

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROKLOROTİAZİD İÇEREN FARMASÖTİK
PREPARATLARDAKİ ETKEN MADDELERİN
KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE MİKTAR
TAYİNLERİ

724004

Ecz. Özgür ÜSTÜNDAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
124004

ANALİTİK KİMYA
ANABİLİM DALI

Danışman
Yard. Doç. Dr. Erdal DİNÇ

2003 - ANKARA

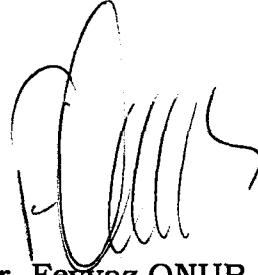
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak Kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/07/2003



Prof. Dr. Feyyaz ONUR

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Tanver DOĞANAY

Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Ankara Üniversitesi



Doç. Dr. Dumitru BALEANU

Çankaya Üniversitesi



Yard. Doç. Dr. Erdal DİNÇ

Ankara Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimdeki çalışmaların planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Danışman Hocam Y. Doç. Dr.Sayın Erdal DİNÇ'e teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen Prof. Dr. Sayın Feyyaz ONUR'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Bu yüksek lisans tez programında anabilim dalımız olanaklarını ve ilgisini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sayın İnci BİRYOL'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Hocam Doç. Dr. Sayın Dumitru BALEANU'ya gösterdiği manevi destekten dolayı teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında manevi desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Sayın Cem YÜCESOY'a, Prof. Dr. Sayın Sibel A. ÖZKAN'a, teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında manevi yardımlarını esirgemeyen Öğr. Grv. Dr. Sayın Bengi USLU ve Arş. Gör. Sayın İ. Murat PALABIYIK'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca ve tezim sırasında yardımlarını ve desteklerini üzerimden eksik etmeyen aileme ve arkadaşım Aylin DUR'a teşekkür ederim.

Ayrıca Anabilim Dalımız Bütün çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	İ
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvi
Kısaltmalar	xxiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tez Kapsamındaki Etkin Maddeler İçin Genel Bilgi	1
1.1.1. Hidroklorotiazid	4
1.1.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
1.1.2. Spironolakton	7
1.1.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	7
1.1.3. Amilorid hidroklorür	10
1.1.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	10
1.1.4. Kaptopril	13
1.1.4.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	13
1.2. Tez Kapsamındaki Etkin Maddeleri İçin Günümüze Kadar Uygulanan Analiz Yöntemleri	16
1.2.1. Hidroklorotiazid İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri	16
1.2.1.1. Spektrofotometrik Yöntemler	16
1.2.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	21
1.2.1.3. Kemometri	27
1.2.1.4. Kapiller Elektroforez	28
1.2.1.5. Polarografi	28
1.2.2. Spironolakton İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri	29
1.2.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler	29
1.2.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	30

1.2.3. Amilorid Hidroklorür İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri	31
1.2.3.1. Spektrofotometrik Yöntemler	31
1.2.3.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	32
1.2.3.3. Fluorimetri	35
1.2.4. Kaptopril İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri	35
1.2.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler	35
1.2.4.2. Kromatografik Yöntemler	36
1.2.4.2.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	36
1.2.4.2.2. Gaz Kromatografisi	37
1.2.4.3. Fluorimetri	38
1.3. KULLANILAN YÖNTEMLER	39
1.3.1. Spektrofotometri	39
1.3.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi	45
1.3.2. Kemometrik Yöntemler	49
1.3.2.1. Lineer Regresyon Analizi	51
1.3.2.2. Bivariate Calibration Yöntemi (BC)	52
1.3.2.3. Multilinear Regression Calibration Yöntemi (MLRC)	55
1.3.2.4. Classical Least Squares Yöntemi (CLS)	57
1.3.2.5. Inverse Least Squares Yöntemi (ILS)	59
1.3.2.6. Principal Component Regression Yöntemi (PCR)	60
1.3.2.7. Partial Least Squares Yöntemi (PLS)	63
1.3.2.8. Kalibrasyon Setinin dizaynı	65
1.3.2.9. Kemometrik Kalibrasyonların Çapraz Validasyonu	66
1.3.2.9.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	66
1.3.2.9.2. Tayinin Standart Hatası (Standat Error of Prediction (SEP))	67

2. DENEYSEL KISIM	69
2.1. Gereçler	69
2.1.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	69
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	69
2.1.3. Kullanılan Antihipertansif Formülasyonlar	70
2.2. Deneylerin Yapılışı	71
2.2.1. Hidroklorotiazid+Spironolakton Karışımının Analizi	71
2.2.1.1. Bivariate Calibration Yöntemi	71
2.2.1.1.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	71
2.2.1.1.2. Bivariate Calibration	72
2.2.1.1.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	76
2.2.1.1.4. Bivariate Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması	77
2.2.1.2. Multilinear Regression Calibration Yöntemi (MLRC)	80
2.2.1.2.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	80
2.2.1.2.2. Multilinear Regression Calibration (MLRC)	80
2.2.1.2.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	81
2.2.1.2.4. Multilinear Regression Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması	83
2.2.1.3. Classical Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (CLS)	86
2.2.1.3.1 Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	86
2.2.1.3.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	86
2.2.1.3.3. Classical Least Squares Kalibrasyon	87
2.2.1.3.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	89
2.2.1.3.5. Çapraz Validasyon	91
2.2.1.3.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	91
2.2.1.3.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	91
2.2.1.3.6. Classical Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması	92

2.2.1.4. Inverse Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (ILS)	94
2.2.1.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	94
2.2.1.4.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	94
2.2.1.4.3. Inverse Least Squares Kalibrasyon	95
2.2.1.4.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	95
2.2.1.4.5. Çapraz Validasyon	98
2.2.1.4.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	98
2.2.1.4.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	98
2.2.1.4.6. Inverse Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	99
2.2.1.5. Principal Component Regression Yöntemi (PCR)	101
2.2.1.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	101
2.2.1.5.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	101
2.2.1.5.3. Principal Component Regression Kalibrasyonu	102
2.2.1.5.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	102
2.2.1.5.5. Çapraz Validasyon	105
2.2.1.5.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	105
2.2.1.5.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	105
2.2.1.5.6. Principal Component Regression Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	106
2.2.1.6. Partial Least Squares Yöntemi (PLS)	108
2.2.1.6.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	108
2.2.1.6.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	108
2.2.1.6.3. Partial Least Squares Kalibrasyon	109
2.2.1.6.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	109
2.2.1.6.5. Çapraz Validasyon	112
2.2.1.6.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	112

2.2.1.6.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	112
2.2.1.6.6. Partial Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	113
2.2.1.7. Varyans Analizi	115
2.2.1.8. Farmakope Yöntemi (USP XXIII)	117
2.2.2. Hidroklorotiazid Amilorid Hidroklorür Karışımının Analizi	119
2.2.2.1. Bivariate Calibration Yöntemi	119
2.2.2.1.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	119
2.2.2.1.2. Bivariate Calibration	120
2.2.2.1.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	124
2.2.2.1.4. Bivariate Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	125
2.2.2.2. Multilinear Regression Calibration Yöntemi (MLRC)	128
2.2.2.2.1. Stok Çözeltilerinin Hazırlanışı	128
2.2.2.2.2. Multilinear Regression Calibration (MLRC)	128
2.2.2.2.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	131
2.2.2.2.4. Multilinear Regression Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	131
2.2.2.3. Classical Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (CLS)	135
2.2.2.3.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	135
2.2.2.3.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	135
2.2.2.3.3. Classical Least Squares Kalibrasyon	138
2.2.2.3.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	138
2.2.2.3.5. Çapraz Validasyon	141
2.2.2.3.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	141
2.2.2.3.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	141
2.2.2.3.6. Classical Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	142
2.2.2.4. Inverse Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (ILS)	144
2.2.2.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	144
2.2.2.4.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	144

2.2.2.4.3. Inverse Least Squares Kalibrasyon	145
2.2.2.4.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	145
2.2.2.4.5. Çapraz Validasyon	148
2.2.2.4.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	148
2.2.2.4.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	148
2.2.2.4.6. Inverse Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	149
2.2.2.5. Principal Component Regression Yöntemi (PCR)	151
2.2.2.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	151
2.2.2.5.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	151
2.2.2.5.3. Principal Component Regression Kalibrasyon	152
2.2.2.5.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	152
2.2.2.5.5. Çapraz Validasyon	155
2.2.2.5.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	155
2.2.2.5.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	155
2.2.2.5.6. Principal Component Regression Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	156
2.2.2.6. Partial Least Squares Yöntemi (PLS)	158
2.2.2.6.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	158
2.2.2.6.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	158
2.2.2.6.3. Partial Least Squares Kalibrasyon	159
2.2.2.6.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	159
2.2.2.6.5. Çapraz Validasyon	162
2.2.2.6.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	162
2.2.2.6.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	162
2.2.2.6.6. Partial Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	163
2.2.2.7. Varyans Analizi	165

2.2.2.8. Farmakope Yöntemi (USP XXIII)	167
2.2.3. Hidroklorotiazid+Kaptopril Karışımının Analizi	169
2.2.3.1. Bivariate Calibration Yöntemi	169
2.2.3.1.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	169
2.2.3.1.2. Bivariate Calibration	169
2.2.3.1.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	174
2.2.3.1.4. Bivariate Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	176
2.2.3.2. Multilinear Regression Calibration Yöntemi (MLRC)	178
2.2.3.2.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	178
2.2.3.2.2. Multilinear Regression Calibration (MLRC)	178
2.2.3.2.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	181
2.2.3.2.4. Multilinear Regression Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	183
2.2.3.3. Classical Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (CLS)	185
2.2.3.3.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	185
2.2.3.3.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	185
2.2.3.3.3. Classical Least Squares Kalibrasyon	186
2.2.3.3.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	189
2.2.3.3.5. Çapraz Validasyon	191
2.2.3.3.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	191
2.2.3.3.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	191
2.2.3.3.6. Classical Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	192
2.2.3.4. Inverse Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (ILS)	194
2.2.3.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	194
2.2.3.4.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	194
2.2.3.4.3. Inverse Least Squares Kalibrasyon	195
2.2.3.4.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	195
2.2.3.4.5. Çapraz Validasyon	198

2.2.3.4.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	198
2.2.3.4.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	198
2.2.3.4.6. Inverse Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	199
2.2.3.5. Principal Component Regression Yöntemi (PCR)	201
2.2.3.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	201
2.2.3.5.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	201
2.2.3.5.3. Principal Component Regression Kalibrasyon	202
2.2.3.5.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	202
2.2.3.5.5. Çapraz Validasyon	205
2.2.3.5.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	205
2.2.3.5.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	205
2.2.3.5.6. Principal Component Regression Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	206
2.2.3.6. Partial Least Squares Yöntemi (PLS)	208
2.2.3.6.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	208
2.2.3.6.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	208
2.2.3.6.3. Partial Least Squares Kalibrasyon	209
2.2.3.6.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	209
2.2.3.6.5. Çapraz Validasyon	212
2.2.3.6.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standart Error of Calibration (SEC))	212
2.2.3.6.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standart Error of Prediction (SEP))	212
2.2.3.6.6. Partial Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması	213
2.2.3.7. Varyans Analizi	215
3. TARTIŞMA	217
3.1. Hidroklorotiazid+Spironolakton Karışımının Kantitatif Analizi	217

3.1.1. Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımı için daha önce yapılan bir çalışmada;	217
3.1.1.1. Hidroklorotiazid ve Spironolaktonu İçeren Karışımın Kantitatif Analizi İçin Yaptığımız Çalışmalarda:	218
3.1.1.2. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının Bivariate Calibration Yöntemiyle Kantitatif Analizi	218
3.1.1.3. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının Multilinear Regression Calibration Yöntemiyle Kantitatif Analizi	219
3.1.1.4. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının CLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	220
3.1.1.5. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının ILS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	221
3.1.1.6. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının PCR Yöntemiyle Kantitatif Analizi	223
3.1.1.7. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının PLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	224
3.2. Hidroklorotiazid+Amilorid Hidroklorür Karışımının Kantitatif Analizi	225
3.2.1. Martin ve arkadaşları Hidroklorotiazid ve amiliod hidroklorürün miktar tayinini...	225
3.2.1.1. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorürü İçeren Karışımın Kantitatif Analizi İçin Yaptığımız Çalışmalarda:	226
3.2.1.2. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının Bivariate Calibration Yöntemiyle Kantitatif Analizi	226
3.2.1.3. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının Multilinear Regression Calibration Yöntemiyle Kantitatif Analizi	227
3.2.1.4. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının CLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	228
3.2.1.5. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının ILS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	229
3.2.1.6. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının PCR Yöntemiyle Kantitatif Analizi	230
3.2.1.7. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının PLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	232
3.3. Hidroklorotiazid+Kaptopril Karışımının Kantitatif Analizi	233
3.3.1. Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımı için daha önce yapılan bir çalışmada;	233
3.3.1.1. Hidroklorotiazid ve Kaptoprili İçeren Karışımın Kantitatif Analizi İçin Yaptığımız Çalışmalarda:	233
3.3.1.2. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının Bivariate Calibration Yöntemiyle Kantitatif Analizi	233

3.3.1.3. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının Multilinear Regression Calibration Yöntemiyle Kantitatif Analizi	235
3.3.1.4. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının CLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	236
3.3.1.5. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının ILS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	237
3.3.1.6. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının PCR Yöntemiyle Kantitatif Analizi	239
3.3.1.7. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının PLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi	240
3.4. Kemometrik Kalibrasyonlar İçin Çapraz Validasyon	257
3.4.1. Hidroklorotiazid-Spironolakton Karışımı	257
3.4.2. Hidroklorotiazid-Amilorid Hidroklorür Karışımı	257
3.4.3. Hidroklorotiazid-Kaptopril Karışımı	257
3.5. Varyans Analizi (ANOVA testi)	261
ÖZET	262
SUMMARY	265
4. SONUÇ	249
Kaynaklar	270
Özgeçmiş	282

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hidroklorotiazidin açık formülü.	4
Şekil 1.2. Hidroklorotiazidin metanol-tampon (0,2M - pH: 5) (80:20) karışımındaki absorpsiyon spektrumu.	5
Şekil 1.3. Hidroklorotiazidin IR Spektrumu (KBr diski halinde)	6
Şekil 1.4. Spironolakton'un açık formülü.	7
Şekil 1.5. Spironolakton'un metanol-tampon (0,2M - pH: 5) (80:20) karışımındaki absorpsiyon spektrumu.	8
Şekil 1.6. Spironolaktonun IR Spektrumu (KBr diski halinde)	9
Şekil 1.7. Amilorid hidroklorürün açık formülü.	10
Şekil 1.8. Amiloridin metanol-tampon (0,2M - pH: 5) (80:20) karışımındaki absorpsiyon spektrumu.	11
Şekil 1.9. Amilorid hidroklorürün IR Spektrumu (KBr diski halinde)	12
Şekil 1.10. Kaptopril'in açık formülü.	13
Şekil 1.11. Kaptoprilin metanol+0,1 M NaOH karışımındaki absorpsiyon spektrumu.	14
Şekil 1.12. Kaptoprilin IR Spektrumu (KBr diski halinde)	15
Şekil 1.13. Enerji seviyeleri arasındaki fark.	40
Şekil 1.14. Moleküldeki enerji seviyeleri	41
Şekil 1.15. Sürekli spektrum	42
Şekil 1.16. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti ($I=$ ışığın numune içinde aldığı yol).	43
Şekil 1.17. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları	46

- Şekil 1.18. Bir çift ışın yollu (double beam) spektrofotometrenin çalışma prensibi 47
- Şekil 1.19. Moleküldeki orbitallerin enerji açısından dizilişi 48
- Şekil 1.20. Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren bir karışımın analizi için kalibrasyon seti. 66
- Şekil 2.1. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde spironolakton a1) $10 \mu\text{g/mL}$, a2) $10 \mu\text{g/mL}$, a3) $14 \mu\text{g/mL}$, a4) $18 \mu\text{g/mL}$, a5) $20 \mu\text{g/mL}$ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları ve hidroklorotiazid a1) $6 \mu\text{g/mL}$, a2) $10 \mu\text{g/mL}$, a3) $14 \mu\text{g/mL}$, a4) $18 \mu\text{g/mL}$, a5) $20 \mu\text{g/mL}$ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. 73
- Şekil 2.2. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde a) $14 \mu\text{g/mL}$ spironolakton, b) $14 \mu\text{g/mL}$ hidroklorotiazid ve c) hidroklorotiazid – spironolakton karışımı. 87
- Şekil 2.3. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde hidroklorotiazid a1) $6 \mu\text{g/mL}$, a2) $10 \mu\text{g/mL}$, a3) $14 \mu\text{g/mL}$, a4) $18 \mu\text{g/mL}$, a5) $20 \mu\text{g/mL}$ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları ve amilorid hidroklorür b1) $6 \mu\text{g/mL}$, b2) $10 \mu\text{g/mL}$, b3) $14 \mu\text{g/mL}$, b4) $18 \mu\text{g/mL}$, b5) $20 \mu\text{g/mL}$ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları. 121
- Şekil 2.4. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde a) $10 \mu\text{g/mL}$ hidroklorotiazid, b) $10 \mu\text{g/mL}$ amilorid hidroklorür ve c) hidroklorotiazid- amilorid hidroklorür karışımı. 136

Şekil 2.5. 0.1 M NaOH ve metanol (1:1) içerisinde kaptoprilin 171
a1) 4 µg/mL, a2) 8 µg/mL, a3) 12 µg/mL, a4) 16
µg/mL , a5) 20 µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon
spektrumları ve Hidroklorotiazidin b1) 3 µg/mL,
b2) 6 µg/mL, b3) 9 µg/mL, b4) 12 µg/mL , b5) 15
µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları.

Şekil 2.6. Metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) içerisinde a) 6 µg/mL 187
hidroklorotiazid, b) 16 µg/mL kaptopril ve c)
hidroklorotiazid-kaptopril karışımı.



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Hidroklorotiazid ve spironolaktonun seçilen 10 dalga boyundaki doğru denklemleri ve lineer regresyon katsayıları.	74
Çizelge 2.2.	Duyarlılık matrislerinin($K \times 10^{-2}$) determinantlarının mutlak değerlerini kullanarak hidroklorotiazid- spironolakton karışımları için dalga boyunun seçimi	75
Çizelge 2.3.	Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay Karışımlarına bivariate kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	78
Çizelge 2.4.	ALDACTAZİDE® tablete uygulanan bivariate kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	79
Çizelge 2.5.	Karışımdaki hidroklorotiazid ve spironolakton için seçilen 10 dalga boyunda elde edilen denklem seti.	82
Çizelge 2.6.	Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına multilinear regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	84
Çizelge 2.7.	ALDACTAZİDE® tablete uygulanan multilinear regression kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	85
Çizelge 2.8.	Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımlarını içeren kalibrasyon seti.	88
Çizelge 2.9.	Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına classical least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	90
Çizelge 2.10.	Kalibrasyon basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	91

Çizelge 2.11.	Tayin basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	92
Çizelge 2.12.	ALDACTAZİDE® tablete uygulanan CLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	93
Çizelge 2.13.	Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına inverse least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	97
Çizelge 2.14.	Kalibrasyon basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	98
Çizelge 2.15.	Tayin basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	99
Çizelge 2.16.	ALDACTAZİDE® tablete uygulanan ILS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	100
Çizelge 2.17.	Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına principal component regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	104
Çizelge 2.18.	Kalibrasyon basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	105
Çizelge 2.19.	Tayin basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	106
Çizelge 2.20.	ALDACTAZİDE® tablete uygulanan PCR kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	107
Çizelge 2.21.	Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına partial least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri	111
Çizelge 2.22.	Kalibrasyon basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	112
Çizelge 2.23.	Tayin basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	113

Çizelge 2.24.	ALDACTAZİDE® tablete uygulanan PLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	114
Çizelge 2.24a.	Kemometrik yöntemlerin ALDACTAZİDE tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar için ANOVA testi.	116
Çizelge 2.25.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün seçilen 14 dalga boyundaki doğru denklemlerive lineer regresyon katsayıları.	122
Çizelge 2.26.	Duyarlılık matrislerinin ($K \times 10^{-2}$) determinantlarının mutlak değerlerini kullanarak hidroklorotiazid-amilorid hidroklorür karışımları için dalga boyunun seçimi.	123
Çizelge 2.27.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür yapay karışımlarına bivariante kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	126
Çizelge 2.28.	MODURETIC® tablete uygulanan bivariante kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	127
Çizelge 2.29.	Karışımdaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için seçilen 14 dalga boyunda elde edilen denklem seti.	130
Çizelge 2.30.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür yapay karışımlarına multiliner regresyon kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	133
Çizelge 2.31.	MODURETIC® tablete uygulanan multiliner regresyon kalibrasyonu yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	134
Çizelge 2.32.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımlarını içeren kalibrasyon seti.	137
Çizelge 2.33.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün yapay karışımlarına classical least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	140

Çizelge 2.34.	Kalibrasyon basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	141
Çizelge 2.35.	Tayin basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	142
Çizelge 2.36.	MODURETIC® tablete uygulanan CLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	143
Çizelge 2.37.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür yapay karışımlarına inverse least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	147
Çizelge 2.38.	Kalibrasyon basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	148
Çizelge 2.39.	Tayin basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	149
Çizelge 2.40.	MODURETIC® tablete uygulanan ILS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	150
Çizelge 2.41.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün yapay karışımlarına principal component regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	154
Çizelge 2.42.	Kalibrasyon basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	155
Çizelge 2.43.	Tayin basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	156
Çizelge 2.44.	MODURETIC® tablete uygulanan PCR kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar	157
Çizelge 2.45.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün yapay karışımlarına partial least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	161
Çizelge 2.46.	Kalibrasyon basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	162

Çizelge 2.47.	Tayin basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	163
Çizelge 2.48.	MODURETIC® tablete uygulanan PLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	164
Çizelge 2.48a.	Kemometrik yöntemlerin MODURETIC® tablete uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar için ANOVA testi.	166
Çizelge 2.49.	Hidroklorotiazid ve kaptoprilin seçilen 15 dalga boyundaki doğru denklemleri ve lineer regresyon katsayıları.	172
Çizelge 2.50.	Duyarlılık matrislerinin ($K \times 10^{-2}$) determinantlarının mutlak değerlerini kullanarak hidroklorotiazid- kaptopril karışımları için dalga boyunun seçimi.	173
Çizelge 2.51.	Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına bivariate kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	175
Çizelge 2.52.	CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan bivariate kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	177
Çizelge 2.53.	Karışımdaki hidroklorotiazid) ve kaptopril için seçilen 10 dalga boyunda elde edilen denklem seti.	180
Çizelge 2.54.	Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına multilineer regresyon kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	182
Çizelge 2.55.	CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan multilineer regresyon kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	184
Çizelge 2.56.	Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımlarını içeren kalibrasyon seti.	188

Çizelge 2.57.	Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına classical least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	190
Çizelge 2.58.	Kalibrasyon basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	191
Çizelge 2.59.	Tayin basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	192
Çizelge 2.60.	CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan CLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	193
Çizelge 2.61.	Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına inverse least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	197
Çizelge 2.62.	Kalibrasyon basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	198
Çizelge 2.63.	Tayin basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	199
Çizelge 2.64.	CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan ILS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	200
Çizelge 2.65.	Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına principal component regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	204
Çizelge 2.66.	Kalibrasyon basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	205
Çizelge 2.67.	Tayin basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	206
Çizelge 2.68.	CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan PCR kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	207

Çizelge 2.69.	Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına partial least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.	211
Çizelge 2.70.	Kalibrasyon basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	212
Çizelge 2.71.	Tayin basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.	213
Çizelge 2.72.	CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan PLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar.	214
Çizelge 2.72a.	Kemometrik yöntemlerin CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar için ANOVA testi.	216
Çizelge 3.1.	Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımlarının analizinde kullanılan çalışma aralıkları.	242
Çizelge 3.2.	Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlara kemometrik yöntemlerin uygulanmasından elde edilen sonuçlar.	243
Çizelge 3.3.	Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik preparatlara standart ilavesinde kemometrik yöntemler için elde edilen ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri.	244
Çizelge 3.4.	Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımının analizinde yöntemlerin uygulanması ile elde edilen % bağıl standart sapmalar.	245
Çizelge 3.5.	ALDACTAZIDE® tablete yöntemler uygulandığında bulunan sonuçlar	246
Çizelge 3.6.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımlarının analizinde kullanılan çalışma aralıkları.	247
Çizelge 3.7.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlara kemometrik yöntemlerin uygulanmasından elde edilen sonuçlar.	248

Çizelge 3.8.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik preparatlara standart ilavesinde kemometrik yöntemlerin için elde edilen ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri.	249
Çizelge 3.9.	Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımının analizinde yöntemlerin uygulanması ile elde edilen bağıl standart sapmalar.	250
Çizelge 3.10.	MODURETIC® tablete yöntemler uygulandığında bulunan sonuçlar	251
Çizelge 3.11.	Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımlarının analizinde kullanılan çalışma aralıkları.	252
Çizelge 3.12.	Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlara kemometrik yöntemlerin uygulanmasından elde edilen sonuçlar.	253
Çizelge 3.13.	Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik preparatlara standart ilavesinde kemometrik yöntemlerin uygulanması ile elde edilen geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri.	254
Çizelge 3.14.	Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımının analizinde yöntemlerin uygulanması ile elde edilen bağıl standart sapmalar.	255
Çizelge 3.15.	CAPTOHEXAL®COMP tablete yöntemler uygulandığında bulunan sonuçlar	256
Çizelge 3.16.	Kemometrik yöntemlerin hidroklorotiazid ve spironolakton karışımına uygulamasında kalibrasyon ve tayin basamaklarında elde edilen çapraz validasyon sonuçları	258

- Çizelge 3.17. Kemometrik yöntemlerin hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımına uygulamasında kalibrasyon ve tayin basamaklarında elde edilen çapraz validasyon sonuçları 259
- Çizelge 3.18. Kemometrik yöntemlerin hidroklorotiazid ve kaptopril karışımına uygulamasında kalibrasyon ve tayin basamaklarında elde edilen çapraz validasyon sonuçları 260



KISALTMALAR

- BC: Bivariate Calibration (İki bileşenli kalibrasyon)
- MLRC: Multilinear Regression Calibration (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu)
- CLS: Classical Least Squares (Klasik en küçük kareler yöntemi)
- ILS: Inverse Least Squares (Ters en küçük kareler yöntemi)
- PCR: Principal Component Regression (Temel bileşen regresyonu yöntemi)
- PLS: Partial Least Squares (Kısmi en küçük kareler yöntemi)
- BSS: % Bağlı standart sapma
- SS: Standart sapma
- GA: Güven aralığı
- SEP: Standart Error of Prediction (Tayinin standart hatası)
- SEC: Standart Error of Calibration (Kalibrasyonun standart hatası)
- r: Korelasyon katsayısı
- S. Hata: Standart hata
- K: Duyarlılık matrisi
- ANOVA: Analysis of Variance (Varyans analizi)
- A: Absorbans
- m: Eğim
- C: Konsantrasyon
- n: Kesim

1. GİRİŞ

1.1. TEZ KAPSAMINDAKİ ETKEN MADDELER İÇİN GENEL BİLGİ

Hidroklorotiazid; hipertansiyon tedavisinde ilk sıralarda tercih edilen tiazid diüretiklerdendir. Tiazid diüretikleri etkilerini özellikle distal tubul üzerinde göstermektedirler ve kan basıncını sodyum ve su atılımını artırarak düşürmektedirler. İleri yaştaki veya sıvı açığı olan hastalar dışında postural hipotansiyon nadiren ortaya çıkmaktadır. Tiazid diüretikler sodyum ve su tutulumuna neden olan diğer antihipertansiflerin (Örneğin hidralazin) bu etkilerini dengelemektedirler. Bu yüzden tiazidlerin β -blokerler ve ACE inhibitörleri gibi diğer antihipertansiflerle kullanılmaları yararlı olmaktadır.

Tiazid diüretikler oral yolla alınmaktadırlar. Önemli elektrolit dengesizliklerine neden olabilmektedirler. En önemli yan etkileri: hipokalemi, hiperürisemi, hiperglisemi ve sıvı kaybıdır. Böbrek fonksiyonları bozuk olan hastalarda tiazidler yeterli etki gösterememektedirler.

Spirolakton; potasyum tutucu diüretiktir ve bu grup diüretikler toplayıcı tubuller üzerinde etki göstermektedir. Sıklıkla tiazid grubu ile kombine olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Spirolakton, aldosteron ile hücre içi sitoplazmik reseptörlere bağlanmak üzere yarışan bir sentetik aldosteron antagonistidir. Ödeme neden olan pek çok durumda kan aldosteron düzeyi yüksektir ve sodyum tutulumundan sorumludur. Aldosteron düzeyi yüksek bir hastaya spironolakton verildiğinde aldosteronun etkisi antagonize edilmiş olmaktadır ve potasyum tutularak sodyum

vücuttan atılmaktadır. Addison hastalığı (primer adrenal yetmezlik) gibi, dolaşımında yeterli aldosteronun bulunmadığı durumlarda ilacın hiçbir diüretik etkisi bulunmamaktadır.

Spironolakton, vücuttan sodyum atılımını zayıf olarak sağladığı halde potasyum tutucu etkisi önemlidir. Bu etkisi nedeniyle spironolakton tiazid diüretiklerin yol açtığı hipokalemiyi önlemek amacıyla kombine edilerek kullanılmaktadır.

Spironolakton yapı olarak seks steroidlerine benzediğinden zayıf hormonal etki de göstermektedir. Erkeklerde jinekomasti, kadınlarda menstruasyon düzensizliklerine neden olabilmektedir. Bu nedenle uzun süre ve yüksek dozda kullanılmamalıdır. Hiperkalemi, bulantı, letarji ve bilinç bulanıklığı da görülebilmektedir.

Amilorid; sodyum transport kanallarını bloke ederek sodyum-potasyum değişimini azaltmaktadır, spironolakton benzeri potasyum tutucu etkisi nedeniyle antihipertansif olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ilacın toplayıcı tubullerde sodyum-potasyum değişimini engelleyici etkisi aldosterona bağlı değildir. Bu nedenle Addison hastalığı olanlarda dahi diüretik etki gösterebilmektedir. Potasyum tutucu etkisinden dolayı amilorid genellikle diğer diüretiklerle birlikte kullanılmaktadır.

Amiloridin en sık gözlenen yan etkileri: bacak krampları, kanda BUN, ürik asit ve potasyum artışıdır.

Kaptopril; anjiyotensin çevirici enzim (ACE) inhibitörüdür ve hipertansiyon tedavisinde ilk tercih ilaçların (β -bloker ve diüretikler) kontrendike olduğu veya yararlı olmadığı durumlarda önerilmektedir.

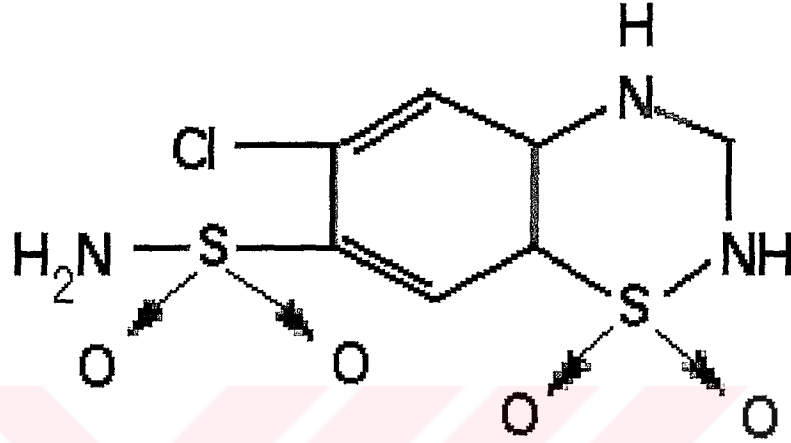
ACE inhibitörleri refleks olarak kardiyak debiyi, atım hızını ve kasılma gücünü arttırmadan periferik direnci azaltarak kan basıncını düşürmektedirler. Bu ilaçlar anjiyotensin I'i güçlü bir vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye çeviren anjiyotensin çevirici enzimi bloke etmektedirler. Dolaşımdaki anjiyotensin II konsantrasyonunu azaltan ACE inhibitörleri aldosteron sekresyonunu azaltmaktadırlar ve bunun sonucunda sodyum ve su tutulumu azalmaktadır.

Kaptoprilin en sık rastlanan yan etkileri: kuru öksürük, cilt döküntüleri, ateş, tad duyusunda değişiklik, hipotansiyon ve hiperkalemidir. Tedaviye potasyum eklenmesi ve spironolakton kullanımı kontrendikedir. Spironolakton fetotoksiktir ve hamilelikte kullanılmamalıdır (Mycek, Harvey ve Champe, 1998; Abacıoğlu ve ark., 2001).

Biz bu tez kapsamında Türkiye ilaç piyasasında yer alan ve endekslere kayıtlı hidroklorotiazid+spironolakton ve hidroklorotiazid+amilorid hidroklorür karışımlarını içeren iki adet tablet preparatında ve Almanya ilaç piyasasında bulunan ve endekslerinde kayıtlı hidroklorotiazid+kaptopril karışımını içeren bir adet tablet preparatında bulunan bu etken maddelerin miktar tayinleri için 6 kemometrik yöntemin uygulanması için tez kapsamında çalışmalar yaptık.

1.1.1.Hidroklorotiazid

Hidroklorotiazid, hipertansiyon tedavisinde ilk sıralarda tercih edilen tiazid diüretiklerdendir.



Şekil 1.1. Hidroklorotiazidin açık formülü.

1.1.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kapalı formülü: C₇H₈ClN₃O₄S₂

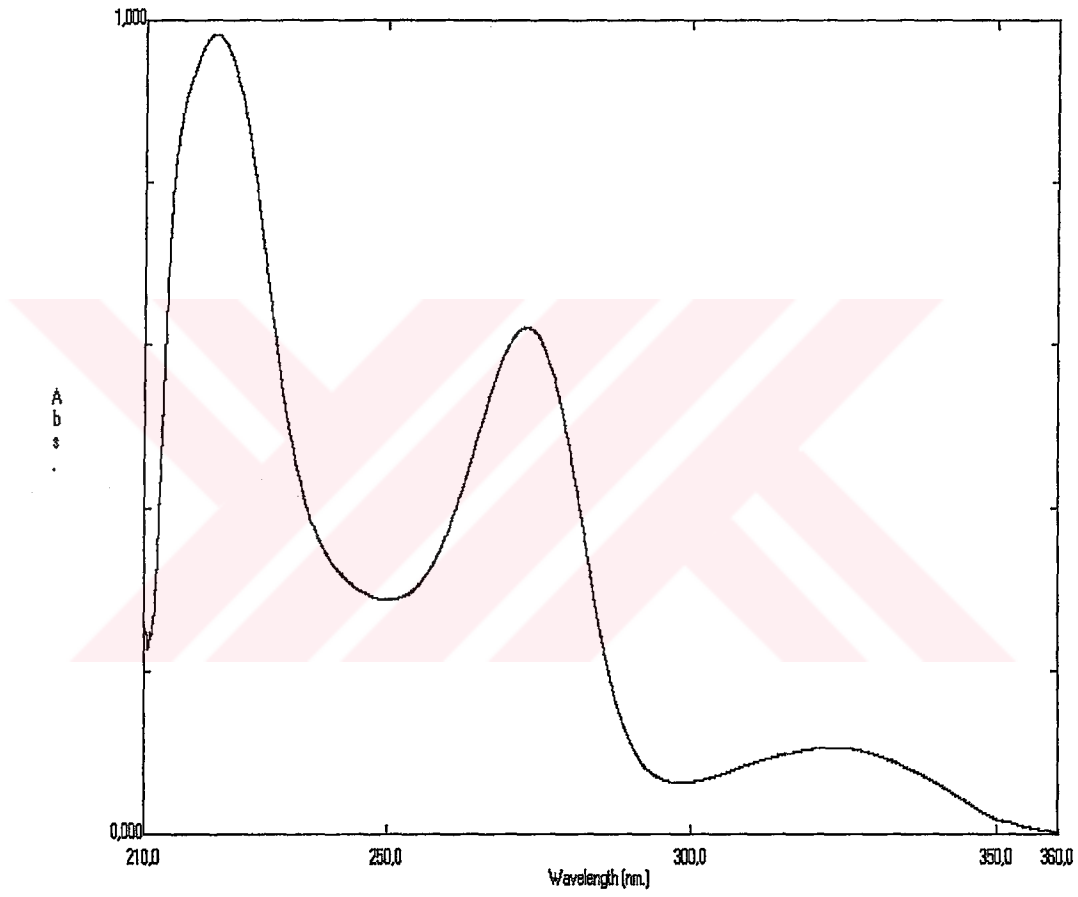
Diğer isimleri: 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazidin-7-sülfonamid-1,1-dioksid. Klorzid, Delco-Retic, Diklorid, Direma, Diucen-H, Diuklor H, Esidrex, Esidrix, HydroDIURIL, HydroSaluric, Hydro-Z, Hydrozide, Jen-Diril, Lexor, Loqua, Mictrin, Natrimax, Neo-Codema, Novohydrazide, Oretic, Ro-Hydrazide, Thiuretic, Urozide.

Molekül ağırlığı: 297,7.

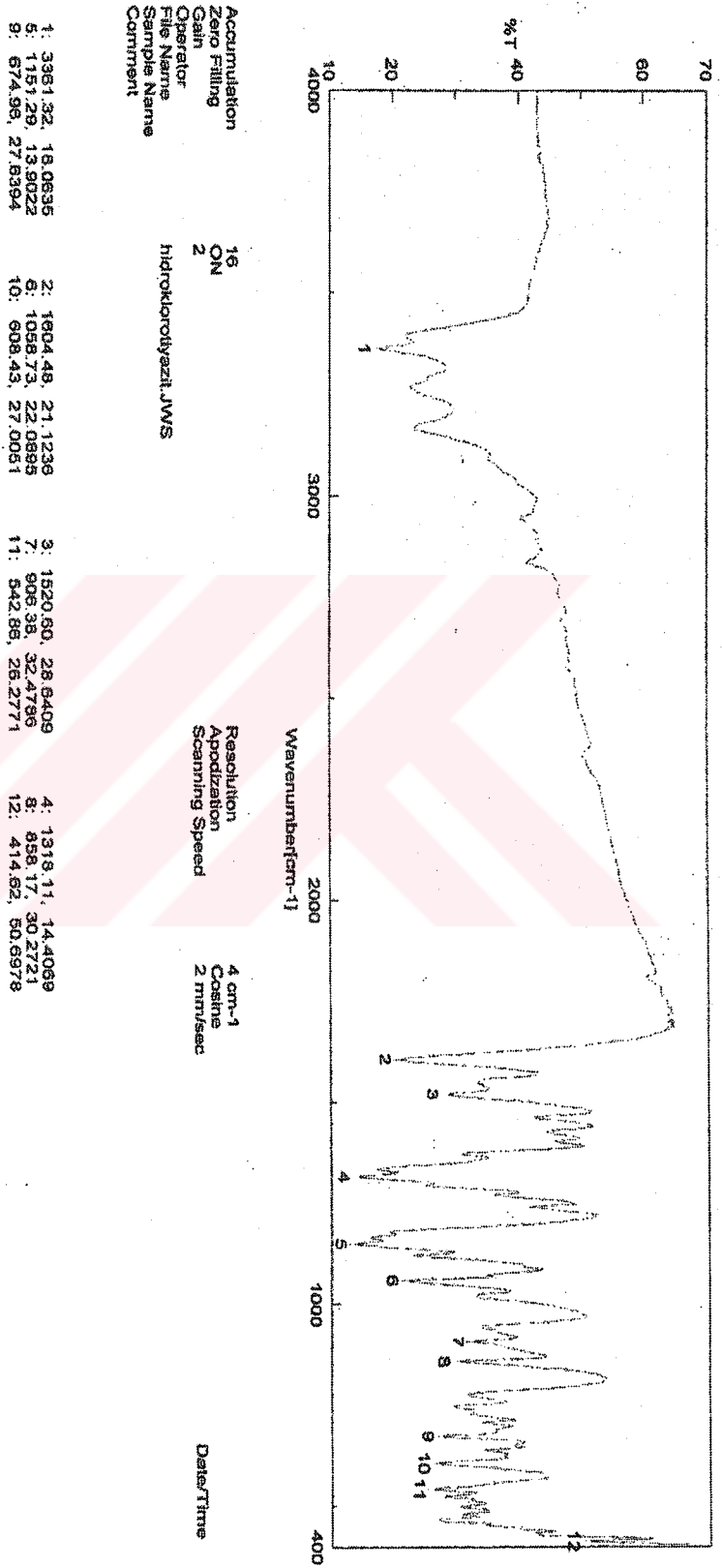
Erime Noktası: 268 °C.

UV max: 272 nm - 318 nm (sulu asit çözeltisinde).

Çözünürlüğü: Pratik olarak suda, kloroform ve eterde çözünmez, 1/200 oranında etanol ve 1/20 oranında asetonda çözünür. Dimetilformamid ve alkali hidroksit çözeltilerinde kolayca çözünür.

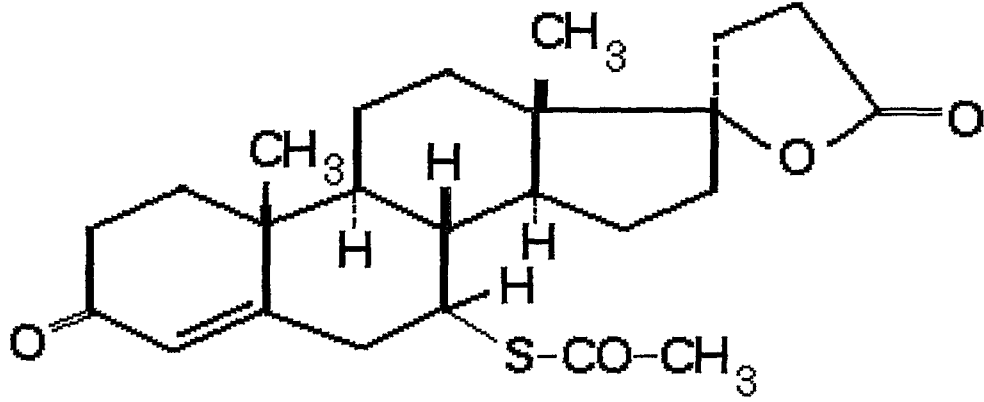


Şekil 1.2. Hidroklorotiazidin metanol ve asetik asit-sodyum asetat tampon (0,2M - pH: 5) (80:20) karışımındaki absorpsiyon spektrumu.



Şekil 1.3. Hidroklorotiazidin IR Spektrumu
(KBr diski halinde)

1.1.2. Spironolakton



Şekil 1.4. Spironolakton'un açık formülü.

1.1.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

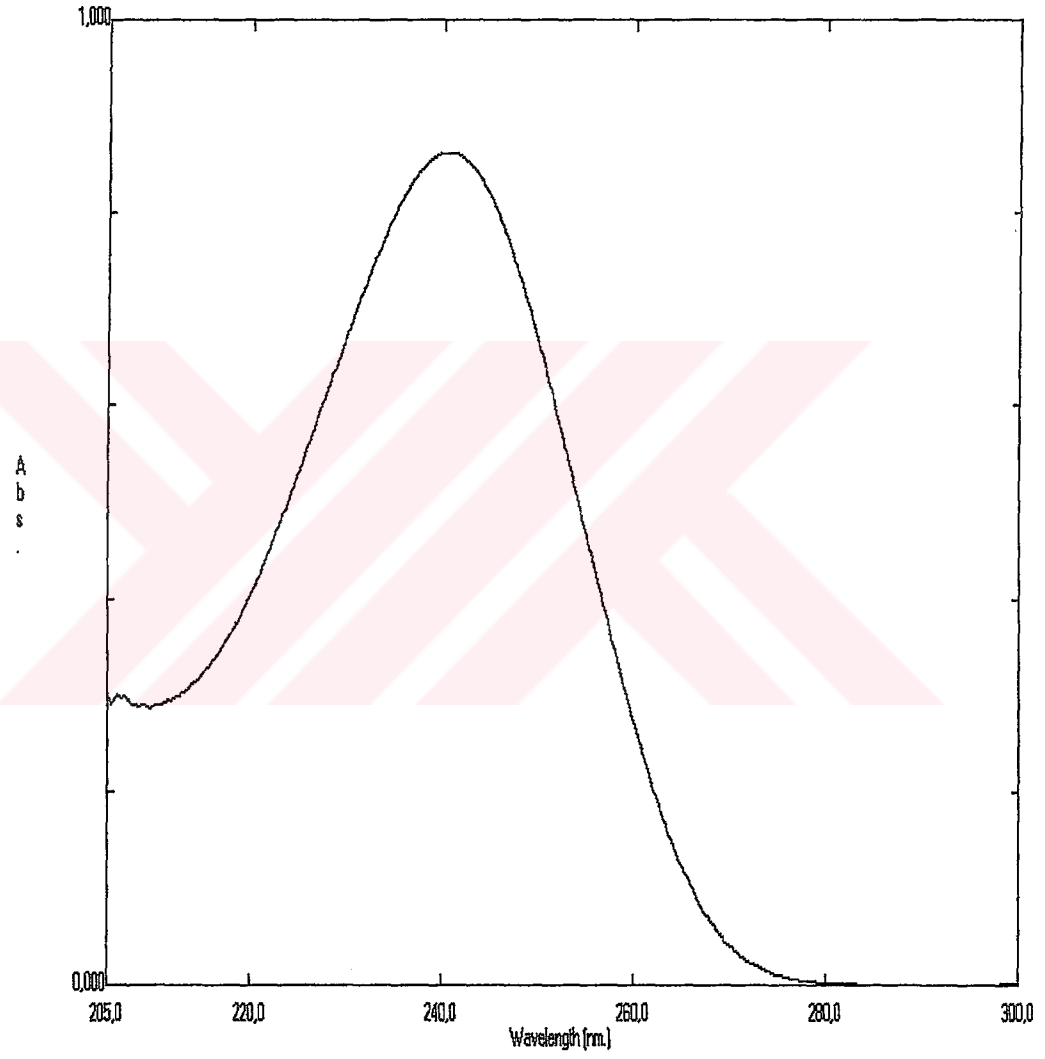
Kapalı formülü: C₂₄H₃₂O₄S.

Diğer isimleri: 7 α -Asetiltiyo-3-okso-17 α -pregn-4-ene-21,17 β -karbolakton, Aldakton, Aldopur, Altex, Diatensec, Laractone, Sincomen, Spiretic, Spiro, Spiroctan, Spirolang, Spirolone, Spirotone.

Erime noktası: 198-207 °C.

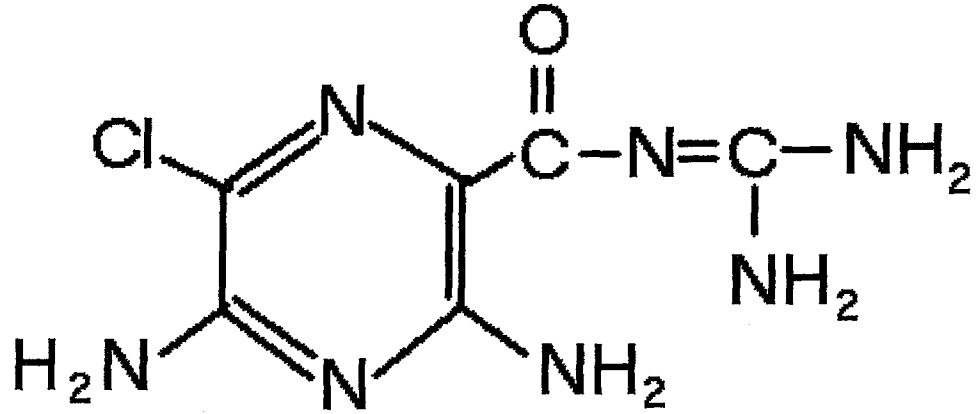
UV max: 242 nm.(sulu asit çözeltisi)

Çözünürlüğü: Pratik olarak suda çözünmez. 1/80 oranında etanol, 1/3 oranında kloroform ve 1/100 oranında eterde çözünür.



Şekil 1.5. Spironolaktunun metanol ve asetik asit-sodyum asetat tampon (0,2M - pH: 5) (80:20) karışımındaki absorpsiyon spektrumu.

1.1.3. Amilorid hidroklorür



Şekil 1.7. Amilorid hidroklorürün açık formülü.

1.1.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kapalı formülü: $C_6H_8ClN_7O \cdot HCl \cdot 2H_2O$

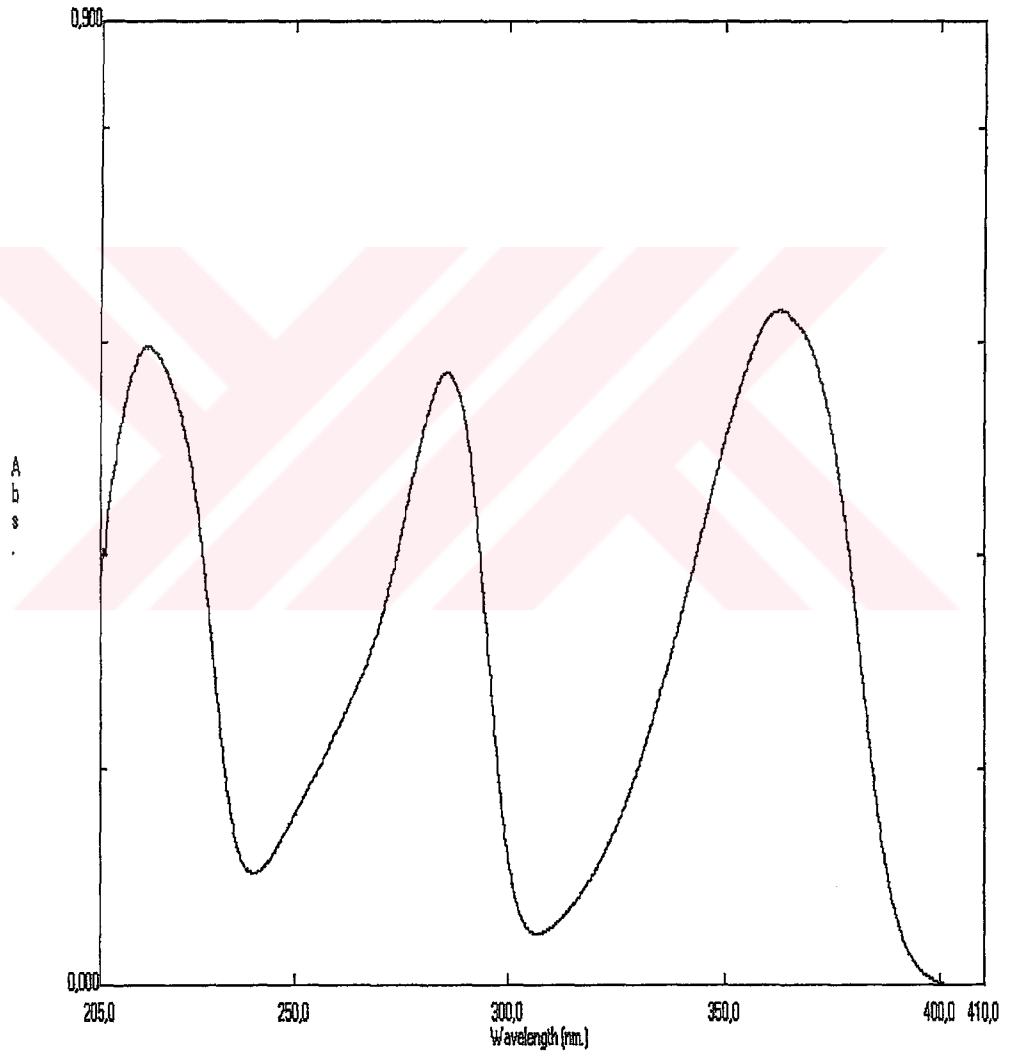
Diğer isimleri: N-Amidino-3,5-diamino-6-kloropirazin-2-karboksamid, Midamor, Modamide.

Molekül ağırlığı: 302,1.

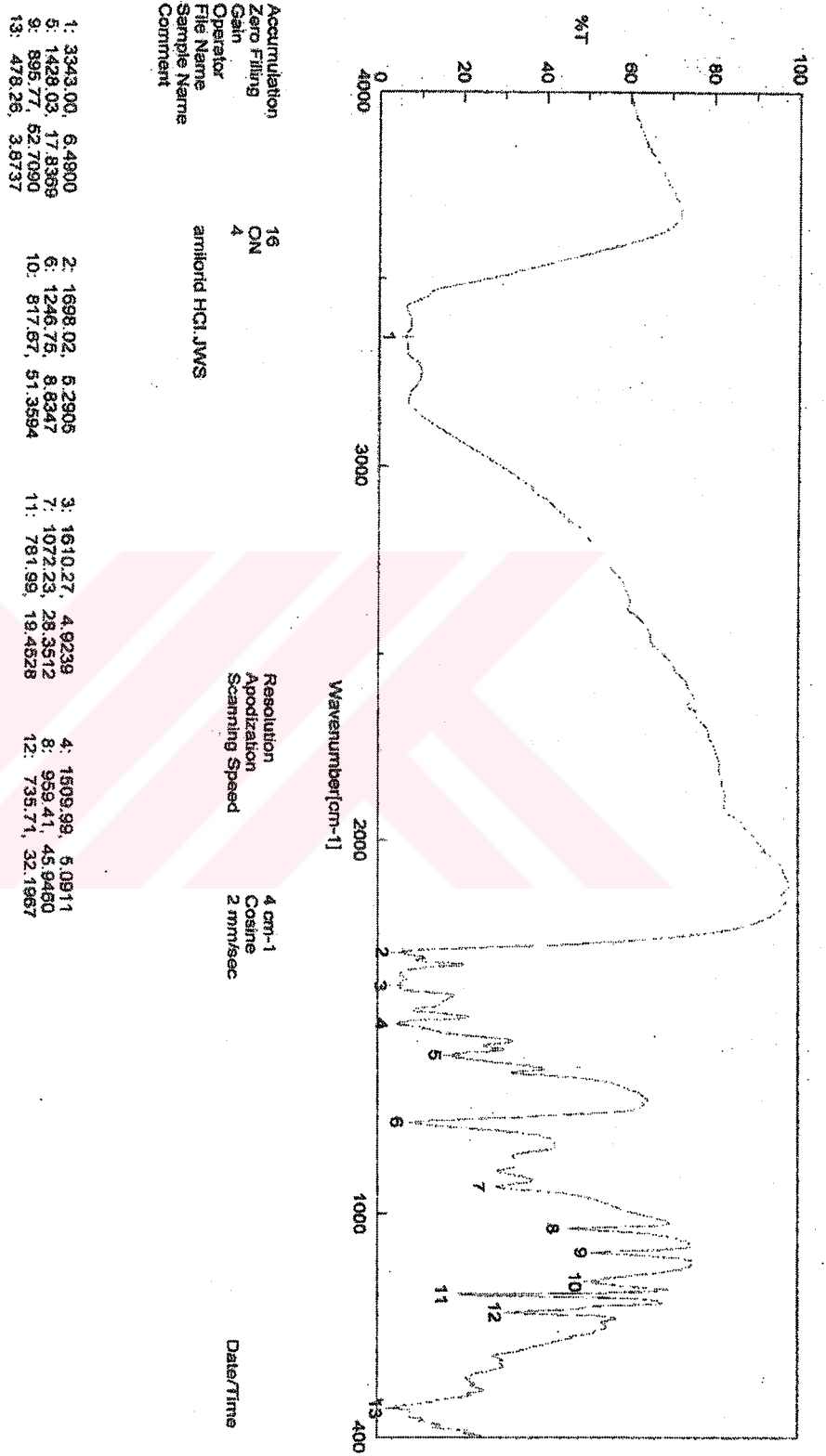
Erime noktası: 240-242 °C.

UV max: 285 nm - 361 nm (sulu asit çözeltisinde).

Çözünürlüğü: Etil asetat ve suda çözünür, 1/350 oranında etanolde çözünür. Kloroform ve eterde pratik olarak çözünmez.

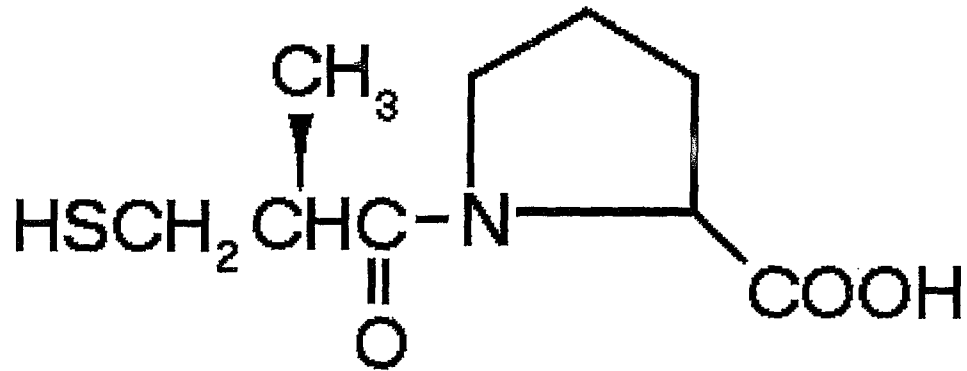


Şekil 1.8. Amiloridin metanol ve asetik asit-sodyum asetat tampon (0,2M - pH: 5) (80:20) karışımındaki absorpsiyon spektrumu.



Şekil 1.9. Amilorid hidroklorürün IR Spektrumu
(KBr diski halinde).

1.1.4. Kaptopril



Şekil 1.10. Kaptoprilin açık formülü.

1.1.4.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kapalı formülü: $C_9H_{15}NO_3S$.

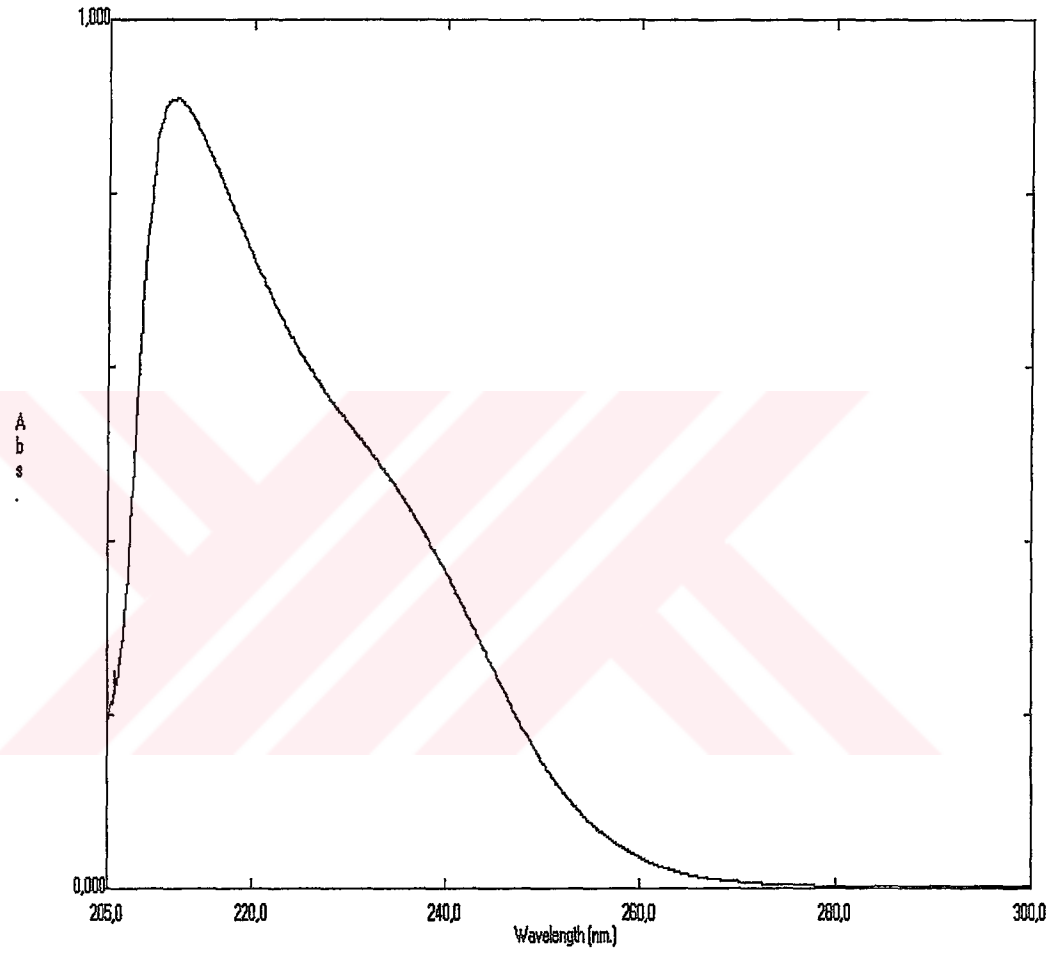
Diğer isimleri: 1-[(2S)-3-Merkapto-2-metilpropionil]-L-prolin, Acepril, Capoten, Lopirin.

Molekül ağırlığı: 217,3.

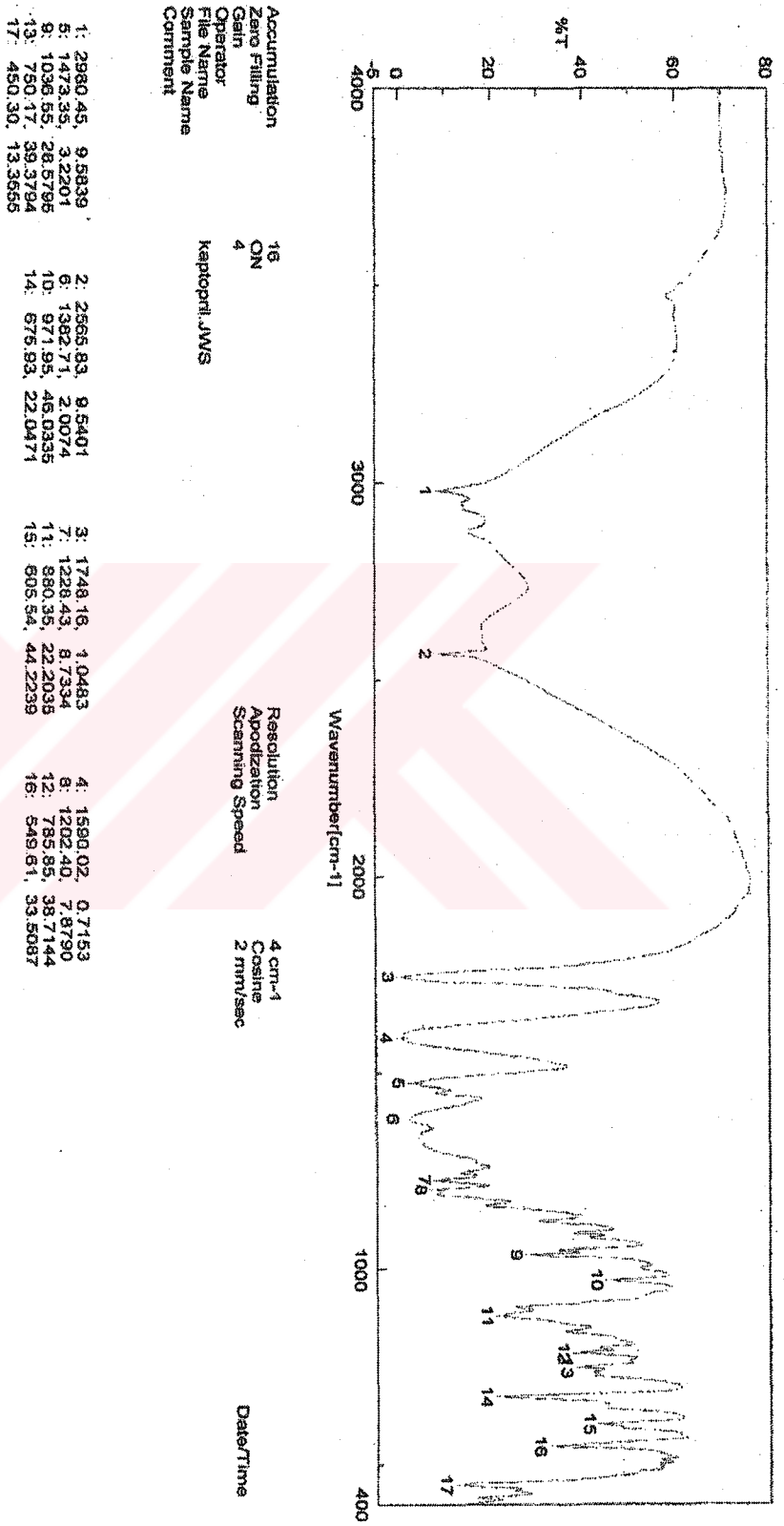
Erime noktası: 106 °C.

UV max: 230 nm – 360 nm. (sulu asit çözeltisinde)

Çözünürlüğü: Suda, etanolde, kloroformda ve metanolde kolayca çözünür.



Şekil 1.11. Kaptoprilin metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) karışımındaki absorpsiyon spektrumu.



Şekil 1.12. Kaptoprilin IR Spektrumu
 (KBr diski halinde).

1.2. TEZ KAPSAMINDAKİ ETKEN MADDELERİ İÇİN GÜNÜMÜZE KADAR UYGULANAN ANALİZ YÖNTEMLERİ

1.2.1. Hidroklorotiazid İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri

1.2.1.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Bebawy ve arkadaşı (1997) farmasötik tabletlerde bulunan hidroklorotiazidi bozunma ürünleri yanında tayin etmek için spektrofotometrik olarak 278,8 nm'de 1. ve 254,4 nm'de 2. türev yöntemini kullanmışlardır.

Salem ve arkadaşları (1991) hidroklorotiazid-spirolakton, hidroklorotiazid-kaptopril, hidroklorotiazid-furosemid iki bileşenli karışımlarındaki etken maddelerin aynı anda miktar tayinlerini türev spektrofotometrisi ile yapmışlardır. Bu tayinde 1. ve 2. türev yöntemleri kullanılmıştır.

Belal ve arkadaşları (1986) altı benzotiadiazini tayin etmek için (klorotiazid, hidroklorotiazid, triklorometiazid, benzotiazid, bendroflumetiazid, metilklotiazid) bu maddeleri hidroliz ederek kuvvetli alkali ortamda etilasetoasetat ile çiftleştirmişler ve sarı renkli bileşikler oluşturmuşlardır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan renkli bileşiklerin maksimum absorpsiyon verdikleri dalga boyunda adı geçen etken maddelerin spektrofotometrik tayimlerini yapmışlardır.

Prasad ve arkadaşları (1997) metoprolol-hidroklorotiazid ve propranolol karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin miktar tayinlerini 1. ve 2. türev yöntemlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada bileşenlerin türev spektrumlarında sıfır noktaları birbirine çok yakın olduğundan bu durumu ortadan kaldırmak için kompensasyon tekniği

kullanmışlardır. Bu tayinlerde çalışma aralığı 1. seri hidroklorotiazid için 5–10 µg/mL, propranolol için 5–15 µg/mL, 2. seride 6,25 µg/mL hidroklorotiazid sabit olmak kaydıyla propranolol için 5–15 µg/mL aralığındadır. Bu iki serinin türev absorbans değerleri kullanılarak hidroklorotiazid ve propranololun miktarlarını tayin edilmişlerdir. Hidroklorotiazid ve metoprolol karışımında ise hidroklorotiazid için 5–10 µg/mL ve metoprolol için 40–60 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışmışlardır.

Banoğlu ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada tabletlerdeki benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazidin spektrofotometrik olarak miktar tayinlerini yapmışlardır ve sonuçları YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu çalışmada 249 nm'ye karşılık gelen dalgaboyunu absorbans oranları metodunda izosbestik nokta olarak seçmişler, 239/249 nm'deki absorbans oranını benazepril için ve 269/249 nm'deki absorbans oranlarını hidroklorotiazidin regresyon denklemlerinin hesaplanması için kullanmışlardır. Kullandıkları diğer spektrofotometrik yöntem 236 ve 269 nm'de her iki etken madde için Vierordt yöntemidir.

Kartal ve Erk (1999) yaptıkları bir spektrofotometrik çalışmada hidroklorotiazid ve amiloridi tayin etmek için spektrum oranları türev yöntemini kullanmışlardır. Bu analizde spektrum oranlarının 1. türevinde karışımdaki hidroklorotiazid için 285,7 nm'de ve amilorid için 302,5 nm'deki analitik sinyalleri kullanarak maddelerin tayini yapılmıştır. Ayrıca bu etken maddelerin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır.

Poulou ve arkadaşları (1989) hidroklorotiazidi tek başına ve hidroklorotiazid–amilorid karışımını içeren tabletlerde bu etken maddelerin miktar tayinlerini 2. türev spektrofotometri ile

yapmışlardır. Bu çalışmada kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarını 0,9993'den büyük ve geri kazanım çalışmalarında bağıl standart sapmayı % 1,3'den daha küçük, standart hatayı ise % 1,5'dan daha küçük olarak bulmuşlardır.

Erk ve Onur (1997) tabletlerdeki benazepril ve hidroklorotiazidin miktar tayinleri için iki spektrofotometrik yöntem kullanmışlardır. Bunlardan birincisi olan 1. türev spektrofotometride benazepril hidroklorür için 260,7 nm'deki ve hidroklorotiazid için 239,8 nm'deki türev absorbans değerlerini ölçerek bu etken maddelerin miktarlarını tayin etmişlerdir. İkinci yöntem olarak absorbans oranları yöntemini 264, 258,3, ve 236,4 nm'ye karşılık gelen dalga boylarını kullanarak benazepril.HCl ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

El-Yazbi ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada hidroklorotiazid ve benazeprili içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin miktar tayinlerini türev spektrofotometri yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için 0,84 standart sapma ile % 100,2 ortalama ve benazepril için 0,78 standart sapmayla % 99 ortalama bulmuşlardır.

Panderi (1999) farmasötik tabletlerdeki hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürün aynı anda miktarlarını tayin etmek için 2. dereceden türev spektrofotometriyi kullanmıştır. Bu çalışmada hidroklorotiazid varlığında benazepril hidroklorürün miktar tayinini 253,6 ve 282,6 nm'deki 2. dereceden türev absorbans değerlerini ölçerek, hidroklorotiazidin miktar tayinini ise 282,6 nm'deki 2. dereceden türev absorbans değerlerini kullanarak gerçekleştirmiştir. Doğrusal çalışma aralığı, benazepril hidroklorür için 14,8–33,8 µg/mL ve hidroklorotiazid için 18,50–42,20 µg/mL'dir. Bu tayinlerde bağıl standart sapma değeri % 1,43'den düşük bulunmuştur.

Erk (1999) iki bileşenli karışımlarda hidroklorotiazid, spironolakton, ramiprilin miktar tayinlerini spektrum oranları türev ve Vierordt yöntemleri ile yapmıştır. Hidroklorotiazid-ramipril karışımını içeren tabletlerde hidroklorotiazid için 0,8 ve ramipril için 0,7 standart sapma ile Vierordt yöntemini, hidroklorotiazid için 0,3 ve ramipril için 0,9 standart sapma ile spektrum oranları türev yönteminin uygulanabildiği görülmektedir. Hidroklorotiazid-spironolakton karışımını içeren tabletlerde Vierordt yöntemi ile hidroklorotiazid için 0,7, spironolakton için 1,1 standart sapma ve spektrum oranları türev spektrofotometrisi ile hidroklorotiazid için 0,5 ve spironolakton için 0,9 standart sapma ile tayinleri gerçekleştirmiştir.

Abdine ve arkadaşları (1978) hidroklorotiazid ve rezerpini içeren kombinasyonlarda bu maddeleri tayin etmek için iyot ile bir yük transferi yöntemini ve diferansiyel spektrofotometrik yöntemleri kullanmışlardır.

Garlucci ve arkadaşları (1993) yaptıkları bir çalışmada tabletlerdeki enalapril maleat ve hidroklorotiazidin aynı anda miktar tayinini türev spektrofotometrisi ile yapmışlardır. Tayinlerini yaklaşık % 2 bağıl standart sapma ile gerçekleştirmişlerdir ve elde ettikleri sonuçları YBSK yöntemi ile karşılaştırmışlardır.

Bedair ve arkadaşları (1986) hidroklorotiazidi hidralazin hidroklorür ve propranolol ile birlikte içeren formülasyonlardaki miktar tayinlerini 2. türev spektrofotometri yöntemi ile yapmışlardır. Bu tayinde hidroklorotiazid için 2. türev absorbans değerlerinin 250 nm'de ve hidralazin hidroklorür için 317 nm'deki 2. türev absorbans değerlerinin ölçümü ile elde edilen kalibrasyonlar kullanılmıştır. Bu çalışmada iki ayrı karışım için geri kazanım değerleri sırasıyla

hidralazin hidroklorür için % 0,8 bağıl standart sapma ile % 100,6, hidroklorotiazid için % 0,4 bağıl standart sapma ile % 100,6 ve propranolol için % 0,6 bağıl standart sapma ile % 99,4 değerlerini elde etmişlerdir.

Erk ve Onur (1996) tabletlerdeki silazapril ve hidroklorotiazidi iki spektrofotometrik yöntem ile tayin etmişlerdir. Türev spektrofotometrisinde 242,8 nm'de ölçülen türev absorbans değerlerini silazaprilin tayini için ve 282,8 nm'de ölçülen türev absorbans değerlerini hidroklorotiazidin tayini için kullanmışlardır. Bu metodun uygulanmasında bağıl standart sapma değerleri silazapril için % 0,77 ve hidroklorotiazid için % 0,24 olarak hesaplamışlardır. Absorbans oranları yönteminde bu maddelerin tayini için 210,4 nm, 250,2 nm ve 270,6 nm dalga boylarını kullanmışlardır.

Sağlık ve arkadaşları (2001) tabletlerde bulunan hidroklorotiazid ve fosinoprilin 4. türev spektrofotometrisi ile tayin ederek sonuçları YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu çalışmada fosinoprilin için 217,7 nm'de ve hidroklorotiazid için 227,9 nm'de ölçülen 4. türev absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlamışlardır.

Magri ve arkadaşları (1995) yaptıkları bir çalışmada hidroklorotiazid ve fosinoprilin aynı anda miktar tayinlerini multiwavelength UV spektrofotometri yöntemi ile yapmışlardır. Bu çalışmada optimum dalga boyu aralığı olarak 210-240 nm aralığını seçmişlerdir.

Şatana ve arkadaşları (2001) tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini 1. türev spektrofotometri ile gerçekleştirerek YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu yöntemde

valsartan ve hidroklorotiazid için sırasıyla 270,6 nm ve 335 nm'deki türev absorbanans değerlerini kullanmışlardır.

1.2.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Christophersen ve arkadaşları (1977) hidroklorotiazidin miktar tayinini serumda % 15 metanol çözeltisini hareketli faz olarak ve Sephadex G-15 kolonunu kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Papadoyannis ve arkadaşları (1998) hidroklorotiazid içeren farmasötik preparatlarda ve insan serumunda bu etken maddenin miktarının tayinini katı faz ekstraksiyonundan sonra asetonitril ve asetik asit (% 1'lik) (20:80) mobil fazını kullanarak UV - görünür alan dedektörü ile 270 nm'de gerçekleştirmişlerdir.

Azuyama (1990) yaptığı çalışmada insan plazmasındaki hidroklorotiazidin miktar tayinini % 1'lik glasiyal asetik asit ve % 0,035'lik trietilen amin içeren asetonitril ve 0,07 M heptan sülfonik asitin sodyum tuzunu (18:82) karışımını hareketli faz olarak, 2 cm X 4,6 mm I.D C₁₈ kolonunu kullanarak başarmışlardır.

Koopmans (1984) çalışmasında plazma ve idrarda bulunan hidroklorotiazidin miktar tayinini 0,01024 M tetrabütil amonyum hidrojen sülfat ve 0,00976 M hidroksimetil aminometan içeren metanol-su (20:80) karışımını hareketli faz olarak kullanarak paslanmaz çelik (15 cm X 4,6 mm I.D) kolon ve UV dedektör ile 272 nm'de yapmışlardır.

Lin ve arkadaşları (1994) plazma ve idrarda bulunan hidroklorotiazidi pH: 4,9 sodyum monobazik fosfat ve 16 g tetrametil amonyum içeren 6000 mL deiyonize su + 980 mL asetonitrilden

ibaret olan karışımı hareketli faz ve 271 nm'de UV dedektörü kullanarak YBSK yöntemi ile tayin etmişlerdir.

Ouyang ve arkadaşları (1998) hidroklorotiazidi farmasötik preparatlarda tek başına ve amilorid ve lisinopril ile birlikte karışımlarında bu etken maddeleri tayin etmek için Ce (IV)'ün kimyasal ışık veren reaksiyonunu takiben fluoresans dedektör kullanarak YBSK ile tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Weinberger ve Pietrantonio (1983) Amerika'da yaptıkları bir çalışmada kan serumunda hidroklorotiazidi tayin etmek için pH: 5 olan 0,05 M tetrabütil amonyum hidroksit ile 0,01 M fosfat tamponunda % 20 asetonitrili çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmışlardır. 50-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon grafiği ile bu etken maddenin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Vries ve arkadaşı (1993) insan plazması ve idrarda hidroklorotiazidin miktarını tayin etmek için iç standart olarak hidroflumetiazidi kullanarak C₁₈ Corasil kolon vasıtasıyla seçimli olarak ayırımını gerçekleştirmişlerdir.

Shaikh ve arkadaşı (1998) dana sütünde bulunan klorotiazid ve hidroklorotiazidin miktar tayini için 0,05 M ve pH: 3 olan potasyum fosfat tamponunda (1:1) oranında asetonitril tetrahidrofurandan ibaret olan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmıştır. Bu etken maddelerin miktar tayini 225 nm'de dalgaboyu değişebilen dedektör yardımı ile hidroklorotiazid ve klorotiazid için korelasyon katsayısının karesi 0,995 olan lineer regresyon denklemleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir.

Cooper ve arkadaşları (1976) insan serumu ve idrardaki hidroklorotiazidin miktarını tayin etmek için μ Bondapak C₁₈ kolonu ve metanol - 0,01 M sodyum dihidrojen fosfatı hareketli faz olarak ve 271 nm'de UV dedektörü kullanmışlardır.

Richter ve arkadaşları (1996) 1996'da Almanya'da yaptıkları bir çalışmada insan serumundaki hidroklorotiazidi ters faz C₁₈ kolonu ve fosfat tamponu-asetonitril (90:10) çözücü sisteminden meydana gelen hareketli faz ile ayırım yaparak miktarını tayin etmişlerdir.

Shiu ve arkadaşları (1986) idrarda bulunan hidroklorotiazidin miktar tayinini YBSK yöntemiyle yapmışlardır. Bu miktar tayininde deiyonize su-metanol-tetrahidrofuran (88:10:2) karışımından oluşan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanılmıştır.

Alton ve arkadaşları (1986) insan idrarında bulunan hidroklorotiazidin miktar tayinini triklorometiazidi iç standart olarak ve 280 nm'de μ Bondapak Phenyl kolonu kullanarak hidroklorotiazidin 0,5-50 μ g/mL çalışma aralığında 5 μ g/mL triklorometiazid varlığında (iç standart) başarmışlardır.

1983 yılında Japonya'da yapılan bir çalışmada (1984) diüretik tiazidlerin biyofarmasötik çalışmaları kapsamında plazmada, idrarda, kan hücrelerinde ve safrada hidroklorotiazidin miktarı YBSK yöntemiyle tayin edilmiştir.

Hitscherich ve arkadaşları (1987) yaptıkları bir çalışmada tabletlerdeki hidroklorotiazidi ve propranolölü YBSK yöntemiyle tayin etmişlerdir. Bu maddelerin miktar tayini için siyanopropil silan kolon ve asetonitril - 0,05 M pH: 3 olan amonyum fosfat (15:85) taşıyıcı fazı ve 280 nm'de UV dedektörü kullanılmıştır.

Broch ve arkadaşları (1997) diüretikler üzerine yaptıkları bir araştırmada hidroklorotiazid ve diğer diüretikleri önce hidroliz işlemine tabi tutarak beş farklı çözücü sistemi ile ayrımını yaparak miktarlarını tayin etmişlerdir.

Martinez ve arkadaşları (1996) farmasötik preparatlardaki hidroklorotiazid ile bir grup diüretiği tayin etmek için 0,01 M ve pH: 3 olan fosfat tamponunda 0,15 M sodyum dodesil sülfat ve % 7 propanolden oluşan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanarak bütün diüretik ilaçları tayin etmişlerdir.

Domingo ve arkadaşları (1992) Spherisorb ODS-2 analitik C₁₈ kolonunu ve hareketli faz olarak pH: 6,9 olan 0,05 M SDS (sodyum dodesil sülfat) - % 5 metanol karışımını kullanarak hidroklorotiazid başta olmak üzere diüretiklerin idrarda miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Fett ve arkadaşları (1991) yaptıkları bir çalışmada biyolojik sıvılarda hidroklorotiazidin tayinini Pinkerton™ ISRP, Hisep™ ve Hypersil C₁₈ YBSK kolonlarını kullanarak YBSK ile başarmışlardır. Üç kolon için de 0,3 – 100 µg/mL çalışma aralığında iyi bir doğrusallık ve % 98 - % 102 geri kazanımla üreden ilacın tayinini yapmışlardır.

Meer ve Brown (1987) plazmadaki amilorid ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini ters faz Spherisorb ODS II kolonu ve asetnitril – metanol – tetraetilamonyum fosfat tamponunu (pH: 2,8) karışımını hareketli faz olarak kullanmak suretiyle gerçekleştirmişlerdir. Bu tayin işleminde fluoresans dedektör kullanan YBSK cihazı kullanmışlardır. Bu çalışmada hidroklorotiazid için 10–550 ng/mL ve amilorid için 0,5–20 ng/mL aralığını doğrusal çalışma aralığı olarak bulmuşlardır.

Croo ve arkadaşları (1985) tabletlerdeki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün aynı anda miktar tayinlerini C₁₈ kolonunu kullanarak YBSK ile başarmışlardır. Bu çalışmada 50 µM propilamin içeren asetonitril – 0,1 M fosfat tamponunu (pH: 3) (15:85) çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmışlardır. Yaptıkları geri kazanım çalışmasında amilorid hidroklorür için % 100,9 ve % 1,6 bağıl standart sapma, hidroklorotiazid için % 101,9 ve % 0,9 bağıl standart sapma ile elde etmişlerdir.

Panderi ve arkadaşı (1999) farmasötik preparatlardaki hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürün miktarlarını tayin etmek için yaptıkları bir kromatografik çalışmada C₁₈ mikro – bore analitik kolonunu ve 0,025 M NaH₂PO₄ (pH: 4,8) ile asetonitril (55:45) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır. Bu etken maddelerin tayininde kalibrasyon grafiklerinin benazepril hidroklorür için 5 – 20 µg/mL ve hidroklorotiazid için 6,2 – 25 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu bulmuşlardır. Bu analiz işleminde tayin limitleri benazepril hidroklorür için 0,88 µg/mL ve hidroklorotiazid için 0,58 µg/mL'dir.

Shetkar ve Shinde'nin (1997) yaptıkları çalışmada hidroklorotiazid ve enalapril maleat içeren karışımlarda bu etken maddelerin miktar tayinlerini µ Bondapak C₁₈ kolonu, 1 mL/dak akış hızında 0,025 M fosforik asit (pH: 3)-asetonitril (84:16) karışımını hareketli faz olarak kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu tayinde geri kazanım değerleri enalapril maleat için % 99,74 ve hidroklorotiazid için %99,69 olarak hesaplanmıştır.

Stewart ve Clark (1986) yaptıkları çalışmada guanetidin ve hidroklorotiazid karışımlarında bu iki etken maddeyi tayin etmek için 0,02 M sodyum pentan sülfonat içeren asetonitril ve 0,05 M NaH₂PO₄ (30:70) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır. Analizi

oktadesilan kolonu ve elektrokimyasal dedektör ile gerçekleştirmişlerdir.

Al-Zaagi ve arkadaşları (2001) farmasötik preparatlarda ramipril ve hidroklorotiazidin miktar tayinini YBSK yöntemi ile yaptıkları stabilite çalışmasında gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada asetonitril 0,1 M sodyum perklorat (46:54) karışımını 1,5 mL/s akış hızında hareketli faz olarak, LC-8 kolonu ile 210 nm'de UV dedektörünü kullanmışlardır.

Carlucci ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini 5-10 µg/mL valsartan için ve 0,5-2,0 µg/mL hidroklorotiazid için kullanılan çalışma aralıklarında YBSK yöntemi ile yapmışlardır. Bu analizde ters faz Hypersil ODS kolonu ve asetonitril-asetat tamponu (0,1 M, pH: 4,9) (40:60) karışımını taşıyıcı faz olarak kullanmışlardır.

Sa'sa' ve arkadaşları (1988) tablet formülasyonlarında atenololün hidroklorotiazid ve klortalidonla olan iki bileşenli karışımlarında bu etken maddeleri YBSK yöntemi ile tayin etmişlerdir. Bu yöntemde 1 mM amonyum asetat ve 2 mM oktansülfonik asitin sodyum tuzunun asetonitrildeki çözeltisini hareketli fazı ve LC-8-DB kolonunu kullanmışlardır.

Argekar ve Sawant (2000) yaptıkları bir çalışmada hidroklorotiazid ve losartan potasyumu tabletlerden analiz etmek için ters faz ve seçimli YBSK yöntemini kullanmışlardır.

Fatmi ve arkadaşı (1990) farmasötik preparatlarda bulunan hidralazin hidroklorür ve hidroklorotiazidin miktar tayinini 254 nm'de UV dedektör ve su-dibutilamin fosfatı hareketli faz olarak kullanarak yapmışlardır. Yaptıkları geri kazanım çalışmasında

hidralazin hidroklorür için % 1,3 bağıl standart sapma ile % 98,9 ve hidroklorotiazid için % 1,1 standart sapma ile % 98,8 değerlerini bulmuşlardır.

Atay ve arkadaşları (2001) farmasötik preparatlarda bulunan hidroklorotiazid ve silazaprilin miktar tayinini YBSK yöntemi ile yapmışlardır. Bu çalışmada metanol-fosfat tamponundan ibaret hareketli fazında seçimli olarak bu etken maddelerin ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Sabit faz olarak Lichrospher 100 RP-18e kolonunu kullanmışlardır.

Özkan (2001) yaptığı bir kromatografik çalışmada tabletlerde ve insan serumunda bulunan losartan potasyum ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile yapmıştır. Bu çalışmada ters faz C₁₈ kolonunun ve 0,01 M KH₂PO₄-asetonitril (65:35) karışımını pH'sını H₃PO₄ ile 3'e ayarlayarak hareketli faz olarak kullanmıştır. Uygulanan yöntemin yakalama limiti ve tayin limitlerini sırasıyla losartan potasyum için 1,02 ng/mL ve 3,39 ng/mL ve hidroklorotiazid için 4,49 ng/mL ve 14,96 ng/mL olarak bulmuştur.

Özkan ve arkadaşları (2001) hidroklorotiazid ve fosinopril sodyumunu içeren tabletlerde bu etken maddelerin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile başarmışlardır. Bu analiz yönteminde ters faz C₁₈ kolonu, % 10'luk fosforik asit çözeltisiyle pH'sı 4'e ayarlanmış metanol-su karışımını (40:60) hareketli faz olarak kullanmışlardır.

1.2.1.3. Kemometri

Dinç (2002) yaptığı kemometrik çalışmada farmasötik tabletlerdeki hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürü tayin etmek için üç kemometrik kalibrasyon yöntemi (CLS, ILS, PCR) kullanmıştır. Bu kalibrasyonlar için çalışma aralığı 0 – 22 µg/mL hidroklorotiazid ve

0–36 µg/mL benazepril hidroklorürü içeren farklı konsantrasyonlarda kalibrasyon seti hazırlanarak 220–350 nm spektral aralıkta 24 noktada (dalga boyunda) absorpsiyon ölçümleri ile hazırlanmıştır. Kalibrasyonları hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürün karışımlarına uygulamıştır.

Dinç ve Baleanu (2002) yaptıkları bir çalışmada tabletlerdeki hidroklorotiazid ve silazaprilin miktar tayinini CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri ile gerçekleştirmişlerdir. Bu miktar tayininde 210–290 nm aralığında 4'er nm aralıklarla 15 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçümler alarak oluşturulan kemometrik yöntemler yapay karışımlara ve tabletlere uygulanmıştır. Analiz sonuçlarında hidroklorotiazid için 0,20 ve silazapril için 0,15'den daha küçük standart sapma ile sonuçlar bulunmuştur.

1.2.1.4. Kapiller Elektforez

Gonzalez ve arkadaşları (1996) karışımlardaki amilorid, triamterene, bendroflumethiazide, bumetanide maddelerinin miktar tayinini kapiller elektforez yöntemiyle başarmışlardır. Bu çalışmada dört ilacın ayrımı pH: 5'de gerçekleştirilerek floresans dedektör kullanmışlardır.

1.2.1.5. Polarografi

Martin ve arkadaşları (1999) amilorid ve hidroklorotiazidi içeren farmasötik formülasyonlarda bu maddelerin miktar tayinlerini diferansiyel puls polarografi yöntemini kullanarak kısmi en küçük kareler metodu ile hazırladıkları kalibrasyonlar ile yapmışlardır. Bu yöntemin uygulamasında doğrusal çalışma aralığını amilorid için

$2,4 \times 10^{-5}$ – $8,0 \times 10^{-5}$ M ve hidroklorotiazid için $8,0 \times 10^{-5}$ – $3,2 \times 10^{-4}$ M olarak bulmuşlardır.

1.2.2. Spironolakton İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri

1.2.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Moussa ve Kousy (1985) bazı diüretik ilaçların kolorimetrik analizleri başlıklı çalışmalarında hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktar tayinlerini bu etken maddeleri tek başına içeren tabletlerde yapmışlardır. Tabletteki hidroklorotiazidi tayin etmek için bu etken maddenin susuz ortamda kobalt klorür ve N-butilamin ile verdiği mavi renkli kompleksin 570 nm'deki absorbansı ölçülerek yapılmıştır. Spironolaktonu içeren tabletlerde ise bu etken maddeyi tayin etmek için renkli hidrazon türevini oluşturan izoniazid ile reaksiyona sokulan spironolaktonun oluşturduğu renkli kompleksin 405 nm'deki absorbans ölçümü kullanılmıştır.

Wahbi ve arkadaşları (1992) ikili karışımların türev spektrofotometrisi ve kompensasyon tekniği ile analizinde spironolakton ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini yapmışlardır. Bu yöntemde uygun kör çözeltileri kullanarak standart çözeltilerinin herbir seti için 1. ve 2. türev spektrumları kaydedilerek her iki bileşiğin 1. türevlerinin maksimumlarının oranı hesaplanır ve ayrıca seçilen dalga boyunda 1. maddenin 1. türev absorbans değerinden 2. maddenin 1. türev absorbans değerinin farkı, 1. maddenin 2. türev absorbans değerinden 2. maddenin 2. türev absorbans değerinden farkına oranlanarak kompensasyon türev yönteminin uygulaması yapmışlardır.

Linares ve arkadaşları (1999) karışımlardaki spironolakton ve altiazidin miktar tayini için kısmi en küçük kareler yöntemini dalga boyu seçimine dayanarak uygulamışlardır. Bu tayinde bulunan sonuçlar YBSK ile doğrulanmıştır. Yöntemin farmasötik preparata uygulanmasında spironolakton için 25,19 ortalama ile 0,11 standart sapma ve altiazid için 14,38 ortalama ile 0,07 standart sapma sonuçlarını bulmuşlardır.

Martin ve arkadaşları (1997) spironolakton ve hidroklorotiazidi içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin miktar tayini için spektrum oranları türevi ve multi-wavelength regresyon yöntemlerini uygulamışlardır. Multi-wavelength regresyon yönteminde hidroklorotiazid ve spironolakton için sırasıyla 0,72 ve 0,84 bağıl standart sapma ve spektrum oranları türev yöntemiyle hidroklorotiazid ve spironolakton için sırasıyla 0,67 ve 0,78 bağıl standart sapma değerleri bulmuşlardır.

1.2.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Croo ve arkadaşları (1985) spironolakton ve altiazid etken maddelerini içeren tabletlere YBSK yöntemini uygulamışlardır. Bu miktar tayini çalışmasında LiChrosorb RP C₁₈ kolonu ve asetonitril-su (1:1) çözücü sistemini içeren karışımını hareketli faz ve UV dedektörü kullanmışlardır. Geri kazanım değerlerini spironolakton için % 99,34 ortalama ile 1,29 bağıl standart sapma, altiazid için % 98,97 ortalama ile 0,76 bağıl standart sapma değerlerini hesaplamışlardır.

Bachman ve Stewart (1990) yaptıkları bir çalışmada tabletlerdeki spironolakton ve hidroklorotiazidin kantitatif analizini

500 mL 0,1 M NaH_2PO_4 ve 450 mL metanolü karıştırarak elde ettikleri çözücü sisteminden meydana gelen hareketli fazı ve Apex Cyano RP kolonunu kullanarak YBSK – fotoliz – elektrokimyasal dedektör ile başarmışlardır. Bu çalışmada kalibrasyonlar için hidroklorotiazidin ve spironolaktonun 100–500 ng/mL aralığının doğrusal olduğu bulunmuştur.

Pramar ve arkadaşları (1991) yaptıkları bir stabilite çalışmasında spironolakton ve bozunma ürünlerinin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada Mikro C_{18} ile Mikrofenil kolonlarını kullanmışlar ve spironolaktonun 3,4-5,2 pH değerleri civarında stabil olduğunu bulmuşlardır. Bu analizde bağıl standart sapma % 0,7 olarak verilmektedir.

1.2.3. Amilorid Hidroklorür İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri

1.2.3.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Toral ve arkadaşları (2002) birinci türev spektrofotometri ile farmasötik formülasyonlardaki amiloridi 343,6 nm'de, furosemidi 241,4 nm'de türev absorbans değerlerini okuyarak tayin etmişlerdir. Bu tayinde düzeltme faktörü 8, atlama faktörü 1×10^{-4} olarak kullanılmıştır. Çalışma aralığı amilorid için $6,9 \times 10^{-8}$ – 16×10^{-5} mol/l ve furosemid için $6,8 \times 10^{-8}$ – 8×10^{-5} mol/l olarak alınmıştır.

Kustrin ve arkadaşları (1993) tabletlerde amiloridin miktarını tayin etmek için pH: 3,6 – 6 aralığındaki asetat tampon çözeltisi içerisinde bu etken maddenin Cu (II) ile oluşturduğu kompleksin 716 nm'de verdiği maksimum absorbans değerleri okunarak çizdirilen

kalibrasyon eğrisini kullanmışlardır. Bu tayinlerde tabletler için bağıl standart sapma % 1,34 - % 2,04 aralığında bulunmuştur.

Bigley ve Grob (1986) yaptıkları çalışmada amilorid, hidroklorotiazid ve metildopayı içeren karışımlarda bu etken maddelerin miktar tayinini flow injection sistemi ile spektrofotometrik olarak tayin etmişlerdir. Etiket miktarı tekrar edilebilirlik işlemlerini değerlendirmek için kullanılarak bağıl standart sapma % 1,16 olarak bulunmuştur.

Erk ve Onur (1997) farmasötik preparatlardaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürü tayin etmek için üç spektrofotometrik yöntem kullanmışlardır. Bu yöntemler sırasıyla Vierordt metodu, Modifiye Vierordt yöntemi ve absorbans oranları yöntemleri olup farmasötik preparata uygulandıklarında hidroklorotiazid için 1,7, 1,6 ve 2,8 standart sapma ile, amiloride hidroklorür için 1,5, 1,8, 2,0 ve 1,6 standart sapma ile tablet analizlerini gerçekleştirmişleridir.

Prasad ve arkadaşları (1998) hidroklorotiazid, amilorid ve atenolol içeren kombinasyonlarda bu etken maddeleri tayin etmek için türev spektrofotometrisi kullanmışlardır. Bu analizde yapılan geri kazanım çalışmasında tablette amilorid hidroklorür için 0,59, hidroklorotiazid için 0,66 ve atenolol için 0,84, kapsülde ise amilorid hidroklorür için 0,49, hidroklorotiazid için 0,46 ve atenolol için 1,18 standart sapma değerlerini bulmuşlardır.

1.2.3.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yip (1984) ve arkadaşları ters faz C₁₈ kolonunu ve pH: 2,2 olan 0,15 M perklorik asit ile % 32 asetonitrilden ibaret olan hareketli fazı

kullanarak spektrofotometrik dedektörle 286 nm'de uyarıcı ışık yollanması yoluyla plazma ve üre içindeki amiloridin miktar tayinini başarmışlardır.

Jankowski ve arkadaşları (1997) furosemid-amilorid ilaç karışımında yaptıkları miktar tayini ve farmakokinetik çalışmalarda bu etkin maddeleri tayin etmek için furosemidi pH: 1'de, amiloridi pH: 12'de insan plazmasından ekstre ettikten sonra YBSK yöntemi uygulamışlardır. Bu maddelerin ayrımı için Nucleosil C₁₈ kolonu ve hareketli faz olarak da pH: 5 olan 0,3 M sodyum asetat-asetonitril (69:31) karışımını kullanmışlardır.

Shi ve arkadaşları (1986) plazma ve idrardaki amiloridin miktar tayinini Silikajel kolon ve hareketli faz olarak su kullanarak YBSK yöntemi ile yapmışlardır. Bu çalışmada plazmadaki amilorid için 0,5-15 ng/mL çalışma aralığındaki sekiz farklı konsantrasyon kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği ve üredeki amilorid için ise 0,1-2 µg/mL aralığında yedi farklı konsantrasyon ile elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanmışlardır.

Bechgaard (1989) yaptığı bir çalışmada insan plazmasındaki amiloridi YBSK ile 372 nm'de uyarıcı ışık yollayarak 420 nm'deki emisyonunu spektrofotometrik olarak ölçmüşler ve % 6 bağıl standart sapma ile miktarını tayin etmişlerdir.

Alliegro ve arkadaşları (1992) amilorid ve onun benzerlerinin plazmadaki seviyelerini tayin etmek için katı faz ekstraksiyonu çözücü değişimi ile ters faz C₁₈ kolonu kullanarak 360 nm'de UV - görünür alan dedektörü kullanmışlardır.

Bi ve arkadaşları (1992) insan idrarındaki amiloridin teşhis ve miktar tayinini YBSK ve gaz kromatografisi - kütle spektrometrisi ile

tayin etmişlerdir. Bu çalışmada idrar numunelerindeki amiloridi önce UV dedektör kullanan YBSK ile tayin etmişler ve sonucu gaz kromatografisi – kütle spektrometrisi ile doğrulamışlardır. YBSK’de HP ODS Hypersil C₁₈ kolonu ve hazırlanan A ile B çözücü sistemini taşıyıcı faz olarak kullanmışlardır. A çözücüsü; 0,02 M, pH: 3,2 olan monobazik sodyum fosfat monohidrat–1,59 g propil amin hidroklorür karışımıdır ve pH’sı fosforik asit ile ayarlanmıştır. B çözücüsü ise asetonitrildir.

Somogyi ve arkadaşları (1998) biyolojik sıvılarda amiloridi tayin etmek için amilorid ve iç standart olarak triamtereni pH: 7,6’da brom timol mavisi ile reaksiyona sokmuşlar ve oluşan iyon çiftini fluoresans dedektör kullanarak YBSK yöntemi ile tayin etmişlerdir.

Domingo ve arkadaşları (1993) amilorid ile birlikte bendroflumetiazid, klortalidon, spironolakton ve triamtereni içeren farmasötik preparatlarda bu maddelerin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile yapmışlardır. Bu maddelerin miktar tayininde Spherisorb Octadecyl Silane ODS–2 C₁₈ kolonunu ve 0,07 M sodyum dodesil sülfat ve % 5’lik pentanol karışımını çözücü sistemi olarak kullanmışlardır.

Forrest ve arkadaşları (1988) çalışmalarında insan vücudundaki sıvılarda amiloridin ölçümü için ters faz C₁₈ kolonu ve 365 nm’de UV – görünür alan dedektörü kullanmışlardır. Bu miktar tayininde çözücü sistemi olarak 4 mL glasiyal asetik asit içeren % 12’lik asetonitril çözeltisini pH’sını trietilenamin ile 4,5’e ayarlayarak kullanmışlardır. Plazmadaki amilorid için yapılan geri kazanım deneylerinde ortalama değer % 100,9 ve standart sapma 4,50 bulunmuştur.

1.2.3.3. Fluorimetri

Pulgarin ve arkadaşları (1997) izopotansiyel fluorimetri yöntemini kullanarak idrardaki amiloridin 15–152 ng/mL konsantrasyon aralığında 364,8 nm’de uyarıcı ışık göndererek 421,8 nm’deki emisyon şartlarında fluoeresans spektrumlarını çizdirmişlerdir. Bu fluoeresans spektrumlarının birinci türevi alınarak ile 392 nm’deki emisyonun fluoeresans şiddeti ölçülmüş ve elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak tayin gerçekleştirilmiştir.

Abdel-Hay ve arkadaşları (1992) spektrofluorimetrik olarak yaptıkları bir çalışmada tabletlerde ve 9,10-fenantrokinonu kullanarak biyolojik sıvılarda guanetidin sülfat, guanoksan sülfat ve amilorid hidroklorür miktar tayinlerini yapmışlardır.

1.2.4. Kaptopril İçin Günümüze Kadar Uygulanan Miktar Tayini Yöntemleri

1.2.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Panderi ve Poulou (1992) tabletlerde tek başına kaptoprili ve kaptopril–hidroklorotiazid kombinasyonlarında bu etken maddelerin miktar tayinlerini türev spektrofotometrisi ile gerçekleştirmişlerdir. Tabletlerdeki kaptoprilin tek başına bulunduğu farmasötik preparatlarda 5–25 µg/mL çalışma aralığında 258 nm’de ikinci dereceden türev absorban değerlerinin ölçümü yaparak bu maddenin tayini gerçekleştirilmişlerdir. Kaptopril 6,0–14 µg/mL ve hidroklorotiazidin 3,0 -7,0 µg/mL çalışma aralığında 278–265 nm’deki spektrumların birinci dereceden türev absorban değerlerinin ölçümüyle kurulan denklem sisteminden faydalanılarak tayin edilmiştir. Kaptopril tabletlerde 0,89 standart sapma ve 3,4

bağıl standart sapma ile, ikili karışımda kaptopril 0,95 standart sapma ve 1,95 bağıl standart sapma ile, hidroklorotiazid ise 0,51 standart sapma ve 1,98 bağıl standart sapma ile analiz edilmiştir.

Mahgoub ve arkadaşları (1992) iki bileşenli karışımlarda kaptoprilin miktar tayinini spektrumların türevi ve spektrumların farklarının türevine dayalı spektrofotometrik yöntemler ile gerçekleştirmişlerdir. Kaptopril 0,1 N NaOH' de 1,4 – 3,0 mg olarak %' de konsantrasyon aralığında 238 nm' deki birinci türev absorban değerlerinin ölçümüyle 0,1 N NaOH – metanol karışımında ise aynı konsantrasyon aralığında 228 ve 248 nm' deki spektrumların farkına dayalı ikinci türev absorban değerleri ölçülerek analizi yapmışlardır. Hidroklorotiazidi 0,1 N NaOH' de 0,7 – 1,5 mg olarak %' de çalışma aralığında 274 nm'de tayin etmişlerdir.

1.2.4.2. Kromatografik yöntemler

1.2.4.2.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Imai ve arkadaşları (1982) kaptoprili insan biyolojik sıvılarında N-(4-dimetilaminofenil) maleimid ile türevlendirerek elektrokimyasal dedektör ile YBSK yöntemini kullanarak miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu tayinde μ Bondapak C₁₈ kolonu ve asetonitril - % 8' lik NH₄H₂PO₄ (pH: 3) (1:2) çözücü sistemini 1 mL/dak akış hızı şartlarında kullanarak işlemi başarmışlardır.

Ouyang ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada farmasötik tabletlerdeki kaptopril ve hidroklorotiazid etken maddelerini rodamin 6G ile duyarlılaştırılmış sülfürik asitli ortamda Ce (IV) ile reaksiyona sokarak fluoresans yapar hale getirmişlerdir. Sonra fluoresans dedektör kullanan YBSK ile bu etken maddelerin

miktar tayinlerini yapmışlardır. Bu çalışmada hidroklorotiazidin 0,6–200 µmol ve kaptoprilin 8–300 µmol aralığında doğrusal cevaplar verdikleri bulunmuştur.

Kirschbaum ve Perlman (1984) tablet formülasyonlarında bulunan kaptopril ve hidroklorotiazidin aynı anda miktar tayinlerini 2 mL/dak akış hızında sudaki % 0,05' lik fosforik asit ve metanol (25:75) karışımını çözücü sistemi, ters faz kolonu ve UV – görünür alan dedektörünü kullanarak seçimli olarak YBSK ile gerçekleştirmişlerdir.

Pereira ve Tam (1988) plazmadaki kaptoprili tayin etmek için kurulan 4–400 ng/mL ve 50–750 ng/mL çalışma aralıklarındaki kalibrasyon denklemlerini kullanarak bu maddenin serbest ve toplam miktarını YBSK yöntemi ile tayin etmişlerdir. Bu çalışmada ODS-3 C₁₈ kolonu ve floresans dedektörü kullanmışlardır. Burada 0,5 mL plazma için tayin sınırları serbest kaptoprilde 10 ng/mL ve toplam kaptoprilde 50 ng/mL olarak bulunmuştur.

1.2.4.2.2. Gaz Kromatografisi

Ivashkiv ve arkadaşları (1984) yaptıkları bir çalışmada insan plazmasındaki toplam kaptoprili gaz-kütle spektroskopisi yöntemlerini kullanarak tayin etmişlerdir. Kaptopril önce N-etilmaleimid ile muamele edilip, XAD-2 resin ile saflaştırılıyor, etil asetat ile ayrıldıktan sonra gaz-kütle spektroskopisi ile tayin işlemi yapılıyor. Bu çalışmada kaptoprilin plazmadaki teşhis sınırı 20 ng/mL olarak bulunmuştur.

1.2.4.3. Fluorimetri

Zhang ve arkadaşları (1995) farmasötik preparatlarda kaptoprilin miktar tayini için sülfürük asit ortamındaki Ce (IV)'ü kaptopril ile reaksiyona sokarak kompleks oluşumunun ardından oluşan Ce (III) – kaptopril*, rodamin B ile reaksiyona tabi tutulmuş ve meydana gelen floresansın ölçümüne dayalı olarak yöntemi uygulamışlardır. Kimyasal ışık emisyonunun duyarlı hale getirilmiş tipi ile 0,1–6,0 μM konsantrasyon aralığında kaptoprilin miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Bu tayinde geri kazanım değerleri % 95,4-% 99,5 olarak bulunmuştur



1.3. KULLANILAN YÖNTEMLER

1.3.1. Spektrofotometri

Işık ile madde arasındaki etkileşmeden yararlanılarak gerçekleştirilen analiz yöntemleri, az analiz materyali gerektirmesi, seçiciliği ve doğruluk derecesinin yüksek oluşu nedeniyle analitik amaçlar için sıkça kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerden biri olan spektrofotometri ışık enerjisinin absorpsiyonuna dayalı bir yöntemdir. Işık ise elektromanyetik bir radyasyondur ve frekansı (ν) veya dalga boyu (λ) ile karakterize edilir.

Enerji ise:

$$E = h \cdot \nu \quad \text{veya} \quad E = h \cdot c / \lambda$$

$$(h = \text{plank sabiti} = 6,62 \times 10^{-27} \text{erg.sn ve } c = 3 \times 10^{10} \text{cm/sn})$$

formülleriyle ifade edilir.

Bu eşitliklere göre ışığın dalga boyu büyüdükçe enerjisinin azalmasına karşılık dalga boyu küçüldükçe enerjisi artar.

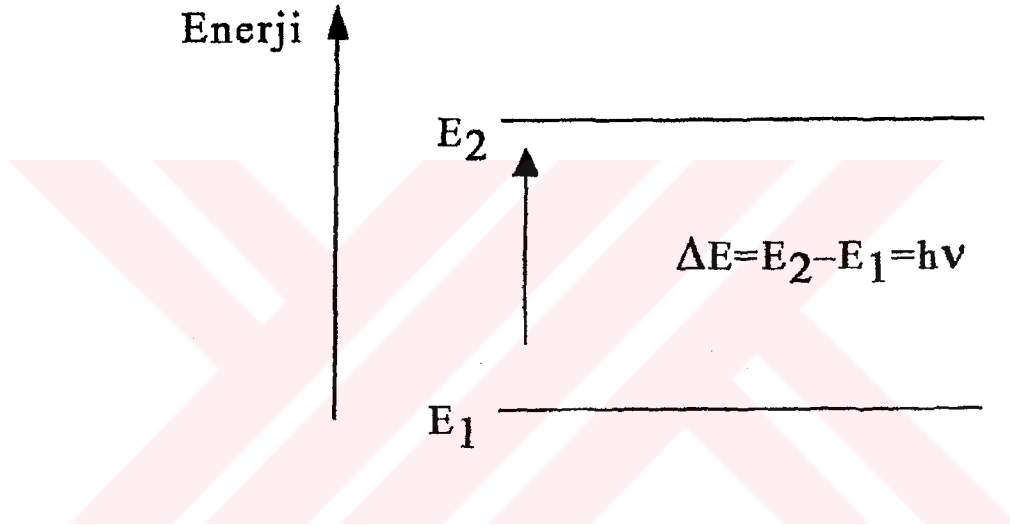
Işık; atom ve moleküller tarafından absorbe edilebilir. UV ve görünür alandaki ışığın absorpsiyonu molekülü oluşturan atomların bağ elektronları ile ilgilidir.

Absorbe edilen enerji kuantaldır ve elektronların düşük enerjili orbitallerden (temel hal) daha yüksek enerjili orbitallere (uyarılmış hal) geçmesine neden olur. Ama her enerji absorbe edilemez; ancak iki enerji seviyesi arasındaki farka eşit bir enerji absorbe edilebilir (Şekil 1.13).

UV ve görünür alandaki ışığın absorpsiyonu aynı zamanda bir molekülün vibrasyonel ve rotasyonel enerji seviyelerinde de değişikliğe neden olur; çünkü bir molekülün toplam enerjisi:

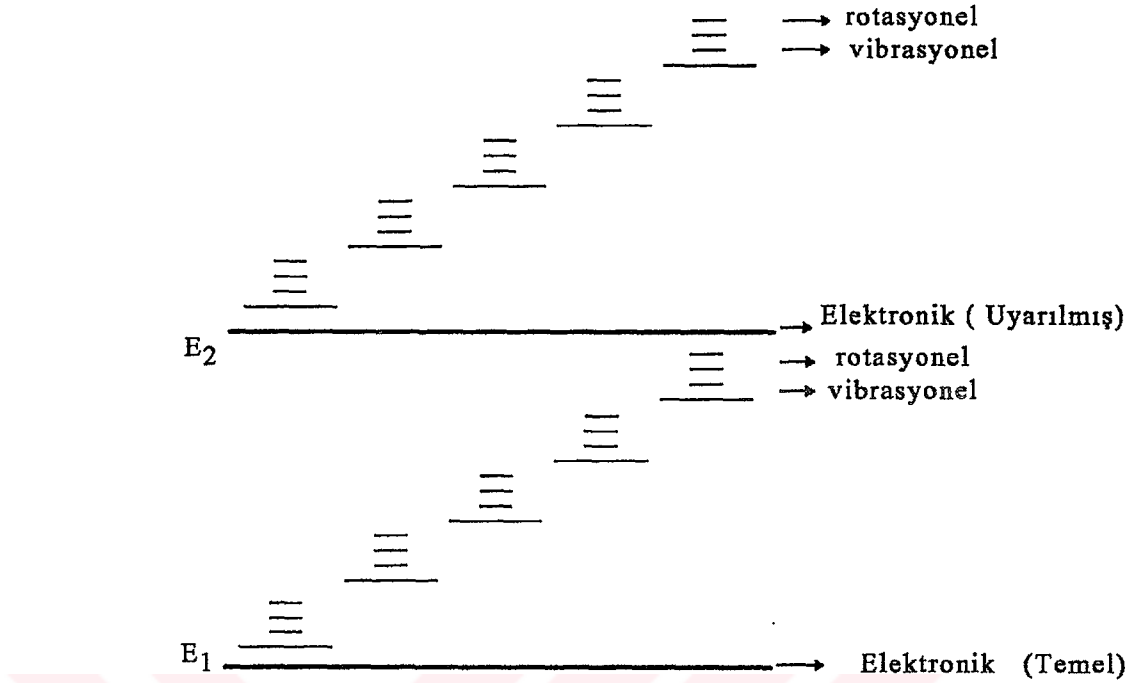
$$E_{\text{toplam}} = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{vibrasyonel}} + E_{\text{rotasyonel}} + E_{\text{translasyon}}$$

dur ve her bir elektronik enerji seviyesi çok sayıda vibrasyonel ve rotasyonel enerji seviyesinden meydana gelmiştir (Şekil 1.14).



Şekil. 1.13. Enerji seviyeleri arasındaki fark.

Elektronik enerji diğer enerjilerden büyüktür. Bu nedenle elektronik uyarılma sırasında vibrasyonel ve rotasyonel enerji seviyelerinde de değişme olur. Vibrasyonel ve rotasyonel enerjiler moleküldeki atomların titreşmesi ve molekülün dönmesi ile ilgilidir. Translasyon enerjisi molekülün bütününe ötelenme hareketi ile ilgilidir ve en düşük enerjili harekettir (şekil 1.14).



Şekil 1.14. Moleküldeki enerji seviyeleri.

İki temel tip moleküler enerji çeşidi vardır:

1-Elektronik uyarılma: 35-150 Kcal/mol, yani kimyasal bağlar seviyesinde bir enerji (200-800 nm'deki ışık) ile gerçekleşebilir. Bu olay sonucunda elektronlar daha yüksek enerjili orbitallere (antibağ orbitalleri) çıkarlar. Bu geçişler sırasında UV ve görünür alan spektrumu meydana gelir.

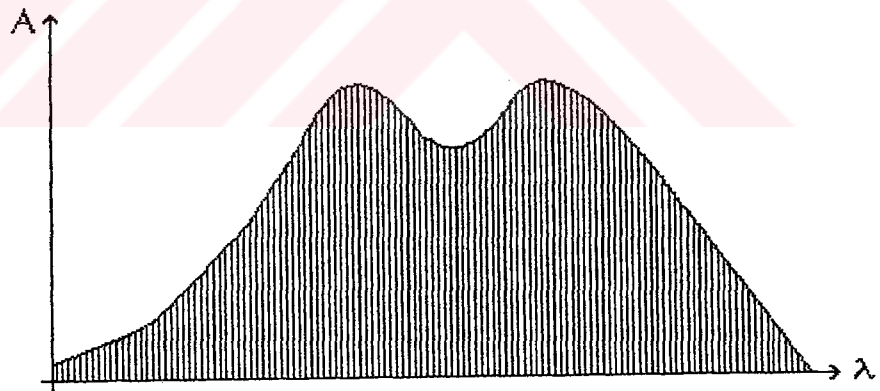
2-Nükleer vibrasyon: 1-15 Kcal/mol derecesinde bir enerji (2-25 mikrondaki ışık) ile gerçekleşebilir ve bu olay sonucunda infrared (IR) spektrumu meydana gelir.

Hangi spektrum bölgesinde olursa olsun belli bir dalga boyundaki ışığın absorpsiyonu enerjiyi absorbe etme kapasitesine sahip bir yapının varlığının göstergesidir. Bu en kolay, dalga boyunun düzenli olarak değiştirilerek bir maddenin üzerine düşürülmesinden

sonra, ışığın geçmeden önce ve geçtikten sonraki şiddetinin ölçülmesi ile belirlenir. Absorpsiyonun olduğu veya ışığın geçtiği dalga boyları kaydedilir. Absorpsiyon miktarının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak kaydedilmesi sonucunda “absorpsiyon spektrumu” elde edilir.

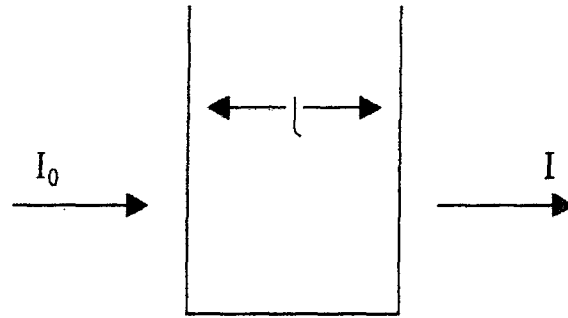
Atomların elektronik uyarılmaları sonucunda her bir yüksek enerjili atomik orbitale geçişe karşılık fotoğraf plağında bir çizgi gözlenir. Bir atomda da birden çok fazla sayıda atomik orbital olduğu için bu tür uyarılma için çok sayıda çizgiden meydana gelen “çizgi spektrumu” görülür (atomik absorpsiyon spektrofotometresi).

Moleküllerde ise birden fazla sayıda atom içermeleri nedeni ile absorpsiyon sonucunda atomlar için gözlenen çizgilerin bir araya gelmesi söz konusudur ve bunun sonucunda “sürekli spektrum” meydana gelir (Şekil 1.15.).



Şekil. 1.15. Sürekli spektrum.

Işık absorpsiyonu spektrofotometrelerde ölçülür. Bu ölçüm atom, iyon veya molekül üzerine gönderilen ışığın şiddeti (I_0) ile geçen ışığın şiddeti (I) arasındaki farkın ölçümü şeklindedir (Şekil 1.16.).



Şekil.1.16. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti (l = ışığın numune içinde aldığı yol).

Işığın absorpsiyonunun üzerine düştüğü atom, iyon veya molekülün konsantrasyonu ile orantılı olarak ilk kez Lambert ve Beer tarafından ortaya konulmuştur.

Beer'e göre aynı derinlikte bir çözeltilerden geçen ve çözelti tarafından absorblanan monokromatik bir ışın demetinin şiddeti çözeltinin konsantrasyonu ile logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır. Bu gerçek:

$$I = I_0 \cdot 10^{-aC} \quad \text{şeklinde verilir.}$$

I_0 gelen ışının şiddeti, I çözeltiyi terkeden ışının şiddeti, a çözeltinin türüne ve monokromatik ışının dalga boyuna bağlı bir sabit, C ise çözeltinin konsantrasyonudur.

Lambert'e göre, bir çözeltilerden geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti, çözelti içinde aldığı yolla logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır. Bu gerçek logaritmik olarak;

$$I = I_0 \cdot 10^{-al} \quad \text{şeklinde gösterilir.}$$

(l = çözeltinin derinliği)

Yukarıda açıklanan iki kanun birleştirilerek,

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot I \cdot C}$$

denklemini elde edilir.

Burada: I = Numuneyi terk eden ışığın şiddeti,

I_0 = Numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti,

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı,

C = Absorpsiyon yapanın konsantrasyonu,

l = Işığın numune içerisinde aldığı yol (cm)'dur.

Eşitliğin eksi logaritması alınır,

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot I \cdot C \quad \text{olur.}$$

$\log \frac{I_0}{I}$ ye absorbans denir ve A ile gösterilir. ϵ ise absorbtivite katsayısı olup, bu katsayı seçilen dalga boyuna göre değişir.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot I \cdot C$$

Bu eşitlik kısaca,

$A = \epsilon \cdot I \cdot C$ şeklinde verilir ve bu eşitlikten konsantrasyon (C) hesaplanabilir.

Bu bağıntıda A değeri C 'ye karşı grafiğe geçirilirse eğimi $\epsilon \cdot I$ olan bir doğru elde edilir, ancak her zaman muntazam bir doğru elde

edilemez. Böyle sapmaların (hataların) çeşitli nedenleri olabilir. Bunlar başlıca:

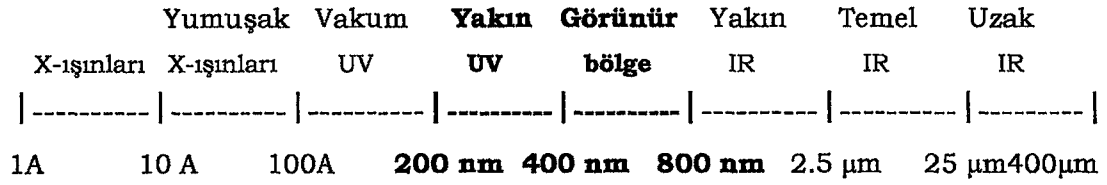
1) *Cihazdan kaynaklanan sapmalar.* Cihazdaki hatalar şunlar olabilir: Cihaza gelen potansiyelin düzgün olmaması, ışın kaynağının iyi çalışmaması, dedektör sisteminin iyi çalışmaması, kaçak ışınların olması, monokromatörün (dalga boyu seçicisi) hatalı olması, slit ayarının iyi ayarlanmaması vb.

2) *Kimyasal maddelerden kaynaklanan sapmalar.* Ölçüm yapılan çözeltide meydana gelen iyonlara ayrışma, birleşme, kompleks oluşumu, fosforesans ve fluoresans olayları, çözeltilerin pH'sı ve ortam sıcaklığı gibi olaylar nedeniyle sapmalar gözlenir.

3) *Analizci hatasından ileri gelen sapmalar.* Analizcinin dikkatsizliği ve bilgisizliğinden ileri gelen uygun olmayan çözücülerle çalışmak, yüksek absorblama konsantrasyonlarında çalışmak, çözelti içinde kabarcıklar ve asılı parçacıkların bulunması, çözeltilerin ölçüldüğü kabın kirli ve çizik olması gibi sebeplerden ötürü sapmalar olabilir.

1.3.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi

Görünür ışık toplam elektromanyetik radyasyonun çok düşük bir bölümüdür (400-800 nm) ve insan gözü tarafından renk olarak görülür. 400 nm olan alt ucunda mor renk vardır ve gökkuşağı renklerini takip ederek 800 nm olan üst sınıra geldiğinde kırmızı renk görülür. Görünür ışığın altındaki bölgeye (100-400 nm) "UV" bölgesi, üstündeki bölgeye ise (800 nm-25 μ) "Infrared" bölgesi adı verilir (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları.

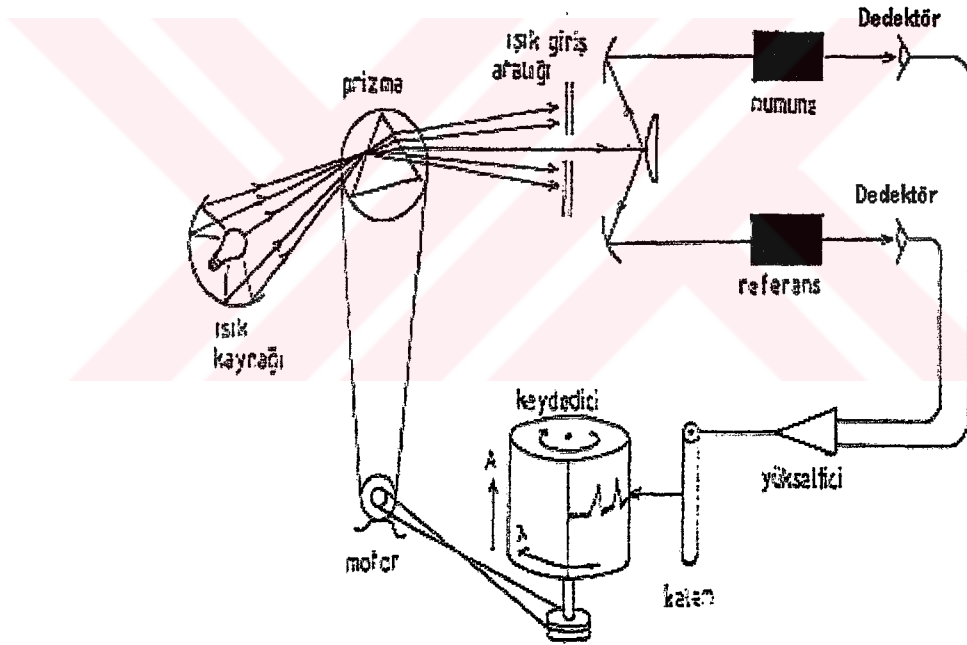
Moleküllerin elektromanyetik dalgalarla, özellikle ultraviyole, görünür alan ve enfraruj ışınları ile uyarılması sonucu meydana gelen absorpsiyondan, molekül hakkında kalitatif ve kantitatif bilgi edinmek mümkündür (Absorpsiyon spektroskopisi). UV ve görünür alandaki ışık kullanıldığında bileşiklerdeki atomların dış elektronları, cinslerine ve konumlarına göre bu ışığın belli dalga boylarını absorbe ederler ki bu özellik dış elektronların uyarılmasına dayandığından bu yöntem, görünür ve ultraviyole alan spektroskopisi veya *elektron spektroskopisi* adını alır. Bu yöntemden maddelerin yapı aydınlatmalarında ve kantitatif tayinlerinde yararlanır. UV ve görünür alan soğurma teknikleri, maddelerin yaklaşık 190-900 nm dalga boyları aralığında ışık soğurması ölçümlerine dayanan analitik yöntemleri kapsar.

UV-Görünür alan absorpsiyon spektroskopisi, kantitatif amaçlarla en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hem organik hem de inorganik maddelerin tayininde kullanılabilmesi, son zamanlardaki gelişmelerle $10^{-6} - 10^{-7}$ M civarına kadar duyarlı olması bu yöntemi çekici hale getirmektedir. Yine bu yöntemle iyi bir kesinlik ve doğruluk sağlamak mümkündür. Zira yöntemin bağıl doğruluktan sapmasının % 1-3 arasında olduğu, bazı tedbirler

alınarak bu belirsizliğin çok daha aşağı düşürülebildiği belirtilmiştir. Bunlardan başka yöntemin kolay veri elde etmede fark edilir bir üstünlüğünün olduğunu belirtmek gerekir.

Bir spektrofotometre şu kısımlardan meydana gelmiştir (Şekil 1.18.):

- Işık kaynağı
- Prizma
- Işık giriş aralığı
- Fotosel
- Dedektör
- Yükseltici
- Kaydedici



Şekil 1.18. Bir çift ışın yollu (double beam) spektrofotometrenin çalışma prensibi.

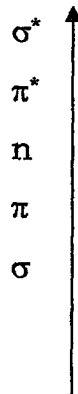
Çalışılacak spektrum bölgesine göre kullanılacak ekipman aşağıda gösterilmiştir.

<u>Spektrum bölgesi</u>	<u>Işık kaynağı</u>	<u>Numunenin konulacağı hücrenin yapısı</u>
UV	Döteryum lambası	Kuartz
Görünür	Tungsten lambası	Cam (veya kuartz)
IR	Nernst Flamanı	NaCl, NaBr

Ultraviyole ve Görünür Alandaki Spektrum:

σ bağlarındaki elektronları uyarmak için çok yüksek enerji gerekir ki günümüzde kullandığımız spektrofotometrelerde sağlanan ışık ile (200–400 nm) mümkün değildir. Bu nedenle doymuş moleküller (ve moleküllerdeki gruplar) UV ve görünür alanda absorpsiyon yapmazlar. UV ve görünür alanda elde edilen spektrum bir moleküldeki π bağlarındaki ve n (ortaklanmamış elektron çiftleri) elektronlarının geçişi ile meydana gelirler.

Molekül orbitallerinin enerji açısından dizilişi aşağıdaki gibidir:



Şekil 1.19. Moleküldeki orbitallerin enerji açısından dizilişi.

En düşük enerjili antibağ orbitali π^* 'dir. Buna göre $n \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri mümkündür. Bunlardan $n \rightarrow \pi^*$ geçişi geometrik olarak zor bir geçiştir. Çünkü bu iki orbital birbirlerine diktir ve geçiş ancak düşük şiddette olabilir ($\epsilon = 10-100$). $n \rightarrow \pi^*$ geçişi yaklaşık olarak 100 K Kal/mol derecesindedir ve basit keton ve aldehitlerde 280 nm civarında meydana gelir. $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri ise uygun bir geometrik yapıya sahip olmaları nedeniyle daha kolay meydana gelir ($\epsilon = 10.000$).

Spektrofotometri:

- a) Tanıma
- b) Miktar tayini
- c) Yapı aydınlatılması
- d) Reaksiyon mekanizması tayin
- e) pKa tayini

gibi amaçlar için kullanılır (Dinç, 1996).

1.3.2. Kemometrik Yöntemler

Numerik yöntemler olarak da adlandırılan kemometrik yöntemler son yıllarda spektrumlarından elde edilen ölçüm değerlerinin bilgisayar destekli programlar ile lineer denklem sistemlerinin çözümüne dayalı kalibrasyonların ve ölçüm değerlerinin dekompozisyonunu içeren algoritmalar kullanılarak kalibrasyonların kurulduğu matematiksel yöntemlerdir. (Haaland ve Thomas, 1990; Beebe ve Kowalski, 1987; Kramer, 1988).

Günümüzde kemometrik yöntemlerin gelişmesiyle birden fazla etken madde içeren farmasötik ürünlerin kantitatif analizi hiçbir kimyasal ön ayırma işlemi ve hiçbir grafik işlemi gerektirmeksizin hızlı, doğru ve hassas olarak gerçekleştirilmektedir. Kemometrik

hesap yöntemlerini spektrofotometrik, elektrokimyasal ve kromatografik ölçüm cihazlarından elde edilen verilere uygulamak mümkündür. (Dinç ve ark, 2001a; Dinç ve ark, 2001b; Dinç ve Baleanu, 2002; Dinç ve ark, 2002a; Dinç ve ark, 2002b; Dinç ve ark, 2002c; Dinç ve Kanbur 2002; Dinç ve ark, 2003; Vidal ve ark, 1997; Berzas ve ark, 1999)

Farmasötik ürünlerin çoğunda genelde birden fazla etken madde bulunabilir bu etken maddelerin aynı bölgede absorban vermeleri sonucunda spektral girişimleri nedeniyle doğrudan kantitatif analizleri mümkün olmadığı için bir ayırma işleminin ardından ancak analizleri yapılabilir. Bu durum, uzun yıllar farmasötik ürün analizlerinde UV- görünür alan spektrofotometrilerin kullanımını kısıtlayıcı bir faktör olmuş, pahalı ve kompleks cihazlar olan YBSK kullanımını gerektirmiştir. Ancak günümüzde karışım analizlerinde UV-görünür alan spektrofotometrisi, kemometrik yöntemlerin kullanımıyla tekrar güncellik kazanmıştır.

Kemometrik yöntemlerle bir maddenin kantitatif analizi, maddenin UV-görünür alan spektrumundaki birden fazla dalga boyundaki absorban ölçümleri kullanılarak, daha hassas bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Son yıllarda classical least squares (CLS), principal component regression (PCR) ve partial least squares (PLS) gibi kemometrik yöntemler analitik kimyacıların sık sık kullandıkları yöntemler olmuştur. Kompleks karışımların kantitatif analizinde kemometrik yöntemler, spektrumlardan ölçülen absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki kalibrasyon algoritmalarına göre kalibrasyonlar hazırlanır ve bu kalibrasyonlarda çok sayıda dalga boyunun ölçümlerde kullanılması sonucunda ortalama nedeniyle gürültü piklerinin etkisi ya tamamen ortadan kaldırılır ya da azaltılır. (Haaland ve Thomas, 1990; Martens ve Naes, 1984; Adams, 1995;

Beebe ve Kowalski, 1987; Kramer, 1988; Dinç ve ark, 2001a; Dinç ve ark, 2001b)

Bu kemometrik kalibrasyonların hesaplanması matriks matematiği içeren bilgisayar programları ile yapılmaktadır (Haaland ve Thomas, 1990; Martens ve Naes, 1984; Dinç ve ark, 2001b; Dinç ve Kanbur 2002; Dinç ve ark, 2003; Dinç, 2003; Lopez-de-Alba, 1997).

CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon algoritmalarına ek olarak kompleks karışımlardaki etken maddelerin analizinde son zamanlarda kullanılmaya başlanan bivariante kalibrasyon (BC) ve multilinear regression kalibrasyon (MLRC) yöntemleride kompleks karışımların analizinde son derece başarılı sonuçlar vermektedir. Bu bivariante kalibrasyon ve multilinear regression kalibrasyon yöntemleri PCR ve PLS gibi soyut vektör işlemlerini de içermediği gibi basit bir matematiksel algoritmaya sahip olmaları diğer kemometrik kalibrasyon yöntemlerine alternatif oluşturmaktadır (Dinç, 2003; Lopez-de-Alba, 1997; Kaiser, 1972). Kemometri günümüzde lineer cebir matematiğine dayalı olarak bilgisayar destekli kalibrasyonlar kurularak kantitatif analizlerin yapılmasına olanak tanıyan Analitik Kimyanın bir koludur.

1.3.2.1. Lineer Regresyon Analizi

Bir X bileşiğinin seçilen λ_i dalga boyunda spektrofotometrik bir tayin için iki değişken (konsantrasyon ve absorbans) arasındaki bir lineer regresyon denklemi aşağıda verilen eşitlik ile tarif edilebilir:

$$A_{Xi} = b_{Xi}C_X + a_{Xi} \quad (1)$$

Burada A_{Xi} , seçilen λ_i dalga boyunda X bileşiğinin absorbansını, C_X X bileşiğinin konsantrasyonunu ($\mu\text{g/mL}$), b_{Xi} lineer regresyon

denkleminin eğimini, a_{Xi} modelde verilen lineer regresyon denkleminin kesimini ifade etmektedir. Bu b eğim değeri gerçek ve deneysel lineer regresyon doğruları arasındaki farkı göstermektedir.

1.3.2.2. Bivariate Calibration (BC) Yöntemi (İki değişkenli kalibrasyon yöntemi)

Bu yöntemde (Dinç, 2003; Lopez-de-Alba, 1997; Kaiser, 1972), iki bileşenli (X ve Y) bir karışımın seçilen iki dalga boyundaki ($\lambda_i=1$ ve 2) absorbanans değerleri aşağıdaki ifade edilen denklemlerle iki bileşenli bir karışımın analizi için yazılabilir.

$$\begin{aligned} A_{kar_1} &= b_{X_1}C_x + b_{Y_1}C_y + a_{XY_1} \\ A_{kar_2} &= b_{X_2}C_x + b_{Y_2}C_y + a_{XY_2} \end{aligned} \quad (2)$$

Burada A_{kar_1} ve A_{kar_2} seçilen iki dalga boyunda (λ_1 ve λ_2) X ve Y nin karışımını absorbananslarını, $b_{x_{1,2}}$ ve $b_{y_{1,2}}$ sırasıyla X ve Y nin lineer regresyon denklemlerinin eğimlerini, a_{XY_1} ve a_{XY_2} iki dalga boyundaki lineer regresyon denklemlerinin kesimlerinin toplamlarını ($a_{XY_1} = a_{X1} + a_{Y1}$ ve $a_{XY_2} = a_{X2} + a_{Y2}$) temsil etmektedir.

Yukarıda yazılan denklemler (2) matriks notasyonuna göre aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$\begin{bmatrix} A_{kar_1} \\ A_{kar_2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X_1} & b_{Y_1} \\ b_{X_2} & b_{Y_2} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_x \\ C_y \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{XY_1} \\ a_{XY_2} \end{bmatrix} \quad (3)$$

Eğer absorbans matriksi (A_{kar}) ve kesim matriksi (a_{XYZ}) aynı boyutta olduğu düşünülürse $A_{kar} - a_{XY}$ farkından yeni bir matriks elde edilir. Bunun için aşağıdaki denklem yazılabilir.

$$\begin{bmatrix} A_{kar_1} - a_{XY_1} \\ A_{kar_2} - a_{XY_2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X_1} & b_{Y_1} \\ b_{X_2} & b_{Y_2} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \end{bmatrix} \quad (4)$$

bu ifade daha basit şekilde yazılacak olursa;

$$(A_{kar} - a_{XY})_{2 \times 1} = K_{2 \times 2} * C_{2 \times 1} \quad (4a)$$

Lineer regresyonların eğim değerlerine karşılık gelen b matriksi K matriksi olarak adlandırılır.

$$K = \begin{bmatrix} b_{X_1} & b_{Y_1} \\ b_{X_2} & b_{Y_2} \end{bmatrix} \quad (5)$$

Bu durumda ikili karışımdaki X ve Y bileşenlerinin konsantrasyonlarını hesaplamak için $(A_{kar} - a_{XY})_{2 \times 1}$ matriksi, $K_{2 \times 2}$ matriksinin ters matriksi $((K^{-1})_{2 \times 2})$ ile çarpılırsa bu ifade aşağıdaki biçime dönüşür:

$$C_{2 \times 1} = (K^{-1})_{2 \times 2} * (A_{kar} - a_{XY})_{2 \times 1} \quad (6)$$

Bu işlem iki bileşenli karışımların analizi için bivariate kalibrasyon yönteminin matematiksel temelidir.

Burada açıklandığı gibi bu kalibrasyon modeli ikili karışımların çözümüne kolaylıkla uygulanabilir. Optimum dalga boyu setinin seçimi bu matematiksel yöntemin iki bileşenli bir karışıma uygulanmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle Kaiser tekniği (Kaiser, 1972) bu bivariate kalibrasyon yönteminin uygulanmasında

iyi bir duyarlılık ve seçicilik sağlanması için optimum dalga boyunun seçimi için uygulanır.

Duyarlılık matrisi K (kare matris) (denklem 5) iki bileşenli karışımlar için önceden seçilen dalga boylarının herbir çifti dikkate alınarak oluşturulur.

Karışımdaki X ve Y bileşenlerinin seçilen iki dalga boyundaki (λ_1 ve λ_2) lineer regresyon denklemlerinden elde edilen eğim değerlerinin K matrisi duyarlılık parametresi olarak dikkate alınır. Duyarlılık parametresi farklı iki dalga boyu setinin karşılaştırılması için kullanılır.

İki bileşenli bir karışımın analizinde duyarlılık, duyarlılık matrisi K'nın determinantlarının mutlak değeri olarak tarif edilir. Bunun için farklı iki dalga boyu setlerine karşılık gelen K matrisinin determinant değerleri çalışılan dalga boyunun seçimi için hesaplanır. Hesaplanan maksimum determinant değeri optimum dalga boyu setinin seçimine olanak tanır. Bu yöntem herbir bileşik için seçilen iki dalga boyundaki lineer regresyon doğru denklemlerine dayanan bir kalibrasyon yöntemidir.

Avantajları:

- i)** Basit kalibrasyon algoritmasına sahip olmasıdır.
- ii)** Ölçüm yapılacak dalga boyunun duyarlılığı en yüksek iki dalga boyunun kullanılması nedeniyle güvenilir sonuçlar elde edilmektedir.
- iii)** Çalışma dalga boyunun iyi seçilmesi koşuluyla bütün ikili karışımlara uygulanabilir.
- iv)** Doğrudan absorbans ölçümleri kalibrasyon için yeterlidir.

1.3.2.3. Multilinear Regression Calibration (MLRC) Yöntemi (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu yöntemi)

Bu yöntemin uygulamasında (Dinç, 2003; Kaiser, 1972) iki bileşenli (X ve Y) bir karışımın absorbansı n sayıda dalga boyunda ($\lambda_i = 1, 2, \dots, n$) ölçülürse aşağıda verilen denklem seti iki bileşenli bir karışımın analizi için yazılabilir:

$$\begin{aligned}
 A_{kar_1} &= b_{X_1} C_X + b_{Y_1} C_Y + a_{XY_1} \\
 A_{kar_2} &= b_{X_2} C_X + b_{Y_2} C_Y + a_{XY_2} \\
 &\dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\
 &\dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\
 A_{kar_n} &= b_{X_n} C_X + b_{Y_n} C_Y + a_{XY_n}
 \end{aligned} \tag{7}$$

Burada A_{kar_1} , A_{kar_2} , \dots , ve A_{kar_n} seçilen dalga boylarında (λ_1 den λ_n 'e kadar) X ve Y karışımının absorbanslarıdır; $b_{X_{1,2,\dots,ve n}}$ ve $b_{Y_{1,2,\dots,ve n}}$, X ve Y bileşiği için seçilen dalga boylarına karşılık gelen n tane lineer regresyon denkleminin eğimleridir; a_{XY_1} , a_{XY_2} , \dots ve a_{XY_n} n tane dalga boyundaki lineer regresyon denklemlerinin kesimlerinin toplamlarıdır ($a_{XY_1} = a_{X_1} + a_{Y_1}$, $a_{XY_2} = a_{X_2} + a_{Y_2} \dots$ ve $a_{XY_n} = a_{X_n} + a_{Y_n}$)

Yukarıdaki denklemler sistemi matriks notasyonuna göre yazılacak olursa aşağıdaki biçimde yazılabilir (7):

$$\begin{bmatrix} A_{kar_1} \\ A_{kar_2} \\ \dots \\ \dots \\ A_{kar_n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X_1} & b_{Y_1} \\ b_{X_2} & b_{Y_2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ b_{X_n} & b_{Y_n} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{XY_1} \\ a_{XY_2} \\ \dots \\ \dots \\ a_{XY_n} \end{bmatrix} \quad (8)$$

A_{kar} ve a_{xy} matrisleri aynı boyutlarda olduğu için yukarıda verilen matris sistemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$\begin{bmatrix} A_{kar_1} - a_{XY_1} \\ A_{kar_2} - a_{XY_2} \\ \dots \\ \dots \\ A_{kar_n} - a_{XY_n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X_1} & b_{Y_1} \\ b_{X_2} & b_{Y_2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ b_{X_n} & b_{Y_n} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \end{bmatrix} \quad (9)$$

Bu verilen matris sistemi (9) özet olarak aşağıdaki gibi verilebilir:

$$(A_{kar} - a_{XYZ})_{nx1} = K_{nx2} * C_{2x1} \quad (9a)$$

Yukarıdaki bölümde bivariante kalibrasyon yönteminde açıklandığı gibi eğimlerin matrisi K matrisi olarak adlandırılır:

$$K_{nx2} = \begin{bmatrix} b_{X_1} & b_{Y_1} \\ b_{X_2} & b_{Y_2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ b_{X_n} & b_{Y_n} \end{bmatrix} \quad (10)$$

$(A_{kar} - a)_{nx1}$ ve K_{nx2} matrisleri K_{nx2} matrisinin transpozunu $(K')_{2xn}$ ile çarpılırsa aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$(K')_{2 \times n} (A_{kar} - a)_{n \times 1} = (K')_{2 \times n} K_{n \times 2} * C_{2 \times 1} \quad (12)$$

İki bileşenli karışımdaki X ve Y bileşiklerinin konsantrasyonu aşağıda verilen formülden hesaplanabilir:

$$C_{2 \times 1} = [(K')_{2 \times n} K_{n \times 2}]^{-1} * [(K')_{2 \times n} (A_{kar} - a_{XY})_{n \times 1}] \quad (13)$$

Burada multilinear regression kalibrasyon yöntemi matriks matematiği olarak da bilinen lineer cebirin kullanımını içermektedir. Bu kalibrasyon modeli iki bileşenli ve ikiden fazla bileşeni içeren karışımların kantitatif analizine uygulanabilir.

Avantajları:

- i) Basit kalibrasyon algoritmasına sahiptir.
- ii) Birden fazla seçilen kritik dalga boyunda çalışma olanağı vermesi nedeniyle hatalı dalga boylarının eliminasyonu mümkündür.
- iii) İki veya daha fazla aktif bileşik içeren kompleks karışımların analizi mümkündür.
- iv) Yöntemin uygulanması için doğrudan absorbans değerlerinin ölçülmesi yeterlidir.

1.3.2.4. Classical Least Squares (CLS) Yöntemi (Klasik en küçük kareler yöntemi)

CLS kalibrasyon yöntemi spektroskopide lineer denklemler sisteminin Beer-Lambert yasasına uygulamasıdır.

$A = K \times C$ (Lambert-Beer yasasına göre)'dir.

Bu denklem lineer denklem sistemleri ile ifade edilecek olursa;

$$\begin{aligned}
A_1 &= K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots\dots\dots K_{1c}C_c \\
A_2 &= K_{21}C_1 + K_{22}C_2 + \dots\dots\dots K_{2c}C_c \\
A_3 &= K_{31}C_1 + K_{32}C_2 + \dots\dots\dots K_{3c}C_c \\
&\dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\
A_w &= K_{w1}C_1 + K_{w2}C_2 + \dots\dots\dots K_{wc}C_c
\end{aligned} \tag{14}$$

A= ölçülen sinyal, K= seçilen noktalardaki katsayılar, C= konsantrasyon. (Kramer, 1988; Dinç ve ark, 2001a; Dinç ve ark, 2001b; Dinç ve Baleanu, 2002; Dinç ve ark, 2002a; Dinç ve ark, 2002b; Dinç ve ark, 2002c; Dinç ve Kanbur 2002; Dinç ve ark, 2003; Dinç; 2003).

a) Yöntemin avantajları;

- i)** hesaplamalar hızlıdır,
- ii)** kalibrasyonlar dalga boyu seçimi gerektirmez,
- iii)** dalga boylarının sayısı bileşenlerin sayısından fazla olsa da kullanılabilir,
- iv)** geniş bir spektral alanda çok sayıda dalga boyunun absorban ölçümlerinin kalibrasyon için kullanılmasında ortalama absorban etkisiyle spektrumlardaki gürültü piklerinin etkisini azaltır,
- v)** PCR ve PLS'ye göre basit bir matematiğe sahiptir.

b) Yöntemin dezavantajları;

- i)** bu kalibrasyonda kalibrasyon karışımlarının her bileşen için tam olarak kompozisyonunun bilinmesi gerekir,
- ii)** spektrofotometride grafik yöntemlerin uygulanmasında olduğu gibi CLS kalibrasyon için de birbiriyle etkileşen bileşenlerin bulunduğu karışımlar analiz için uygun değildir.

- ii) dalga boylarının sayısı kalibrasyon numunelerinin sayısı ile sınırlanan modeller kullanılır,
- iii) genellikle çok sayıda numune kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, çünkü katsayı matriksinin hesaplanmasında matriks determinant değerinin "0" çıkması sonsuz çözüm gerektirmesi nedeniyle sakınca doğurur, bunu aşmak için kalibrasyon setindeki seri sayısını artırmak gerekir,
- iv) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması ve bir ön kalibrasyon vasıtasıyla ölçüm son derece zor ve sıkıcıdır.

1.3.2.6. Principal Component Regression (PCR) Yöntemi (Temel bileşen regresyon yöntemi)

Kemometrik yöntemler ailesinden birisi olan principal component regression yöntemin konsantrasyon seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir.

Burada açıklanan PCR algoritması Martens ve Naes (1984) tarafından verilen şemaya göre açıklanmaktadır. PCR kalibrasyonu kurulmasındaki basamaklar aşağıdaki biçimdedir:

Analiz edilecek maddenin konsantrasyon ve absorbans verilerinin varyans-kovaryansı bulunur. Varyans-kovaryans saçılma matriksinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigen value) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A \quad (16)$$

Burada C analiz edilecek maddenin konsantrasyonudur, a sabit sayı, b ise temel bileşenlerin ve C-loading matriksinin (q) çarpımından elde edilir:

$$b = P \cdot q \quad (17)$$

Burada P öz vektörlerin matriksidir. Öz vektörler kolon matriksi en uygun öz değere (faktöre) ya da öz değerlere (faktörlere) karşılık gelmektedir. Burada q vektörü C-loadings olarak adlandırılır ve T (sayı matriksi) üzerinden C'nin regresyonu ile tayin edilir:

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_0 \quad (18)$$

Burada D diagonal matriks olup herbir öz değer tersine eşittir. t_1 sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir :

$$t_1 = A_0 \cdot P_1 \quad (19)$$

Ortalanmış absorbans ve konsantrasyon, A_0 ve C_0 ile gösterilebilir. Burada a sabiti genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir :

$$a = C_{ort} - A^T_{ort} \cdot b \quad (20)$$

Herbir aşamada elde edilen değerler 16 no'lu denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir (Haaland ve Thomas, 1990; Martens ve Naes, 1984; Adams, 1995; Beebe ve Kowalski, 1987; Kramer, 1988; Dinç ve ark, 2001a; Dinç ve

ark, 2001b; Dinç ve Baleanu, 2002; Dinç ve ark, 2002a; Dinç ve ark, 2002b; Dinç ve ark, 2002c; Dinç ve Kanbur 2002; Dinç ve ark, 2003).

a) Yöntemin avantajları;

- i)** dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir,
- ii)** dalga boylarının çok sayıda alınması ortalama etkisi nedeniyle spektral gürültü piklerini azaltır,
- iii)** PCR data işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına olanak tanır.
- iv)** analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir,
- v)** bazen orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir,
- vi)** kalibrasyon için ölçülen absorbanların dekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdan ve ölçüm aletlerinden gelen gürültü piklerine karşılık gelen gürültü piklerinin verdiği sayısal değerlerin eliminasyonuna olanak tanır.

b) Yöntemin dezavantajları;

- i)** hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır,
- ii)** yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için),
- iii)** kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere karşılık gelmeyebilir,
- iv)** genellikle çok sayıda kalibrasyon numunesinin kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir,

- v) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

1.3.2.7. Partial Least Squares Regression (PLS) (Kısmi en küçük kareler yöntemi)

PLS algoritması bağımlı ve bağımsız değişkenlerin dekompozisyonuna dayanır.

Spektrofotometrik bir çalışmada, absorbands (A) ve konsantrasyon (C), A_0 ve C_0 vektör matrislerini verecek şekilde ortalama işlemine tabi tutulur.

Ortogonal PLS algoritması:

- a) Ağırlık vektör aşağıdaki ifadeden hesaplanır:

$$W = A_0' C_0 / C_0' C_0 \quad (21)$$

- b) Sayı matrisleri t_1 ve P_1 aşağıda verilen eşitlikten hesaplanır:

$$t_1 = A_0 W_1 \quad (22)$$

$$P_1 = (A_0^T t_1) / (t_1^T t_1) \quad (23)$$

$$q_1 = (C_0^T t_1) / (t_1^T t_1) \quad (24)$$

- c) Genel lineer regresyon katsayıları aşağıda verilen denklemlerden hesaplanır:

$$b = W (P^T W)^{-1} q \quad (25)$$

$$a = C_{ort} - A_{ort}^T \cdot b \quad (26)$$

- iii) genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir,
- iv) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

1.3.2.8. Kalibrasyon Setinin Dizaynı

Kemometrik (CLS, ILS, PCR, PLS) kalibrasyonlar için kalibrasyon seti ya rastgele (randomly) ya da analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin konsantrasyonlarına göre bu maddelerin konsantrasyonları çalışma aralığının içine düşecek şekilde bir kalibrasyon setinin dizaynı yapılır. Simetrik kalibrasyon setinin planlamasında analiz edilecek maddelerin konsantrasyonları kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturmalıdır. Kemometrik çalışmalarda rastgele kalibrasyon setinin hazırlanmasından ziyade analiz edilecek maddelerin konsantrasyonlarına göre simetrik bir kalibrasyon setinin hazırlanması elde edilecek sonuçların doğruluğu ve hataların minimize edilmesi açısından tercih edilecek bir durumdur. Örneğin 25 mg hidroklorotiazid maddesi + 25 mg spironolakton maddesi içeren bir numunenin analizi için hazırlanan kalibrasyon setinin dizaynı aşağıdaki diyagram üzerinde verilmiştir (Şekil 1.20). Kemometrik kalibrasyonlarda rastgele ve simetrik kalibrasyon setleri kullanılabilir, fakat her zaman tercih edileni simetrik kalibrasyon setidir.

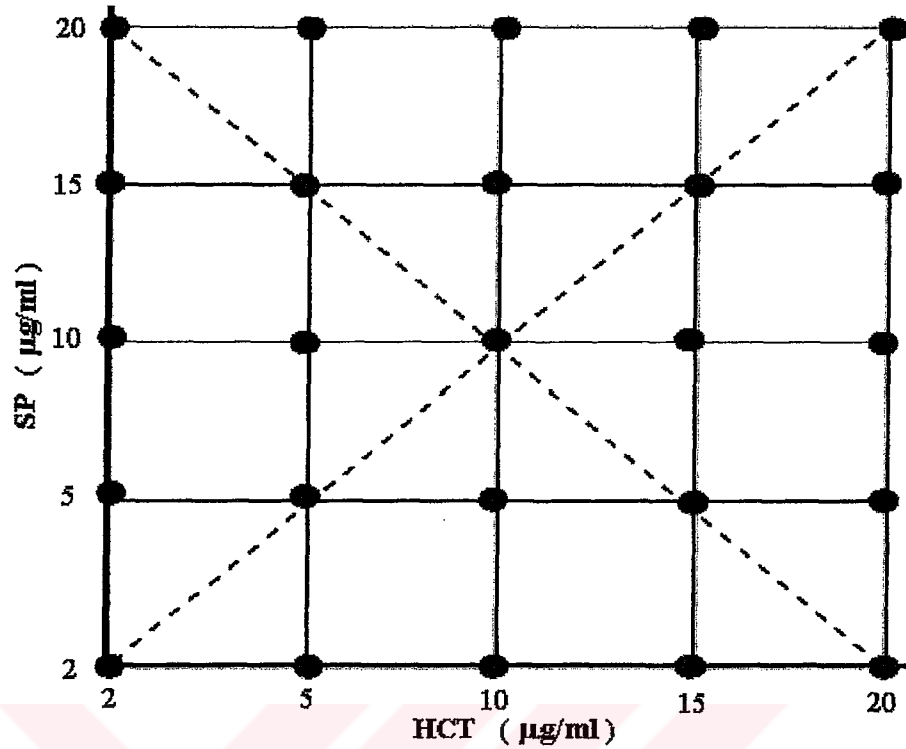
PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorbanans değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanır (Haaland ve Thomas, 1990; Martens ve Naes, 1984; Adams, 1995; Beebe ve Kowalski, 1987; Kramer, 1988; Dinç ve ark, 2001a; Dinç ve ark, 2001b; Dinç ve Baleanu, 2002; Dinç ve ark, 2002a; Dinç ve ark, 2002b; Dinç ve ark, 2002c; Dinç ve Kanbur 2002; Dinç ve ark, 2003).

a) Yöntemin avantajları;

- i)** PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır,
- ii)** tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir,
- iii)** kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik konsantrasyonlarını yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır,
- iv)** yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir,
- v)** bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olamayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir,
- vi)** bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS'nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR'den daha iyi sonuçlar verir,

b) Yöntemin dezavantajları;

- i)** PLS hesaplamaları klasik metodlardan daha yavaştır,
- ii)** PLS modelleri anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur,



Şekil 1.20. Hidroklorotiazid ve spironolaktone içeren bir karışımın analizi için kalibrasyon seti.

1.3.2.9. Kemometrik Kalibrasyonların Çapraz Validasyonu

Kemometrik kalibrasyonların uygulanabilirlik, tayin gücü, doğruluk ve kesinliğinin testi için kalibrasyon aşamasında ve tayin aşamasında validasyonu için bazı istatistiksel parametreler kullanılmaktadır. Bu parametrelerden en önemlileri kalibrasyonun standart hatası (SEC) ve tayinin standart hatası (SEP)'dir.

1.3.2.9.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration, SEC)

Kemometrik yöntemlerde kurulan kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonun standart hatasını göstermek gerekir. Bu parametre kalibrasyon çözeltilerinden elde edilen verilerle hesaplanır. Kemometrik hesaplamalarda SEC değeri minimum olan kemometrik kalibrasyonlar kullanılarak kantitatif tayinler gerçekleştirilir.

SEC değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (C_i^{Konulan} - C_i^{Bulunan})^2}{n-1}} \quad (27)$$

($C^{konulan}$ konulan konsantrasyon değeri, $C^{bulunan}$ bulunan konsantrasyon değeri, n hazırlanan sentetik karışım sayısı).

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için SEC değeri yanında, konulan-bulunan konsantrasyon değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak korelasyon katsayısı (r), doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır. Özellikle konulan-bulunan konsantrasyonların lineer regresyon denklemi için korelasyon katsayısının 1'e yakın çıkması kurulan kalibrasyonun doğruluğunda önemli bir faktördür (Haaland ve Thomas, 1990; Martens ve Naes, 1984; Adams, 1995; Beebe ve Kowalski, 1987; Kramer, 1988; Dinç ve ark, 2001a; Dinç ve ark, 2001b; Dinç ve Baleanu, 2002; Dinç ve ark, 2002a; Dinç ve ark, 2002b; Dinç ve ark, 2002c; Dinç ve Kanbur 2002; Dinç ve ark, 2003).

1.3.2.9.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction, SEP)

SEP, tayin aşamasında (yani yöntemlerin yapay karışımlara uygulanmasında) kurulan kemometrik yöntemlerin uygulanabilirlik ve tayin gücünün testi yine kalibrasyon basamağında yapılan işlemler ile benzer olup SEP yanında eğim, r değerlerinin 1'e yakın olması kurulan kalibrasyonun tutarlılığını gösterir. Konulan-bulunanların miktarlarına göre yapılan bir diğer validasyon tekniğidir. SEP'i hesaplamak için aşağıdaki eşitlik kullanılır:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (C_i^{Konulan} - C_i^{Bulunan})^2}{n-1}} \quad (28)$$

$C^{Konulan}$ =konulan konsantrasyon değeri, $C^{Bulunan}$ =bulunan konsantrasyon değeri, n hazırlanan sentetik karışım sayısı.

Kemometrik tayinlerde SEP değerinin en küçük olduğu sentetik karışım seti kullanılır. (Haaland ve Thomas, 1990; Martens ve Naes, 1984; Adams, 1995; Beebe ve Kowalski, 1987; Kramer, 1988; Dinç ve ark, 2001a; Dinç ve ark, 2001b; Dinç ve Baleanu, 2002; Dinç ve ark, 2002a; Dinç ve ark, 2002b; Dinç ve ark, 2002c; Dinç ve Kanbur 2002; Dinç ve ark, 2003).

2. DENEYSEL KISIM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- Spektrofotometre (UV/VIS): Shimadzu UV-1601
- IR Spektrofotometre: Jasco FT/IR-420 Fourier Transform Infrared Spectrometer
- Hassas terazi: Shimadzu Libror AEG-220
- Manyetik karıştırıcı: Ikamak RH Jonke&Kunkel IKA (Labortechnik)
- Pipet (1-10 mL)
- Mikropipet (10-100 µl ve 100-1000 µl'lik)
- Sartorius Minisart tek kullanımlık filtre ($\phi = 0,20 \mu\text{m}$)
- 100 ml ve 25 ml'lik balonjoje (İldam)

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Metanol (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Hidroklorotiazid (Merck Sharp Dohme)
- Amilorid hidroklorür (Merck Sharp Dohme)
- Spironolakton (Ali Raif)
- Kaptopril (Hexal AG)

2.1.3. Kullanılan Antihipertansif Formülasyonlar

1) Moduretic® tablet (Merck Sharp Dohme)

Hidroklorotiazid 50 mg /tablet

Amilorid hidroklorür 5 mg /tablet

2) Aldactazide® tablet (Ali Raif)

Hidroklorotiazid 25 mg /tablet

Spironolakton 25 mg /tablet

3) Captohexal-comp® tablet (Hexal AG)

Hidroklorotiazid25 mg /tablet

Kaptopril 50 mg /tablet

2.2. Deneylerin Yapılışı

2.2.1. Hidroklorotiazid + Spironolakton Karışımının Analizi

2.2.1.1. Bivariate Calibration Yöntemi (BC) (İki bileşenli kalibrasyon yöntemi)

Hidroklorotiazid–spironolakton karışımında bu iki bileşik için hazırlanan standart serinin konsantrasyonlarına karşı seçilen maksimum, minimum ve omuzlara karşılık gelen 10 dalga boyundaki absorbanslarının ölçümü kullanılarak 10 lineer regresyon denklemi elde edildi (Şekil 2.1). Seçilen 10 dalga boyundaki elde edilen lineer regresyon denkleminde, Kaiser tekniği ile bulunan 240 ve 270 nm'deki en duyarlı 2 dalga boyuna karşılık gelen lineer regresyon denklemleri ile bivariate kalibrasyon yönteminin teorik açıklamasının yapıldığı Bölüm 1.3.2.2 de 6 no'lu denklem kullanılarak iki etken maddenin miktar tayini hesaplandı.

2.2.1.1.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

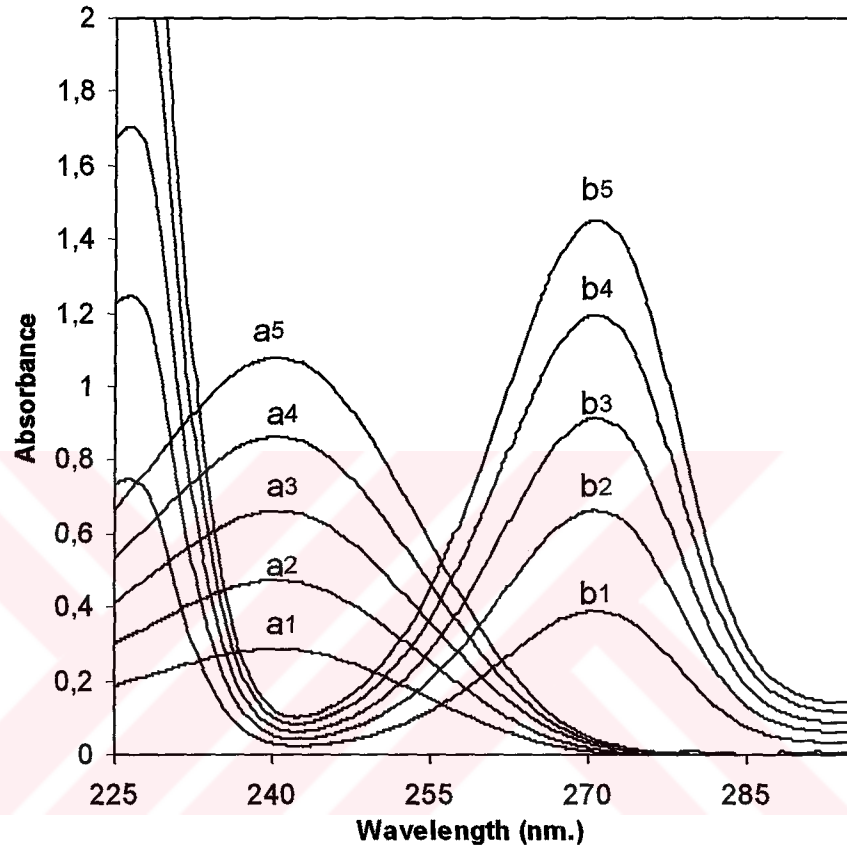
a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.1.1.2. Bivariate Calibration (BC) (İki bileşenli kalibrasyon)

Bivariate kalibrasyon için 6–20 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hidroklorotiazid ve spironolaktonu içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerden yararlanılarak hazırlandı. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun standart seri çözeltilerin 225-295 nm aralığındaki spektrularında 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'ye karşılık gelen dalga boylarında absorpsiyonları okunarak regresyon analizi yapılarak sonuçları Çizelge 2.1 de verildiği gibi hesaplandı.

Buradaki uygulamada optimum iki dalga boyunu içeren dalga boyu setinin seçimi için duyarlılık matrislerinden 45 farklı çift hesaplandı ve hidroklorotiazid–spironolakton karışımları için dalga boyu setinin seçimi Çizelge 2.2 de sunuldu. Duyarlılık matrislerinin en yüksek determinant değerini veren optimum iki dalga boyu bu kalibrasyon modeli için 240 ile 270 nm'lerine karşılık gelen noktalar olduğu hesaplanarak saptandı. Bu seçilen iki dalga boyunda hidroklorotiazid ve spironolaktonun lineer regresyon denklemleri Çizelge 2.1 de görülmektedir. Bu iki dalga boyunda herbir bileşiğin kalibrasyon denklemleri kullanılarak Bölüm 1.3.2.2 de verilen algoritmaya göre bu maddelerin 6–20 µg/mL konsantrasyon aralığında bivariate kalibrasyon kuruldu. Bu yöntemin uygulanmasında yapılan matematiksel işlemlerde Microsoft Excel 2000, Maple V ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.



Şekil 2.1. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde spironolaktonun a1) 6 µg/mL, a2) 10 µg/mL, a3) 14µg/mL, a4) 18 µg/mL , a5) 20µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları ve hidroklorotiazidin a1) 6 µg/mL, a2) 10 µg/mL, a3) 14µg/mL, a4) 18 µg/mL , a5) 20µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları.

Çizelge 2.1. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun seçilen 10 dalga boyundaki doğru denklemleri ve lineer regresyon katsayıları.

λ	Hidroklorotiazid		Spironolakton	
	$A = m \times C + n$	r	$A = m \times C + n$	r
235	$A = 0,0261 \times C - 0,0171$	0,9938	$A = 0,0500 \times C - 0,0556$	0,9901
240	$A = 0,0066 \times C - 0,0113$	0,9952	$A = 0,0539 \times C - 0,0623$	0,9902
245	$A = 0,0063 \times C - 0,0124$	0,9949	$A = 0,0538 \times C - 0,1076$	0,9934
250	$A = 0,0119 \times C - 0,0180$	0,9947	$A = 0,0454 \times C - 0,1140$	0,9938
255	$A = 0,0228 \times C - 0,0263$	0,9943	$A = 0,0329 \times C - 0,0990$	0,9937
260	$A = 0,0402 \times C - 0,0410$	0,9945	$A = 0,0199 \times C - 0,0709$	0,9926
265	$A = 0,0607 \times C - 0,0573$	0,9942	$A = 0,0078 \times C - 0,0134$	0,9941
270	$A = 0,0727 \times C - 0,0697$	0,9941	$A = 0,0028 \times C - 0,0077$	0,9962
275	$A = 0,0638 \times C - 0,0592$	0,9944	$A = 0,0000 \times C + 0,0000$	0,0000
280	$A = 0,0360 \times C - 0,0359$	0,9946	$A = 0,0000 \times C + 0,0000$	0,0000

2.2.1.1.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, 6–20 µg/mL doğrusal çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan bivariante kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 101,4, spironolakton için % 102,6 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 1,28 ve spironolakton için % 2,07 olarak hesaplandı. Bivariate kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.3 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağlı standart sapma değerleri bivariante kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 98,5 ve % 2,51 ve spironolakton için % 97,6 ve % 1,75 olarak bulundu.

2.2.1.1.4. Bivariate Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjode metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/25 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine Bölüm 2.2.1.1 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.4 de sunuldu.

Çizelge 2.3. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına bivariate kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan $\mu\text{g/mL}$		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	6	10	101,2	102,0
2	10	10	102,0	100,8
3	14	10	97,9	100,6
4	18	10	97,8	100,7
5	20	10	103,0	109,0
6	10	6	101,0	100,0
7	10	10	101,0	100,8
8	10	14	105,0	105,7
9	10	18	102,0	101,1
10	10	20	103,0	105,0
		Ortalama	101,4	102,6
		BSS	1,28	2,07

BSS = Bağıl standart sapma

Çizelge 2.4. ALDACTAZIDE® tablete uygulanan bivariante kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 25 mg spironolakton/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	24,8	25,0
2	24,8	25,0
3	24,0	25,0
4	24,7	25,3
5	24,5	25,5
6	24,8	25,3
7	24,8	24,8
8	24,9	25,5
9	24,7	24,1
10	25,5	25,5
Ortalama	24,8	25,1
SS	0,37	0,43
BSS	1,49	1,72
S. Hata	0,12	0,14
GA (P=0,05)	0,24	0,28

SS = Standart sapma

S.Hata = Standart hata

GA = Güven aralığı

2.2.1.2. Multilinear Regression Calibration Yöntemi (MLRC) (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu yöntemi)

Hidroklorotiazid–spironolakton karışımını içeren tabletlerde bu etken maddelerin 225-295 nm dalga boyu aralığındaki spektrumlarında kritik dalga boylarına karşılık gelen 235 nm'den 280 nm'ye kadar 10 dalga boyunda elde edilen lineer regresyon fonksiyonlarına dayalı olarak kurulan MLRC yöntemi ile Bölüm 1.3.2.3 de 13 nolu denklem kullanılarak karışımlardaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktar tayinleri yapıldı.

2.2.1.2.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

- a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.
- b) Spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.1.2.2. Multilinear Regression Calibration (MLRC) (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu)

Bu yöntemde kalibrasyon için 6–20 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hidroklorotiazid ve spironolaktonu içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerden yararlanılarak hazırlandı. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun standart seri çözeltilerin Çizelge 2.1 de 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'ye karşılık gelen dalga boylarındaki lineer regresyon denklemleri hesaplandı (Bölüm 1.3.2.8).

Multilineer regresyon kalibrasyonu için 225–295 nm spektral aralıkta 235 nm'den 280 nm'ye kadar 10 dalga boyunda herbir bileşik için Çizelge 2.1 deki hesaplanan lineer regresyon fonksiyonları kullanarak Çizelge 2.5 deki MLRC denklem seti elde edildi.

Bu kalibrasyon için Çizelge 2.5 deki MLRC denklem seti kullanılarak 10 dalga boyunda Bölüm 1.3.2.3 de verilen algoritmaya göre bu maddelerin 6–20 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında multilineer regresyon kalibrasyonu kuruldu. Yöntemin uygulanmasında yapılan matematiksel işlemlerde Microsoft Excel 2000, Maple V ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.1.2.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, 6–20 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan multilineer regresyon kalibrasyonunun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,2, spironolakton için % 102,5 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,66, spironolakton için % 2,07 olarak hesaplandı. Multilineer regresyon kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 2.6 da sunuldu.

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak

hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri multilinear regression kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 99,4 ve % 0,98 ve spironolakton için % 102,0 ve % 1,87 olarak bulundu.

Çizelge 2.5. Karışımdaki hidroklorotiazid ve spironolakton için seçilen 10 dalga boyunda elde edilen MLRC denklem seti.

λ	Denklem Seti
235	$A_{k1} = 0,0261 \times C_{HCT} + 0,0500 \times C_{SP} - 0,0727$
240	$A_{k2} = 0,0066 \times C_{HCT} + 0,0539 \times C_{SP} - 0,0735$
245	$A_{k3} = 0,0063 \times C_{HCT} + 0,0538 \times C_{SP} - 0,1201$
250	$A_{k4} = 0,0119 \times C_{HCT} + 0,0454 \times C_{SP} - 0,1320$
255	$A_{k5} = 0,0228 \times C_{HCT} + 0,0329 \times C_{SP} - 0,1253$
260	$A_{k6} = 0,0402 \times C_{HCT} + 0,0199 \times C_{SP} - 0,1119$
265	$A_{k7} = 0,0607 \times C_{HCT} + 0,0078 \times C_{SP} - 0,0707$
270	$A_{k8} = 0,0727 \times C_{HCT} + 0,0028 \times C_{SP} - 0,0774$
275	$A_{k9} = 0,0638 \times C_{HCT} + 0,0000 \times C_{SP} - 0,0592$
280	$A_{k10} = 0,0360 \times C_{HCT} + 0,0000 \times C_{SP} - 0,0359$

2.2.1.2.4. Multilinear Regresyon Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/25 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine Bölüm 2.2.1.2 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.7 de sunulmuştur.

Çizelge 2.6. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına Multilinear regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	6	10	98,8	104,0
2	10	10	101,0	104,0
3	14	10	99,9	103,0
4	18	10	99,4	105,0
5	20	10	104,8	101,0
6	10	6	102,0	101,7
7	10	10	101,0	101,0
8	10	14	98,9	101,4
9	10	18	98,4	101,7
10	10	20	97,9	102,0
		Ortalama	100,2	102,5
		BSS	0,66	2,07

Çizelge 2.7. ALDACTAZIDE® tablete uygulanan multilinear regression kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 25 mg spironolakton/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	24,7	25,5
2	24,0	25,0
3	25,0	25,5
4	24,5	25,3
5	24,8	24,1
6	24,2	25,0
7	24,5	24,7
8	24,8	24,5
9	24,7	24,4
10	24,5	25,0
Ortalama	24,6	24,9
SS	0,29	0,47
BSS	1,19	1,90
S. Hata	0,09	0,15
GA (P=0,05)	0,19	0,30

2.2.1.3. Classical Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (CLS) (Klasik en küçük kareler yöntemi)

Bu yöntemde 205–300 spektral aralıkta 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 15 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi ve katsayıların matriksi (K), kalibrasyon seti ve absorbanlar arasındaki lineer denklem sistemi kullanılarak hesaplandı (Şekil 2.2). Hesaplanan katsayıların matriksi (K) lineer denklem sisteminde yerine kondu. Kurulan CLS kalibrasyonu karışımlardaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktar tayinlerinin hesaplanmasında kullanıldı. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.1.3.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

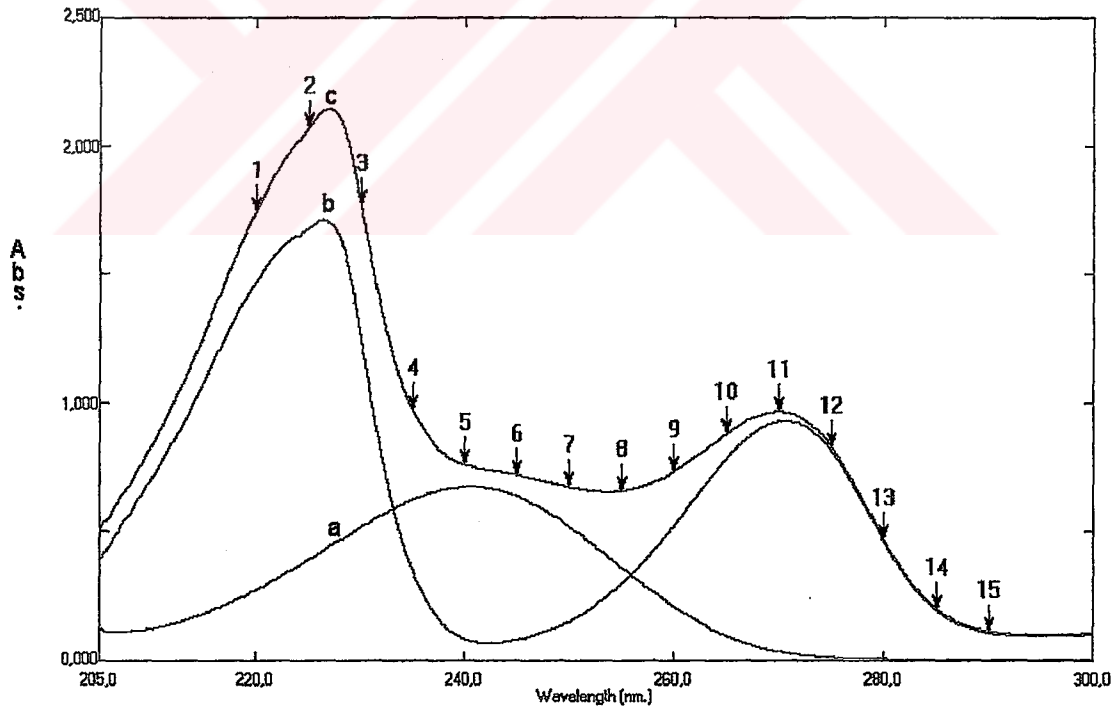
- a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.
- b) Spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.1.3.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 2–20 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığında hidroklorotiazid ve spironolakton içeren 25 farklı konsantrasyonda oluşan kalibrasyon seti Bölüm 1.3.2.8 de açıklandığı şekilde stok çözeltilerden hazırlandı (Çizelge 2.8). Bu kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun konsantrasyonları dikkate alınarak ve çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8).

2.2.1.3.3. Classical Least Squares Kalibrasyon (Klasik en küçük kareler kalibrasyonu)

CLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 205–300 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285 ve 290 nm'ye karşılık gelen 15 noktada absorbans değerleri okundu. Bölüm 1.3.2.4 de açıklanan algoritmaya göre kalibrasyon seti ve ölçülen absorbans değerleri ile lineer bir denklem sistemi oluşturuldu. Kurulan bu lineer denklem sisteminde katsayıların matriksi (K) hesaplandı ve katsayılar matriksi CLS kalibrasyonda yerine konuldu. Hazırlanan yapay karışımlar ve farmasötik preparat numunelerindeki hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarları yukarıda belirtilen 15 dalga boyundaki absorbansları okunarak oluşturulan kalibrasyon denkleminde yerine konarak hesaplandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde a) 14 µg/mL spironolakton, b) 14 µg/mL hidroklorotiazid ve c) hidroklorotiazid – spironolakton karışımı.

1 2 15
↓ ↓ ↓ işaretleri 220 nm'den 290 nm'ye kadar 15 noktadaki çalışma dalga boyuna karşılık gelmektedir.

Çizelge 2.8. Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımlarını içeren kalibrasyon seti.

No:	Hidroklorotiazid µg/mL	Spironolakton µg/mL
1	2.0	2.0
2	2.0	5.0
3	2.0	10.0
4	2.0	15.0
5	2.0	20.0
6	5.0	2.0
7	5.0	5.0
8	5.0	10.0
9	5.0	15.0
10	5.0	20.0
11	10.0	2.0
12	10.0	5.0
13	10.0	10.0
14	10.0	15.0
15	10.0	20.0
16	15.0	2.0
17	15.0	5.0
18	15.0	10.0
19	15.0	15.0
20	15.0	20.0
21	20.0	2.0
22	20.0	5.0
23	20.0	10.0
24	20.0	15.0
25	20.0	20.0

2.2.1.3.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, 2-20 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışım çözeltilerinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan CLS kalibrasyonunun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,2, spironolakton için % 100,9 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 1,87, spironolakton için % 1,55 olarak hesaplandı. CLS kalibrasyonunun yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen deneysel sonuçlar Çizelge 2.9 da verildi.

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağlı standart sapma değerleri CLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 101,2 ve % 1,54 ve spironolakton için % 103,1 ve % 2,20 olarak bulundu.

Çizelge 2.9. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına classical least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Spirolakton	Hidroklorotiazid	Spirolakton
	1	2	10	95,0
2	6	10	102,7	101,1
3	10	10	101,1	101,2
4	14	10	100,0	99,8
5	18	10	100,2	98,8
6	20	10	100,4	98,3
7	10	2	102,1	103,0
8	10	6	100,4	102,3
9	10	10	99,9	101,3
10	10	14	100,8	103,4
11	10	18	99,7	100,8
12	10	20	100,7	100,4
	Ortalama		100,2	100,9
	BSS		1,87	1,55

2.2.1.3.5. Çapraz Validasyon

2.2.1.3.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan CLS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık CLS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.10 da verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.10. Kalibrasyon basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spironolakton
SEC	0,3240	0,1510
r	0,9985	0,9999
Kesim	-0,1880	-0,0804
Eğim	1,0124	1,0055

2.2.1.3.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden CLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık

hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.11 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.11. Tayin basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spirolakton
SEP	0,1010	0,1820
r	0,9996	0,9990
Kesim	0,0224	-0,0102
Eğim	1,0029	1,0082

2.2.1.3.6. Classical Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/25 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.1.3.3 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.12 de sunulmuştur.

Çizelge 2.12. ALDACTAZIDE® tablete uygulanan CLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 25 mg spironolakton/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	25,7	24,0
2	25,6	24,9
3	25,6	24,8
4	24,2	26,0
5	25,5	24,8
6	25,5	24,7
7	25,5	24,8
8	26,0	24,8
9	25,4	24,9
10	25,5	24,8
Ortalama	25,4	24,8
SS	0,47	0,48
BSS	1,84	1,93
S. Hata	0,15	0,15
GA (P=0,05)	0,30	0,31

2.2.1.4. Inverse Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (ILS) (Ters en küçük kareler yöntemi)

Bu yöntem Bölüm 1.3.2.5 de verilen algoritmaya göre uygulandı, ILS kalibrasyonu için 205–300 nm spektral aralıkta 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda=5$ nm aralıklarla 15 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi ve katsayıların matriksi (P), kalibrasyon seti ve absorbanslar arasındaki lineer denklem sistemi kullanılarak hesaplandı (Şekil 2.2). Hesaplanan katsayıların matriksi (P) lineer denklem sisteminde yerine kondu. Kurulan ILS kalibrasyonu karışımlardaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktar tayinlerinin hesaplanmasında kullanıldı. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.1.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.1.4.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 2–20 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığında hidroklorotiazid ve spironolakton içeren 25 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.8). Bu kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun konsantrasyonları dikkate

alınarak çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8)

2.2.1.4.3. Inverse Least Squares Kalibrasyon (Ters en küçük kareler kalibrasyonu)

ILS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 205–300 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285 ve 290 nm'ye karşılık gelen 15 noktada absorbans değerleri okundu. Bölüm 1.3.2.5 de açıklanan algoritmaya göre kalibrasyon seti ve ölçülen absorbans değerleri ile lineer bir denklem sistemi oluşturuldu. Kurulan bu lineer denklem sisteminde katsayıların matriksi (P) hesaplandı ve katsayılar matriksi ILS kalibrasyonda yerine konuldu. Hazırlanan yapay karışımlar ve farmasötik preparat numunelerindeki hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarları yukarıda belirtilen 15 dalga boyundaki absorbanları okunarak oluşturulan kalibrasyon denkleminde yerine konularak hesaplandı.

2.2.1.4.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, 2–20 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan ILS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,2, spironolakton için % 100,8 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 1,87, spironolakton için % 1,70 olarak hesaplandı. ILS kalibrasyonunun yapay karışımlara

uygulanması ile elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 2.13 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri ILS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 100,9 ve % 1,05 ve spironolakton için % 102,1 ve % 1,92 olarak bulundu.



Çizelge 2.13. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına inverse least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan mg/mL		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	2	10	95,0	99,9
2	6	10	102,7	101,0
3	10	10	101,1	101,2
4	14	10	100,0	98,4
5	18	10	100,2	98,8
6	20	10	100,4	98,3
7	10	2	102,1	103,0
8	10	6	100,4	102,3
9	10	10	99,9	101,3
10	10	14	100,8	103,4
11	10	18	99,7	101,1
12	10	20	100,7	100,4
	Ortalama		100,2	100,8
	BSS		1,87	1,70

2.2.1.4.5. Çapraz Validasyon

2.2.1.4.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan ILS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık ILS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.14 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.14. Kalibrasyon basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spironolakton
SEC	0,3220	0,1540
r	0,9985	0,9999
Kesim	-0,1880	-0,0804
Eğim	1,0124	1,0055

2.2.1.4.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden ILS kalibrasyonu için tayinin standart

hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.15 de gösterildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.15. Tayin basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spironolakton
SEP	0,1000	0,1950
r	0,9996	0,9988
Kesim	0,0224	-0,0399
Eğim	1,0029	1,0102

2.2.1.4.6. Inverse Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/25 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.1.4 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.16 da sunulmuştur.

Çizelge 2.16. ALDACTAZIDE® tablete uygulanan ILS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 25 mg spironolakton/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Spirolakton
1	24,9	24,8
2	24,9	24,8
3	25,0	24,8
4	26,0	24,0
5	25,2	25,0
6	25,1	24,9
7	25,1	24,7
8	24,0	24,9
9	25,1	26,0
10	25,2	25,0
Ortalama	25,0	24,9
SS	0,48	0,48
BSS	1,93	1,94
S. Hata	0,15	0,15
GA (P=0,05)	0,31	0,31

2.2.1.5. Principal Component Regression Yöntemi (PCR) (Temel bileşen regresyonu yöntemi)

Bu yöntemin uygulamasında 205–300 nm spektral aralıkta 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda=5$ nm aralıklarla 15 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi. Kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarında ölçülen absorbans verileri ve konsantrasyonlar için oluşturulan matriks sistemlerine Bölüm 1.3.2.6 açıklanan PCR algoritması uygulanarak PCR kalibrasyonu elde edildi. Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımların aynı dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri PCR kalibrasyonunda yerine konarak bu iki etken maddenin miktar tayini gerçekleştirildi. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.1.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.1.5.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 2–20 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığında hidroklorotiazid ve spironolakton içeren 25 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.8). Bu kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun konsantrasyonları dikkate

alınarak çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8).

2.2.1.5.3. Principal Component Regression Kalibrasyonu (Temel bileşen regresyonu kalibrasyonu)

PCR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 205–300 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285 ve 290 nm'ye karşılık gelen 15 noktada absorbans değerleri okundu. PCR kalibrasyonu için Bölüm 1.3.2.6 da açıklanan algoritmaya göre absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans–kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbansların varyans–kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra konsantrasyonların varyans–kovaryans matrisi arasındaki lineer ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kuruldu. Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımların ve farmasötik preparatın yukarıda belirtilen 15 dalga boyundaki absorbans değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayini hesaplandı.

2.2.1.5.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, 2–20 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonunun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 101,2, spironolakton için % 102,3 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 1,83, spironolakton için % 1,40

olarak hesaplandı. PCR kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 2.17 de verildi.

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PCR kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 102,6 ve % 1,17 ve spironolakton için % 101,3 ve % 1,34 olarak bulundu.

Çizelge 2.17. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına principal component regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan mg/mL		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	2	10	101,0	100,9
2	6	10	104,0	102,5
3	10	10	100,6	102,8
4	14	10	98,9	100,3
5	18	10	100,7	101,1
6	20	10	102,6	100,8
7	10	2	101,4	103,0
8	10	6	100,0	104,5
9	10	10	99,9	102,9
10	10	14	105,0	104,6
11	10	18	100,1	102,1
12	10	20	99,6	101,6
	Ortalama		101,2	102,3
	BSS		1,83	1,40

2.2.1.5.5. Çapraz Validasyon

2.2.1.5.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan PCR kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık PCR kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.18 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.18. Kalibrasyon basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spironolakton
SEC	0,1720	0,0940
r	0,9991	0,9999
Kesim	-0,0080	-0,0441
Eğim	1,0030	1,0031

2.2.1.5.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart

hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.19 da verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.19. Tayin basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spironolakton
SEP	0,1640	0,2100
r	0,9984	0,9990
Kesim	-0,0253	0.0215
Eğim	1,0133	1,0196

2.2.1.5.6. Principal Component Regression Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/25 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.1.5 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.20 de sunulmuştur.

Çizelge 2.20. ALDACTAZIDE® tablete uygulanan PCR kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 25 mg spironolakton/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	24,9	25,1
2	24,9	24,0
3	26,0	26,0
4	25,4	25,2
5	25,3	25,0
6	25,4	24,1
7	24,8	24,3
8	25,3	24,0
9	24,0	24,5
10	25,4	24,5
Ortalama	25,1	24,7
SS	0,53	0,64
BSS	2,11	2,61
S. Hata	0,17	0,20
GA (P=0,05)	0,34	0,41

2.2.1.6. Partial Least Squares Yöntemi (PLS) (Kısmi en küçük kareler yöntemi)

PLS yöntemi için 205–300 nm spektral aralıkta 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 15 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi. Kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarında ölçülen absorbans verileri ve konsantrasyonlar için oluşturulan matriks sistemlerine Bölüm 1.3.2.7 de açıklanan PLS algoritması uygulanarak PLS kalibrasyonu elde edildi. Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımların aynı dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri PLS kalibrasyonunda yerine konarak bu iki etken maddenin miktar tayini gerçekleştirildi. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.1.6.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.1.6.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 2–20 $\mu\text{g/mL}$ hidroklorotiazid ve spironolakton içeren 25 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.8). Bu kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun konsantrasyonları dikkate alınarak çalışma

aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8).

2.2.1.6.3. Partial Least Squares Kalibrasyon (Kısmi en küçük kareler kalibrasyonu)

PLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 205–300 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285 ve 290 nm'ye karşılık gelen 15 noktada absorbans değerleri okundu. PLS kalibrasyonu için Bölüm 1.3.2.7 de açıklanan algoritmaya göre absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans–kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbans ve konsantrasyonların varyans–kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra PLS kalibrasyonu kuruldu. Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımların ve farmasötik preparatın yukarıda belirtilen 15 dalga boyundaki absorbans değerleri okunarak PLS kalibrasyonu kullanılarak bu etken maddelerin miktar tayini hesaplandı.

2.2.1.6.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve spironolaktonun metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, 2–20 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,2 ve spironolakton için % 100,0 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 2,42, spironolakton için % 1,59 olarak hesaplandı. PLS yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 2.21 de sunuldu.

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 101,8 ve % 1,71 ve spironolakton için % 99,8 ve % 1,89 olarak bulundu.



Çizelge 2.21. Hidroklorotiazid ve spironolaktonun yapay karışımlarına partial least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan mg/mL		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	2	10	95,0	98,6
2	6	10	100,5	100,3
3	10	10	100,4	100,8
4	14	10	99,9	98,3
5	18	10	100,4	99,2
6	20	10	100,7	98,9
7	10	2	100,2	97,5
8	10	6	99,0	101,0
9	10	10	99,2	100,8
10	10	14	105,9	103,4
11	10	18	100,1	101,0
12	10	20	101,5	100,6
		Ortalama	100,2	100,0
		BSS	2,42	1,59

2.2.1.6.5. Çapraz Validasyon

2.2.1.6.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan PLS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık PLS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.22 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.22. Kalibrasyon basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spironolakton
SEC	0,2450	0,1290
r	0,9997	0,9993
Kesim	0,1907	0,1877
Eğim	0,9895	0,9871

2.2.1.6.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık

hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.23 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.23. Tayin basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Spirolakton
SEC	0,6220	0,1760
r	0,9986	0,9990
Kesim	-0,0201	-0,1454
Eğim	1,0077	1,0170

2.2.1.6.6. Partial Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjode metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/25 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.1.6 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.24 de sunulmuştur.

Çizelge 2.24. ALDACTAZIDE® tablete uygulanan PLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 25 mg spironolakton/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Spironolakton
1	24,9	24,9
2	24,7	24,8
3	24,7	24,9
4	25,5	24,8
5	25,2	24,8
6	25,1	24,7
7	25,1	24,8
8	24,8	24,9
9	25,1	24,7
10	25,2	24,8
Ortalama	25,0	24,8
SS	0,25	0,07
BSS	1,01	0,28
S. Hata	0,08	0,02
GA (P=0,05)	0,16	0,04

2.2.1.7. Varyans Analizi (ANOVA testi)

Geliştirilen 6 kemometrik metodun ALDACTAZIDE® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak üzere tabletlerdeki herbir için 10 numunenin 6 setine ANOVA (Analysis of variance) testi uygulanarak F değerleri hesaplandı. F tablosunda $n= 5$ ve $n= 54$ için $P= 0,05$ olan değeri 2,37 verilmesine karşın biz hesaplarımızda hidroklorotiazid için 2,296 ve spironolakton için 1,076 değerlerini hesapladık. Bu sonuçlara göre tablo değeri ve hesaplanan F değerleri arasındaki farkın anlamsız olduğu gözlenmiştir. Farmasötik preparata uygulanan 6 kemometrik yöntem için elde edilen varyans analiz sonuçları Çizelge 2.24a da verildi.

Çizelge 2.24a. Kemometrik yöntemlerin ALDACTAZIDE® tablete uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar için ANOVA testi

Etken madde	Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F
Hidroklorotiazid	Gruplar arası	11,611	5	2,322	2,296
	Gruplar içi	54,624	54	1,012	
	Genel varyasyon	66,235	59		
Spironolakton	Gruplar arası	1,463	5	0,293	1,076
	Gruplar içi	14,684	54	0,272	
	Genel varyasyon	16,147	59		

2.2.1.8. Farmakope Yöntemi (USP XXIII)

Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren tabletler için verilen miktar tayini işlemi:

a) Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımı için 20'den az olmamak üzere hidroklorotiazid+spironolakton tableti tartılır ve iyice toz edilir, 20 mg spironolaktona karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojeye aktarılır, üzerine yaklaşık 70 mL metanol ilave edilir, 30 dakika karıştırılır, hacim metanol ile seyreltilerek tamamlanır ve tekrar karıştırılır, santrifüj edilir ve berrak kısımdan 20 mL'lik bir kısım 100 mL'lik balonjojeye tekrar aktarılır, hacim metanol ile tamamlandıktan sonra tekrar karıştırılır.

b) Standart çözeltide mL'sinde 0,0125 mg spironolakton ve hidroklorotiazid olacak şekilde metanol ve % 1'lik sodyum içeren 0,1 N HCl karışımında standart çözelti hazırlanır.

c) Kromatografik sistem; Sıvı kromatografisinde L₁ kolonu (3,9 mm–30 cm), 254 nm'de UV dedektör ve dakikada 1 mL akış hızında metanol-su (7:3) hareketli faz kullanılmıştır. Uygun kromatogramda 5 enjeksiyonda standart çözelti için bağıl standart sapma % 2'den daha fazla olmayacak şekilde ve ayırma faktörü hidroklorotiazid ve spironolakton için % 2'den daha az olmayacak şekilde doğrudan piklerin cevabı kaydedilir.

d) Standart çözeltilerden ve deney çözeltilerinden ayrı ayrı (yaklaşık 10 µl) enjekte edilir ve kromatogramlar kaydedilir, en büyük pik için cevaplar ölçülür. Bağıl tutulma zamanları yaklaşık olarak hidroklorotiazid için 0,5 dakika ve spironolakton için 1 dakika olarak bulunur. $0,5C(r_u/r_s)$ formülü kullanılarak tabletlerdeki

spironolaktonun mg olarak miktarı tayin edilir. Burada C, mg/ml olarak konsantrasyondur. r_u ve r_s sırasıyla numune çözeltisi ve standart çözeltiden elde edilen, spironolakton için pik cevaplarıdır. Benzer işlem ve benzer formül hidroklorotiazidin miktar tayininde de kullanılır.



2.2.2. Hidroklorotiazid + Amilorid Hidroklorür Karışımının Analizi

2.2.2.1. Bivariate Calibration Yöntemi (BC) (İki bileşenli kalibrasyon yöntemi)

Hidroklorotiazid–amilorid hidroklorür karışımında bu iki bileşik için hazırlanan standart serinin konsantrasyonlarına karşı 240-400 nm aralığında spektrumlardan 265 nm'den 330 nm'ye kadar seçilen maksimum, minimum ve omuzlara karşılık gelen 14 dalga boyundaki absorbanlarının ölçümü kullanılarak 14 lineer regresyon denklemi elde edildi (Şekil 2.3). Seçilen 14 dalga boyunda elde edilen lineer regresyon denklemlerinden, Kaiser tekniğine göre bulunan 270 nm ve 290 nm'deki en duyarlı 2 dalga boyuna karşılık gelen lineer regresyon denklemleri ile bivariate kalibrasyon yönteminin teorik açıklamasının yapıldığı Bölüm 1.3.2.2 de 6 no'lu denklem kullanılarak iki etken maddenin miktar tayini yapıldı.

2.2.2.1.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

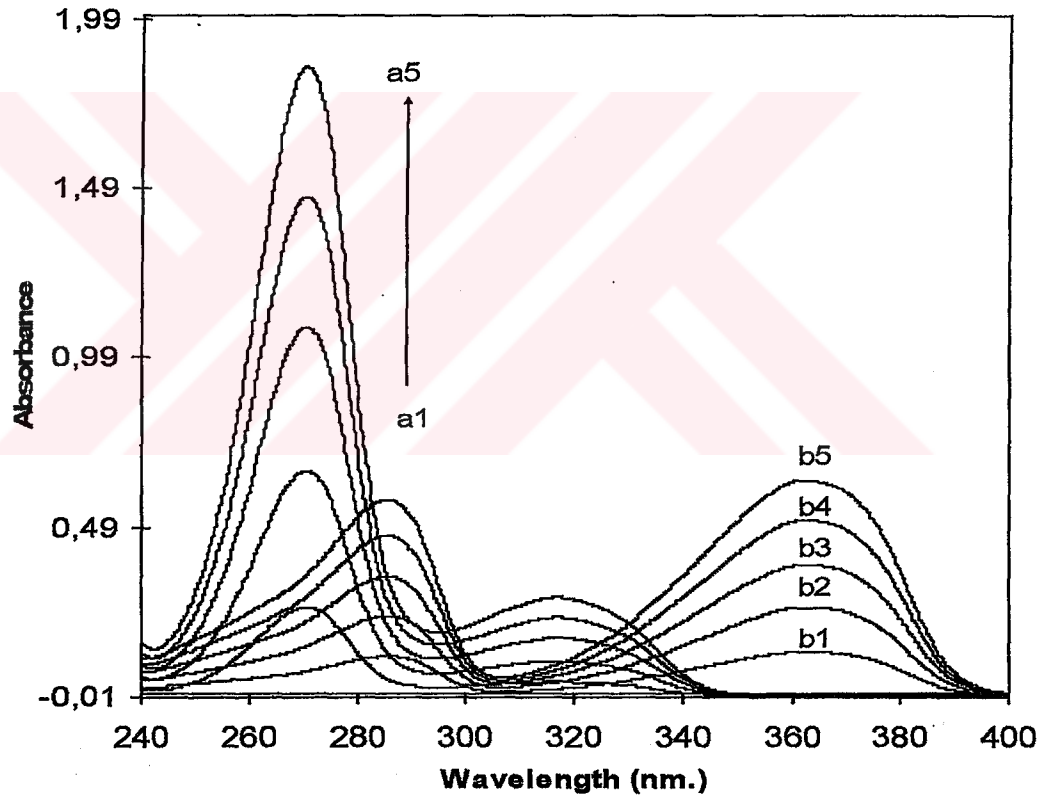
a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Amilorid hidroklorürün metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.1.2. Bivariate Calibration (BC) (İki bileşenli kalibrasyon)

Bivariate kalibrasyon için 4–28 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 2–10 µg/mL aralığında amilorid hidroklorürü içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerden yararlanılarak hazırlandı. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün standart seri çözeltilerin 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330 nm'ye karşılık gelen 14 dalga boylarındaki absorbansları okunarak regresyon analizi yapılarak sonuçları Çizelge 2.25 de verildi (Şekil 2.3).

Buradaki uygulamada optimum iki dalga boyunu içeren dalga boyu setinin seçimi için duyarlılık matrikslerinden 91 farklı çift hesaplandı ve hidroklorotiazid–amilorid hidroklorür karışımları için dalga boyu setinin seçimi Çizelge 2.26 da sunuldu. Duyarlılık matrikslerinin en yüksek determinant değerini veren optimum iki dalga boyu bu kalibrasyon modeli için 270 ile 290 nm'lerine karşılık gelen noktalar olduğu saptandı. Bu seçilen iki dalga boyunda hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün lineer regresyon denklemleri Çizelge 2.25 de görülmektedir. Bu iki dalga boyunda herbir bileşiğin kalibrasyon denklemleri kullanılarak Bölüm 1.3.2.2 de verilen algoritmaya göre hidroklorotiazidin 4–28 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında, amilorid hidroklorürün 2–10 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında bivariate kalibrasyonu kuruldu. Bu yöntemin uygulanmasında yapılan matematiksel işlemlerde Microsoft Excel 2000, Maple V ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.



Şekil 2.3. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde hidroklorotiazid a1) 6 µg/mL, a2) 10 µg/mL, a3) 14µg/mL, a4) 18 µg/mL , a5) 20µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları ve amilorid.HCl b1) 6 µg/mL, b2) 10 µg/mL, b3) 14µg/mL, b4) 18 µg/mL , b5) 20µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları.

Çizelge 2.25. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün seçilen 14 dalga boyundaki doğru denklemleri ve lineer regresyon katsayıları.

λ	Hidroklorotiazid		Amilorid hidroklorür	
	$A = m \times C + n$	r	$A = m \times C + n$	r
265	$A = 0.0557 \times C - 0.0054$	0,9998	$A = 0,0287 \times C - 0,0033$	0,9996
270	$A = 0,0664 \times C - 0,0059$	0,9998	$A = 0,0745 \times C - 0,0033$	0,9996
275	$A = 0,0582 \times C - 0,0038$	0,9998	$A = 0,0429 \times C - 0,0030$	0,9997
280	$A = 0,0323 \times C - 0,0066$	0,9998	$A = 0,0523 \times C - 0,0029$	0,9998
285	$A = 0,0138 \times C - 0,0058$	0,9996	$A = 0,0578 \times C - 0,0033$	0,9998
290	$A = 0,0078 \times C - 0,0073$	0,9997	$A = 0,0527 \times C - 0,0030$	0,9998
295	$A = 0,0068 \times C - 0,0072$	0,9997	$A = 0,0329 \times C - 0,0030$	0,9996
300	$A = 0,0073 \times C - 0,0070$	0,9997	$A = 0,0119 \times C - 0,0022$	0,9989
305	$A = 0,0085 \times C - 0,0068$	0,9997	$A = 0,0053 \times C - 0,0018$	0,9966
310	$A = 0,0095 \times C - 0,0065$	0,9997	$A = 0,0056 \times C - 0,0016$	0,9969
315	$A = 0,0103 \times C - 0,0063$	0,9997	$A = 0,0077 \times C - 0,0016$	0,9984
320	$A = 0,0102 \times C - 0,0062$	0,9997	$A = 0,0109 \times C - 0,0019$	0,9992
325	$A = 0,0092 \times C - 0,0061$	0,9997	$A = 0,0152 \times C - 0,0023$	0,9996
330	$A = 0,0077 \times C - 0,0058$	0,9996	$A = 0,0207 \times C - 0,0022$	0,9997

2.2.2.1.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, hidroklorotiazid için 4–28 µg/mL, amilorid hidroklorür için 2–10 µg/mL doğrusal çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan bivariante kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 97,5, amilorid hidroklorür için % 100,5 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,25, amilorid hidroklorür için % 2,04 olarak hesaplandı. Bu yöntemin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 2.27 de verildi.

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağlı standart sapma değerleri bivariante kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 103,1 ve % 2,14 ve amilorid hidroklorür için % 97,6 ve % 2,25 olarak bulundu.

2.2.2.1.4. Bivariate Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/20 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine 2.2.2.1 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.27 de sunuldu.

Çizelge 2.27. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür yapay karışımlarına bivariante kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan mg/mL		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	4	2,5	100,5	100,0
2	10	2,5	83,8	98,4
3	16	2,5	88,4	103,2
4	22	2,5	99,2	98,0
5	28	2,5	99,5	98,0
6	25	2	102,2	100,0
7	25	4	99,4	101,5
8	25	6	100,8	102,0
9	25	8	101,0	100,5
10	25	10	100,2	102,9
		Ortalama	97,5	100,5
		BSS	0,25	2,04

Çizelge 2.28. MODURETIC® tablete uygulanan bivariate kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 50 mg hidroklorotiazid ve 5 mg amilorid hidroklorür/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	50,7	5,1
2	50,0	4,9
3	50,1	5,0
4	49,0	4,9
5	50,4	4,9
6	49,1	5,0
7	51,2	4,9
8	50,1	5,1
9	50,0	4,9
10	50,5	4,8
Ortalama	50,1	4,9
SS	0,67	0,10
BSS	1,34	1,93
S. Hata	0,21	0,03
GA (P=0,05)	0,43	0,06

2.2.2.2. Multilinear Regression Calibration Yöntemi (MLRC) (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu yöntemi)

Hidroklorotiazid–amilorid hidroklorür karışımını içeren tabletlerde bu etken maddelerin 240–400 nm dalga boyu aralığındaki spektrumlarından 265 nm’den 330 nm’ye kadar maksimum, minimum ve omuzlara karşılık gelen 14 dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak elde edilen lineer regresyon fonksiyonlarına dayalı olarak kurulan MLRC kalibrasyon ile Bölüm 1.3.2.3 de 13 no’lu denklem kullanılarak karışımdaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktar tayinleri yapıldı (Şekil 2.3).

2.2.2.2.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

- a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücünde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.
- b) Amilorid hidroklorürün metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücünde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.2.2. Multilinear Regression Calibration (MLRC) (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu)

Bu yöntemde kalibrasyon için 4–28 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 2–10 µg/mL doğrusal çalışma aralığında amilorid hidroklorürü içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerden yararlanılarak hazırlandı. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün standart seri çözeltilerin 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330 nm’ye karşılık

gelen dalga boylarındaki absorbanları okunarak regresyon analizi yapılarak sonuçları Çizelge 2.25 de verildi (Şekil 2.3). MLRC için 240–400 nm spektral aralıkta 265 nm'den 330 nm'ye kadar 14 dalga boyunda herbir bileşik için Çizelge 2.25 de hesaplanan lineer regresyon fonksiyonları kullanarak Çizelge 2.29 daki MLRC denklem seti elde edildi.

Bu kalibrasyon için Çizelge 2.29 deki denklem seti kullanılarak 14 dalga boyunda Bölüm 1.3.2.3 de verilen algoritmaya göre hidroklorotiazid için 4–28 µg/mL ve amilorid hidroklorür için 2–10 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında multilineer regression kalibrasyonu kuruldu. Bu yöntemin uygulanmasında yapılan matematiksel işlemlerde Microsoft Excel 2000, Maple V ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

Çizelge 2.29. Karışımdaki hidroklorotiazid (HCT) ve amilorid hidroklorür (AM) için seçilen 14 dalga boyunda elde edilen denklem seti.

λ	Denklem Seti
265	$A_{k1} = 0.0557 \times \text{CHCT} + 0,0287 \times \text{CAM} - 0,0033$
270	$A_{k2} = 0,0664 \times \text{CHCT} + 0,0745 \times \text{CAM} - 0,0033$
275	$A_{k3} = 0,0582 \times \text{CHCT} + 0,0429 \times \text{CAM} - 0,0030$
280	$A_{k4} = 0,0323 \times \text{CHCT} + 0,0523 \times \text{CAM} - 0,0029$
285	$A_{k5} = 0,0138 \times \text{CHCT} + 0,0578 \times \text{CAM} - 0,0033$
290	$A_{k6} = 0,0078 \times \text{CHCT} + 0,0527 \times \text{CAM} - 0,0030$
295	$A_{k7} = 0,0068 \times \text{CHCT} + 0,0329 \times \text{CAM} - 0,0030$
300	$A_{k8} = 0,0073 \times \text{CHCT} + 0,0119 \times \text{CAM} - 0,0022$
305	$A_{k9} = 0,0085 \times \text{CHCT} + 0,0053 \times \text{CAM} - 0,0018$
310	$A_{k10} = 0,0095 \times \text{CHCT} + 0,0056 \times \text{CAM} - 0,0016$
315	$A_{k11} = 0,0103 \times \text{CHCT} + 0,0077 \times \text{CAM} - 0,0016$
320	$A_{k12} = 0,0102 \times \text{CHCT} + 0,0109 \times \text{CAM} - 0,0019$
325	$A_{k13} = 0,0092 \times \text{CHCT} + 0,0152 \times \text{CAM} - 0,0023$
330	$A_{k14} = 0,0077 \times \text{CHCT} + 0,0207 \times \text{CAM} - 0,0022$

2.2.2.2.3 Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, hidroklorotiazidin 4–28 µg/mL, amilorid hidroklorürün 2–10 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan MLRC için kesinlik ve doğruluk test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 99,3 ve amilorid hidroklorür için % 103,0 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,09 ve amilorid hidroklorür için % 0,14 olarak hesaplandı. MLRC yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 2.30 da gösterildi.

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama ve bağlı standart sapma değerleri multilinear regression kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 102,4 ve % 1,94 ve amilorid hidroklorür için % 98,1 ve % 1,82 olarak bulundu.

2.2.2.2.4. Multilinear Regression Calibration (MLRC) Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100

mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzöldü. Analiz için süzölen çözeltili aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/20 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine Bölüm 2.2.2.2 de açıkladığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.31 de sunulmuştur.



Çizelge 2.30. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür yapay karışımlarına multilinear regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	4	2,5	99,8	102,4
2	10	2,5	97,7	104,4
3	16	2,5	99,1	101,6
4	22	2,5	101,3	99,6
5	28	2,5	101,7	104,8
6	25	2	99,2	104,9
7	25	4	99,7	104,5
8	25	6	97,5	103,7
9	25	8	96,8	102,0
10	25	10	99,9	102,2
		Ortalama	99,3	103,0
		BSS	0,09	0,14

Çizelge 2.31. MODURETIC® tablete uygulanan multilinear regression kalibrasyonu yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 50 mg hidroklorotiazid ve 5 mg amilorid hidroklorür/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	50,8	5,0
2	49,0	5,0
3	50,0	5,0
4	50,0	4,9
5	49,1	5,1
6	50,1	4,8
7	50,1	4,8
8	50,1	5,0
9	51,1	5,0
10	50,6	4,9
Ortalama	50,1	5,0
SS	0,66	0,10
BSS	1,33	1,96
S. Hata	0,21	0,03
GA (P=0,05)	0,42	0,06

2.2.2.3. Classical Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (CLS) (Klasik en küçük kareler yöntemi)

CLS kalibrasyon yönteminin uygulamasında kalibrasyon seti için 205–395 nm spektral aralıkta 220 nm'den 385 nm'ye aralığında 34 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi ve katsayıların matriksi (K) kalibrasyon seti ve absorbanslar arasındaki lineer denklem sistemi kullanılarak hesaplandı (Şekil 2.4) . Hesaplanan katsayıların matriksi (K) lineer denklem sisteminde yerine kondu. Kurulan CLS kalibrasyonu karışımlardaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktar tayinlerinin hesaplanmasında kullanıldı. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.2.3.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

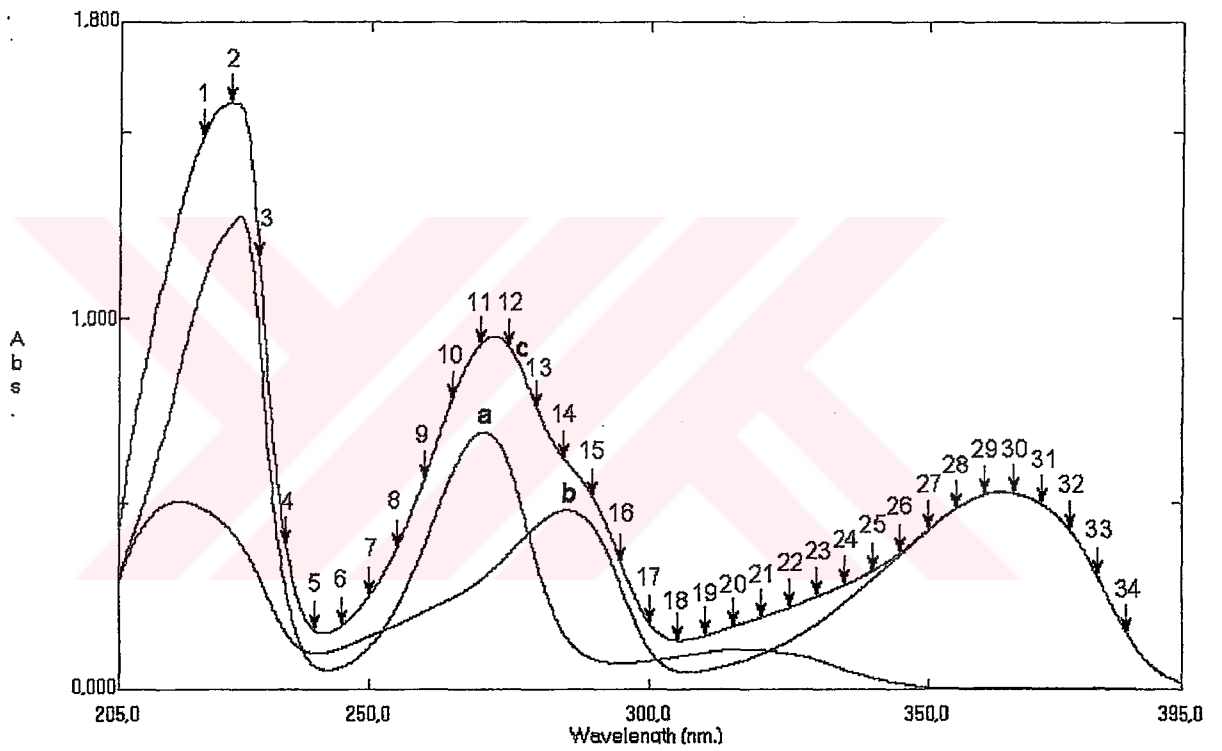
a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Amilorid hidroklorürün metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.3.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 4–28 µg/mL hidroklorotiazid ve 2-10 µg/mL çalışma aralığında amilorid hidroklorür içeren 25 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden simetrik kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.32). Bu kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve amilorid

hidroklorürün konsantrasyonları dikkate alınarak çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8).



Şekil 2.4. Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) çözücü sisteminde a) 10 µg/mL hidroklorotiazid, b) 10 µg/mL amilorid hidroklorür ve c) hidroklorotiazid-amilorid hidroklorür karışımı.

(↓¹, ↓², ↓³ ↓³⁴ işaretleri 220 nm'den 385 nm'ye kadar 34 noktadaki çalışma dalga boyuna karşılık gelmektedir).

Çizelge 2.32. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımlarını içeren kalibrasyon seti.

No:	Hidroklorotiazid µg/mL	Amilorid hidroklorür µg/mL
1	4.0	2.0
2	4.0	4.0
3	4.0	6.0
4	4.0	8.0
5	4.0	10.0
6	10.0	2.0
7	10.0	4.0
8	10.0	6.0
9	10.0	8.0
10	10.0	10.0
11	16.0	2.0
12	16.0	4.0
13	16.0	6.0
14	16.0	8.0
15	16.0	10.0
16	22.0	2.0
17	22.0	4.0
18	22.0	6.0
19	22.0	8.0
20	22.0	10.0
21	28.0	2.0
22	28.0	4.0
23	28.0	6.0
24	28.0	8.0
25	28.0	10.0

2.2.2.3.3. Classical Least Squares Kalibrasyon (Klasik en küçük kareler kalibrasyonu)

CLS kalibrasyonu için Bölüm 1.3.2.8 de açıklandığı gibi simetrik olarak hazırlanan kalibrasyon seti için 205–395 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den başlayarak 385 nm'ye karşılık gelen $\Delta\lambda=5$ nm aralıklarla 34 noktada absorbands değerleri okundu. Bölüm 1.3.2.4 de açıklanan algoritmaya göre kalibrasyon seti ve ölçülen absorbands değerleri ile lineer bir denklem sistemi oluşturuldu. Kurulan bu lineer denklem sisteminde katsayıların matriksi (K) hesaplandı ve katsayılar matriksi CLS kalibrasyonda yerine konuldu. Hazırlanan yapay karışımlar ve farmasötik preparat numunelerindeki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktarları yukarıda belirtilen 34 dalga boyundaki absorbandsları okunarak oluşturulan kalibrasyon denkleminde yerine konarak hesaplandı.

2.2.2.3.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, hidroklorotiazidin 4–28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, amilorid hidroklorürün 2–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan CLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,8 ve amilorid hidroklorür için % 101,4 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 1,84 ve amilorid hidroklorür için % 0,81 olarak hesaplandı. CLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen geri kazanım sonuçları Çizelge 2.33 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri CLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 96,7 ve % 2,35 ve amilorid hidroklorür için % 102,6 ve % 1,54 olarak bulundu.



Çizelge 2.33. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün yapay karışımlarına classical least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	4	2,5	99,8	102,0
2	10	2,5	102,9	102,0
3	16	2,5	103,1	101,2
4	22	2,5	101,5	102,8
5	28	2,5	99,7	100,0
6	25	2	101,7	100,5
7	25	4	101,6	101,3
8	25	6	102,0	101,8
9	25	8	97,4	100,8
10	25	10	98,8	101,2
		Ortalama	100,8	101,4
		BSS	1,84	0,81

2.2.2.3.5. Çapraz Validasyon

2.2.2.3.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan CLS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık CLS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.34 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.34. Kalibrasyon basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEC	0,4690	0,2490
r	0,9991	0,9998
Kesim	0,0190	0,0230
Eğim	1,0122	0,9955

2.2.2.3.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden CLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık

hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.35 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.35. Tayin basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEP	0,3930	0,2090
r	0,9977	0,9999
Kesim	0,2400	0,0110
Eğim	0,9960	1,0100

2.2.2.3.6. Classical Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/20 oranında 100 mL'ye seyreltilti. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.2.3 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.36 da sunuldu.

Çizelge 2.36. MODURETIC® tablete uygulanan CLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 50 mg hidroklorotiazid ve 5 mg amilorid hidroklorür/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	51,0	5,1
2	50,8	5,0
3	50,6	5,1
4	51,0	5,1
5	49,0	5,1
6	51,0	5,0
7	51,9	5,1
8	51,0	5,0
9	51,2	5,1
10	51,7	5,0
Ortalama	50,9	5,1
SS	0,78	0,04
BSS	1,53	0,81
S. Hata	0,25	0,01
GA (P=0,05)	0,50	0,03

2.2.2.4. Inverse Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (ILS) (Ters en küçük kareler yöntemi)

Bu yöntem Bölüm 1.3.2.5 de açıklanan ILS algoritmasına göre ILS kalibrasyonu için 205–395 nm spektral aralıkta çalışma dalga boyu olarak 220 nm'den 385 nm'ye kadar 34 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi ve katsayıların matriksi (P), kalibrasyon seti ve absorbanlar arasındaki lineer denklem sistemi kullanılarak hesaplandı (Şekil 2.4). Hesaplanan katsayıların matriksi (P) lineer denklem sisteminde yerine kondu. Kurulan ILS kalibrasyonu karışımlardaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür miktar tayinlerinin hesaplanmasında kullanıldı. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.2.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Amilorid hidroklorürün metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.4.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 4–28 µg/mL çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 2–10 µg/mL çalışma aralığında amilorid hidroklorür içeren 25 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden simetrik kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.32). Bu kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür konsantrasyonları dikkate alınarak çalışma

aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8).

2.2.2.4.3. Inverse Least Squares Kalibrasyon (Ters en küçük kareler kalibrasyonu)

ILS kalibrasyon için Bölüm 1.3.2.8 de açıklandığı gibi simetrik olarak hazırlanan kalibrasyon seti için 205–385 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den başlayarak 385 nm'ye karşılık gelen $\Delta\lambda = 5$ aralıklarla 34 noktada absorbans değerleri okundu. Bölüm 1.3.2.5 de açıklanan algoritmaya göre kalibrasyon seti ve ölçülen absorbans değerleri ile lineer bir denklem sistemi oluşturuldu. Kurulan bu lineer denklem sisteminde katsayıların matriksi (P) hesaplandı ve katsayılar matriksi inverse least squares kalibrasyonda yerine konuldu. Hazırlanan yapay karışımlar ve farmasötik preparat numunelerindeki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktarları yukarıda belirtilen 34 dalga boyundaki absorbansları okunarak oluşturulan kalibrasyon denkleminde yerine konarak hesaplandı.

2.2.2.4.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, hidroklorotiazidin 4–28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, amilorid hidroklorürün 2–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan ILS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,6 ve amilorid hidroklorür için % 101,2 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 1,95 ve amilorid hidroklorür için % 1,13 olarak hesaplandı. ILS kalibrasyon yönteminin yapay

karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.37 de hesaplanarak sunuldu.

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri ILS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 98,2 ve % 1,34 ve amilorid hidroklorür için % 101,9 ve % 1,61 olarak bulundu.



Çizelge 2.37. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür yapay karışımlarına inverse least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	4	2,5	99,5	101,6
2	10	2,5	103,0	101,6
3	16	2,5	103,2	102,4
4	22	2,5	101,5	102,4
5	28	2,5	100,3	100,4
6	25	2	101,6	100,0
7	25	4	98,3	101,5
8	25	6	101,9	102,0
9	25	8	97,6	100,9
10	25	10	98,8	98,8
		Ortalama	100,6	101,2
		BSS	1,95	1,13

2.2.2.4.5. Çapraz Validasyon

2.2.2.4.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan ILS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık ILS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.38 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.38. Kalibrasyon basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEC	0,4630	0,0850
r	0,9995	0,9989
Kesim	-0,1878	-0,0801
Eğim	1,0122	1,0065

2.2.2.4.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden ILS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık

hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.39 da verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.39. Tayin basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEP	0,3870	0,0710
r	0,9978	0,9999
Kesim	0,2420	0,0090
Eğim	0,9960	1,0120

2.2.2.4.6. Inverse Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/20 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.2.4 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.40 da sunulmuştur.

Çizelge 2.40. MODURETIC® tablete uygulanan ILS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 50 mg hidroklorotiazid ve 5 mg amilorid hidroklorür/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	51,6	5,1
2	51,0	5,0
3	50,8	5,1
4	50,0	5,1
5	50,4	5,1
6	51,0	5,0
7	51,8	5,0
8	51,1	5,0
9	51,2	5,1
10	51,8	5,1
Ortalama	51,1	5,1
SS	0,58	0,04
BSS	1,13	0,73
S. Hata	0,18	0,01
GA (P=0,05)	0,37	0,02

2.2.2.5. Principal Component Regression Yöntemi (PCR) (Temel bileşen regresyonu yöntemi)

PCR kalibrasyonu için 205–395 nm spektral aralıkta çalışma dalga boyu olarak 220 nm'den 385 nm'ye kadar 34 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi. Kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarında ölçülen absorbans verileri ve konsantrasyonlar için oluşturulan matriks sistemlerine Bölüm 1.3.2.6 da açıklanan PCR algoritması uygulanarak PCR kalibrasyonu elde edildi. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımların aynı dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri PCR kalibrasyonunda yerine konarak bu iki etken maddenin miktar tayini gerçekleştirildi. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.2.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Amilorid hidroklorürün ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.5.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu PCR kalibrasyon yöntem için 4–28 µg/mL çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 2-10 µg/mL çalışma aralığında amilorid hidroklorür içeren 25 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.32). Bu

kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür konsantrasyonları dikkate alınarak çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8).

2.2.2.5.3. Principal Component Regression Kalibrasyon (Temel bileşen regresyonu kalibrasyonu)

Principal component regression kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon seti için 205–385 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den başlayarak 385 nm'ye karşılık gelen $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 34 noktada absorbans değerleri okundu. PCR kalibrasyonu için Bölüm 1.3.2.6 da açıklanan algoritmaya göre absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans–kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için ölçülen absorbansların varyans–kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra konsantrasyonların varyans–kovaryans matrisi arasındaki lineer ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kuruldu. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımların ve farmasötik preparatın yukarıda belirtilen 34 dalga boyundaki absorbans değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayini hesaplandı.

2.2.2.5.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, hidroklorotiazidin 4–28 $\mu\text{g/mL}$, amilorid hidroklorürün 2–10 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu

test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 101,0 ve amilorid hidroklorür için % 100,4 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,83 ve amilorid hidroklorür için % 1,84 olarak hesaplandı. PCR kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.41 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PCR kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 99,1 ve % 1,05 ve amilorid hidroklorür için % 96,5 ve % 0,98 olarak bulundu.

Çizelge 2.41. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün yapay karışımlarına principal component regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	4	2,5	100,0	98,0
2	10	2,5	101,0	98,0
3	16	2,5	101,0	97,6
4	22	2,5	102,3	101,6
5	28	2,5	102,1	100,8
6	25	2	100,8	102,5
7	25	4	102,0	100,8
8	25	6	100,2	101,7
9	25	8	100,6	101,3
10	25	10	100,2	102,1
	Ortalama		101,0	100,4
	BSS		0,83	1,84

2.2.2.5.5. Çapraz Validasyon

2.2.2.5.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan PCR kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık PCR kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.42 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.42. Kalibrasyon basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEC	0,3710	0,1060
r	0,9987	0,9997
Kesim	-0,1885	-0,0807
Eğim	1,0127	1,0059

2.2.2.5.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık

hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.43 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.43. Tayin basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEP	0,3110	0,0880
r	0,9994	0,9997
Kesim	-0,0520	-0,0700
Eğim	1,0140	1,0250

2.2.2.5.6. Principal Component Regression Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/20 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.2.5 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.44 de sunulmuştur.

Çizelge 2.44. MODURETIC® tablete uygulanan PCR kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 50 mg hidroklorotiazid ve 5 mg amilorid hidroklorür/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	51,0	5,0
2	51,6	5,0
3	49,1	5,0
4	51,8	4,9
5	51,8	5,0
6	51,8	5,0
7	51,6	4,9
8	50,4	4,9
9	51,8	5,0
10	50,6	4,9
Ortalama	51,2	5,0
SS	0,89	0,04
BSS	1,75	0,85
S. Hata	0,28	0,01
GA (P=0,05)	0,57	0,03

2.2.2.6. Partial Least Squares Yöntemi (PLS) (Kısmi en küçük kareler yöntemi)

PLS yönteminde hazırlanan kalibrasyon seti için 205–385 nm aralığında 220 nm'den 385 nm'ye kadar 34 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi. Kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarında ölçülen absorbans verileri ve konsantrasyonlar için oluşturulan matriks sistemlerine Bölüm 1.3.2.7 de açıklanan PLS algoritması uygulanarak PLS kalibrasyonu elde edildi. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımların aynı dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri PLS kalibrasyonunda yerine konarak bu iki etken maddenin miktar tayini gerçekleştirildi. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.2.6.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Amilorid hidroklorürün metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.2.6.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 4–28 µg/mL çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 2–10 µg/mL çalışma aralığında amilorid hidroklorür içeren 25 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.32). Bu kalibrasyon seti rastgele değil simetrik olarak farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve

amilorid hidroklorür konsantrasyonları dikkate alınarak çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır (Bölüm 1.3.2.8).

2.2.2.6.3. Partial Least Squares Kalibrasyon (Kısmi en küçük kareler yöntemi)

Partial least squares kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon seti için 205–385 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den başlayarak 385 nm'ye karşılık gelen $\Delta\lambda = 4$ nm aralıklarla 34 noktada absorban değerleri okundu. PLS kalibrasyonu için Bölüm 1.3.2.7 de açıklanan algoritmaya göre absorban ve konsantrasyon değerlerinin varyans–kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorban ve konsantrasyonların varyans–kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra PLS kalibrasyonu kuruldu. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımların ve farmasötik preparatın yukarıda belirtilen 34 dalga boyundaki absorban değerleri okunarak PLS kalibrasyonu kullanılarak bu etken maddelerin miktar tayini hesaplandı.

2.2.2.6.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit–sodyum asetat (80:20) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, hidroklorotiazidin 4–28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, amilorid hidroklorürün 2–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,1 ve spironolakton için % 100,9 olarak bulundu. Bağıl standart sapma

değerleri hidroklorotiazid için % 2,10 ve spironolakton için % 2,25 olarak hesaplandı. PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.45 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 101,0 ve % 1,21 ve amilorid hidroklorür için % 98,3 ve % 1,10 olarak bulundu.

Çizelge 2.45. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün yapay karışımlarına partial least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	4	2,5	97,5	97,6
2	10	2,5	99,7	97,8
3	16	2,5	102,5	98,0
4	22	2,5	103,8	102,8
5	28	2,5	100,1	101,2
6	25	2	101,2	103,5
7	25	4	101,6	101,3
8	25	6	99,0	102,0
9	25	8	98,2	101,8
10	25	10	97,8	103,1
		Ortalama	100,1	100,9
		BSS	2,10	2,25

2.2.2.6.5. Çapraz Validasyon

2.2.2.6.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan PLS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık PLS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.46 da verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.46. Kalibrasyon basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEC	0,4930	0,1490
r	0,9995	0,9987
Kesim	-0,1881	-0,0803
Eğim	1,0123	1,0051

2.2.2.6.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PLS kalibrasyonu için tayinin standart

hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.47 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.47. Tayin basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
SEP	0,4120	0,1250
r	0,9970	0,9996
Kesim	0,0880	-0,0880
Eğim	0,9980	1,0350

2.2.2.6.6. Partial Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit-sodyum asetat (80:20) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/20 oranında 100 mL'ye seyreltili. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.2.6 da açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.48 de sunuldu.

Çizelge 2.48. MODURETIC® tablete uygulanan PLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 50 mg hidroklorotiazid ve 5 mg amilorid hidroklorür/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
1	51,8	5,0
2	51,0	5,0
3	51,0	5,0
4	50,2	5,0
5	50,7	5,0
6	50,9	5,0
7	51,0	5,0
8	51,2	5,0
9	52,0	5,0
10	50,6	4,9
Ortalama	51,0	5,0
SS	0,52	0,04
BSS	1,02	0,81
S. Hata	0,16	0,01
GA (P=0,05)	0,33	0,03

2.2.2.7. Varyans Analizi (ANOVA testi)

Geliştirilen 6 kemometrik metodun MODURETIC® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak üzere tabletlerdeki herbir etken madde için 10 numunenin 6 setine ANOVA testi uygulanarak F değerleri hesaplandı. F tablosunda $n= 5$ ve $n= 54$ için $P= 0,05$ olan değeri 2,37 verilmesine karşın biz hesaplarımızda hidroklorotiazid için 1,959 ve amilorid hidroklorür için 1,995 bulduk. Bu sonuçlara göre tablo değeri ve hesaplanan F değerleri arasındaki farkın anlamsız olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2.48a).



Çizelge 2.48a. Kemometrik yöntemlerin MODURETIC® tablete uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar için ANOVA testi

Etken madde	Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F
Hidroklorotiazid	Gruplar arası	10,370	5	2,074	1,959
	Gruplar içi	57,173	54	1,059	
	Genel varyasyon	67,543	59		
Amilorid hidroklorür	Gruplar arası	0,284	5	$5,7 \times 10^{-2}$	1,995
	Gruplar içi	1,539	54	$2,9 \times 10^{-2}$	
	Genel varyasyon	1,824	59		

2.2.2.8. Farmakope Yöntemi (USP XXIII)

Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren tabletler için verilen miktar tayini işlemi:

a) Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımı için 20'den az olmamak üzere hidroklorotiazid+amilorid hidroklorür tableti tartılır ve iyice toz edilir, 5 mg amilorid hidroklorüre karşılık gelen miktar 50 mL'lik balonjojeye aktarılır, üzerine 1 N HCl'den 2 mL ve metanolden 15 mL ilave edilir, 10 dakika karıştırılır, hacim su ile seyreltilerek tamamlanır. İlave olarak 10 dakika daha karıştırılır ve süzülür.

b) Standart hazırlama: mL'de 1 mg olacak şekilde metanol içerisinde amilorid hidroklorür çözülür. Bu çözeltinin 10 mL'si hidroklorotiazid 100 mg'ını içeren balonjojeye aktarılır. Üzerine 20 mL metanol ilave edilir. Bu çözeltiliye 1 N HCl'den 4 mL eklenir. Hacim su ile tamamlanır ve karıştırılır. Hazırlanan standart çözeltilide amilorid hidroklorür ve hidroklorotiazid konsantrasyonları sıra ile yaklaşık 0,1 mg/mL ve 1 mg/mL'dir.

c) Kromatografik sistem; Sıvı kromatografisinde L₁ kolonu (3,9 mm-30 cm), 286 nm'de UV dedektör ve dakikada 1 mL akış hızı ile su, metanol ve tampon (fosforik asit ile pH'sı 3' ayarlanmış 136 g monobazik potasyum fosfat çözeltisi) (71:25:4) kullanılmıştır. Uygun kromatogramda 5 enjeksiyonda standart çözelti için bağıl standart sapma % 2'den daha fazla olmayacak şekilde ve ayırma faktörü hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için % 2'den daha az olmayacak şekilde doğrudan pik cevabı kaydedilir.

d) Standart çözeltiliden ve deney çözeltilisinden ayrı ayrı (yaklaşık 10 µl) enjekte edilir ve kromatogramlar kaydedilir, en büyük pik için cevaplar ölçülür. Bağıl tutulma zamanları yaklaşık olarak

hidroklorotiazid için 0,7 dakika ve amilorid hidroklorür için 1 dakika olarak bulunur. $50C(r_u/r_s)$ formülü kullanılarak tabletlerdeki amilorid hidroklorürün mg olarak miktarı tayin edilir. Burada C, mg/ml olarak konsantrasyondur. r_u ve r_s sırasıyla numune çözeltisi ve standart çözeltiden elde edilen, amilorid hidroklorür için pik cevaplarıdır. Benzer işlem ve benzer formül hidroklorotiazidin miktar tayininde de kullanılır.



2.2.3. Hidroklorotiazid + Kaptopril Karışımının Analizi

2.2.3.1. Bivariate Calibration yöntemi (BC) (İki bileşenli kalibrasyon yöntemi)

Hidroklorotiazid-kaptopril karışımında bu iki bileşik için ayrı ayrı hazırlanan standart serilerinin konsantrasyonlarına karşı seçilen maksimum, minimum ve omuzlara karşılık gelen 15 dalga boyundaki absorbanslarının ölçümü kullanılarak 15 lineer regresyon denklemi elde edildi (Şekil 2.5). Seçilen 15 dalga boyundaki elde edilen lineer regresyon denkleminde, Kaiser tekniğine göre bulunan 220 ve 272 nm'deki en duyarlı 2 dalga boyuna karşılık gelen kalibrasyon denklemi ile BC yönteminin teorik açıklamasının yapıldığı Bölüm 1.3.2.2 de 6 no'lu denklem kullanılarak iki etken maddenin miktar tayini yapıldı.

2.2.3.1.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

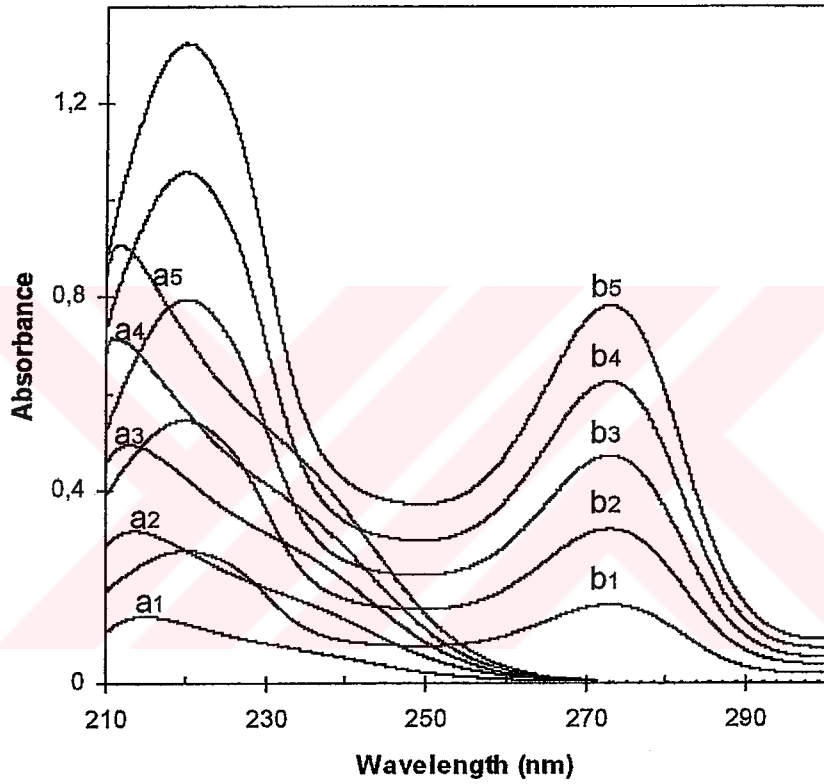
- a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.
- b) Kaptoprilin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.3.1.2. Bivariate Calibration (BC) (İki bileşenli kalibrasyon)

Bivariate kalibrasyon için 3–15 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 4–20 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kaptoprili içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerden yararlanılarak hazırlandı. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin standart seri çözeltilerin 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268,

272, 276 nm'ye karşılık gelen dalga boylarındaki absorbanları okunarak regresyon analizi yapılarak sonuçları Çizelge 2.49 da verildi.

Buradaki uygulamada optimum iki dalga boyunu içeren dalga boyu setinin seçimi için duyarlılık matrikslerinden 105 farklı çift hesaplandı ve hidroklorotiazid-kaptopril karışımları için dalga boyu setinin seçimi Çizelge 2.50 de verildi. Duyarlılık matrikslerinin en yüksek determinant değerini veren optimum iki dalga boyu bu kalibrasyon modeli için 220 ile 272 nm'lerine karşılık gelen noktalar bulundu. Bu seçilen iki dalga boyunda hidroklorotiazid ve kaptoprilin lineer regresyon denklemleri Çizelge 2.49 da görülmektedir. Bu iki dalga boyunda herbir bileşiğin kalibrasyon denklemleri kullanılarak Bölüm 1.3.2.2 de kompakt formda verilen matriks denklemleri yardımıyla hidroklorotiazidin 3–15 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında, kaptoprilin 4–20 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında bivariate kalibrasyon kuruldu. Bu yöntemin uygulanmasında yapılan matematiksel işlemlerde Microsoft Excel 2000, Maple V ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.



Şekil 2.5. 0.1 M NaOH ve metanol (1:1) içerisinde kaptoprilin a1) 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a2) 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a3) 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a4) 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a5) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları ve hidroklorotiazidin b1) 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b2) 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b3) 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b4) 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, b5) 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları.

Çizelge 2.49. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin seçilen 15 dalga boyundaki doğru denklemleri ve lineer regresyon katsayıları.

λ	Hidroklorotiazid		Kaptopril	
	A= a C + b	r	A= a C + b	r
220	A= 0,0873 C + 0,0119	0,9999	A= 0,0375 C - 0,0268	0,9999
224	A= 0,0820 C + 0,0153	1,0000	A= 0,0329 C - 0,0253	0,9999
228	A= 0,0683 C + 0,0145	1,0000	A= 0,0294 C - 0,0274	0,9999
232	A= 0,0476 C + 0,0091	0,9999	A= 0,0291 C - 0,0678	0,9959
236	A= 0,0331 C + 0,0101	0,9999	A= 0,0235 C - 0,0285	0,9998
240	A= 0,0273 C + 0,0079	0,9999	A= 0,0194 C - 0,0245	0,9998
244	A= 0,0252 C + 0,0056	0,9999	A= 0,0145 C - 0,0188	0,9999
248	A= 0,0241 C + 0,0075	1,0000	A= 0,0098 C - 0,0119	0,9999
252	A= 0,0243 C + 0,0084	0,9998	A= 0,0059 C - 0,0060	0,9998
256	A= 0,0267 C + 0,0022	0,9998	A= 0,0034 C - 0,0020	0,9995
260	A= 0,0309 C + 0,0073	1,0000	A= 0,0017 C + 0,0006	0,9981
264	A= 0,0383 C + 0,0061	0,9999	A= 0,0008 C + 0,0019	0,9950
268	A= 0,0461 C + 0,0108	1,0000	A= 0,0004 C + 0,0013	0,9900
272	A= 0,0513 C + 0,0070	1,0000	-	-
276	A= 0,0496 C + 0,0036	0,9999	-	-

2.2.3.1.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Yöntemin validasyonu için metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) karışımından oluşan çözücü sisteminde, hidroklorotiazid için 3–15 µg/mL ve kaptoprilin için 4–20 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltilerinin bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan BC yönteminin kesinlik ve doğruluk testi yapıldı. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,1 ve kaptopril için % 100,4 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 2,01 ve kaptopril için % 2,61 olarak hesaplandı. BC kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.51 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri bivariante kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 103,4 ve % 2,64 ve kaptopril için % 102,4 ve % 2,75 olarak bulundu.

Çizelge 2.51. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına bivariante kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan $\mu\text{g/mL}$		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	6	4	99,6	102,5
2	6	8	97,3	104,3
3	6	12	104,4	97,0
4	6	16	101,0	98,7
5	6	20	101,7	98,6
6	3	12	99,5	100,9
7	6	12	98,4	102,7
8	9	12	98,6	103,0
9	12	12	99,5	98,0
10	15	12	101,1	98,0
	Ortalama		100,1	100,4
	BSS		2,01	2,61

2.2.3.1.4. Bivariate Calibration Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjode metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/40 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine Bölüm 2.2.3.1 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.52 de verildi.

Çizelge 2.52. CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanan bivariante kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 50 mg kaptopril/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	25,4	52,1
2	26,7	49,1
3	25,7	51,3
4	25,1	50,8
5	25,3	50,7
6	24,7	50,1
7	24,0	50,3
8	24,4	51,5
9	26,3	52,0
10	25,8	51,9
Ortalama	25,3	51,0
SS	0,83	0,97
BSS	3,29	1,89
S. Hata	0,26	0,31
GA (P= 0,05)	0,53	0,62

2.2.3.2. Multilinear Regression Calibration Yöntemi (MLRC) (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu yöntemi)

Hidroklorotiazid-kaptopril karışımını içeren tabletlerde bu etken maddelerin 210–300 nm dalga boyu aralığındaki spektrumlarından herbirinin kritik dalga boylarına karşılık gelen 15 dalga boyunda elde edilen lineer regresyon fonksiyonlarına dayalı olarak kurulan MLRC kalibrasyon ile Bölüm 1.3.2.3 de (13) nolu denklem kullanılarak hidroklorotiazid ve kaptoprilin karışımındaki miktar tayinleri yapıldı (Şekil 2.5).

2.2.3.2.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

- a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.
- b) Kaptoprilin metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.3.2.2. Multilinear Regression Calibration (MLRC) (Lineer regresyon fonksiyonların kalibrasyonu)

Bu yöntemde kalibrasyon için 3–15 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 4–20 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kaptoprili içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerden yararlanılarak hazırlandı ve spektrumları çizdirildi (Şekil 2.5). Hidroklorotiazid ve kaptoprilin standart seri çözeltilerinin seçilen 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 252, 256, 260, 264, 268, 272 ve 276 nm'ye karşılık gelen dalga boylarındaki absorbansları ölçülerek herbir bileşik için lineer regresyon denklemleri kullanılarak (Çizelge 2.49) multilinear regression

kalibrasyonunu oluřturmak için izelge 2.53 deki denklem seti elde edildi (Bölüm 1.3.2.8).

Bu kalibrasyon için Bölüm 1.3.2.3 de verilen MLRC algoritmasına göre hidroklorotiazid için 3–15 µg/mL ve kaptopril için 4–20 µg/mL konsantrasyon aralığında multilinear regression kalibrasyonu kuruldu. Bu yöntemin uygulanmasında yapılan matematiksel işlemlerde Microsoft Excel 2000, Maple V ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

Çizelge 2.53. Karışımdaki hidroklorotiazid (HCT) ve kaptopril (CTP) için seçilen 10 dalga boyunda elde edilen denklem seti.

λ	Denklem Seti
220	$A_{k1} = 0,0873 C_{HCT} + 0,0375 C_{CTP} - 0,0148$
224	$A_{k2} = 0,0820 C_{HCT} + 0,0329 C_{CTP} - 0,0100$
228	$A_{k3} = 0,0683 C_{HCT} + 0,0294 C_{CTP} - 0,0129$
232	$A_{k4} = 0,0476 C_{HCT} + 0,0291 C_{CTP} - 0,0588$
236	$A_{k5} = 0,0331 C_{HCT} + 0,0235 C_{CTP} - 0,0184$
240	$A_{k6} = 0,0273 C_{HCT} + 0,0194 C_{CTP} - 0,0165$
244	$A_{k7} = 0,0252 C_{HCT} + 0,0145 C_{CTP} - 0,0132$
248	$A_{k8} = 0,0241 C_{HCT} + 0,0098 C_{CTP} - 0,0044$
252	$A_{k9} = 0,0243 C_{HCT} + 0,0059 C_{CTP} + 0,0024$
256	$A_{k10} = 0,0267 C_{HCT} + 0,0034 C_{CTP} + 0,0002$
260	$A_{k11} = 0,0309 C_{HCT} + 0,0017 C_{CTP} + 0,0078$
264	$A_{k12} = 0,0383 C_{HCT} + 0,0008 C_{CTP} + 0,0080$
268	$A_{k13} = 0,0461 C_{HCT} + 0,0004 C_{CTP} + 0,0120$
272	$A_{k14} = 0,0513 C_{HCT} + 0,0000 C_{CTP} + 0,0070$
276	$A_{k15} = 0,0496 C_{HCT} + 0,0000 C_{CTP} + 0,0036$

2.2.3.2.3. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazid ve kaptoprilin metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücü sisteminde, hidroklorotiazid için 3–15 µg/mL ve kaptopril için 4–20 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan multilinear regression kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,5 ve kaptopril için % 100,3 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,70 ve kaptopril için % 2,91 olarak hesaplandı. MLRC yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.54 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama ve bağlı standart sapma değerleri multilinear regression kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 102,8 ve % 2,56 ve kaptopril için % 102,1 ve % 2,11 olarak bulundu.

Çizelge 2.54. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına multilineer regresyon kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan µg/mL		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	6	4	100,3	105,0
2	6	8	99,5	104,9
3	6	12	100,0	102,7
4	6	16	100,3	99,3
5	6	20	101,2	99,5
6	3	12	101,0	96,4
7	6	12	101,8	98,6
8	9	12	100,3	100,1
9	12	12	99,9	97,8
10	15	12	101,1	98,9
	Ortalama		100,5	100,3
	BSS		0,70	2,91

2.2.3.2.4. Multilineer Regresyon Kalibrasyon Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjode metanol ve 0,1 M (1:1) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine Bölüm 2.2.3.2 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.55 de sunulmuştur.



Çizelge 2.55. CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanan multilinear regression kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 50 mg kaptopril/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	25,0	52,5
2	25,1	51,5
3	25,8	50,7
4	25,6	51,0
5	26,0	51,9
6	25,4	50,6
7	24,5	51,0
8	24,4	50,6
9	24,6	50,0
10	26,0	50,4
Ortalama	25,2	51,0
SS	0,61	0,75
BSS	2,42	1,47
S. Hata	0,19	0,24
GA (P= 0,05)	0,39	0,48

2.2.3.3. Classical Least-Squares Kalibrasyon Yöntemi (CLS) (Klasik en küçük kareler yöntemi)

CLS yönteminde hazırlanan kalibrasyon seti için 205–395 spektral aralıkta 220 nm'den 280 nm'ye kadar 13 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi ve katsayıların matriksi (K) kalibrasyon seti ve absorpsiyonlar arasındaki lineer denklem sistemi kullanılarak hesaplandı (Şekil 2.6). Hesaplanan katsayıların matriksi (K) lineer denklem sisteminde yerine kondu. Kurulan CLS kalibrasyonu karışımlardaki hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktar tayinlerinin hesaplanmasında kullanıldı. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.3.3.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

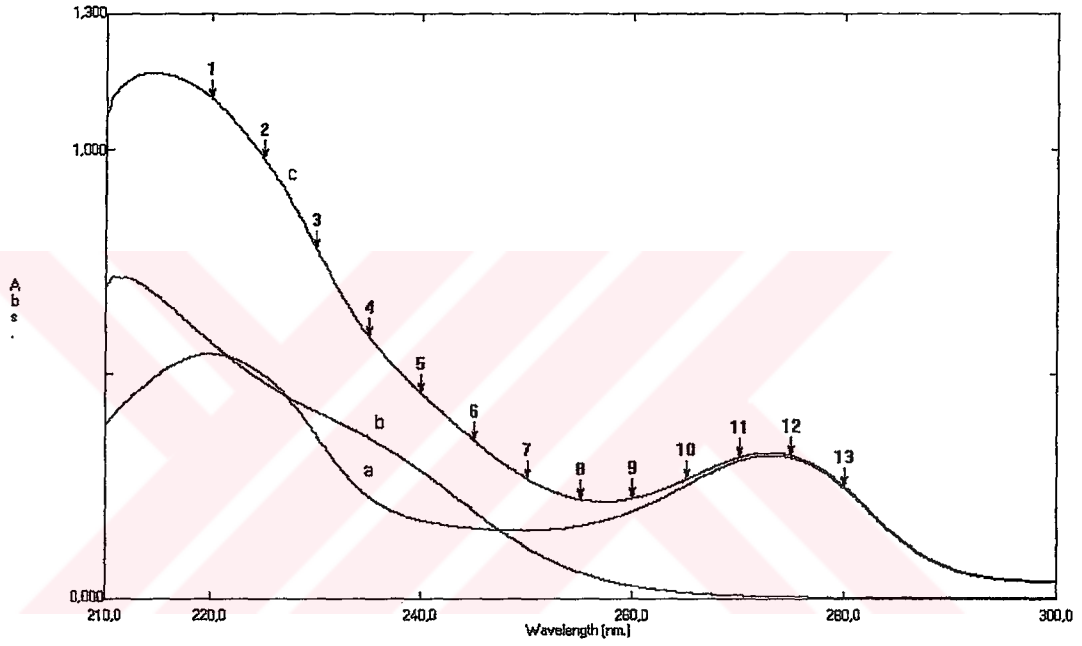
- a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.
- b) Kaptoprilin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.3.3.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 0–15 µg/mL çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 0–20 µg/mL çalışma aralığında kaptopril içeren 16 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti rastgele hazırlandı (Çizelge 2.56). Bu kalibrasyon seti rastgele farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve kaptoprilin konsantrasyonları dikkate alınarak saptanan çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır.

2.2.3.3.3. Classical Least Square Kalibrasyon (Klasik en küçük kareler kalibrasyonu)

Classical least square kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 215–300 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'ye karşılık gelen $\Delta\lambda=5$ nm aralıklarla 13 noktada absorbans değerleri okundu. Bölüm 1.3.2.4 de açıklanan algoritmaya göre kalibrasyon seti ve ölçülen absorbans değerleri ile lineer bir denklem sistemi oluşturuldu. Kurulan bu lineer denklem sisteminde katsayıların matriksi (K) hesaplandı ve katsayılar matriksi classical least square kalibrasyonda yerine konuldu. Hazırlanan yapay karışımlar ve farmasötik preparat numunelerindeki hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktarları yukarıda belirtilen 13 dalga boyundaki absorbansları okunarak oluşturulan kalibrasyon denkleminde yerine konarak hesaplandı (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Metanol ve 0,1 M NaOH (1:1) içerisinde a) 6 µg/mL hidroklorotiazid, b) 16 µg/mL kaptopril ve c) hidroklorotiazid-kaptopril karışımı.

(↓, ↓, ..., ↓ işaretleri 220 nm'den 280 nm'ye kadar 13 noktadaki çalışma dalga boyuna karşılık gelmektedir.

Çizelge 2.56. Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımlarını içeren kalibrasyon seti.

No.	Hidroklorotiazid $\mu\text{g/mL}$	Kaptopril $\mu\text{g/mL}$
1	3	0
2	15	0
3	0	4
4	0	20
5	6	4
6	6	8
7	6	12
8	6	16
9	6	20
10	0	8
11	3	12
12	6	12
13	9	12
14	12	12
15	15	12
16	9	0

2.2.3.3.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Hidroklorotiazidin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 3–15 µg/mL aralığında ve kaptoprilin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 4–20 µg/mL aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan CLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,5 ve kaptopril için % 99,1 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 1,19 ve kaptopril için % 2,66 olarak hesaplandı. CLS yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.57 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağlı standart sapma değerleri CLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 100,5 ve % 1,99 ve kaptopril için % 101,7 ve % 1,86 olarak bulundu.

Çizelge 2.57. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına classical least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	6	4	102,0	95,5
2	6	8	100,3	99,6
3	6	12	100,0	102,3
4	6	16	99,5	101,3
5	6	20	99,5	102,9
6	3	12	102,7	95,3
7	6	12	101,8	97,8
8	9	12	99,9	99,8
9	12	12	99,3	97,3
10	15	12	100,2	98,8
	Ortalama		100,5	99,1
	BSS		1,19	2,66

2.2.3.3.5. Çapraz Validasyon

2.2.3.3.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan CLS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık CLS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.58 da verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.58. Kalibrasyon basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEC	0,0676	0,0542
r	0,9999	1,0000
Kesim	-0,0374	0,0169
Eğim	1,0041	1,0037

2.2.3.3.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden CLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP),

validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.59 da verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.59. Tayin basamağında CLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEP	0,0687	0,3338
r	0,9999	0,9981
Kesim	-0,0723	0,5955
Eğim	1,0068	0,9542

2.2.3.3.6. Classical Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/40 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.3.3 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.60 da sunulmuştur.

Çizelge 2.60. CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanan CLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 50 mg kaptopril/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	25,0	52,1
2	27,1	50,8
3	25,9	51,3
4	25,6	50,8
5	26,0	50,7
6	25,3	50,1
7	24,6	50,3
8	24,5	51,5
9	24,6	52,0
10	26,0	51,9
Ortalama	25,5	51,1
SS	0,83	0,71
BSS	3,25	1,39
S. Hata	0,26	0,22
GA (P=0,05)	0,53	0,45

2.2.3.4. Inverse Least Squares Kalibrasyon Yöntemi (ILS) (Ters en küçük kareler yöntemi)

ILS yöntemi için hazırlana kalibrasyon seti için 205–395 nm spektral aralıkta 220 nm'den 280 nm'ye kadar 13 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi ve okunan absorbanlar arasındaki lineer denklem sistemi kullanılarak katsayıların matriksi (P) hesaplandı (Şekil 2.6) . Hesaplanan katsayıların matriksi (P) lineer denklem sisteminde yerine kondu. Kurulan ILS kalibrasyonu karışımlardaki hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktar tayinlerinin hesaplanmasında kullanıldı. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.3.4.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Kaptoprilin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.3.4.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 0–15 µg/mL çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 0–20 µg/mL çalışma aralığında kaptopril içeren 16 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.56). Bu kalibrasyon seti rastgele farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve kaptoprilin konsantrasyonları dikkate alınarak saptanan çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır.

2.2.3.4.3. Inverse Least Square Kalibrasyon (Ters en küçük kareler kalibrasyonu)

ILS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 215 – 300 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'ye karşılık gelen 13 noktada absorban değerleri okundu. Bölüm 1.3.2.5 de açıklanan algoritmaya göre kalibrasyon seti ve ölçülen absorban değerleri ile lineer bir denklem sistemi oluşturuldu. Kurulan bu lineer denklem sisteminde katsayıların matriksi (P) hesaplandı ve katsayılar matriksi classical least square kalibrasyonda yerine konuldu. Hazırlanan yapay karışımlar ve farmasötik preparat numunelerindeki hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktarları yukarıda belirtilen 13 dalga boyundaki absorbanları okunarak oluşturulan kalibrasyon denkleminde yerine konularak hesaplandı.

2.2.3.4.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

ILS kalibrasyonunun validasyonu için metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde hidroklorotiazid için 3–15 µg/mL çalışma aralığını ve kaptoprilin için 4–20 µg/mL çalışma aralığını kapsayacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan ILS kalibrasyonun kesinliği ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,8 ve kaptopril için % 100,6 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,45 ve kaptopril için % 1,69 olarak hesaplandı. ILS yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.61 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan

kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri ILS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 101,9 ve % 2,01 ve kaptopril için % 100,9 ve % 1,63 olarak bulundu.



Çizelge 2.61. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına inverse least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	6	4	101,3	104,0
2	6	8	100,8	101,9
3	6	12	101,0	100,7
4	6	16	100,7	100,4
5	6	20	101,0	100,4
6	3	12	99,7	98,8
7	6	12	100,8	100,6
8	9	12	100,9	101,3
9	12	12	100,4	99,9
10	15	12	101,0	97,7
	Ortalama		100,8	100,6
	BSS		0,45	1,69

2.2.3.4.5. Çapraz Validasyon

2.2.3.4.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan ILS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık ILS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.62 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.62. Kalibrasyon basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEC	0,0868	0,0890
r	0,9999	0,9999
Kesim	-0,0209	-0,0398
Eğim	1,0015	1,0047

2.2.3.4.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden ILS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan

konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.63 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.63. Tayin basamağında ILS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEP	0,0758	0,1465
r	1,0000	0,9994
Kesim	0,0063	-0,0952
Eğim	0,9911	1,0052

2.2.3.4.6. Inverse Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjode metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücü karışımında çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/40 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.3.4 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.64 de sunulmuştur.

Çizelge 2.64. CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanan ILS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 50 mg kaptopril/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	25,3	52,8
2	24,2	49,9
3	25,1	52,0
4	25,0	48,1
5	26,1	49,9
6	25,4	50,8
7	25,5	49,2
8	25,9	51,3
9	25,4	48,5
10	25,2	49,9
Ortalama	25,3	50,2
SS	0,52	1,49
BSS	2,05	2,96
S. Hata	0,16	0,47
GA (P=0,05)	0,33	0,95

2.2.3.5. Principal Component Regression Yöntemi (PCR) (Temel bileşen regresyonu yöntemi)

PCR yöntemi için 205–300 nm spektral aralıkta 220 nm'den 280 nm'ye kadar 13 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi (Şekil 2.6). Kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarında ölçülen absorbanans verileri ve konsantrasyonlar için oluşturulan matriks sistemlemelerine Bölüm 1.3.2.6 da açıklanan PCR algoritması uygulanarak PCR kalibrasyonu elde edildi. Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımların aynı dalga boylarında ölçülen absorbanans değerleri PCR kalibrasyonunda yerine konarak bu iki etken maddenin miktar tayini gerçekleştirildi. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.3.5.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Kaptoprilin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.3.5.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 0–15 µg/mL çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 0–20 µg/mL çalışma aralığında kaptopril içeren Çizelge 2.56 da gösterilen 16 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı. Bu kalibrasyon seti rastgele farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve kaptoprilin konsantrasyonları dikkate alınarak saptanan çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır.

2.2.3.5.3. Principal Component Regression Kalibrasyonu (Temel bileşen regresyonu kalibrasyonu)

PCR kalibrasyonu için hazırlanan kalibrasyon setinin 220–280 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'ye karşılık gelen (Şekil 2.6) $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 13 noktada absorban değerleri okundu. PCR kalibrasyonu için Bölüm 1.3.2.6 da açıklanan algoritmaya göre absorban ve konsantrasyon değerlerinin varyans–kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbanların varyans–kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra konsantrasyon matrisleri ile arasındaki lineer ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kuruldu. Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımların ve farmasötik preparatın yukarıda belirtilen 13 dalga boyundaki absorban değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayini hesaplandı.

2.2.3.5.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Yöntemin validasyonu için 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde hidroklorotiazidin 3–15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığında ve kaptoprilin 4–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,3 ve kaptopril için % 99,8 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,73 ve kaptopril için % 2,35 olarak hesaplandı. PCR yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.65 de gösterildi.

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PCR kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 100,3 ve % 1,45 ve kaptopril için % 102,5 ve % 2,17 olarak bulundu.



Çizelge 2.65. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına principal component regression kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Karışım No	Konulan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	6	4	101,3	96,5
2	6	8	99,5	103,4
3	6	12	100,0	101,8
4	6	16	99,8	100,2
5	6	20	100,8	99,0
6	3	12	101,0	99,1
7	6	12	101,3	100,8
8	9	12	99,7	102,3
9	12	12	99,5	96,4
10	15	12	100,3	98,3
	Ortalama		100,3	99,8
	BSS		0,73	2,35

2.2.3.5.5. Çapraz Validasyon

2.2.3.5.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve kaptoprilin içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan PCR kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık PCR kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.66 da verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.66. Kalibrasyon basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEC	0,3464	0,1129
r	0,9987	0,9999
Kesim	0,1788	0,0650
Eğim	0,9849	0,9986

2.2.3.5.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP),

validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.67 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.67. Tayin basamağında PCR kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEP	0,0519	0,2357
r	0,9999	0,9994
Kesim	-0,0367	-0,0518
Eğim	1,0028	1,0060

2.2.3.5.6. Principal Component Regression Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjode metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/40 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.3.5 de açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.68 de sunulmuştur.

Çizelge 2.68. CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan PCR kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 50 mg kaptopril/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	25,7	49,4
2	25,8	49,4
3	26,7	49,0
4	26,4	50,0
5	25,3	51,1
6	26,2	49,5
7	25,1	49,8
8	24,0	50,0
9	25,3	49,8
10	25,0	50,2
Ortalama	25,5	49,8
SS	0,78	0,56
BSS	3,07	1,13
S. Hata	0,25	0,18
GA (P=0,05)	0,50	0,36

2.2.3.6. Partial Least Squares Yöntemi (PLS) (Kısmi en küçük kareler yöntemi)

PLS yönteminin uygulanmasında 205–300 nm spektral aralıkta 220 nm'den 280 nm'ye kadar 13 nokta çalışma dalga boyu olarak seçildi. Kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarında ölçülen absorbans verileri ve konsantrasyonlar için oluşturulan matriks sistemlemelerine Bölüm 1.3.2.7 de açıklanan PLS algoritması uygulanarak PLS kalibrasyonu elde edildi. Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımların aynı dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri PLS kalibrasyonunda yerine konarak bu iki etken maddenin miktar tayini gerçekleştirildi. Bu yöntemin veri işlemleri için Maple V, Microsoft Excel 2000 ve SPSS 10.0 programları kullanıldı.

2.2.3.6.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

a) Hidroklorotiazidin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

b) Kaptoprilin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 100 mg/100 mL olarak stok çözeltisi hazırlandı.

2.2.3.6.2. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Bu yöntem için 0–15 µg/mL çalışma aralığında hidroklorotiazid ve 0–20 µg/mL kaptopril içeren 16 farklı konsantrasyonda karışım dizaynına göre stok çözeltilerden kalibrasyon seti hazırlandı (Çizelge 2.56). Bu kalibrasyon seti rastgele farmasötik preparattaki hidroklorotiazid ve kaptoprilin konsantrasyonları dikkate alınarak saptanan çalışma aralığına göre kalibrasyon setinin karışım dizaynı yapılmıştır.

2.2.3.6.3. Partial Least Square Kalibrasyon (Kısmi en küçük kareler kalibrasyonu)

PLS için hazırlanan kalibrasyon setinin 220–280 nm dalga boyu aralığında 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'ye karşılık gelen $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklar ile 13 noktada absorbans değerleri okundu PLS kalibrasyonu için Bölüm 1.3.2.7 de açıklanan algoritmaya göre absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans–kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbans ve konsantrasyonların varyans–kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra PLS kalibrasyonu kuruldu. Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımların ve farmasötik preparatın yukarıda belirtilen 13 dalga boyundaki absorbans değerleri okunarak PLS kalibrasyonu kullanılarak bu etken maddelerin miktar tayini hesaplandı.

2.2.3.6.4. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

PLS kalibrasyonunun validasyon işleminde hidroklorotiazidin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 3–15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığında ve kaptoprilin metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde 4–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için % 100,5 ve kaptopril için % 98,9 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri hidroklorotiazid için % 0,98 ve kaptopril için % 2,65 olarak hesaplandı. PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.69 da gösterildi.

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren tablet preparatlarında, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için farmasötik tablet preparatına üzerinde yazılı olan miktar kadar standart ilavesi yapılarak hazırlanan çözeltiler kullanılarak geri kazanım çalışması yapıldı. Bu denemelerdeki 5 tekrar için % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında hidroklorotiazid için % 99,1 ve % 2,09 ve kaptopril için % 101,9 ve % 1,38 olarak bulundu.



Çizelge 2.69. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin yapay karışımlarına partial least squares kalibrasyonu yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Deney No	Konulan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	6	4	101,5	95,3
2	6	8	100,0	101,1
3	6	12	100,0	102,4
4	6	16	99,7	100,8
5	6	20	100,2	102,0
6	3	12	102,3	96,3
7	6	12	101,8	98,0
8	9	12	100,0	99,3
9	12	12	99,5	96,3
10	15	12	100,5	97,1
		Ortalama	100,5	98,9
		BSS	0,98	2,65

2.2.3.6.5. Çapraz Validasyon

2.2.3.6.5.1. Kalibrasyonun Standart Hatası (Standard Error of Calibration (SEC))

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için kurulan PLS kalibrasyonunun doğruluğunu veya geçerliliği için kalibrasyonun standart hatası (SEC), kalibrasyon setinin konsantrasyonuna karşılık PLS kalibrasyonundan hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için bulunan sonuçlar Çizelge 2.70 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.1).

Çizelge 2.70. Kalibrasyon basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEC	0,1612	0,2378
r	0,9992	0,9980
Kesim	0,0028	0,0935
Eğim	1,0038	0,9965

2.2.3.6.5.2. Tayinin Standart Hatası (Standard Error of Prediction (SEP))

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan

konsantrasyonların lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar Çizelge 2.71 de verildi (Bölüm 1.3.2.9.2).

Çizelge 2.71. Tayin basamağında PLS kalibrasyonu için elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Parametre	Hidroklorotiazid	Kaptopril
SEP	0,0616	0,3144
r	0,9999	0,9980
Kesim	-0,0484	0,4830
Eğim	1,0028	0,9666

2.2.3.6.6. Partial Least Squares Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulaması

Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik tablete yöntemi uygulamak için 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjode metanol ve 0.1 M NaOH (1:1) karışımını içeren bir çözücüde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözelti aynı çözücüyle çalışma aralığının içine düşecek şekilde 1/40 oranında 100 mL'ye seyreltildi. Bu analiz çözeltilerine yöntem Bölüm 2.2.3.6 da açıklandığı biçimde uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2.72 de sunulmuştur.

Çizelge 2.72. CAPTOHEXAL® COMP tablete uygulanan PLS kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar (preparat etiketinde yazılı olan miktar (25 mg hidroklorotiazid ve 50 mg kaptopril/tablet).

Deney No	mg/tablet	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
1	25,0	51,9
2	25,0	52,1
3	26,0	52,4
4	25,6	51,9
5	26,0	50,2
6	25,3	51,4
7	24,5	50,3
8	24,4	49,8
9	24,6	52,1
10	26,0	51,9
Ortalama	25,2	51,4
SS	0,64	0,95
BSS	2,54	1,84
S. Hata	0,20	0,30
GA (P=0,05)	0,41	0,60

2.2.3.7. Varyans Analizi (ANOVA testi)

Geliştirilen 6 kemometrik metodun CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanması ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak üzere tabletlerdeki herbir için 10 numunenin 6 setine ANOVA testi uygulanarak F değerleri hesaplandı. F tablosunda $n= 5$ ve $n= 54$ için $P= 0,05$ olan değeri 2,37 verilmesine karşın biz hesaplarımızda hidroklorotiazid için 0,611 ve kaptopril için 0,860 bulduk. Bu sonuçlara göre tablo değeri ve hesaplanan F değerleri arasındaki farkın anlamsız olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2.72a).

Çizelge 2.72a. Kemometrik yöntemlerin CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanmasıyla elde edilen sonuçları için ANOVA testi

Etken madde	Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F
Hidroklorotiazid	Gruplar arası	1,233	5	0,247	0,611
	Gruplar içi	21,809	54	0,404	
	Genel varyasyon	23,042	59		
Kaptopril	Gruplar arası	54,037	5	10,807	0,860
	Gruplar içi	678,853	54	12,571	
	Genel varyasyon	732,891	59		

3. TARTIŞMA

Tezin konusu olan “Hidroklorotiazid İçeren Farmasötik Preparatlardaki Etken Maddelerin Kemometrik Yöntemlerle Miktar Tayinleri” başlıklı çalışmamızda hidroklorotiazid-spirolakton, hidroklorotiazid-amilorid hidroklorür, hidroklorotiazid-kaptopril içeren 2 bileşenli 3 adet karışımın kemometrik yöntemler ile kantitatif analizi amaçlanmıştır.

Çalışmalarımızda 2 bileşenli 3 karışımın herbirindeki etken maddelerin aynı anda herhangi bir ayırma işlemi, spektrumların türevi ve bölümü gibi işlemler yapmaksızın miktar tayinleri için 6 kemometrik yöntem geliştirildi ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

3.1. Hidroklorotiazid + Spirolakton Karışımının Kantitatif Analizi

3.1.1. Hidroklorotiazid ve spiroolakton karışımı için daha önce yapılan bir çalışmada; Bachman ve Stewart (1990) YBSK yöntemi ile elektrokimyasal dedektör kullanarak hidroklorotiazid ve spiroolaktonun miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Martin ve arkadaşları (1997) aynı karışımdaki hidroklorotiazid ve spiroolaktonun spektrum oranları türev spektroskopisi ve multiwavelength regression yöntemlerini doğrudan ve flow-injection sistemi ile kullanarak bu etken maddelerin miktar tayinlerinin yapılabileceğini bulmuşlardır.

3.1.1.1. Hidroklorotiazid ve Spironolaktonu İçeren Karışımın Kantitatif Analizi İçin Yaptığımız Çalışmalarda:

3.1.1.2. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının BC Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.1.1 de açıklandığı gibi hidroklorotiazid ve spironolakton karışımının 235-280 nm aralığındaki spektrumundan seçilen 10 kritik dalga boyundaki en duyarlı 240 ve 270 nm'deki lineer regresyon denklemleri kullanılarak BC oluşturuldu. 240 ve 270 nm'deki dalga boyunda karışımın ölçülen absorpsiyonları BC' unda yerine konarak hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarları hesaplandı. Bu yöntemde doğrusal çalışma aralığı her iki bileşik için 6-20 µg/mL (Çizelge 3.1) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.2) hidroklorotiazid için % 1,28 bağıl standart sapma (Çizelge 3.4) ile %101,4 ve spironolakton için % 2,07 bağıl standart sapma ile % 102,6 olarak hesaplanmıştır. Geliştirdiğimiz bu yöntemi daha önce literatürde verilen yöntemler ile karşılaştırdığımızda YBSK yönteminin (Bachman ve Stewart,1990) bu maddelerin analizi için bir ayırma işlemi gerektirmesi ve cihazın pahalı olması bu yöntemin dezavantajıdır. Aynı karışıma spektrum oranları türev yönteminin uygulanmasında (Martin ve ark.,1997) bu maddelerin tayini için alınan absorpsiyon spektrumları üzerinde spektrumların bir bölme işlemi, arkasından türev işlemi gibi zaman alıcı ve bazı durumlarda seçilen bölücü konsantrasyonuna göre bölme işleminin sonucunda sonsuza giden pikler veren dezavantajları vardır. Buna karşılık çalışmalarımızda kullandığımız BC yöntemi herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi alınan spektrumlar üzerinde spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemleri de gerektirmemektedir. Ayrıca diğer CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemlerine göre doğrusal çalışma aralığı kullanması bir avantajıdır. Bu nedenle analizler için geliştirilen bu yöntem basit bir

matematiksel algoritmaya sahip olması yanında son derece kolay, ucuz, tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar vermiştir.

BC yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.3) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

Bivariate kalibrasyon yönteminin ALDACTAZIDE® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.4 ve Çizelge 3.5 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve spironolakton için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.1.1.3. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının MLRC Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.1.2. de açıklandığı gibi hidroklorotiazid ve spironolakton karışımının 235-280 nm aralığındaki spektrumundan maksimum minimum ve omuzlara karşılık gelen seçilen 10 kritik dalga boyundaki lineer regresyon denklemleri kullanılarak multilinear regression kalibrasyon oluşturuldu. Bu seçilen 10 kritik dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarları hesaplandı. Bu yöntemde doğrusal çalışma aralığı her iki bileşik için 6-20 µg/mL (Çizelge 3.1) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.2) hidroklorotiazid için % 0,66 bağıl standart sapma ile % 100,2 ve spironolakton için % 2,07 bağıl standart sapma ile % 102,5 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.4). Bu yöntemin avantajları doğrudan UV görünür alan spektrumlarına uygulanması ve herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi spektrumların

bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemlerin kullanılmamasıdır. CLS, ILS, PCR ve PLS yöntemlerine göre doğrusal bir çalışma aralığı kullanması avantajdır. Ayrıca birden fazla dalga boyunda çalışma yapılması nedeniyle absorbans ölçümlerinden gelen hatalar minimize edilmektedir.

MLRC yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.3) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

Multilinear regression calibration yönteminin ALDACTAZIDE® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.7 ve Çizelge 3.5 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve spironolakton için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.1.1.4. Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımının CLS yöntemiyle kantitatif analizi

Bölüm 2.2.1.3. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve spironolakton karışımı için 205-300 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 15 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak CLS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 15 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbansları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarlar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı her iki bileşik için 2-20 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.1) ve yöntem için ortalama geri

kazanım değerleri (Çizelge 3.2) hidroklorotiazid için % 1,87 bağıl standart sapma (Çizelge 3.4) ile % 100,2 ve spironolakton için % 1,55 bağıl standart sapma ile % 100,9 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemin avantajları doğrudan UV görünür alan spektrumlarına uygulanması ve herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemlerin kullanılmamasıdır. CLS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında birbiriyle son derece uyumlu sonuçlar elde edildi. CLS yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.1).

CLS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.3) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

CLS yönteminin ALDACTAZIDE® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.12 ve Çizelge 3.5 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve spironolakton için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.1.1.5. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının ILS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.1.4. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve spironolakton karışımı için 205-300 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 15 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer

denklem sistemi kullanılarak ILS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 15 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarlar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı her iki bileşik için 2-20 µg/mL (Çizelge 3.1) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.2) hidroklorotiazid için % 1,87 bağıl standart sapma (Çizelge 3.4) ile % 100,2 ve spironolakton için % 1,70 bağıl standart sapma ile % 100,8 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Bachman ve Stewart,1990; Martin ve ark., 1997) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. ILS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi. ILS yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.1).

ILS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.3) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

ILS yönteminin ALDACTAZIDE® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.16 ve Çizelge 3.5 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve spironolakton için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.1.1.6. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının PCR Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.1.5. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve spironolakton karışımı için 205-300 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 15 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki PCR algoritması kullanılarak PCR kalibrasyonu kuruldu. Seçilen 15 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbansları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarlar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı her iki bileşik için 2-20 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.1) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.2) hidroklorotiazid için % 1,83 bağıl standart sapma (Çizelge 3.4) ile % 101,2 ve spironolakton için % 1,40 bağıl standart sapma ile % 102,3 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Bachman ve Stewart,1990; Martin ve ark., 1997) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. PCR kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi. PCR yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.1).

PCR yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.3) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

PCR yönteminin ALDACTAZIDE® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.20 ve Çizelge 3.5 de verilmiştir.

Hidroklorotiazid ve spironolakton için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.1.1.7. Hidroklorotiazid ve Spironolakton Karışımının PLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.1.6. da açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve spironolakton karışımı için 205-300 nm spektral dalga boyu aralığında 220 nm'den 290 nm'ye kadar $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 15 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak PLS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 15 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarlar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı her iki bileşik için 2-20 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.1) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.2) hidroklorotiazid için % 2,42 bağıl standart sapma (Çizelge 3.4) ile % 100,2 ve spironolakton için % 1,59 bağıl standart sapma ile % 100,0 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Bachman ve Stewart,1990; Martin ve ark., 1997) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. Ayrıca kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarındaki absorban değerlerinin matriksinin ve konsantrasyon matrikslerinin dekompozisyonu esnasında ölçüm aletlerinden ve ortamdan gelen gürültü piklerinin eliminasyonu söz konusudur. PLS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi. PLS yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.1).

PLS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.3) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

PLS yönteminin ALDACTAZIDE® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.24 ve Çizelge 3.5 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve spironolakton için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.2. Hidroklorotiazid + Amilorid Hidroklorür Karışımının Kantitatif Analizi

3.2.1. Martin ve arkadaşları (1999) hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktar tayinini diferansiyel puls polarografisi ile PLS kalibrasyonunu kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Poulou ve arkadaşları (1989) 2. türev spektrofotometri yöntemi ile hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın aynı anda bu etken maddelerin miktar tayinini başarmışlardır.

De Croo ve arkadaşları (1985) aynı karışım için YBSK yöntemini uygulayarak bu maddelerin miktar tayinlerinin yapılabileceğini ortaya koymuşlardır.

3.2.1.1. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür İçeren Karışımın Kantitatif Analizi İçin Yaptığımız Çalışmalarda:

3.2.1.2. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının BC Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.2.1. de açıklandığı gibi hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımının 265-330 nm aralığındaki spektrumundan seçilen 14 kritik dalga boyunda Kaiser tekniğine göre bulunan en duyarlı 270 ve 290 nm'deki lineer regresyon denklemleri kullanılarak bivariate kalibrasyon oluşturuldu. Aynı iki dalga boyunda karışımın ölçülen absorpsiyonları bivariate kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktarları hesaplandı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için doğrusal çalışma aralığı 4-28 µg/mL, amilorid hidroklorür için doğrusal çalışma aralığı 2-10 µg/mL (Çizelge 3.6) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.7) hidroklorotiazid için % 0,25 bağıl standart sapma (Çizelge 3.9) ile % 97,5 ve amilorid hidroklorür için % 2,04 bağıl standart sapma ile % 100,5 olarak hesaplanmıştır. Geliştirdiğimiz bu yöntemi daha önce literatürde verilen yöntemler ile karşılaştırdığımızda YBSK yönteminin (De Croo ve ark., 1985) bu maddelerin analizi için bir ayırma işlemi gerektirmesi ve cihazın pahalı olması bu yöntemin dezavantajıdır. Aynı karışıma spektrum oranları türev yönteminin uygulanmasında (Poulou ve ark., 1989) bu maddelerin tayini için alınan absorpsiyon spektrumları üzerinde spektrumların bir bölme işlemi, arkasından türev işlemi gibi zaman alıcı dezavantajları vardır. Buna karşılık geliştirdiğimiz bivariate kalibrasyon yöntemi herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi alınan spektrumlar üzerinde spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemleri de gerektirmemektedir. Bu nedenle geliştirilen bu yöntem son derece kolay, ucuz ve tekrar edilebilirdir.

BC yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.8) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

BC yönteminin MODURETIC® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.28 ve Çizelge 3.10 da verilmiştir. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.2.1.3. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının MLRC Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.2.2 de açıklandığı gibi hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımının 235-280 nm aralığındaki spektrumundan seçilen 14 kritik dalga boyundaki lineer regresyon denklemleri kullanılarak multilinear regression kalibrasyon oluşturuldu. Seçilen 14 kritik dalga boyunda karışımın ölçülen absorpsanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktarları hesaplandı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için doğrusal çalışma aralığı 4-28 µg/mL , amilorid hidroklorür için doğrusal çalışma aralığı 2-10 µg/mL (Çizelge 3.6) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.7) hidroklorotiazid için % 0,09 bağıl standart sapma (Çizelge 3.9) ile % 99,3 ve amilorid hidroklorür için % 0,14 bağıl standart sapma ile % 103,0 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemin avantajları doğrudan UV görünür alan spektrumlarına uygulanması ve herhangi bir ayırma

işlemi gerektirmediği gibi spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemlerin kullanılmamasıdır.

MLRC yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.8) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

Multilinear regression kalibrasyon yönteminin MODURETIC® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.31 ve Çizelge 3.10 da verilmiştir. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.2.1.4. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının CLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.2.3. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımı için 220-385 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 34 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorpsiyon değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak CLS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 34 dalga boyunda karışımın ölçülen absorpsiyonları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktarları tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 4-28 $\mu\text{g/mL}$, amilorid hidroklorür için 2-10 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.6) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.7) hidroklorotiazid için % 1,84 bağıl standart sapma (Çizelge 3.9) ile % 100,8 ve amilorid hidroklorür için % 0,81 bağıl standart sapma ile % 101,4 olarak hesaplanmıştır. Bu

yöntemin avantajları doğrudan UV görünür alan spektrumlarına uygulanması ve herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemlerin kullanılmamasıdır. CLS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

CLS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.8) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

CLS yönteminin MODURETIC® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.36 ve Çizelge 3.10 da verilmiştir. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.2.1.5. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının ILS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.2.4. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımı için 220-385 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 34 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak ILS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 34 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür miktarlar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 4-28 $\mu\text{g/mL}$, amilorid hidroklorür için 2-10 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.6) ve yöntem için ortalama

geri kazanım değerleri (Çizelge 3.7) hidroklorotiazid için % 1,95 bağıl standart sapma (Çizelge 3.9) ile % 100,6 ve amilorid hidroklorür için % 1,13 bağıl standart sapma ile % 101,2 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Martin ve ark., 1999; Poulou ve ark., 1989; De Croo ve ark., 1985) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. ILS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbirleriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

ILS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.8) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

ILS yönteminin MODURETIC® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.40 ve Çizelge 3.10 da verilmiştir. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.2.1.6. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının PCR Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.2.5. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımı için 220-385 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 34 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak PCR kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 34 dalga boyunda karışımın ölçülen

absorbansları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 4-28 µg/mL , amilorid hidroklorür için 2-10 µg/mL (Çizelge 3.6) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.6) hidroklorotiazid için % 0,83 bağıl standart sapma (Çizelge 3.9) ile % 101,0 ve amilorid hidroklorür için % 1,84 bağıl standart sapma ile % 100,4 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Martin ve ark., 1999; Poulou ve ark., 1989; De Croo ve ark., 1985) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. PCR kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbirleriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

PCR yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.8) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

PCR yönteminin MODURETIC® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.44 ve Çizelge 3.10 da verilmiştir. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.2.1.7. Hidroklorotiazid ve Amilorid Hidroklorür Karışımının PLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.2.6. da açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımı için 220-385 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 34 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak PLS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 34 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün miktar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 4-28 $\mu\text{g/mL}$, amilorid hidroklorür için 2-10 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.6) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.7) hidroklorotiazid için % 2,10 bağıl standart sapma (Çizelge 3.9) ile % 100,1 ve amilorid hidroklorür için % 2,25 bağıl standart sapma ile % 100,9 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Martin ve ark., 1999; Poulou ve ark., 1989; De Croo ve ark., 1985) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. Ayrıca kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarındaki absorban değerlerinin matrisinin ve konsantrasyonların dekompozisyonu esnasında ölçüm aletlerinden ve ortamdan gelen gürültü piklerinin eliminasyonu söz konusudur. PLS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

PCR yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.8) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

PLS yönteminin MODURETIC® tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.48 ve Çizelge 3.10 da verilmiştir. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.3. Hidroklorotiazid + Kaptopril Karışımının Kantitatif Analizi

3.3.1. Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımı için daha önce yapılan bir çalışmada; Kirchbaum ve Perlman (1984) bu etken maddelerin miktar tayinini YBSK yöntemi ile başarmışlardır.

Ouyang ve arkadaşları (1999) aynı karışım içinde bulunan hidroklorotiazid ve kaptoprili tayin etmek için YBSK yöntemiyle fluoresans dedektör kullanmışlardır.

Panderi ve Poulou (1992) tabletlerde kaptopril- hidroklorotiazid kombinasyonlarında bu etken maddelerin miktar tayinlerini özel bir hesap tekniği kullanarak 1. türev spektrofotometri yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir.

3.3.1.1. Hidroklorotiazid ve Kaptoprili İçeren Karışımın Kantitatif Analizi İçin Yaptığımız Çalışmalarda:

3.3.1.2. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının BC Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.3.1. de açıklandığı gibi hidroklorotiazid ve kaptopril karışımının 220-276 nm aralığındaki spektrumundan seçilen 15 kritik dalga boyunda Kaiser tekniğine göre bulunan en duyarlı 220 ve

272 nm'deki lineer regresyon denklemleri kullanılarak bivariante kalibrasyon oluşturuldu. Aynı iki dalga boyunda karışımın ölçülen absorbansları bivariante kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktarları hesaplandı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için doğrusal çalışma aralığı 3-15 µg/mL, kaptopril için doğrusal çalışma aralığı 4-20 µg/mL (Çizelge 3.11) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.12) hidroklorotiazid için % 2,01 bağıl standart sapma (Çizelge 3.14) ile % 100,1 ve kaptopril için % 2,61 bağıl standart sapma ile % 100,4 olarak hesaplanmıştır. Geliştirdiğimiz bu yöntemi daha önce literatürde verilen yöntemler ile karşılaştırdığımızda YBSK yönteminin (Ouyang ve ark., 1999; Kirschbaum ve Perlman, 1984) bu maddelerin analizi için bir ayırma işlemi gerektirmesi ve cihazın pahalı olması bu yöntemin dezavantajıdır. Aynı karışıma spektrum oranları türev yönteminin uygulanmasında (Panderi ve Poulou, 1992) bu maddelerin tayini için alınan absorpsiyon spektrumları üzerinde spektrumların bir bölme işlemi, arkasından türev işlemi gibi zaman alıcı dezavantajları vardır. Buna karşılık geliştirdiğimiz bivariante kalibrasyon yöntemi herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi alınan spektrumlar üzerinde spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemleri de gerektirmemektedir. Bu nedenle geliştirilen bu yöntem son derece kolay, ucuz ve tekrar edilebilirdir.

BC yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.13) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

BC yönteminin CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.52 ve Çizelge 3.15 de verilmiştir.

Hidroklorotiazid ve kaptopril için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.3.1.3. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının MLRC Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.3.2. de açıklandığı gibi hidroklorotiazid ve kaptopril karışımının 220-276 nm aralığındaki spektrumundan seçilen 15 kritik dalga boyundaki lineer regresyon denklemleri kullanılarak multilinear regression calibration oluşturuldu. Seçilen 15 kritik dalga boyunda karışımın ölçülen absorbansları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktarları hesaplandı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için doğrusal çalışma aralığı 3-15 µg/mL, kaptopril için doğrusal çalışma aralığı 4-20 µg/mL (Çizelge 3.11) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.12) hidroklorotiazid için % 0,70 bağıl standart sapma (Çizelge 3.14) ile % 100,5 ve kaptopril için % 2,91 bağıl standart sapma ile % 100,3 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemin avantajları doğrudan UV görünür alan spektrumlarına uygulanması ve herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemlerin kullanılmamasıdır.

MLRC yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.13) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

MLRC yönteminin CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.55 ve Çizelge 3.15 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve kaptopril için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlenmiştir.

3.3.1.4. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının CLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.3.3. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve kaptopril karışımı için 220-280 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 13 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak CLS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 13 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbansları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktarlar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 0-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kaptopril için 0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Çizelge 3.11) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.12) hidroklorotiazid için % 1,19 bağıl standart sapma (Çizelge 3.14) ile % 100,5 ve kaptopril için % 2,66 bağıl standart sapma ile % 99,1 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemin avantajları doğrudan UV görünür alan spektrumlarına uygulanması ve herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi spektrumların bölümü ve türevi gibi zaman alıcı işlemlerin kullanılmamasıdır. CLS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

CLS yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.11). CLS kalibrasyonu için analiz edilecek maddelerin karışımlarından oluşan kalibrasyon setinde sıfır konsantrasyonu

kullanıldığı için çalışma aralığının başlangıç konsantrasyonu sıfırdan başlar. Bu nedenle CLS kalibrasyonunun çalışma aralığı Çizelge 3.11 den de görüleceği gibi BC ve MLRC kalibrasyonlarından daha geniş ve sıfır eşiğine sahiptir.

CLS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.13) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

CLS yönteminin CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.60 ve Çizelge 3.15 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve kaptopril için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.3.1.5. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının ILS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.3.4. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve kaptopril karışımı için 220-280 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 13 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak ILS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 13 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 0-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kaptopril için 0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Çizelge 3.11) ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.12) hidroklorotiazid için % 0,45 bağıl standart sapma (Çizelge 3.14) ile %

100,8 ve kaptopril için % 1,69 bağıl standart sapma ile % 100,6 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Ouyang ve ark., 1999; Kirschbaum ve Perlman, 1984; Panderi ve Poulou, 1992) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. ILS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

ILS yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.11). ILS kalibrasyonu için analiz edilecek maddelerin karışımlarından oluşan kalibrasyon setinde sıfır konsantrasyonu kullanıldığı için çalışma aralığının başlangıç konsantrasyonu sıfırdan başlar. Bu nedenle ILS kalibrasyonunun çalışma aralığı Çizelge 3.11 den de görüleceği gibi BC ve MLRC kalibrasyonlarından daha geniş ve sıfır eşliğine sahiptir.

ILS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.13) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

ILS yönteminin CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.64 ve Çizelge 3.15 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve kaptopril için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.3.1.6. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının PCR Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.3.5. de açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve kaptopril karışımı için 220-280 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 13 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak PCR kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 13 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktarlar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 0-15 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.11), kaptopril için 0-20 $\mu\text{g/mL}$ ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.12) hidroklorotiazid için % 0,73 bağıl standart sapma (Çizelge 3.14) ile % 100,3 ve kaptopril için % 2,35 bağıl standart sapma ile % 99,8 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Ouyang ve ark., 1999; Kirschbaum ve Perlman, 1984; Panderi ve Poulou, 1992) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve türevi) içermemektedir. PCR kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

PCR yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.11). PCR kalibrasyonu için analiz edilecek maddelerin karışımlarından oluşan kalibrasyon setinde sıfır konsantrasyonu kullanıldığı için çalışma aralığının başlangıç konsantrasyonu sıfırdan başlar. Bu nedenle PCR kalibrasyonunun çalışma aralığı Çizelge 3.11 den de görüleceği gibi BC ve MLRC kalibrasyonlarından daha geniş ve sıfır eşiğine sahiptir.

PCR yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.13) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

PCR yönteminin CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.68 ve Çizelge 3.15 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve kaptopril için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3.3.1.7. Hidroklorotiazid ve Kaptopril Karışımının PLS Yöntemiyle Kantitatif Analizi

Bölüm 2.2.3.6. da açıklandığı şekliyle hidroklorotiazid ve kaptopril karışımı için 220-280 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 13 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçülen absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki çok değişkenli lineer denklem sistemi kullanılarak PLS kalibrasyonu kuruldu. Seçilen bu 13 dalga boyunda karışımın ölçülen absorbanları kurulan kalibrasyonda yerine konarak hidroklorotiazid ve kaptoprilin miktar tayinleri yapıldı. Bu yöntemde uygun çalışma aralığı hidroklorotiazid için 0-15 $\mu\text{g/mL}$ (Çizelge 3.11), kaptopril için 0-20 $\mu\text{g/mL}$ ve yöntem için ortalama geri kazanım değerleri (Çizelge 3.12) hidroklorotiazid için % 0,98 bağıl standart sapma (Çizelge 3.14) ile % 100,5 ve kaptopril için % 2,65 bağıl standart sapma ile % 98,9 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem literatürlerde (Ouyang ve ark., 1999; Kirschbaum ve Perlman, 1984; Panderi ve Poulou, 1992) verilen yöntemlerle karşılaştırıldığında herhangi bir ayırma işlemi gerektirmediği gibi grafik işlemlerini de (spektrumların bölümü ve

türevi) içermemektedir. Ayrıca kalibrasyon seti için seçilen dalga boylarındaki absorbans değerlerinin matriksinin ve konsantrasyonların dekompozisyonu esnasında ölçüm aletlerinden ve ortamdan gelen gürültü piklerinin eliminasyonu söz konusudur. PLS kalibrasyonu diğer kemometrik yöntemler ile karşılaştırıldığında son derece birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildi.

PLS yöntemi BC ve MLRC yöntemlerine göre daha geniş çalışma aralığı ve daha düşük konsantrasyonlara inebilmektedir (Çizelge 3.11). PCR kalibrasyonu için analiz edilecek maddelerin karışımlarından oluşan kalibrasyon setinde sıfır konsantrasyonu kullanıldığı için çalışma aralığının başlangıç konsantrasyonu sıfırdan başlar. Bu nedenle PLS kalibrasyonunun çalışma aralığı Çizelge 3.11 den de görüleceği gibi BC ve MLRC kalibrasyonlarından daha geniş ve sıfır eşliğine sahiptir.

PLS yönteminin validasyonu için tablet katkı maddelerinin analiz sırasında girişim yapıp yapmadığı ticari preparata standart ilavesiyle test edildi (Çizelge 3.13) ve elde edilen sonuçlara göre bizim oluşturduğumuz deneysel şartlarda tablet katkı maddelerinin girişiminin sözkonusu olmadığı gözlemlendi.

PLS yönteminin CAPTOHEXAL®COMP tablete uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 2.72 ve Çizelge 3.15 de verilmiştir. Hidroklorotiazid ve kaptopril için elde edilen sonuçların farmasötik preparat üzerinde belirtilen etiket miktarlarıyla son derece uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.1. Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımlarının analizinde kullanılan çalışma aralıkları.

Yöntemler	Hidroklorotiazid µg/mL	Spironolakton µg/mL
BC	6-20	6-20
MLRC	6-20	6-20
CLS	2-20	2-20
ILS	2-20	2-20
PCR	2-20	2-20
PLS	2-20	2-20

BC: Bivariate calibration
 MLRC: Multilinear regression calibration
 CLS: Classical least squares
 ILS: Inverse least squares
 PCR: Principal component regression
 PLS: Partial least squares

Çizelge 3.2. Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren karışımlara kemometrik yöntemlerin uygulanmasından elde edilen sonuçlar.

Yöntemler	Hidroklorotiazid Geri Kazanım (%)	Spironolakton Geri Kazanım (%)
BC	101,4	102,6
MLRC	100,2	102,5
CLS	100,2	100,9
ILS	100,2	100,8
PCR	101,2	102,3
PLS	100,2	100,0

Çizelge 3.3. Hidroklorotiazid ve spironolakton içeren farmasötik preparatlara standart ilavesinde kemometrik yöntemler için elde edilen ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri.

Yöntem	Hidroklorotiazid		Spironolakton	
	Geri Kazanım (%)	Bağıl Standart Sapma (%)	Geri Kazanım (%)	Bağıl Standart Sapma (%)
BC	98,5	2,51	97,6	1,75
MLRC	99,4	0,98	102,0	1,87
CLS	101,2	1,54	103,1	2,20
ILS	100,9	1,05	102,1	1,92
PCR	102,6	1,17	101,3	1,34
PLS	101,8	1,71	99,8	1,89

Çizelge 3.4. Hidroklorotiazid ve spironolakton karışımının analizinde yöntemlerin uygulanması ile elde edilen % bağıl standart sapmalar.

Yöntemler	Hidroklorotiazid Bağıl Standart Sapma (%)	Spironolakton Bağıl Standart Sapma (%)
BC	1,28	2,07
MLRC	0,66	2,07
CLS	1,87	1,55
ILS	1,87	1,70
PCR	1,83	1,40
PLS	2,42	1,59

Çizelge 3.5. ALDACTAZIDE® tablete yöntemler uygulandığında bulunan sonuçlar (preparat etiketi üzerinde belirtilen miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 25 mg spironolakton/tablet)

Yöntemler	Hidroklorotiazid (ortalama)	Spironolakton (ortalama)
BC	24,8	25,1
MLRC	24,6	24,9
CLS	25,4	24,8
ILS	25,0	24,9
PCR	25,1	24,7
PLS	25,0	24,8

Çizelge 3.6. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımlarının analizinde kullanılan çalışma aralıkları.

Yöntemler	Hidroklorotiazid $\mu\text{g/mL}$	Amilorid hidroklorür $\mu\text{g/mL}$
BC	4-28	2-10
MLRC	4-28	2-10
CLS	4-28	2-10
ILS	4-28	2-10
PCR	4-28	2-10
PLS	4-28	2-10

Çizelge 3.7. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren karışımlara kemometrik yöntemlerin uygulanmasından elde edilen sonuçlar.

Yöntemler	Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
BC	97,5	100,5
MLRC	99,3	103,0
CLS	100,8	101,4
ILS	100,6	101,2
PCR	101,0	100,4
PLS	100,1	100,9

Çizelge 3.8. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür içeren farmasötik preparatlara standart ilavesinde kemometrik yöntemlerin için elde edilen ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri.

Yöntem	Hidroklorotiazid		Amilorid hidroklorür	
	Geri Kazanım (%)	Bağıl Standart Sapma (%)	Geri Kazanım (%)	Bağıl Standart Sapma (%)
BC	103,1	2,14	97,6	2,25
MLRC	102,4	1,94	98,1	1,82
CLS	96,7	2,35	102,6	1,54
ILS	98,2	1,34	101,9	1,61
PCR	99,1	1,05	96,5	0,98
PLS	101,0	1,21	98,3	1,10

Çizelge 3.9. Hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımının analizinde yöntemlerin uygulanması ile elde edilen bağıl standart sapmalar.

Yöntemler	Bağıl Standart Sapma (%)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
BC	0,25	2,04
MLRC	0,09	0,14
CLS	1,84	0,81
ILS	1,95	1,13
PCR	0,83	1,84
PLS	2,10	2,25

Çizelge 3.10. MODURETIC® tablete yöntemler uygulandığında bulunan sonuçlar (preparat etiketi üzerinde belirtilen miktar: 50 mg hidroklorotiazid ve 5 mg amilorid hidroklorür/tablet)

Yöntemler	(ortalama)	
	Hidroklorotiazid	Amilorid hidroklorür
BC	50,1	4,9
MLRC	50,1	5,0
CLS	50,9	5,1
ILS	51,1	5,1
PCR	51,2	5,0
PLS	51,0	5,0

Çizelge 3.11. Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımlarının analizinde kullanılan çalışma aralıkları.

Yöntemler	Hidroklorotiazid $\mu\text{g/mL}$	Kaptopril $\mu\text{g/mL}$
BC	3-15	4-20
MLRC	3-15	4-20
CLS	0-15	0-20
ILS	0-15	0-20
PCR	0-15	0-20
PLS	0-15	0-20

Çizelge 3.12. Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren karışımlara kemometrik yöntemlerin uygulanmasından elde edilen sonuçlar.

Yöntemler	Geri Kazanım (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
BC	100,1	100,4
MLRC	100,5	100,3
CLS	100,5	99,1
ILS	100,8	100,6
PCR	100,3	99,8
PLS	100,5	98,9

Çizelge 3.13. Hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik preparatlara standart ilavesinde kemometrik yöntemlerin uygulanması ile elde edilen geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri.

Yöntem	Hidroklorotiazid		Kaptopril	
	Geri Kazanım (%)	Bağıl Standart Sapma (%)	Geri Kazanım (%)	Bağıl Standart Sapma (%)
BC	103,4	2,64	102,4	2,75
MLRC	102,8	2,56	102,1	2,11
CLS	100,5	1,99	101,7	1,86
ILS	101,9	2,01	100,9	1,63
PCR	100,3	1,45	102,5	2,17
PLS	99,1	2,09	101,9	1,38

Çizelge 3.14. Hidroklorotiazid ve kaptopril karışımının analizinde yöntemlerin uygulanması ile elde edilen bağıl standart sapmalar.

Yöntemler	Bağıl Standart Sapma (%)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
BC	2,01	2,61
MLRC	0,70	2,91
CLS	1,19	2,66
ILS	0,45	1,69
PCR	0,73	2,35
PLS	0,98	2,65

Çizelge 3.15. CAPTOHEXAL®COMP tablete yöntemler uygulandığında bulunan sonuçlar (preparat etiketi üzerinde belirtilen miktar: 25 mg hidroklorotiazid ve 50 mg kaptopril/tablet)

Yöntemler	(ortalama)	
	Hidroklorotiazid	Kaptopril
BC	25,3	51,0
MLRC	25,2	51,0
CLS	25,5	51,1
ILS	25,3	50,2
PCR	25,5	49,8
PLS	25,2	51,4

3.4. Kemometrik Kalibrasyonlar İçin apraz Validasyon

Kemometrik yöntemlerin (CLS, ILS, PCR, PLS) kompleks karışımlara uygulanmasında kalibrasyon ve tayin basamaklarında yöntemi gerçek numunelere uygulamadan önce kurulan kalibrasyonun tayin gücünün ve geçerliliğinin test edilmesi çapraz validasyon işlemi uygulanarak yapılmaktadır. Tez kapsamında üzerinde çalıştığımız hidroklorotiazid–spironolakton, hidroklorotiazid–amilorid hidroklorür ve hidroklorotiazid–kaptopril karışımları için 4 kemometrik yöntemi kalibrasyon ve tayin basamaklarında çapraz validasyonda kullanılan parametreleri hesapladık.

3.4.1. Hidroklorotiazid–spironolakton karışımından elde ettiğımız SEC ve SEP değerlerini son derece minimize eden kalibrasyon seti hazırlandığı ve kalibrasyonların bu karışımın analizinde kullanılabilirliği kalibrasyon ve tayin aşamasında elde edilen korelasyon katsayılarının (r) 0,99 dan büyük olması göstermektedir (izelge 3.16).

3.4.2. Hidroklorotiazid–amilorid hidroklorür karışımından elde ettiğımız SEC ve SEP değerlerini son derece minimize eden kalibrasyon seti hazırlandığı ve kalibrasyonların bu karışımın analizinde kullanılabilirliği kalibrasyon ve tayin aşamasında elde edilen korelasyon katsayılarının (r) 0,99 dan büyük olması göstermektedir (izelge 3.17).

3.4.3. Hidroklorotiazid–kaptopril karışımından elde ettiğımız SEC ve SEP değerlerini son derece minimize eden kalibrasyon seti hazırlandığı ve kalibrasyonların bu karışımın analizinde kullanılabilirliği kalibrasyon ve tayin aşamasında elde edilen korelasyon katsayılarının (r) 0,99 dan büyük olması göstermektedir (izelge 3.18).

Çizelge 3.16. Kemometrik yöntemlerin hidroklorotiazid ve spironolakton karışımına uygulamasında kalibrasyon ve tayin basamaklarında elde edilen çapraz validasyon sonuçları

	Etken madde	Yöntemler	CLS	ILS	PCR	PLS
Kalibrasyon basamağı	Hidroklorotiazid	SEC	0,3240	0,3220	0,1720	0,2450
		r	0,9985	0,9985	0,9991	0,9997
	Spironolakton	SEC	0,1510	0,1540	0,0940	0,1290
		r	0,9999	0,9999	0,9999	0,9993
Tayin basamağı	Hidroklorotiazid	SEP	0,1010	0,1000	0,1640	0,6220
		r	0,9996	0,9996	0,9984	0,9986
	Spironolakton	SEP	0,1820	0,1950	0,2100	0,1760
		r	0,9990	0,9988	0,9990	0,9990

Çizelge 3.17. Kemometrik yöntemlerin hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür karışımına uygulamasında kalibrasyon ve tayin basamaklarında elde edilen çapraz validasyon sonuçları

	Etken madde	Yöntemler	CLS	ILS	PCR	PLS
Kalibrasyon basamağı	Hidroklorotiazid	SEC	0,4690	0,4630	0,3710	0,4930
		r	0,9991	0,9995	0,9987	0,9995
	Amilorid hidroklorür	SEC	0,2490	0,0850	0,1060	0,1490
		r	0,9998	0,9989	0,9997	0,9987
Tayin basamağı	Hidroklorotiazid	SEP	0,3930	0,3870	0,3110	0,4120
		r	0,9977	0,9978	0,9994	0,9970
	Amilorid hidroklorür	SEP	0,2090	0,0710	0,0880	0,1250
		r	0,9999	0,9999	0,9997	0,9996

Çizelge 3.18. Kemometrik yöntemlerin hidroklorotiazid ve kaptopril karışımına uygulamasında kalibrasyon ve tayin basamaklarında elde edilen çapraz validasyon sonuçları

	Etken madde	Yöntemler	CLS	ILS	PCR	PLS
Kalibrasyon basamağı	Hidroklorotiazid	SEC	0,0676	0,0868	0,3464	0,1612
		r	0,9999	0,9999	0,9987	0,9992
	Kaptopril	SEC	0,0542	0,0890	0,1129	0,2378
		r	1,0000	0,9999	0,9999	0,9980
Tayin basamağı	Hidroklorotiazid	SEP	0,0687	0,0758	0,0519	0,0616
		r	0,9999	1,0000	0,9999	0,9999
	Kaptopril	SEP	0,3338	0,1465	0,2357	0,3144
		r	0,9981	0,9994	0,9994	0,9980

3.5. Varyans Analizi (ANOVA testi)

Geliştirilen 6 kemometrik metodun ALDACTAZIDE[®], MODURETIC[®] ve CAPTOHEXAL[®]COMP tabletlere uygulanması ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak üzere tabletlerdeki herbir etken madde için 10 numunenin 6 setine ANOVA (Analysis of variance) testi uygulanarak F değerleri hesaplandı (Çizelge 2.24a, 2.48a ve 2.72a). Farmasötik preparatalara uygulanan 6' şar kemometrik yöntem için elde edilen varyans analiz sonuçları göre tablo değeri ve hesaplanan F değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.



ÖZET

Hidroklorotiazid İçeren Farmasötik Preparatlardaki Etken Maddelerin Kemometrik Yöntemlerle Miktar Tayinleri

Bu çalışmada altı kemometrik yöntem (bivariate calibration (BC), multilinear regression calibration (MLRC), classical least-squares (CLS), inverse least-squares (ILS), principal component regression (PCR) and partial least-squares (PLS) yöntemleri hidroklorotiazid-spiroinolakton, hidroklorotiazid-amilorid hidroklorür ve hidroklorotiazid-kaptopril karışımlarını içeren farmasötik preparatlara başarıyla uygulandı.

1. Hidroklorotiazid-Spiroinolakton Karışımının Analizi

Farmasötik tablet preparatında bulunan hidroklorotiazid ve spiroinolaktonun aynı anda miktar tayinleri BC, MLRC, CLS, ILS, PCR ve PLS yöntemleri ile gerçekleştirildi.

Hidroklorotiazid ve spiroinolakton için 6-20 µg/mL doğrusal çalışma aralığında bivariate kalibrasyon için 240 ve 270 nm optimum dalga boyları olarak seçildi. Kurulan kalibrasyon hidroklorotiazid ve spiroinolakton içeren farmasötik tablet preparatına uygulandı.

MLRC yönteminde hidroklorotiazid ve spiroinolaktonun karışımı seçilen 10 dalga boyunda (225 nmden 295 nm'ye kadar) elde edilen lineer regresyon fonksiyonlarının kalibrasyonu kullanılarak analiz edildi.

Kalibrasyon seti için 25 noktalı karışım dizaynına karşılık gelen 2-20 µg/mL hidroklorotiazid ve spiroinolaktonu içeren kalibrasyon sistemi kullanılarak CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyonları 0. dereceden absorpsiyon spektrumları için 220-290 nm dalga boyu aralığında 15 noktadaki absorbans ölçümleri ile elde edildi.

2. Hidroklorotiazid–Amilorid Hidroklorür Karışımının Analizi

BC, MLRC, CLS, ILS, PCR ve PLS metodları farmasötik tablet preparatındaki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün aynı anda miktar tayinlerinde kullanıldı.

Bivariate kalibrasyonu için absorbans değerleri hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün herbir karışımı için Kaiser tekniği ile bulunan optimum iki dalga setinde (270 ve 290 nm) ölçüldü. BC yöntemi ile hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorür farmasötik tablet preparatında tayin edildi.

Karışımındaki herbir ilaç için 10 lineer regresyon fonksiyonu 10 dalga boyu setinde (235 nm'den 280 nm'ye kadar) absorbansların ölçümü ile elde edildi. Tabletlerdeki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün aynı anda miktar tayinleri multilineer regresyon kalibrasyon yöntemi kullanılarak başarıldı.

CLS, ILS, PCR ve PLS algoritmalarına göre kalibrasyonlar 25 noktalı karışım dizaynına karşılık gelen 4-28 µg/mL hidroklorotiazid ve 2-10 µg/mL amilorid hidroklorür içeren kalibrasyon seti için 220 nm'den 385 nm'ye kadar dalga boyu aralığında 34 noktada absorbansların ölçümü ile kuruldu. Bu kemometrik kalibrasyonlar hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürü içeren bir farmasötik preparatın kantitatif analizine başarıyla uygulandı.

3. Hidroklorotiazid-Kaptopril Karışımın Analizi

Bir farmasötik tablet preparatında hidroklorotiazid ve kaptoprilin aynı anda kantitatif analizi BC, MLRC, CLS, ILS, PCR ve PLS metodları ile yapıldı.

Bivariate kalibrasyon hidroklorotiazid için 3–15 µg/mL ve kaptopril için 4–20 µg/mL doğrusal çalışma aralığında iki dalga boyu setinde (220 ve 272 nm) absorbans değeri ölçülerek kuruldu. Bu kalibrasyon farmasötik tablet preparatındaki hidroklorotiazid ve kaptoprilin aynı anda analizine uygulandı.

Multilinear regression calibration 10 dalga boyu setinde (210 nm'den 300 nm'ye kadar) absorbans ölçümleri kullanılarak hesaplandı. Bu kurulan kalibrasyon hidroklorotiazid ve kaptopril içeren farmasötik preparata başarıyla uygulandı.

Hidroklorotiazid için 0–15 µg/mL ve kaptopril için 0–20 µg/mL çalışma aralığında içeren kalibrasyon seti kemometrik kalibrasyonlar için bu etken maddelerin stok çözeltileri kullanılarak rastgele hazırlandı. CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyonları 0. dereceden absorpsiyon spektrumları için 215–300 nm dalga boyu aralığında 15 noktada absorbans değerlerinin ölçümü ile kuruldu. Hidroklorotiazid ve kaptoprilin farmasötik preparattaki miktar tayinleri bu kalibrasyonlarla gerçekleştirildi.

Anahtar Sözcükler: Kemometrik yöntemler, miktar tayini, hidroklorotiazid, spironolakton, amilorid hidroklorür, kaptopril, farmasötik preparat.

SUMMARY

Quantitative Determination of Active Compounds in Pharmaceutical Preparations Containing Hydrochlorothiazide by Using Chemometric Methods.

In this study, six chemometrics methods, bivariate calibration (BC), multilinear regression calibration (MLRC), classical least-squares (CLS), inverse least-squares (ILS), principal component regression (PCR) and partial least-squares (PLS) were satisfactorily applied to the quantitative analysis of binary mixtures of hydrochlorothiazide–spironolactone, hydrochlorothiazide–amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide–captopril in pharmaceutical preparations.

1. Analysis of Hydrochlorothiazide-Spironolactone Mixture

Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and spironolactone in a pharmaceutical tablet preparation was carried out by BC, MLRC, CLS, ILS, PCR and PLS methods.

Bivariate calibration, an optimum two-wavelength set was selected as 240 and 270 nm for the bivariate calibration in the working range 6-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for both drugs. The constructed calibration was applied to pharmaceutical tablet preparation containing hydrochlorothiazide and spironolactone.

In the MLRC method, the mixture of hydrochlorothiazide and spironolactone was simultaneously analysed by using the calibration of multilinear regression functions at ten-wavelength set (from 225 nm to 295 nm).

By using a calibration set containing 2-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hydrochlorothiazide and spironolactone corresponding to 25 point mixture design, CLS, ILS, PCR and PLS calibrations were constructed by measuring the absorbance values at 15 points in the wavelength

range 220-290 nm for the zero-order spectra. The quantitative analysis of hydrochlorothiazide and spironolactone was accomplished by these calibrations.

2. Analysis of Hydrochlorothiazide-Amiloride hydrochloride Mixture

BC, MLRC, CLS, ILS, PCR and PLS methods were subjected to the simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride in a pharmaceutical tablet preparation.

In case of the bivariate calibration, absorbance values were measured at the optimum two-wavelength set found by Kaiser's technique for each mixture of hydrochlorothiazide and amiloride (270 and 290 nm). Hydrochlorothiazide and amiloride were determined in a pharmaceutical tablet preparation.

In the MLRC method, ten linear regression functions for each drug were obtained by measuring the zero-order absorbances at ten-wavelengths set (from 235 nm to 280 nm). Statistical data of ten linear regression functions were used for the calibration of multilinear regression functions. Simultaneous analysis of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride in tablets was achieved by using the calibration of multilinear regression functions.

According to the algorithms of CLS, ILS, PCR and PLS, the calibrations were constructed by measuring the zero-order absorbances at 34 points in the range of the wavelength from 220 nm to 385 nm for calibration set containing 4-28 $\mu\text{g/mL}$ hydrochlorothiazide and 2-10 $\mu\text{g/mL}$ amiloride hydrochloride corresponding to 25 point mixture design, These chemometric calibrations were applied to the quantitative analysis of a

pharmaceutical preparation containing hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride.

3. Analysis of Hydrochlorothiazide-Captopril Mixture

Simultaneous quantitative analysis of hydrochlorothiazide and captopril in a pharmaceutical tablet preparation was made by BC, MLRC, CLS, ILS, PCR and PLS methods.

Bivariate calibration was constructed by measuring the absorbance values at two-wavelength set (220 and 272 nm) in the working range 3-15 $\mu\text{g/mL}$ for hydrochlorothiazide and 4-20 $\mu\text{g/mL}$ for captopril. This calibration was applied to the simultaneous analysis of hydrochlorothiazide and captopril in a pharmaceutical tablet preparation.

Calibration of multilinear regression functions was calculated by using the measurements at fifteen-wavelength set (from 210 nm to 300 nm). The constructed calibration was applied to a pharmaceutical preparation containing hydrochlorothiazide-captopril.

Calibration set containing 0-15 $\mu\text{g/mL}$ hydrochlorothiazide and 0-20 $\mu\text{g/mL}$ captopril were randomly prepared by using the stock solutions of hydrochlorothiazide and captopril for chemometric calibrations. CLS, ILS, PCR and PLS calibrations were constructed by measuring the absorbance values at 13 points in the wavelength range 215-300 nm for the zero-order spectra. The quantitative determination of hydrochlorothiazide and captopril in a pharmaceutical preparation was realized by these calibrations.

Key words : Chemometric methods, quantitative determination, hydrochlorothiazide, spironolactone, amiloride hydrochloride, captopril, pharmaceutical preparation.



4. SONUÇ

Farmasötik formülasyonlarının etken madde içeriklerinin tayinine yönelik metodların geliştirilmesi, üretim aşaması yanında üretim sonrası yapılacak rutin kontroller için büyük önem taşımaktadır. Farmasötik formülasyonlarının analizlerinde spektrofotometrik, YBSK ve grafik metodlar kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerle yapılan analizler uzun bir ön hazırlık gerektirir ve analizin maliyeti de bir hayli yüksektir. Halbuki birçok farmasötik formülasyonunun kemometrik yöntemlerin kullanımıyla daha kısa zamanda ve daha az maliyetle analiz edilebilir.

Bu tez çalışmasında da Aldactazid[®], Moduretic[®] ve Captohexal-comp[®] tabletlerde bulunan etken maddelerin tayininin kemometrik yöntemler kullanılarak yapılabilirliği araştırıldı. Bu üç farmasötik preparatlarda bulunan etken maddelerin miktar tayinleri herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmadan kantitatif analizleri için alt kemometrik yöntem (BC, MLRC, CLS, ILS, PCR ve PLS) ucuz, kolay, hızlı ve başarılı bir şekilde gerçekleştirildi.

Tez kapsamında kullanılan kemometrik yöntemlerin, formülasyonlardaki etken maddelerin analizi için kullanılan literatürlerde verilen diğer spektrofotometrik ve YBSK yöntemlerine göre kolay uygulanabilir, tekrar edilebilirliğinin yüksek ve düşük maliyetli olduğu ve Aldactazid[®], Moduretic[®] ve Captohexal-comp[®] tabletlerde kalite kontrollerine yönelik yapılan rutin analizlerinde kemometrik yöntemlerin güvenle kullanılabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- ABACIOĞLU, N., ONURSAL, E., HATUNOĞLU, K., ABACIOĞLU, H. (2001). Türkiye Tıbbi İlaç Rehberi, Farmalist.
- ABDEL-HAY, M.H., GALAL, S.M., BEDAIR, M.M., GAZY, A.A., WAHBI, A.A.M. (1992). Spectrofluorimetric determination of guanethidine sulphate, guanoxan sulphate and amiloride hydrochloride in tablets and in biological fluids using 9,10-phenanthraquinone. *Talanta*. **39(10)**: 1369-1375.
- ABDINE, H., ELSAYED, M.A.H., ELSAYED, Y.M. (1978). Spectrophotometric determination of hydrochlorothiazide and reserpine in combination. *Analyst*. **103**: 354-358.
- ADAMS, M.J. (1995). Chemometrics in Analytical Spectroscopy. In: The Royal Society of Chemistry; Thomas, Graham House, Science Park, Cambridge, p:187.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S., ZIVANOVIC, L.J., VASILJEVIC, M., PECANAC, D. (1993). Spectrophotometric determination of amiloride as its Cu(II) complex. *Pharmazie*. **48**: 10.
- ALLIEGRO, M.A., DYER, K.D., CRAGOE, E.J., JR., GLASER, B.M., ALLIEGRO, M.C. (1992). High-performance liquid chromatographic method for quantitating plasma levels of amiloride and its analogues. *J. Chromatogr.* **582**: 217-223.
- ALTON, K.B., DESRIVIERES, D., PATRICK, J.E. (1986). High-performance liquid chromatographic assay for hydrochlorothiazide in human urine. *J. Chromatogr.* **374**: 103-110.
- ARGEKAR, A.P., SAWANT, J.G. (2000). A gradient reversed phase high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of hydrochlorothiazide (HCT) and losartan potassium (LOS) from tablets. *Anal. Lett.* **33(5)**: 869-880.
- ATAY, O., TAMER, U., ARIKAN, D. (2001). Determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* **34(7)**: 1153-1161.
- AZUYAMA, C.T. (1990). Sensitive liquid chromatographic method for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Chromatogr.* **532**: 168-174.

- BACHMAN, W.J., STEWART, J.T. (1990). HPLC-photolysis-electrochemical detection in pharmaceutical analysis: application to the determination of spironolactone and hydrochlorothiazide in tablets. *J. Chromatogr. Sci.* **28**: 123-128.
- BANOGLU, E., OZKAN, Y., ATAY, O. (2000). Dissolution tests of benazepril-HCl and hydrochlorothiazide in commercial tablets: comparison of spectroscopic and high-performance liquid chromatography methods. *IL Farmaco.* **55**: 477-483.
- BEBAWY, L.I., EL KOUSY, N. (1997). Stability-indicating method for the determination of hydrochlorothiazide, benzydamine hydrochloride and clonazepam in the presence of their degradation products. *Anal. Lett.* **30(7)**: 1379-1397.
- BECHGAARD, E. (1989). Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of amiloride in human plasma by direct injection with pre-column enrichment. *J. Chromatogr.* **490**: 219-223.
- BEDAIR, M., KORANY, M.A., EL-YAZBI, F.A. (1986). UV-derivative spectrophotometric determination of hydralazine hydrochloride in combination with hydrochlorothiazide or propranolol hydrochloride. *Sci. Pharm.* **54**: 31-36.
- BEEBE, K.R., KOWALSKI, B.R. (1987). An introduction to multivariate calibration and analysis. *Anal. Chem.* **59**: 1007.
- BELAL, F., AL-ZAAGI, I.A., GADKARIEM, E.A., ABOUNASSIF, M.A. (2001). A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24(3)**: 335-342.
- BELAL, F., RIZK, M., IBRAHIEM, F., EL-DIN, M.S. (1986). Spectrophotometric determination of benzothiadiazines in dosage forms. *Talanta.* **33(2)**: 170-172.
- BERZAS, J.J., RODRIGUEZ, J.R., CASTANEDA, G. (1999). Partial least squares method in the analysis by square wave voltammetry. Simultaneous determination of sulphamethoxypridine and trimethoprim. *Anal. Chim. Acta.* **349**: 303-311.
- BI, H., COOPER, S.F., COTE, M.G. (1992). Determination and identification of amiloride in human urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **582**: 93-101.

- BIGLEY, F.P., GROB, R.L. (1986). Pharmaceutical applications of a high-performance flow injection system. *Anal. Chim. Acta.* **181**: 241-244.
- BONET-DOMINGO, E., MEDINA-HERNANDEZ, M.J., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C. (1993). A micellar liquid chromatographic procedure for the determination of amiloride, bendroflumethiazide, chlorthalidone, spironolactone and triamterene in pharmaceuticals. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **11(8)**: 711-716.
- CARDA-BROCH, S., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C., SIMO-ALFONSO, E.F., ESTEVE-ROMERO, J.S. (1997). Micellar liquid chromatographic determination of diuretics by diazotization and coupling with the Bratton-Marshall reagent. *Anal. Chim. Acta.* **353**: 215-226.
- CARLUCCI, G., DI CARLO, V., MAZZEO, P. (2000). Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* **33(12)**: 2491-2500.
- CARLUCCI, G., DI GIUSEPPE, E., MAZZEO, P. (1993). Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* **93**: 245-248.
- CHRISTOPHERSEN, A.S., RASMUSSEN, K.E., SALVESEN, B. (1977). Determination of hydrochlorothiazide in serum by high - pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **132**: 91-97.
- COOPER, M.J., SINAIKO, A.R., ANDERS, M.W., MIRKIN, B.L. (1976). High pressure liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide in human serum and urine. *Anal. Chem.* **48**: 1110-1116.
- DE CROO, F., VAN DEN BOSSCHE, W., DE MOERLOOSE, P. (1985). Simultaneous quantitative determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* **20(8)**: 477-481.
- DE CROO, F., VAN DEN BOSSCHE, W., DE MOERLOOSE, P. (1985). Simultaneous determination of althiazide and spironolactone in tablets by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **329**: 422-427.

- DE VRIES, J.X., VOSS, A. (1993). Simple determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **7**: 12-14.
- DÎNC, E. (2002). Spectral analysis of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by three chemometric techniques. *Anal. Lett.* **35(6)**: 1021-1039.
- DÎNÇ, E. (1996). Atropin sülfat içeren karışımlarda bileşenlerin spektrofotometrik yöntemlerle miktar tayinleri ve bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanması. Doktora Tezi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- DÎNC, E., BALEANU, D. (2002). Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **30**: 715-723.
- DÎNÇ, E., BALEANU, D. (2002). Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical-least-squares and principal component regression techniques. *Farmaco.* **57**: 33-37.
- DÎNÇ, E. (2003). Linear regression analysis and its application to the multivariate spectral calibrations for the multiresolution of a ternary mixture of caffeine, paracetamol and metamizol in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal* (baskıda)
- DÎNÇ, E., BALEANU, D., ONUR, F. (2001a). Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26**: 949-957.
- DÎNÇ, E., BALEANU, D., ONUR, F. (2001b). Chemometric quantitative analysis of pyridoxine HCl and thiamine HCl in a vitamin combination by principal component analysis, classical least squares and inverse least squares techniques. *Spectrosc. Lett.* **34**: 279-288.
- DÎNÇ, E., BALEANU, D., ONUR, F. (2002c). Simultaneous spectrophotometric analysis of codeine phosphate, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets by inverse least-squares and principal component regression techniques. *Anal. Lett.* **35**: 545-558.
- DÎNÇ, E., BAYDAN, E., KANBUR, M., ONUR, F. (2002a). Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double

divisor - ratio spectra derivative, inverse least - squares and principal component regression methods. *Talanta*. **58**: 579-594.

DİNÇ, E., KANBUR, M. (2002). Spectrophotometric multicomponent resolution of a veterinary formulation containing oxfendazole and oxyclozanide by multivariate calibration-prediction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**: 779-788.

DİNÇ, E., SERİN C., TUĞCU-DEMİRÖZ, F., DOĞANAY, T. (2003). Dissolution and assaying of multicomponent tablets by chemometric methods using computer-aided spectrophotometer. *Int. J. Pharm.* **250**: 339-350.

DİNÇ, E., YÜCESOY, C., ONUR, F. (2002b). Simultaneous spectrophotometric determination of mefenamic acid and paracetamol in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and chemometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**: 1091-1100.

DOMINGO, E.B., HERNANDEZ, M.J.M., RAMOS, G.R., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C. (1992). High-performance liquid chromatographic determination of diuretics in urine by micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **582**: 189-194.

EL-YAZBI, F.A., ABDINE, H.H., SHAALAN, R.A. (1999). Spectrophotometric methods for the determination of benazepril hydrochloride in its single and multi-component dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20**: 343-350.

ERK, N. (1999). Ratio-spectra zero-crossing derivative spectrophotometric determination of certain drugs in two-component mixtures. *Anal. Lett.* **32(7)**: 1371-1388.

ERK, N., ONUR, F. (1996). Simultaneous determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by spectrophotometric methods. *Anal. Lett.* **29(11)**: 1963-1974.

ERK, N., ONUR, F. (1997). Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by spectrophotometric methods. *Analysis*. **25**: 161-163.

ERK, N., ONUR, F. (1997). Three new spectrophotometric methods for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride in sugar-coated tablets. *Anal. Lett.* **30(8)**: 1503-1515.

FATMI, A.A., WILLIAMS, G.V. (1990). Determination of hydralazine hydrochloride and hydrochlorothiazide in dosage forms by high

performance liquid chromatography. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **16(5)**: 779-789.

FETT, J.J., HISCHAK, F., CLINE LOVE, L.J. (1991). Mobile phase versus stationary phase approaches to the direct injection of biological fluids in liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **5**: 14-18.

FORREST, G., McINNES, G.T., FAIRHEAD, A.P., THOMPSON, G.G., BRODIE, M.J. (1988). Simple high-performance liquid chromatographic method for the measurement of amiloride in body fluids. *J. Chromatogr.* **428**: 123-130.

GONZALEZ, E., BECERRA, A., LASERNA, J.J. (1996). Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone electrophoresis using fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* **687**: 145-150.

HAALAND, D.M., THOMAS E.V. (1990). Comparison of multivariate calibration methods for quantitative spectral analysis. *Anal. Chem.* **62**: 1091-1099.

HITSCHERICH, M.E., RYDBERG, E.M., TSILIFONIS, D.C., DALY, R.E. (1987). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **10(5)**: 1011-1021.

HSIEH, J.Y.-K., LIN, C., MATUSZEWSKI, B.K., DOBRINSKA, M.R. (1994). Fully automated methods for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12(12)**: 1555-1562.

IVASHKIV, E., McKINSTRY, D.N., COHEN, A.I. (1984). Determination of total captopril in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry with selected-ion monitoring after reduction of disulfides. *J. Pharm. Sci.* **73(8)**: 1113-1117.

JANKOWSKI, A., SKOREK-JANKOWSKA, A., LAMPARCZYK, H. (1997). Determination and pharmacokinetics of a furosemide-amiloride drug combination. *J. Chromatogr. B.* **693**: 383-391.

KAISER, H. (1972). Zur definition von selectivität, spezifiät und empfindlichkeit von analysenverfahren. *Z. Anal. Chem.* **260**: 252-260.

KARTAL, M., ERK, N. (1999). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride by ratio spectra

derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **19**: 477-485.

KIRSCHBAUM, J., PERLMAN, S. (1984). Analysis of captopril and hydrochlorothiazide combination tablet formulations by liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **73(5)**: 686-687.

KOOPMANS, P.P, TAN, Y., VAN GINNEKEN, C.A.M., GRIBNAU, F.W.J. (1984). High performance liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide in plasma and urine. *J. Chromatogr.* **307**: 445-450.

KRAMER, R. (1988). *Chemometric Techniques in Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York, p: 51-97.

LINARES, M.S., FRAGA, J.M.G., JIMENEZ, A.I., JIMENEZ, F., ARIAS, J.J. (1999). Influence of the selected wavelength range on the simultaneous spectrophotometric determination of mixture components by use of partial least-squares regression. *Anal. Lett.* **32(12)**: 2489-2505.

LÓPEZ-DE-ALBA, P.L., LÓPEZ-MARTÍNEZ, L., MICHELINI-RODRIGUEZ, L. I., WRÓBEL, K., WRÓBEL, K., AMADOR-HERNÁNDEZ, J. (1997) Extraction of sunset yellow and tartrazine by ion-pair formation with adogen-464 and their simultaneous determination by bivariate calibration and derivative spectrophotometry. *Analyst.* **122**: 1575-1579.

MAGRI, A.L., BALESTRIERI, F., MAGRI, A.D., MARINI, D. (1995). Determination of fosinopril in pharmaceutical formulations containing hydrochlorothiazide by multiwavelength UV spectrophotometry. *Talanta.* **42**: 1719-1723.

MAHGOUB, H., EL-YAZBI, F.A., BARARY, M.H. (1992). Derivative and derivative-difference spectrophotometric determination of captopril in two-component mixtures. *Sci. Pharm.* **60**: 239-245.

MARTENS, H., NAES, T. (1984). *Multivariate calibration by data compression*, Report from Norwegian Food Research Institute. Aas-NHL, Norway.

MARTIN, E., HERNANDEZ, O., ARIAS, J.J., JIMENEZ, A.I. (1997). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and spironolactone in pharmaceutical preparations using batch and dynamic systems. *Microchem. J.* **56**: 207-215.

- MARTIN, M.E., HERNANDEZ, O.M., JIMENEZ, A.I., ARIAS, J.J., JIMENEZ, F. (1999). Partial least-squares method in analysis by differential pulse polarography. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta.* **381**: 247-256.
- MOUSSA, B.A., EL KOUSY, N.M. (1985). Colorimetric analysis of some diuretic drugs: hydrochlorothiazide and spironolactone. *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.* **7**:79-82.
- MYCEK, M.J., HARVEY, R.A., CHAMPE, P.C. (1998). Farmakoloji. Lippincott's Illustrated Series, Nobel Tıp Kitapevi (2. Baskı).
- OUYANG, J., BAEYENS, W.R.G., DELANGHE, J., VAN DER WEKEN, G., CALOKERINOS, A.C. (1998). Cerium(IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide. *Talanta.* **46**: 961-968.
- OUYANG, J., BAEYENS, W.R.G., DELANGHE, J., VAN DER WEKEN, G., VAN DAELE, W., DE KEUKELEIRE, D., GARCIA CAMPANA, A.M. (1999). Chemiluminescence-based liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide and captopril. *Anal. Chim. Acta.* **386**: 257-264.
- OZKAN, S.A. (2001). Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide from tablets and human serum by RP-HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **24(15)**: 2337-2346.
- OZKAN, S.A., AKAY, C., CEVHEROGLU, S., SENTURK, Z. (2001). Rapid and accurate simultaneous determination of fosinopril sodium and hydrochlorothiazide in tablets by HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **24(7)**: 983-991.
- PANDERI, I., PARISSI-POULOU, M. (1992). Determination of captopril and captopril- hydrochlorothiazide combination in tablets by derivative UV spectrophotometry. *Int. J. Pharm.* **86**: 99-106.
- PANDERI, I.E. (1999). Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by second-order derivative spectrophotometry. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **21**: 257-265.
- PANDERI, I.E., PARISSI-POULOU, M. (1999). Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide by micro-bore liquid chromatography. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **21(5)**: 1017-1024.

- PAPADOYANNIS, I.N., SAMANIDOU, V.F, GEORGA, K.A., GEORGARAKIS, E. (1998). High pressure liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide (HCT) in pharmaceutical preparations and human serum after solid phase extraction. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **21(11)**: 1671-1683.
- PARISSI-POULOU, M., REIZOPOULOU, V., KOUPPARIS, M., MACHERAS, P. (1989). Second derivative UV spectrophotometric determination of hydrochlorothiazide and hydrochlorothiazide-amiloride combination in tablets. *Int. J. Pharm.* **51**: 169-174.
- PEREIRA, C.M., TAM, Y.K. (1988). Simplified determination of captopril in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **425**: 208-213.
- PRAMAR, Y., GUPTA, V.D., ZERAI, T. (1991). Quantification of spironolactone in the presence of canrenone using high-performance liquid chromatography. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **17(5)**: 747-761.
- PRASAD, C.V.N., BHARADWAJ, V., NARSIMHAN, V., CHOWDHARY, R.T., PARIMOO, P. (1997). Simultaneous determination of metoprolol-hydrochlorothiazide and propranolol-hydrochlorothiazide in combined formulations by derivative spectroscopy. *J. AOAC Int.* **80**: 325-330.
- PRASAD, C.V.N., PARIHAR, C., SUNIL, K., PARIMOO, P. (1998). Simultaneous determination of amiloride HCl, hydrochlorothiazide and atenolol in combined formulations by derivative spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 877-884.
- PULGARIN, J.A.M., MOLINA, A.A., LOPEZ, P.F. (1997). Direct determination of amiloride in urine using isopotential fluorimetry. *Analyst.* **122**: 247-252.
- RAPADO-MARTINEZ, I., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C., VILLANUEVA-CAMANAS, M. (1996). Performance of micellar mobile phase in reversed-phase chromatography for the analysis of pharmaceuticals containing β -blockers and other antihypertensive drugs. *Analyst.* **121**: 1677-1682.
- RICHTER, K., OERTEL, R., KIRCH, W. (1996). New sensitive method for the determination of hydrochlorothiazide in human serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* **729**: 293-296.

- SAGLIK, S., SAGIRLI, O., ATMACA, S., ERSOY, L. (2001). Simultaneous determination of fosinopril and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic methods. *Anal. Chim. Acta.* **427**: 253-257.
- SALEM, H., EL-MAAML, M., EL-SADEK, M., KHEIR, A.A. (1991). U.V. and U.V. derivative spectrophotometric determination of two-component mixtures. *Spectroscopy Letters.* **24(3)**:451-470.
- SASA, S.I., JALAL, I.M., KHALIL, H.S. (1988). Determination of atenolol combinations with hydrochlorothiazide and chlorthalidone in tablet formulations by reverse-phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **11(8)**: 1673-1696.
- SATANA, E., ALTINAY, S., GOGER, N.G, OZKAN, S.A., 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)**: 1009-1013.
- SHAIKH, B., RUMMEL, N. (1998). Liquid chromatographic determination of chlorothiazide and hydrochlorothiazide diuretic drugs in bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 1039-1043.
- SHETKAR, P.B., SHINDE, V.M. (1997). Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by reversed phase HPLC. *Anal. Lett.* **30(6)**: 1143-1152.
- SHI, R.J.-Y., BENET, L.Z., LIN, E.T. (1986). High-performance liquid chromatographic assay of basic amine drugs in plasma and urine using a silica gel column and an aqueous mobile phase. *J. Chromatogr.* **377**: 399-404.
- SHIMADA, K., TANAKA, M., NAMBARA, T., IMAI, Y., ABE, K., YOSHINAGA, K. (1982). Determination of captopril in human blood by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **227**: 445-451.
- SHIU, G.K., PRASAD V.K., LIN, J., WORSLEY, W. (1986). Simple and selective high-performance liquid chromatographic method for the determination of hydrochlorothiazide in urine. *J. Chromatogr.* **377**: 430-435.
- SOMOGYI, A., KEAL, J., BOCHNER, F. (1988). Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for determination of

amiloride in biologic fluids using an ion-pair extraction method. *Therapeutic Drug Monitoring*. **10**: 463-468.

STEWART, J.T., CLARK, S.S. (1986). Liquid chromatographic determination of guanethidine salts and hydrochlorothiazide using electrochemical detection and ion-pair techniques. *J. Pharm. Sci.* **75(4)**: 413-415.

The United States Pharmacopeia XXIII. 1995.

TORAL, M.I., POPE, S., QUINTANILLA, S., RICHTER, P. (2002). Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. *Int. J. Pharm.* **00**: 1-10.

VAN DER MEER, M.J., BROWN, L.W. (1987). Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **423**: 351-357.

VIDAL, J.L.M., GARCIA, M.D.G., GALERA, M.M., FRENICH, A.G. (1997). Comparison of multicomponent determination of iprodine, procymidone and chlorothalonil by partial least-squares modeling using spectrophotometric and high-performance data. *Anal. Lett.* **30(13)**: 2409-2432.

WAHBI, A.A.M., EL-YAZBI, F.A., BARARY, M.H., SABRI, S.M. (1992). Derivative spectrophotometric analysis of two-component mixtures using a compensation technique. *Analyst.* **117**: 785-789.

WEINBERGER, R., PIETRANTONIO, T. (1983). Fully automated liquid chromatographic system for the determination of hydrochlorothiazide in blood plasma and sera. *Anal. Chim. Acta.* **146**: 219-226.

YAMAZAKI, M., ITO, Y., SUZUKA, T., YAGINUMA, H., ITOH, S., KAMADA, A., ORITA, Y., NAKAHAMA, H., NAKANISHI, T., ANDO, A. (1984). Biopharmaceutical studies of thiazide diuretics. II.¹⁾ High-performance liquid chromatographic method for determination of hydrochlorothiazide in plasma, urine, blood cells and bile. *Chem. Pharm. Bull.* **32(6)**: 2387-2394.

YIP, M.S., COATES, P.E., THIESSEN, J.J. (1984). High-performance liquid chromatographic analysis of amiloride in plasma and urine. *J. Chromatogr.* **307**: 343-350.

ZHANG, X.R., BAEYENS, W.R.G., VAN DER WEKEN, G., CALOKERINOS, A.C., NAKASHIMA, K. (1995). Chemiluminescence determination of captopril based on a Rhodamine B sensitized cerium(IV) method. *Anal. Chim. Acta.* **303**: 121-125.



ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Denizli’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Ankara’da tamamladım. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans öğrenimime başladım ve 2000 yılında mezun oldum. 2000 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans programına başladım. 2001 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.

