 nm 'deki pik alanları

ölçülmüştür. Yöntemde doğrusal çalışma aralığı bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için ise 2.0 – 22.0 µg/mL olup korelasyon katsayıları bisoprolol fumarat 230 nm’de 0.9903 ve hidroklorotiazit için ise 0.9996 olarak hesaplanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 230 nm’deki BSS % değerleri bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için sırasıyla 0.41 ve 0.54; geri kazanım değerleri bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazit için sırasıyla %100.2 ve %100.6 olarak bulunmuştur.

Önerilen bu spektrofotometrik metotlar ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu bisoprolol fumarat ve bisoprolol fumarat+hidroklorotiazit içeren farmasötik preparatlara başarı ile uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bisoprolol fumarat; hidroklorotiazit; doğrudan UV spektrofotometri; birinci türev spektrofotometri; spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri; farmasötik preparat; yüksek performanslı sıvı kromatografi

SUMMARY

Simultaneous determination of pharmaceutical preparations containing Bisoprolol fumarate and Hydrochlorothiazide by using Spectrophotometry

In this study; spectrophotometric method and high performance liquid chromatographic method for determination are suggested for the tablets including bisoprolol fumarate alone and bisoprolol fumarate+hydrochlorothiazide combination.

Direct UV spectrophotometry , first derivative UV spectrophotometry and high performance liquid chromatographic method have been proposed for only bisoprolol fumarate including tablets.

The first suggested method is direct UV spectrophotometry. In this method , absorbance values of standart and sample solutions in methanol measured at 224.6 nm.Linear working range of bisoprolol fumarate was 2.0-22.0 µg/mL.In the calibration graphs, coefficient of correlation was 0.9983. Limit of detection and limit of quantification for 224.6 nm was 0.008 µg/mL and 0.027 µg/mL respectively. To determine the accuracy of method ,"% recovery" study that used standart addition method were performed; in these studies RSD value at 224.6 nm's was found %1.84 and mean recovery value was found %98.6.

In first derivative UV spectrophotometry, absorbance values of standart and sample solutions in methanol measured at 232.6 nm. Linear working range of bisoprolol fumarate was 2.0-22.0 µg/mL.In the calibration graphs ,coefficient of correlation was 0.9995. Limit of detection and limit of

quantification for 232.6 nm was 0.013 µg/mL and 0.043 µg/mL respectively. To determine the accuracy of method, "% recovery" study that used standard addition method were performed; in these studies RSD value at 232.6 nm's was found %1.75 and mean recovery value was found %99.1.

The third method suggested is high performance liquid chromatography. This method was applied to standard and samples containing bisoprolol fumarate area was measured 230 nm. Linear working range was 2.0-22.0 µg/mL. Calibration graphs, coefficient of correlation was 0.9903. Limit of detection for 230 nm's was 0.211 µg/mL and limit of quantification for this wavelength was 0.703 µg/mL. In the "% recovery" study performed to investigate the accuracy of the method, for 230 nm's mean recovery value was found %100.2 and RSD value was found %0.41.

Ratio spectra first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography are proposed for the quantitative determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide combination.

The first method that suggested is ratio spectra first derivative spectrophotometry. First derivative absorbance values of solutions containing bisoprolol fumarate 244.6 nm and hydrochlorothiazide 275.8 nm. As a result of experiments that performed in bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide 2.0-22.0 µg/mL working range, calibration curves were bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide 0.9978 and 0.9996, respectively. Limit of detection for bisoprolol fumarate 244.6 nm's was 0.102 µg/mL and limit of quantification for this wavelength was 0.340 µg/mL. Limit of detection for hydrochlorothiazide 275.8 nm's was 0.098 µg/mL and limit of quantification for this wavelength was 0.326 µg/mL.

The second and the last method suggested is high performance liquid chromatography. UV detector of high performance liquid chromatography was set to 230 nm both bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide. As a

result of experiments that performed in bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide 2.0-22.0 $\mu\text{g/mL}$ working range, calibration curves were bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide 0.9903 and 0.9996, respectively. Limit of detection for bisoprolol fumarate 230 nm's was 0.161 $\mu\text{g/mL}$ and limit of quantification for this wavelenght was 0.537 $\mu\text{g/mL}$. Limit of detection for hydrochlorothiaizide 230 nm's was 0.081 $\mu\text{g/mL}$ and limit of quantification for this wavelenght was 0.270 $\mu\text{g/mL}$. In the "% recovery" study performed to investigate the accuracy of the method, for bisoprolol fumarate mean recovery value was found %100.2 and RSD value was found %0.41. And for hydrochlorothiazide mean recovery value was found %100.6 and RSD value was found %0.54.

Key Words: Bisoprolol fumarate; hydrochlorothiazide; direct spectrophotometry; first derivative spectrophotometry; ratio first derivative spectrophotometry; pharmaceutical preparations; high performance liquid chromatography

KAYNAKLAR

- ABDEL-HAY MH, GAZY AA , HASSAN EM, BELAL TS. (2008) Derivative and Derivative Ratio Spectrophotometric Analysis of Antihypertensive Ternary Mixture of Amiloride Hydrochloride, Hydrochlorothiazide and Timolol Maleate. *J. Chin. Chem. Soc.* **55(5)**:971-978
- BAING MM, VAIDYA VV, SANE RT, MENON SN, DALVI K. (2006) Simultaneous RP-LC determination of losartan potassium, ramipril, and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. *Chrom.* **64(5-6)**:293-296
- BEBAWY LI, ABBAS SS, FATTAH LA, REFAAT HH (2005) Application of first-derivative, ratio derivative spectrophotometry, TLC-densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and plasma. *Farm.* **60(10)**:859-67
- BHATT J, SUBBAIAH G, KAMBLI S, SHAH B, PATEL M, SAXENA A, BALIGA A, NIGAM S, PAREKH H, YADAV G (2007) A high throughput and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the estimation of bisoprolol in human plasma using multiplexing technique. *J Chrom. B: Analyt Technol. Biomed. Life Sci.* **852(1-2)**:374-81.
- BHATT LR, GODGE RK, VORA AT, DAMLE MC. (2007) Validated RP-HPLC method for simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulation. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **30(20)**:3059-3067

BHAVAR GB , GIRIJA B, CHATPALLIWAR VA, PATIL DD, SURANA SJ. (2008) Validated HPTLC Method for Simultaneous Determination of Quinapril Hydrochloride and Hydrochlorothiazide in a Tablet Dosage Form. *Ind. J. Pharm. Sci.* **70(4)**:529-531

BRAZA AJ, MODAMIO P, LASTRA CF, MARIÑO EL. (2002) Development, validation and analytical error function of two chromatographic methods with fluorimetric detection for the determination of bisoprolol and metoprolol in human plasma. *Biomed. Chrom.* **16(8)**:517-22.

BUHRING KU, GARBE A. (1986) Determination of the new beta-blocker bisoprolol and of metoprolol, atenolol and propranolol in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chrom.* **382**:215-24.

CAUDRON E, LAURENT S. (2004) Simultaneous determination of the acid/base antihypertensive drugs celiprolol, bisoprolol and irbesartan in human plasma by liquid chromatography. *J. Chrom. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **801(2)**:339-45.

CILOGLU, E. (2008) Risperidon içeren preparatlarda kantitatif analiz yöntemleri, Yüksek lisans tezi, Ankara

DHANDAPANI B, KUMAR KS , DHARUMAN J, GEETHA K.(2008) Simultaneous estimation of nebivolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets. *Asia. J. Chem.* **20(2)**:1648-1650

DINC, E. (1996) , Atropin sülfat içeren karışımlarda bileşenlerin spektrofotometrik yöntemlerle miktar tayineri ve bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanması, Doktora tezi,Ankara

- DINC E, ALTINOZ S, BALEANU D. (2007) Simultaneous determination of quinapril and hydrochlorothiazide in tablets by ratio spectra derivative spectrophotometric and chemometric methods. *Rev. de Chim.* **58(12)**:1263-1267
- DINC E, BALEANU D, USTUNDAG O, ABOUL-ENEIN HY. (2004) Continuous wavelet transformation applied to the simultaneous quantitative analysis of two-component mixtures. *Pharm.* **59(8)**:618-23.
- DINC E, USTUNDAG O. (2003) Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spironolactone in tablets by chemometric analysis methods. *Farm.* **58(11)**:1151-61.
- DINC E, BALEANU D. (2002) Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30(3)**:715-23.
- DING L, ZHOU X, GUO X, SONG Q, HE J, XU G. (2007) LC-ESI-MS method for the determination of bisoprolol in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44(2)**:520-5.
- EASTWOOD RJ, JERMAN JC, BHAMRA RK, HOLT DW. (1990) High performance liquid chromatographic measurement of bisoprolol in plasma. *Biomed. Chrom.* **4(4)**:178-80
- EL-GINDY A, ASHOUR A, ABDEL-FATTAH L, SHABANA MM. (2001) Spectrophotometric determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in binary mixture using second derivative, second derivative of the ratio spectra and chemometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25(2)**:299-307.

- EL-GINDY A, ASHOUR A, ABDEL-FATTAH L, SHABANA MM. (2001) Application of LC and HPTLC-densitometry for the simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25(2)**:171-9
- ELSHANAWANE AA, MOSTAFA SM, ELGAWISH MS. (2009) Development and Validation of an LC Method for Simultaneous Determination of Amloride Hydrochloride and Hydrochlorothiazide in Human Urine. *J. AOAC Inter.* **92(3)**:813-819
- ERK N. (2003) Application of first derivative UV-spectrophotometry and ratio derivative spectrophotometry for the simultaneous determination of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide. *Pharm.* **58(11)**:796-800.
- ERK N. (2003) Three new spectrophotometric methods applied to the simultaneous determination of hydrochlorothiazide and irbesartan. *Pharm.* **58(8)**:543-8.
- ERK N. (2002) Simultaneous determination of fosinopril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by spectrophotometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27(6)**:901-12.
- ERTURK S, CETIN SM, ATMACA S. (2003) Simultaneous determination of moexipril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33(3)**:505-11.
- FERRARO MC, CASTELLANO PM, KAUFMAN TS. (2004). Chemometric determination of amloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34(2)**:305-14.

FERRARO MC, CASTELLANO PM, KAUFMAN TS. (2002) Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30(4)**:1121-31.

GARG G, SARAF S, SARAF S. (2008) Spectrophotometric and Column High-Performance Liquid Chromatographic Methods for Simultaneous Estimation of Metoprolol Tartrate and Hydrochlorothiazide in Tablets. *J. AOAC Int.* **91(5)**:1045-1050

GOWDA N, PANGHAL S, VIPUL K, RAJSHREE M. (2009) Validation and Application of High-Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Nebivolol and Hydrochlorothiazide: A Novel Approach to Multivariate Calibrations by R-Software Environment. *J. AOAC Int.* **92(5)**:1356-1365

GOYAL RN, TYAGI A, BACHETTI N, BISHNOI S. (2008) Voltametric determination of bisoprolol fumarate in pharmaceutical formulations and urine using single-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta.* **53(6)**:2802-2808

GUNDUZ T.(1988)Enstrümantel Analiz Kitabı. Ankara: Gazi Büro Kitabevi

HAJIAN R (HAJIAN, REZA), SHAMS N (SHAMS, NAFISEH), RAD A (RAD, ARDESHIR) (2009) Application of H-Point Standard Addition Method for Simultaneous Spectrophotometric Determination of Hydrochlorothiazide and Propranolol. *J. Brazil. Chem. Soc.* **20(5)**: 860-865

HEFNAWY MM, SULTAN MA, AL-SHEHRI MM.(2007) Enantioanalysis of bisoprolol in human plasma with a macrocyclic antibiotic HPLC chiral column using fluorescence detection and solid phase extraction. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **55(2)**:227-30.

HILLAERT S, VAN DEN BOSSCHE W. (2003) Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31(2)**:329-39.

HILLAERT S, DE GRAUWE K, VAN DEN BOSSCHE W. (2001) Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several inhibitors of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. *J. Chrom. A*. **924(1-2)**:439-49.

<http://www.medicineonline.com/drugs/;RXMediaPharma,2008>

<http://www.msxlabs.org/forum>

<http://tr.wikipedia.org>

HUANG T, HE Z, YANG B, SHAO L, ZHENG X, DUAN G.(2006) Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41(2)**:644-8.

IVANOVIC D , MEDENICA M , JANCIC B , KNEZEVIC N , MALENOVIC A , MILIC J.(2007) Validation of an analytical procedure for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, lisinopril, and their impurities. *Acta Chrom.* **18**:143-156

ILAÇ REHBERİ, VADEMECUM 2009, Ankara

JOSHI SJ, KARBHARI PA, BHOIR SI, BINDU KS, DAS C.(2010)RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52(3)**:362-371.

KADAM BR, BARI SB.(2007) Quantitative analysis of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high performance thin-layer chromatography with ultraviolet absorption densitometry. *Acta Chrom.* **18**:260-269

KARGOSHA K, SARRAFI AH. (2001) Spectrophotometric simultaneous determination of triamterene and hydrochlorothiazide in triamterene-H tablets by multivariate calibration methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26(2)**:273-9.

KAYAALP, S.O. (1998). Nöroleptik ilaçlar. *Tıbbi Farmakoloji Gözden Geçirme Kitabı*, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. **s: 255-257**.

KAYA B., DINC E., BALEANU D.(2009) Chemometric Methods for the Simultaneous Spectrophotometric Determination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide in the Commercial Pharmaceuticals. *Rev. Chim.* **60(6)**:544-550

KOLOCOURI F, DOTSIKAS Y, APOSTOLOU C, KOUSOULOS C, LOUKAS YL. (2007)Simultaneous determination of losartan, EXP-3174 and hydrochlorothiazide in plasma via fully automated 96-well-format-based solid-phase extraction and liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **387(2)**:593-601.

KOWALCZUK D, HOPKALA H. (2004) Application of derivative spectrophotometry for simultaneous determination of quinapril and hydrochlorothiazide in the combination tablets. *J. AOAC Int.* **87**(4):847-51.

KUMAR V, SHAH RP, SINGH S.(2008) Lcand LC-MS methods fo the investigation of polypills for the treatment of cardiovascular diseases- Part 1. Separation of active components and classification of their interaction /degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**(3):508-515

LEVEILLIAN P, FOMPEYDIE D. (1986) Spectrophotometric derivee. *Anal.* **14**:1-8

LI S, LIU G, JIA J, LIU Y, PAN C, YU C, CAI Y, REN J(2007) Simultaneous determination of ten antiarrhythmic drugs and a metabolite in human plasma by liquid chromatography--tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B :Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **847**(2):174-81.

LIU M, ZHANG D, SUN Y, WANG Y, LIU Z, GU J.(2007) Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric determination of bisoprolol in human plasma. *Biomed. Chrom.* **21**(5):508-13.

LI H, WANG Y, JIANG Y, TANG Y, WANG J, ZHAO L, GU J(2007)A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of valsartan and hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Chrom. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **852**(1-2):436-42

- LIU F, ZHANG JD, XU Y, GAO S, GUO QX.(2008) Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Lett.* **41(8)**:1348-1365
- LIU F , XU Y , GAO S , ZHANG JD , GUO QX.(2007) Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44(5)**:1187-1191
- LI L, SUN J , YANG P , HE ZG.(2006) Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometric method for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Anal. Lett.* **39(15)**:2797-2807
- MAGGIO RM, CASTELLANO PM, KAUFMAN TS.(2008) A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. *Anal. Bioanal. Chem.* **391(8)**:2949-2955
- MOFFAT AC, OSSELTON MD, WIDDOP B. (2003) Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. *Pharm. Press*. ISBN: 978 0 85369 473 1
- OBANDO MA, ESTELA JM, CERDA V.(2008) Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to a monolithic column. *Anal. Bioanal. Chem.* **391(6)**:2349-2356

ONUR F, YUCESoy C.(1983)Türev Spektrofotometrisi. *Fabad J. Pharm. Sci.***13**:462

PAREKH SA, PUDAGE A, JOSHI SS, VAIDYA VV, GOMES NA, KAMAT SS. (2008) Simultaneous determination of hydrochlorothiazide, quinapril and quinaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B: Anal. Techno. Biomed. and Life Sci.* **873(1)**:59-69

PESTE G, ONISCU C, VLASE A.(2010) Experimental research for determination of bisoprolol fumarate in human plasma samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique. *Rom. Biotechno. Lett.* **15(2)**:5140-5145

QUTAB SS, RAZZAQ SN, ASHFAQ M, SHUJA ZA, KHAN IU.(2007) Simple and sensitive LC-UV method for simultaneous analysis of hydrochlorothiazide and candesartan cilexetil in pharmaceutical formulations. *Acta Chrom.* **19**:119-129

RAO DD, SATYANARAYANA NV, SAI SS, REDDY YR, MUKKANTI K.(2009) Simultaneous Determination of Losartan Potassium, Atenolol and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations by Stability-Indicating UPLC. *Chrom.* **70(3-4)**:647-651

RAMADAN NK, ZAAZAA HE (2007) Membrane electrodes for determination of some beta-blocker drugs. *J. AOAC Int.* **90(4)**:987-94.

RX MediaPharma, 2010

REZAEI B , DAMIRI S.(2008) Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode as a Sensor for Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Hydrochlorothiazide. *IEEE Sens. J.* **8(9-10)**:1523-1529

- SAGIRLI O , ONAL A , TOKER SE , SENSOY D.(2007) Simultaneous HPLC analysis of olmesartan and hydrochlorothiazide in combined tablets and in vitro dissolution studies. *Chrom.* **66(3-4)**:213-218
- SALVADORI MC, MOREIRA RF, BORGES BC, ANDRAUS MH, AZEVEDO CP, MORENO RA, BORGES NC,(2009) Simultaneous Determination of Losartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by LC/MS/MS with Electrospray Ionization and Its Application to Pharmacokinetics. *Clin. Exp.I Hyper.* **31(5)**:415-427
- SARBY, S.M., ABDEL-HAY, M.H., BARARY, M.H., BELAL, T.S. (2000). Sensitive spectrofluorimetric and spectrophotometric methods for the determination of thonzylamine hydrochloride in pharmaceutical preparations based on coupling with dimethylbarbituric acid in presence of dicyclohexylcarbodiimide. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**: 257-264.
- SATANA E, ALTINAY S, GÖGER NG, ÖZKAN SA, SENTURK Z. (2001) Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25(5-6)**:1009-13.
- SATHE SR, BARI SB .(2007) Simultaneous analysis of losartan potassium, atenolol, and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption densitometry. *Acta Chrom.* **19(5)**:270-278
- SHAH DA, BHATT KK , MEHTA RS, BALDANIA SL.(2008) Determination of Nebivolol Hydrochloride and Hydrochlorothiazide in Tablets by First-Order Derivative Spectrophotometry and Liquid Chromatography. *J. AOAC Int.* **91(5)**:1075-1082

SHAIKH S, THUSLEEM OA, MUNEER MS, AKMAL J, KONDAGULI AV, RUCKMANI K. (2008) A simple and rapid high performance liquid chromatographic method for the determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in a tablet dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48 (3)**:1055-1057

SKOOG DA., HOLLER FJ., NIEMAN TA., (1997). *Principles of Instrumental analysis Fifty Edition*. Çevirenler KILIÇ E., KÖSEOĞLU F., YILMAZ, H (2003) *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık, Ankara

SONG M, HANG T, ZHAO H, WANG L, GE P, MA P.(2007) Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionisation. *Rap. Com. Mass Spec.***21(21)**:3427-3434

STOLARCZYK M, MASLANKA A, KRZEK J, MILCZAREK J.(2008) Application of derivative spectrophotometry for determination of enalapril, hydrochlorothiazide and valsartan in complex pharmaceutical preparations. *Acta Pol. Pharm.* **65(3)**:275-281

STOLARCZYK M , ANNA M , KRZEK J.(2008) Chromatographic and densitometric analysis of hydrochlorothiazide, valsartan, candesartan, and enalapril in selected complex hypotensive drugs. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol .* **31(13)**:1892-1902

SULTAN M.(2008) Simultaneous determination of carvedilol and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometric and HPLC methods. *Asia. J. Chem.* **20(3)**:2283-2292

- TAGLIARI MP, STULZER HK, MURAKAMI FS, KUMINEK G, VALENTE B, OLIVEIRA PR, SILVA MAS.(2008) Development and validation of a stability-indicating LC method to quantify hydrochlorothiazide in oral suspension for pediatric use. *Chrom .* **67(7-8)**:647-652
- TIAN DF, TIAN XL, TIAN T, WANG ZY, MO FK.(2008) Simultaneous Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablets by RP-HPLC. *Ind. J. Pharm. Sci.* **70(3)**:372-U7
- TORAL MI, SALDIAS OYM.(2009) Strategies used to development analytical methods for simultaneous determination of organic compounds by derivative spectrophotometry. *Quimica Nova.* **32(1)**:257-282
- TUTUNJI MF, IBRAHIM HM, KHABBAS MH, TUTUNJI LF(2009) Simultaneous determination of bisoprolol and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B: Anayt. Technol. Biomed. and Life Sci.* **877(16-17)**:1689-1697
- UYGUNER, N.(2010) Eprosartan ve hidroklorotiazit'in tabletlerde türev spektrofotometri ile miktar tayini. Dönem projesi, Ankara
- VALIZADEH H, ZAKERI-MILANI P, ISLAMBULCHILAR Z, TAJERZADEH H. (2006) A simple and rapid high-performance liquid chromatography method for determining furosemide, hydrochlorothiazide, and phenol red: applicability to intestinal permeability studies. *J. AOAC Int.* **89(1)**:88-93.
- VIGNADUZZO SE, MAGGIO RM, CASTELLANO PM, KAUFMAN TS.(2006) PLS and first derivative of ratio spectra methods for determination of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets. *Anal. Bioanalyt. Chem.* **386(7-8)**:2239-2244

VONAPARTI A, KAZANIS M, PANDERI I.(2006) Development and validation of a liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric method for the determination of benazepril, benazeprilat and hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Mass Spec* . **41(5)**:593-605

VORA DN, KADAV AA.(2008) Developmant and validation of a simultaneous HPLC method for estimation of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate from tablets. *Ind. J. Pharm. Sci.* **70(4)**:542-546

VUJIC Z ,CREVAR M, OBRADOVIC V, KUNTIC V, USKOKOVIC-MARKOVIC S.(2009) Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide, Cilazapril and Its Active Metabolite Cilazaprilat in Urine by Gradient RP-LC. *Chrom.* **70(7-8)**:1221-1225

WANG Q, DING F, LI H, HE P, FANG Y. (2003) Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30(5)**:1507-14.

WEI YQ, ZOU HB, YUAN JR(2006) Simultaneous LC determination of chlorogenic acid and hydrochlorthiazide in Zhenju Jiangya tablets. *Chrom.* **64 (11-12)** :709-711

www.rxlist.com/cgi/generic/bishctz.htm - 38k

www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/health_advice/netdoctor/archive/100003948.html - 44k -

www.ahmetalpman.com/defilacoku.asp?id=1543 - 84k

www.ilacabak.com/ilacgoster.php?ld=4248 - 17k

YAN TT, LI H, DENG LL, GUO YJ, YU WS, FAWCETT JP, ZHANG D, CUI YM, GUA JK. (2008) Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48(4)**:1225-1229

YILDIZ A., GENÇ O., BEKTAS (1997) Ultraviyole ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi. *Enstrümantal Analiz*, Ankara :Hacettepe Taş Kitapçılık, 43.

ZECEVIĆ M, ZIVANOVIĆ L, AGATONOVIC-KUSTRIN S, MINIC D. (2001) The use of a response surface methodology on HPLC analysis of methyldopa, amiloride and hydrochlorothiazide in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24(5-6)**:1019-25.

ZECEVIC M, ZIVANOVIC LJ, AGATONOVIC-KUSTRIN S, IVANOVIC D, MAKSIMOVIC M. (2000) Statistical optimization of a reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of amiloride and hydrochlorothiazide in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22(1)**:1-6.

ZHANG X, OUYANG J, BAEYENS WR, ZHAI S, YANG Y, HUANG G. (2003) Enantiomeric separation of beta-blockers by HPLC using (R)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid as chiral stationary phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31(6)**:1047-57.

ZHENG X, LU M, ZHANG L, CHÍ Y, ZHENG L, CHEN G. (2008) An online field-amplification sample stacking method for the determination of diuretics in urine by capillary electrophoresis-amperometric detection. *Tal.* **76(1)**:15-20

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Gözde

Soyadı: ÖZCAN

Doğum yeri ve tarihi: Kırşehir-1984

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: İlk yerleşim Mah. 2011. Sk. Saygınlar Sit.

No:24,Batıkent, ANKARA

0505 2606291

II. Eğitimi

2007 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, ANKARA

2002 Nermin-Mehmet ÇEKİÇ Anadolu Lisesi, ANKARA

1999 Hacı Fatma ERDEMİR Anadolu Lisesi, KIRŞEHİR

1995 Cumhuriyet İlkokulu, KIRŞEHİR

III. Ünvanları

Eczacı

IV. Mesleki Deneyimi

Kamu Eczacısı (Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı,İlaç ve Kozmetikler Arş. Md. , Ankara)

