

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TELMİSARTAN VE HİDROKLOROTİAZİT'İN  
YPSK YÖNTEMLERİ İLE AYNI ANDA ANALİZİ**

**Tuğba KUTUCU**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

**2008 – ANKARA**

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Angiotensin - II Reseptör Antagonistler (Sartanlar)	4
1.2. Telmisartan ve Hidroklorotiazit Hakkında Genel Bilgi	10
1.2.1. Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in Kimyasal Yapısı	12
1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri	13
1.3. Çalışmanın Amacı	14
1.4. Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in Analiz Yöntemleri	15
1.4.1. Sıvı Kromatografisi ve Kütle Spektrofotometrisi	15
1.4.2. Kapiler Elektroforez	15
1.4.3. Spektrofotometri	16
1.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	18
1.5. Kromatografi	22
1.5.1. Adsorpsiyon Kromatografisi	25
1.5.2. İyon Çifti Kromatografisi	26
1.5.3. İyon Değişirme Kromatografisi	26
1.5.4. Eleme Kromatografisi	27
1.5.5. Dağılma Kromatografisi	28
1.5.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi(YPSK)	33
1.6. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)	57
1.6.1. Validasyonun Genel İşlemleri	58
1.6.2. Tipik Validasyon Parametreleri	59
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>70</b>
2.1. Kimyasal Maddeler	70
2.2. Cihazlar	70
2.3.. Cam ve Diğer Malzemeler	70
2.4. Çözeltilerin Hazırlanması	72

2.5.	YPSK Yöntemi	74
2.5.1.	Deneyin Yapılışı	74
2.5.2.	YPSK Yönteminin Optimizasyonu	74
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>75</b>
3.1.	Standart Maddelerin Saflık Kontrolleri	75
3.1.1.	IR Spektroskopisi	75
3.2.	Telmisartan ve Hidroklorotiazit Dalgaboyu Taraması	77
3.3.	Geliştirilen YPSK-UV/GB Dedektör Yöntemine Ait Analiz Bulguları	79
3.3.1.	YPSK Sistemi Optimizasyonu	79
3.3.2.	Telmisartan ve Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB Dedektör ile Yönteminin Analiz Validasyonu	87
3.3.2.1.	Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık	87
3.3.2.2.	Sentetik Karışım	91
3.3.2.3.	Dozaj Formlarına Uygulama ve Geri Kazanım	92
3.3.2.4.	Doğruluk ve Kesinlik	95
3.3.2.5.	Cihaz Tekrarlanabilirliği	97
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>98</b>
	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>104</b>
	<b>ÖZET</b>	<b>106</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>107</b>
	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>108</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>114</b>

## ÖNSÖZ

Telmisartan anjiyotensin II (Tip1) reseptör blokörü ve Hidroklorotiazit’de tiazit grubu diüretik ilaçlar grubunda yer alan antihipertansif etkili ilaçlardır. Bu iki ilacın birlikte kullanımı daha etkin bir tedaviyi sağlamaktadır. Tez kapsamında bu ikili ilaç karışımının aynı anda analizi için en uygun kolon ve hareketli faz kompozisyonu ve akış hızının etkisi incelenmiş ve yeni, basit, hızlı, duyarlı ve seçici bir analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemin bu maddelerin dozaj formlarından aynı anda analizine uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve yüksek lisans tezim boyunca başta saygı değer hocalarıma olmak üzere Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D.’nin tüm personeline teşekkür ederim. Bu sebeple başta danışman hocam, Prof.Dr.Sibel A. Özkan’a yüksek lisans eğitimim boyunca bana göstermiş olduğu yakın ilgi ve alakasından ötürü, yüksek lisans tezimin her aşamasında yararlandığım tecrübesinden ve çalışmalarımın bilimsellik dahilinde yürümesi için faydalandığım, engin bilgisinden ötürü teşekkür ederim. Değerli hocalarım, Prof.Dr.Feyyaz Onur’a, Doç.Dr.Bengi Uslu’ya, Doç.Dr.Erdal Dinç’e ve Prof.Dr.Nevin Erk’e vermiş oldukları bilgiler için sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Çalışmalarım boyunca benden desteğini esirgemeyen ve bu çalışmanın yapılması için gerekli imkanı veren, başta Prof.Dr. Fethi Şahin ve Prof.Dr. Serdar Ünlü olmak üzere, Kim. Rıdvan Sert’e ve Uzm.Ecz.Berna Ökçelik Erdoğan’a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan başta Sevgili Babama ve tüm aileme, her fırsatta bana güvenini ve sevgisini gösteren, hayatımı paylaşan dostlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

$\alpha$	Seçicilik
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
$k'$	Kapasite faktörü
T	Telmisartan
H	Hidroklorotiazit
I	İrbesartan
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
N	Eşdeğer teorik tabaka sayısı
$N_{et}$	Etkin eşdeğer teorik tabaka sayısı
PSO	Pik simetri oranı
R	Ayırıcılık
r	Korelasyon katsayısı
$r^2$	Tanımlayıcılık katsayısı
SS	Standart sapma
BSS	Bağıl Standart sapma
t	Alıkonma zamanı
UV/GB	Ultraviyole/Görünür bölge
IR	Kızıl Ötesi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi

## ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1. Telmisartanın Yapısı	12
Şekil 1.2. Hidroklorotiazitin Yapısı	12
Şekil 1.3. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi	23
Şekil 1.4. Kromatografik sistemin sınıflandırılması	24
Şekil 1.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kısımları	34
Şekil 1.6. Tek vuruşlu şırınga sabit hacim pompası	36
Şekil 1.7. İki pistonlu diyafram pompası	37
Şekil 1.8. Tek pistonlu pompa	38
Şekil 1.9. Pnömatik yükseltici pompa	38
Şekil 1.10. Çift ışın yollu bir UV/GB dedektörü	45
Şekil 1.11. Floresans dedektör	47
Şekil 1.12 YPSK yöntemiyle elde edilen kromatogram	49
Şekil 1.13. Ayırıcılığın piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi ( $\sigma$ :sabit)	53
Şekil 1.14. Seçiciliğin ayırıcılık üzerine etkisi	54
Şekil 1.15. Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi	55
Şekil 1.16. Alıkonma zamanı ve pik şekline etkisi	56
Şekil 1.17. Teşhis sınırını hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli	64
Şekil 1.18. Tayin alt sınırı hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli	65
Şekil 1.19. Kalibrasyon doğrusu (grafiği) ve eşitliği	67
Şekil 3.1. Telmisartanın IR spektrumu	75
Şekil 3.2. Hidroklorotiazitin IR spektrumu.	76
Şekil 3.3. Telmisartanın 80 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltilisinin UV/GB spektrumu	77
Şekil 3.4. Hidroklorotiazitin 12,5 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltilisinin UV/GB Spektrumu	78
Şekil 3.5. ACE 5 C18 4.6x250 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 4µg/ml derişiminde Telmisartan ve 0,03 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit (Alıkonma zamanı 2.800 olan pik Hidroklorotiazit, 8.639 olan pik ise Telmisartan pikidir).	80
Şekil 3.6. Inertsil ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 4µg/ml derişiminde Telmisartan ve 0,06 µg/ml derişiminde	

Hidroklorotiazit (Altkonma zamanı 2.867 olan pik Hidroklorotiazit, 14.718 olan pik ise Telmisartan pikidir).	80
Şekil 3.7. Asetonitril oranının % 44 (hacimce) olduğu kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	82
Şekil 3.8. Asetonitril oranının % 45 (hacimce) olduğu kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	82
Şekil 3.9. Asetonitril oranının % 46 (hacimce) olduğu kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	83
Şekil 3.10. Hareketli faz akış hızının 1.0 ml/dk olduğu kromatogram ; 4µg/ml derişiminde Telmisartan , 0,06 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	84
Şekil 3.11. Hareketli faz akış hızının 2,0 ml/dk olduğu kromatogram ; 4µg/ml derişiminde Telmisartan , 0,06 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	84
Şekil 3.12. İç standart olarak Losartanın kullanıldığı kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 20 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde Losartan	85
Şekil 3.13. İç standart olarak İrbesartanın kullanıldığı kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	85
Şekil 3.14. Sistem uygunluk parametrelerinin hesaplandığı kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	86
Şekil 3.15. Telmisartan analizi için doğrusal aralık	88
Şekil 3.16.Hidroklorotiazit analizi için doğrusal aralık	89
Şekil 3.17. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren Micardis Plus (80+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kromatogram; 80µg/ml derişiminde Telmisartan, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan	93

## ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Katyon ve Anyon Değişiriciler	27
Çizelge 1.2. Eleme kromatografisinde kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri	28
Çizelge 1.3.Çözücülerin fiziksel özellikleri	30
Çizelge 1.4. Ters ve Normal-faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması	31
Çizelge 1.5. Ters ve Normal-faz sıvı kromatografide kullanılan sabit ve hareketli fazlar	32
Çizelge 3.1. Sistem Uygunluk Parametreleri.	86
Çizelge 3.2. Telmisartanın YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait eğrisi kalibrasyon özellikleri (n=16).	89
Çizelge 3.3. Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisi özellikleri (n=16)	90
Çizelge 3.4. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren sentetik karışımın dedektörü YPSK-UV/GB ile analizi yöntemine ait % geri kazanım sonuçları	91
Çizelge 3.5. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren Micardis Plus (80+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait bulgular (n=5)	92
Çizelge 3.6. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren Micardis Plus (80+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait % geri kazanım sonuçları (n=5)	94
Çizelge 3.7. Telmisartanın YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları	95
Çizelge 3.8. Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine ait günler arası gün içi ve kesinlik ve doğruluk analizi bulguları	96
Çizelge 3.9. Telmisartanın YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine cihaz tekrarlanabilirliği analiz bulguları	97
Çizelge 3.10. Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine cihaz tekrarlanabilirliği analiz bulguları	97

## 1. GİRİŞ

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

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

Hipertansiyon kalbi zorlayarak kalp yetmezliğine de neden olabilir. Üstelik ateroskleroz ve bunun yol açabileceği iskemik kalp hastalığı (belli bir bölgede kan

akımının kesilmesi nedeniyle oluşan geçici kansızlık sonucu dokuların hava alamaması) riskini de önemli ölçüde artırır. Buna ek olarak; hipertansiyonlu hastalar kanama ve beyindeki kan damarlarının pıhtıyla tıkanması olayına diğerlerinden daha kolay yakalanırlar. Hipertansiyon ayrıca koroner arter hastalığına da büyük katkıda bulunur ki, bu hastalık sanayileşmiş toplumlarda ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bütün bu olgular tedavi edilmeyen hipertansiyonun sonuçları olup, hipertansiyona bağlı morbidite (hastalık) veya mortalite (ölüm) büyük bir bölümünü oluşturur.

Hipertansiyon, nedenine göre 2 grupta sınıflandırılabilir.

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

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

Tedavi üç grupta incelenebilir.

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

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

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

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

### 1.1. Angiotensin - II Reseptör Antagonistler (Sartanlar) :

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

Güçlü vazokonstriktif angiotensin II'nin (AT II) AT<sub>1</sub> reseptöre yapışmasını önleyerek etki gösterirler. Bradikinin üzerine ACE-inhibitörleri gibi etkileri yoktur.

Arteriyel hipertansiyon sol ventrikül hipertrofisinin önemli nedenlerinden birisidir. Hipertansiyonun sol ventriküle olan etkisi oldukça karmaşık olup bazı hipertansif hastalarda sol ventrikül kitlesi artarken bazılarında ise normal kalmaktadır. Arteriyel hipertansiyonda sol ventrikül hipertrofisinin, anjiyotensin II reseptörlerinin uyarılmasına bağlı olarak oluştuğu söylenmektedir. Basınç yüklenmesinin kardiyovasküler sistemde oluşturduğu ilk etki ventriküler hipertrofik değişimlerdir. Renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) aktif hormonu, ACE (anjiyotensin dönüştürücü enzim) etkisiyle AT<sub>1</sub>' den meydana getirilen AT II'dir. Anjiyotensin II, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin en önemli vazoaktif hormonudur ve hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler bozuklukların fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar. AT II reseptör antagonistleri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. ACE inhibitörlerine benzer antihipertansif etkinliğe ve düşük bir yan etki potansiyeline sahiptirler. AT<sub>1</sub> reseptörlerini seçici ve yarışmalı olarak bloke ederler. Anjiyotensin II çeşitli dokuların hücre membranlarındaki spesifik reseptörlere bağlanır. Ayrıca vücutta sodyum tutulmasını ve aldosteron salgılanmasını teşvik eder. Anjiyotensin II'nin vazokonstrüksiyon, aldosteron salınımının uyarılması, tuz ve su dengesinin düzenlenmesi ve hücre büyümesinin uyarılması gibi temel fizyolojik etkileri tip I reseptörü (AT<sub>1</sub>) aracılığıyla olur (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2008).

**Valsartan**

Valsartan, oral yolla alındığı zaman aktif olan, spesifik bir anjiotensin II (AT II) reseptör antagonistidir. Özellikle AT<sub>1</sub> reseptör alt-tipi üzerinde seçici bir etki gösterir. AT<sub>1</sub> reseptöründe hiçbir kısmi agonist etkisi olmayan valsartanın bu reseptöre olan afinitesi, AT II reseptörüne olan etkisinin yaklaşık 20 000 katıdır. Valsartan, aynı zamanda kininaz II adıyla da bilinen, AT<sub>1</sub>'i anjiotensin II'ye dönüştüren ve bradikinini parçalayan bir enzim olan “anjiotensin dönüştürücü enzimi” (ACE) inhibe etmez. Valsartan, diğer hormon reseptörlerine veya kardiyovasküler düzenlemede önemli oldukları bilinen iyon kanallarına bağlanmaz ya da onları bloke etmez. Hipertansiyon hastalarına valsartan verilmesi sonucunda, nabız sayısı değişmez ve kan basıncı azalır. Hastaların çoğunda antihipertansif etki, bir tek oral dozun alınmasından sonraki 2 saat içerisinde başlar ve 4-6 saat içerisinde en yüksek düzeye ulaşır. Antihipertansif etki dozun verilmesinden sonra 24 saat boyunca devam eder. Tekrarlanan dozlar kullanıldığı zaman, maksimal kan basıncı azalması, hangi doz kullanılırsa kullanılsın genellikle 2-4 hafta içerisinde elde edilir ve uzun süreli tedavi sırasında aynı şekilde devam eder. Valsartanın hidroklorotiazit ile birlikte kullanılması, kan basıncında önemli bir ilave azalma sağlar. Ağızdan alınan valsartan hızla emilir, ancak emilen miktar çok değişik olabilir. Valsartan içeren Diovan® için ortalama mutlak biyoyararlanım %23'tür.

Ödem, asteni, uykusuzluk, deri döküntüsü, libido azalması, baş dönmesi tesbit edilebilen yan etkileridir. Valsartan plazma proteinlerine güçlü bir şekilde bağlandığından, hemodiyaliz yoluyla vücuttan uzaklaştırılmaz.

**Kandesartan Sileksetil**

Kandesartan sileksetil oral kullanıma uygun bir ön ilaçtır. Gastro-intestinal kanaldan emilimi sırasında ester hidrolizi sonucu hızla, aktif formu olan kandesartana dönüşür. Kandesartan, AT<sub>1</sub> reseptörlerine selektif olarak sıkı bağlanan ve yavaş ayrılan, bir anjiotensin II reseptör antagonistidir. Agonist aktivitesi yoktur. Kandesartan,

anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye çeviren ve bradikinini parçalayan ADE'i (anjiyotensin dönüştürücü enzim) inhibe etmez. Kandesartan, diğer hormon reseptörlerine veya kardiyovasküler regülasyonda önemli olduğu bilinen iyon kanallarına bağlanmaz veya bloke etmez. Anjiyotensin II reseptörleri antagonizması, plazma renin düzeylerinde, anjiyotensin I ve anjiyotensin II düzeylerinde doza bağlı artışlara ve plazma aldosteron derişiminde de düşüşe sebep olur. Kandesartan, hipertansiyon tedavisinde, arteriyel kan basıncında uzun etkili ve doza bağlı bir düşüş sağlayarak etki gösterir. Antihipertansif etkisi, kalp hızında refleks artışa neden olmadan sistemik periferik direnci azaltmasına bağlıdır. Tek dozluk kullanımı takiben, antihipertansif etki genellikle 2 saat içinde başlar. İlaç herhangi bir dozda devamlı kullanıldığında, kan basıncındaki düşüşün büyük bir kısmı genellikle 4 hafta içinde elde edilir ve uzun süreli tedavi ile kan basıncındaki bu seviye devam ettirilir. Dozaj formu olan Atacand®'ın günde tek doz kullanımı, kan basıncında 24 saat boyunca etkili ve düzgün bir azalmaya neden olur. Atacand®, hidroklorotiazit ile birlikte kullanıldığında aditif antihipertansif etki ortaya çıkar. Kandesartan, hidroklorotiazit ya da amlodipin ile birlikte kullanıldığında iyi tolere edilmiştir. Oral uygulandıktan sonra, kandesartan sileksetil ilacın aktif formu olan kandesartana dönüşür. Oral kandesartan sileksetil solüsyonunun alınmasından sonra kandesartan'ın mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %40'tır. Aynı oral solüsyon ile karşılaştırılan tablet formunun bağıl biyoyararlanımı, yaklaşık %34'dür. Dolayısıyla tabletin mutlak biyoyararlanımı %14'dür. Tablet alınmasından sonra en yüksek serum derişimine (Cmax) 3-4 saat'te ulaşılır. Kandesartan esas olarak idrar ve safra yoluyla değişmeden atılır, çok küçük bir kısmı karaciğerde metabolize edildikten sonra atılır. Kandesartan'ın yarılanma süresi yaklaşık 9 saattir. Tekrarlanan dozlardan sonra birikme özelliği göstermez.

### **Losartan**

Losartan bir non-peptid angiotensin II reseptör antagonistidir. Losartan vücutta dönüştüğü aktif metaboliti ile birlikte selektif olarak AT<sub>1</sub> reseptörlerine bağlanarak angiotensin II'nin vazokonstriktör ve aldosteron salgılatıcı etkilerini bloke eder ve bu yolla antihipertansif etki gösterir. Gerek losartan gerek onun aktif ana metabolitinin

AT<sub>1</sub> reseptörlerinde parsiyel agonist aktivitesi yoktur. In vitro araştırmalarda losartanın AT<sub>1</sub> reseptörleri için geri dönüşümlü ve kompetitif bir inhibitör olduğu, aktif metabolitinin ise geri dönüşümlü ve non-kompetitif inhibitör etki gösterdiği ve losartana göre ağırlıkça 10-40 kat daha aktif olduğu gösterilmiştir. Renin-angiotensin-aldosteron sisteminin, kan basıncı, kan hacmi ve sodyum iyonunun kontrol ve regülasyonunda önemli fonksiyonu vardır. Hipotansiyon, hipovolemi ve hiponatremi bu sistemi aktive eder. Renin sekresyonu artar, renin kandaki angiotensinojeni angiotensin I'e dönüştürür, bu da ACE (kininase II) ile AT II'ye dönüşür. AT II damar düz kaslarında kontraksiyon yapar, kan basıncını arttırır, aldosteron ve vazopressin salıverilmesini stimüle eder, sempatik sistemi stimüle eder, susuzluk hissini arttırır, AT II'nin bütün bu fizyolojik etkileri losartan ve aktif metaboliti tarafından inhibe edilir. Angiotensin vücuttaki fizyolojik etkilerini AT<sub>1</sub> reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. Bütün angiotensin II reseptörlerinin yaklaşık % 30'unu oluşturan AT II reseptörlerinin kardiyovasküler sistemdeki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Losartan ve aktif metaboliti, AT<sub>1</sub> reseptörleri için yüksek derecede selektivite gösterir. Bunların AT<sub>1</sub> reseptörlerine ilgisi, AT II reseptörlerine göre 1000 kat fazladır. Terapötik dozlarda losartan verilmesinden sonra kan basıncı düşer, renin ve angiotensin II seviyeleri yükselir, aldosteron azalır, potasyum değişmez. Böbrekte glomerular filtrasyon hızı ve filtrasyon fraksiyonu değişmez, renal plazma akımı artar, plazma lipid profili değişmez. Glukoz tüketim indeksi ve insülin sensitivitesi yükselir, ürikozürik etki görülür. ACE inhibitörleri ile karşılaştırmalı bir araştırmada losartanın öksürüğe neden olmadığı gözlenmiştir. Losartan, hipertansiyonlu hastaların tedavisinde en az ADE inhibitörleri, dihidropiridin kalsiyum antagonistleri ve beta-adrenerjik blokörler kadar etkilidir. Hidroklorotiazit ile kombine olarak verildiğinde dozu titre ederek kan basıncını istenilen seviyeye kadar düşürmek mümkündür. Losartan ağız yoluyla iyi absorbe olur, karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Sistemik biyoyararlılığı yaklaşık % 33'tür. Absorbe olan losartanın % 14'ü aktif metabolite dönüşür. Ortalama doruk plazma derişimleri losartan için 1 saatte, metabolit için 3-4 saatte oluşur ve bunlar yaklaşık birbirinin aynıdır. Losartan yemekten sonra alınırsa absorbsiyonu yavaşlar. Losartan ve metaboliti plazma proteinlerine (başlıca albümine) yüksek oranda bağlanır. Serbest plazma fraksiyonu losartan için % 1,3; metaboliti için % 0,2'dir.

Losartanın serebrospinal sıvıya geçişi çok azdır. Losartan, aktif karboksilik asit metabolitinin yanı sıra birçok inaktif metabolite de dönüşür. Bunu P450 2C9 ve 3A4 enzim sistemleri sağlar. Normal kimselerde losartanın % 14'ü metabolitlere dönüşür (O'Neil, 2001; Sweetman, 2007; Duplay, 2007; RxMediapharma, 2008).

### **Olmesartan Medoksomil**

Olmesartan medoksomil, kuvvetli, oral yoldan etkili, seçici bir anjiyotensin II reseptör (tip AT<sub>1</sub>) antagonistidir. ATII'nin kaynağı veya sentez yolundan bağımsız olarak AT<sub>1</sub>'in aracılık yaptığı bütün AT II etkilerini bloke ederek etkimesi beklenmektedir. Anjiyotensin II reseptörlerinin seçici olarak antagonizmi, plazma renin seviyelerinde ve anjiyotensin I ve II derişimlerinde yükselmelerle ve plazma aldosteron derişimlerinde bir miktar azalmayla sonuçlanmaktadır. AT II, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin primer vazoaktif hormonudur ve AT<sub>1</sub> reseptörü yoluyla hipertansiyon fizyopatolojisinde anlamlı bir rol oynamaktadır. Hipertansiyonda, Olmesartan, arteriyel kan basıncında doza bağılı, uzun süre devam eden bir azalmaya neden olmaktadır. Olmesartan günde tek doz ile, 24 saatlik doz aralığı boyunca kan basıncında etkili ve düzgün bir azalma sağlamaktadır. Günde tek doz kullanım, aynı günlük dozda günde 2 kez kullanım ile kan basıncında benzer azalma meydana getirir. Sürekli tedaviyle, kan basıncını düşürme etkisinin önemli bir kısmı 2 haftalık tedaviden sonra gözlenebilmekteyse de, kan basıncında maksimum azalmalara tedaviye başlandıktan 8 hafta sonra ulaşılmaktadır. Hidroklorotiazit ile birlikte kullanıldığında kan basıncındaki ek bir azalma etkisi olmaktadır ve birlikte kullanılmaları iyi tolere edilmektedir. Olmesartan medoksomil bir ön ilaçtır. Barsak mukozasındaki ve gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu sırasında portal kan içindeki esterezlarla hızla farmakolojik olarak aktif metabolite olan olmesartana dönüşmektedir. Plazmada veya ifrazatta hiç bir tam olmesartan medoksomil veya tam medoksomil grubu yan zinciri tespit edilmemiştir. Tablet formülasyonundan olmesartanın ortalama mutlak biyoyararlanımı %25,6'dır. Olmesartan medoksomil'in oral dozundan 2 saat kadar sonra olmesartanın ortalama pik plazma derişimine (C<sub>max</sub>) ulaşılmaktadır. Olmesartan plazma proteinine yüksek

ölçüde bağlanmaktadır (%99,7). Birden fazla oral dozdan sonra olmesartanın terminal eliminasyon yarı ömrü 10-15 saat arasında değişmiştir.

### **Eprosartan Mesilat**

Anjiotansin II reseptör antagonisti antihipertansif eprosartan anjiyotensin II (Tip 1) reseptör blokörüdür. Eprosartan da Angiotensin II reseptör antagonistlerinden olup AT<sub>1</sub> reseptörlerini selektif olarak bloke eden güçlü ve uzun etkili nonpeptid ajandır. Eprosartan da diğer bu grup ilaçlar gibi etkisini, ekstrensek AT II dışında, intrinsek ATII'nin de etkilerini bloke ederek gösterirler. Renin Anjiotensin aktivitesini düşürücü etkileri yanında sempatikolitik ve antiproliferatif etkisi de vardır. Losartan ve Valsartandan sonra çıkarılan üçüncü anjiotensin II grubu antagonistidir. Anjiyotensin dönüştürücü enzimi inhibe etmez bu nedenle bradikinin birikimine de yol açmaz. Oral yoldan kullanılır. Absorbsiyonu oldukça hızlıdır. Aç karnına alındığı zaman maksimum derişimine 1-2 saat içerisinde ulaşılır. Biyoyararlanımı yaklaşık %13'tür. Plazma proteinlerine %98 oranında bağlanır. Safra ve idrarla atılır. Eliminasyon yarı ömrü 5-9 saat arasındadır. Hastada kararlı konumuna 4 günde ulaşır.

## 1.2. Telmisartan ve Hidroklorotiazit Hakkında Genel Bilgi

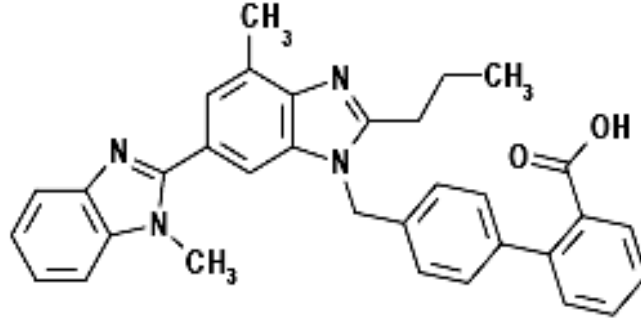
Telmisartan yağda çözülebilen, tetrazol yapısı taşımayan anjiyotensin II (Tip1) reseptör blokörüdür. Aynı gruptaki Valsartan ve Losartan'a benzemektedir. Telmisartan'ın AT<sub>1</sub> reseptör alt tipine olan ilgisi AT II reseptör alt tipine olan ilgisine göre çok daha fazladır. Telmisartan, AT II'nin etkilerini insüline duyarlılığı artıran ilaçların hedefi olan peroksizom proliferatörünce aktive edilen reseptör- $\gamma$ 'yı aktive ettiği gösterilmiştir (PPAR- $\gamma$ ). Antihipetansif etkisinin yanında, insülin duyarlılığını da artırarak, hipertansiyon oluşum mekanizması, hedef organ hasarı ve mortalite, morbiditede önemli rol oynayan lipid ve glüköz metabolizması üzerine olumlu etkisi bulunur. Telmisartan da, Anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye çeviren ve bradikinini parçalayan ADE'i (anjiyotensin dönüştürücü enzim) inhibe etmez. Bradikinin, P maddesi ve ADE üzerine etkisi yoktur. Diğer hormon reseptörlerine veya kardiyovasküler regülasyonda önemli olduğu bilinen iyon kanallarına bağlanmaz veya bloke etmez. Anjiyotensin II reseptörleri antagonizması, plazma renin düzeylerinde, anjiyotensin I ve anjiyotensin II düzeylerinde doza bağlı artışlara ve plazma aldosteron derişiminde de düşüşe sebep olur. Telmisartan, diğer benzeri ilaçların moleküllerinden daha kuvvetli biçimde kalp, karaciğer ve böbreklerde bulunan AT<sub>1</sub> reseptörlerine bağlanarak uzun süre koruma sağlar. Kanda bulunan ve vücuttaki kan basıncını arttıran AT II hormonunu daha etkili baskıladığı için daha uzun süreli etki göstermektedir. Yapılan çalışmalar Telmisartan'ın 35 saat etki yapabildiği için hipertansiyon hastalarında görülen sabah kalp krizi riskini azalttığı yönündedir(RxMediapharma, 2008; Sweetman, 2007).

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

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

### 1.2.1. Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in Kimyasal Yapısı

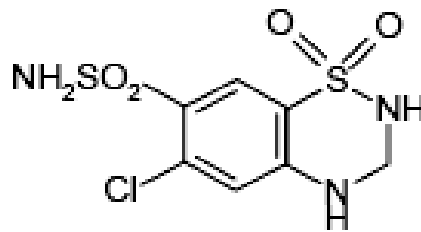
Telmisartan nonpeptit bir moleküldür ve açık formülün okunuşu; 4'-[(1,4'-dimetil-2'-propil[2,6'-bi-1H-benzimidazol]-1'-yl)metil]-[1,1'-bifenil]-2-karboksilik asit şeklindedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Telmisartanın Yapısı

Telmisartan sarımsı renkte bir katıdır ve molekül ağırlığı 514,63'tür. Pratikte suda çözünmez, pH değeri 3 ile 9 arasındadır. Kapalı formülü  $C_{33}H_{30}N_4O_2$ 'dir. Kuvvetli bazlarda çözünür.

Hidroklorotiazit beyaz renkte, kokusuz, kristal yapıda bir maddedir ve molekül ağırlığı 297,74'dür. Suda çözünürlüğü az, fakat sodyum hidroksitte çözünürlüğü yüksektir. Açık formülünün okunuşu; 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazidin-7-sulfonamid 1,1-dioksit şeklindedir (Şekil 1.2). Kapalı formülü  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$  'dir.



Şekil 1.2. Hidroklorotiazitin Yapısı

### 1.2.2. Farmakokinetik Özellikleri

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

Hidroklorotiazitin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu verildiği farmasötik şekle ve verilen doza bağılı olarak değişkenlik gösterir. Sistemik biyoyarlanımı yaklaşık %50-60'tır. Etkisi oral yolla verildikten 2 saat sonra başlar ve doruk etki düzeyine 4 saatte ulaşır. Toplam etki süresi 6-12 saattir. Hidroklorotiazit plasentayı aşmasına rağmen kan-beyin engelini aşamaz. Anne sütüne geçebilir. Hidroklorotiazit metabolize olmaz ve esas olarak idrarla değişmeden atılır; verilen dozun %61'i 24 saatte elimine olur.

### 1.3. Çalışmanın Amacı:

Bu çalışmada, telmisartan ve hidroklorotiazitin aynı anda kromatografik tayini için basit, hızlı, duyarlı ve doğru bir yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemlerin farmasötik dozaj formlarından analizi için uygulanması amaçlanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ve kromatografik sistemde kullanılan Ultraviyole/Görünür Bölge (UV/GB) dedektörü ile uygun bir ayırımın sağlanabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonu ve meydana getirilen bu şartlarda telmisartan ve hidroklorotiazitin plazma içerisinde tayinine uygulanması amaçlanmıştır.

Bu nedenle telmisartan ve hidroklorotiazitin plazma içerisinde tayini için geliştirilecek yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla yöntem validasyonu uygulanacak, yapılan analizlerin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilecektir. Geliştirilen yöntemin duyarlılık, doğruluk, kesinlik, aralık ve doğrusallık, cihaz tekrarlanabilirliği, tekrarlanabilirlik, sağlamlık, özgünlük, tutarlılık, mutlak ve bağıl geri kazanım, gerçek numunelerin analizine uygulanabilirlik gibi parametreleri değerlendirilecek, sistem uygunluğu testleri gerçekleştirilecektir.

## **1.4. Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in Literatürde Yer Alan Tayin Yöntemleri**

### **1.4.1.Sıvı Kromatografisi ve Kütle Spektrofotometrisi**

Chen ve ark. (2005) telimsartanı insan plazmasında tayin edebilmek için sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometrisi yöntemini geliştirmişlerdir. Öncelikle 0,1 ml plazmadaki proteinler metanol ile çöktürülmüş, daha sonra santrifüj edilerek plazma proteinlerini ayırmış ve metanolü uçurmuşlardır. Hareketli faz olarak 10 mM amonyum asetat:asetonitril (58:42, h/h) ve % 0,2 asetik asit karışımını 0,2 ml/dk akış hızıyla kullanmışlardır. Numuneler tekrar bu hareketli faz içerisinde çözülmüştür. İç standart olarak valsartanın kullanıldığı bu yöntemde, kolon olarak Hypersil-Keystone C18 seçilmiştir. Ölçümler, pozitif seçici iyon gösterim modunda elektrosprey iyon kaynağıyla yapılmıştır. Tayin sınırı 0,001 µg/ml bulunmuştur.

### **1.4.2. Kapiler Elektroforez**

Zhang, M., ve ark. (2006), kapiler elektroforez yöntemini insan idrarlarındaki antiotensin II reseptör antagonistlerin kantitatif tayinleri için kullanmışlardır. Bu yöntemde polimonolitik kapiler kullanmışlardır. Yöntemde doğrusal çalışma aralığını 0,08-3,00 µg/ml, alt tayin sınırını ise 0,015-0,020 µg/ml olarak belirlemişlerdir.

Gonzales, L., ve ark. (2002), telmisartan, irbesartan, losartan, valsartan ve eprosartan için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde % 5'lik metanol ile 5 mM potasyum dihidrojen fosfat, borik asitle 25:75 (h/h)(pH=5.0) oranında karıştırıp kullanılmıştır.

Hillaert, S., ve ark. (2002), losartan, telmisartan, eprosartan, valsartan, irbesartan ve kandesartan için kapiller zon elektroforez yöntemiyle validasyon ve optimizasyon

işlemlerini uygulamışlardır. Yöntemde 60 mM sodyum fosfat tamponu (pH=2,0) kullanmışlardır.

Hillaert, S., ve ark. (2003), telmisartan ile altı antijiyotensin-II-reseptör antagonistleri ve hidroklorotiazitin kantitatif tayini için kapiler zon elektroforez ve miseller elektrokinetik kapiler kromatografik yöntemlerini geliştirmişlerdir. Her iki yöntemin uygulamasında da validasyon parametreleri kullanılmış ve yöntemler valide edilmiştir.

### 1.4.3. Spektrofotometri

Bebawy ve ark. (2005), hidroklorotiazit ve telmisartanın kantitatif analizleri için dört yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden ilki türev spektrofotometrisidir. Yöntemde karışım içerisindeki telmisartan ve hidroklorotiazitin analizi için sırasıyla 241,6 ve 227,6 nm dalga boylarındaki türev absorbans değerlerinin ölçümleri kullanılmıştır. Spektrum oranları türev yönteminde telmisartan için 242,7nm'de ve hidroklorotiazit için 274,9 nm'deki sinyal genlikleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. İki etken maddenin İTK ile ayırımından sonra sırasıyla telmisartan ve hidroklorotiazit için 295 ve 225 nm'deki dansiyometrik ölçümler ile kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir.

Panderi ve ark. (1999), farmasötik tabletlerdeki benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazitin miktarlarını aynı anda tayin etmek için 2.dereceden türev spektrofotometriyi kullanmışlardır. Bu yöntemde hidroklorotiazit varlığında benazepril hidroklorürün miktar tayinini 253,6 ve 282,6 nm'deki 2.dereceden türev absorbans değerlerini ölçerek, hidroklorotiazitin miktar tayinini ise 282,6 nm'deki absorbans değerlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Doğrusal çalışma aralığı hidroklorotiazit için 18,50-42,20 µg/ml olarak saptanmıştır.

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

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

Magri ve ark. (1995), hidroklorotiazit ve fosinoprilin aynı anda miktar tayini analizlerini çoklu dalgaboyu UV spektrofotometri yöntemiyle yapmışlardır. Bu yöntemde optimum dalga boyu aralığını 210-240 nm olarak belirlemişlerdir.

Şatana ve ark. (2001), farmasötik tabletlerdeki hidroklorotiazit ve valsartan karışımının miktar tayinini 1. türev spektrofotometrisi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemi YPSK yöntemi ile karşılaştırarak doğrulamışlardır. Yöntemde sırasıyla hidroklorotiazit ve valsartan için 335 nm ve 270,6 nm'deki türev absorbans değerleri kullanılmıştır.

Salem ve ark. (1991) hidroklorotiazit-spirolakton, hidroklorotiazit-kaptopril, hidroklorotiazit-furosemid karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin aynı anda miktar tayinlerini türev spektrofotometrisi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu tayinde 1. ve 2. türev yöntemleri kullanılmıştır.

Belal ve ark. (1986) altı benzotiadiazini tayin etmek için (klorotiazit, hidroklorotiazit, triklorometiazit, benziazit, bendroflumetiazid, metilklotiazit) bu maddeleri hidroliz ederek kuvvetli alkali ortamda etilasetoasetat ile çiftleştirmişler ve sarı renkli bileşikler oluşturmuşlardır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan renkli bileşiklerin maksimum absorbans verdikleri dalga boyunda adı geçen etken maddelerin spektrofotometrik tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Bebawy ve ark. (1997) yaptıkları bir çalışmada farmasötik tabletlerde bulunan hidroklorotiazit'in bozunma ürünleri yanında miktar tayini için spektrofotometrik olarak 278,8 nm'de 1. ve 254,4 nm'de 2. türev yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

#### 1.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Leena R.B. ve ark. (2007), yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemle telmisartan, hidroklorotiazit ve rabeprazol etken maddelerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Telmisartan ve hidroklorotiazit'in tayinini 270 nm dalga boyunda, 1ml/dk hızındaki hareketli faz ile yapmışlardır. Hareketli faz olarak asetonitril : metanol (30:70-h/h) kullandıkları bu yöntemi Telmisartan ve hidroklorotiazitin tabletlerden analizine uygulamışlardır. Telmisartan, hidroklorotiazit ve rabeprazolün çıkış zamanları sırasıyla  $1,79 \pm 0,01$ ,  $2,80 \pm 0,01$  ve  $3,19 \pm 0,01$  olarak bulunmuştur.

Wankhede SB. ve ark. (2007), telmisartan ve hidroklorotiazitin saf etken maddeden ve farmasötik dozaj formlarından analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemini geliştirmişlerdir. 271 nm dalga boyunu analiz için kullanmışlardır. Hareketli faz olarak asetonitril : 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3.0 (60:40-h/h) kullanmışlardır. Alıkonma değerleri telmisartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 5,19 ve 2,97 olarak bulunmuştur. Yöntem, gerekli validasyon parametreleri sınanarak valide edilmiştir. Sabit faz olarak ODS Hypersil C18 (25 cm×4.6 mm I.D) kullanılmıştır. Doğrusallık aralığı telmisartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 4,1-20,48  $\mu\text{g/ml}$  ve 1,28-6,4  $\mu\text{g/ml}$ 'dir.

Nie, J., ve ark (2005), insan plazması ve idrarında anjiotensin II reseptör antagonistlerinin katı faz mikroekstraksiyonu için bir polimonolitik kapiler (metakrilik asit-etilen glikol dimetakrilat, MAA-EGDMA) kullanmışlardır. YPSK yöntemi floresans dedeksiyon ile kandesartan, losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan miktar tayinlerine uygulanmıştır. Bu bileşikler için yakalama sınırı sırasıyla insan plazmasında ve idrarda 0,1-15,3 ng/mL and 0,1-15,2 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin uygulamasında doğrusal derişim çalışma aralığı telmisartan için 0,5-200 ng/mL, kandesartan ve irbesartan için 0,005-2  $\mu\text{g/ml}$ , valsartan için 0,01-2  $\mu\text{g/ml}$  ve losartan için 0,05-5  $\mu\text{g/ml}$  olarak verilmiştir.

Shen, J., ve ark (2005), insan plazmasındaki telmisartan miktarının tayini için YPSK yöntemi geliştirmişler, iç standart olarak Naproksen kullanmışlardır. Yöntemin uygulamasında çalışma aralıkları 0,0005-1 µg/ml olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmalara da başarı ile uygulanmıştır.

Torrealday, N., ve ark (2003), tarafından yapılan bir çalışmada telmisartanın idrarda miktar tayini için kromatografik şartların optimize edildiği YPSK yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada Novapak C18 kolonu, hareketli faz olarak asetonitril-fosfat tamponu (45:55, h/h) ve akış hızı 0,5 ml/dk olarak verilmektedir. Kromatografik tayin floresans detektör ile 305 nm deki uyarma ve 365 nm deki emisyon dalga boylarında ve cevaplar ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

Weinberger ve Pietrantonio (1983), Amerika'da yaptıkları bir çalışmada kan serumunda hidroklorotiaziti tayin etmek için pH: 5 olan 0,05 M tetrabütil amonyum hidroksit ile hacimce %20 asetonitril içeren 0,01M fosfat tamponundan oluşan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmışlardır. 0,05-1 µg/ml derişim aralığında hazırlanan kalibrasyon grafiği ile bu etken maddenin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.

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

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

Cooper ve ark. (1976), insan serumu ve idrardaki hidroklorotiazitin miktarını tayin etmek için Bondapak C18 kolonunu metanol - 0,01 M sodyum dihidrojen fosfat hareketli fazını ve 271 nm'deki UV dedektörünü kullanmışlardır.

Domingo ve ark. (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 hidroklorotiazit başta olmak üzere diüretiklerin idrardan miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

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

Shaikh ve Rummel (1998), dana sütünde bulunan klorotiazid ve hidroklorotiazitin miktar tayini için 0,05 M ve pH 3 olan potasyum fosfat tamponu ile asetonitril tetrahidrofurandan (50:50, h/h) ibaret olan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmıştır. Bu etken maddelerin miktar tayini 225 nm'de fotodiyot dizisi dedektörü yardımı ile hidroklorotiazit ve klorotiazid için determinasyon katsayısının karesi 0,995 olduğu doğru denklemleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir.

Carlucci ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazitin miktar tayinlerini 5-10 µg/ml valsartan için ve 0,5-2,0 µg/ml hidroklorotiazit için kullanılan çalışma aralıklarında YPSK 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.

Stewart ve Clark (1986), yaptıkları çalışmada guanetidin ve hidroklorotiazit karışımlarında bu iki etken maddeyi tayin etmek için 0,02 M sodyum pentan sülfonat içeren asetonitril ve 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30:70) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır. Analizi oktadesilan kolonu ve elektrokimyasal dedektör kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

De Croo ve ark. (1985), tabletlerdeki hidroklorotiazit ve amilorid hidroklorürün aynı anda miktar tayinlerini C18 kolonunu kullanarak YPSK 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, hidroklorotiazit için % 101,9 ve % 0,9 bağıl standart sapma ile elde etmişlerdir.

Fett ve ark. (1991), yaptıkları bir çalışmada biyolojik sıvılarda hidroklorotiazitin tayinini Pinkerton TM ISRP, Hisep TM ve Hypersil C18 kolonlarını kullanarak YPSK yöntemiyle başarmışlardır. Üç kolon için de 0,3 – 100 µg/ml çalışma aralığında iyi bir doğrusallık ve % 98 - % 102 geri kazanımla idrardan ilacın tayinini yapmışlardır.

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

### 1.5.Kromatografi

Kromatografi birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, karışımların, birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan, birçok yöntemi kapsayan yöntemlerin genel adıdır (Skoog, 1998). Yüzlerce maddenin karışımı bile kromatografi yöntemiyle analiz edilebilir. Kromatografi terimi ilk olarak Mikhail Tswett tarafından 1906 yılında kullanılmıştır. Daha sonraları analitik çalışmaların birçoğunda kromatografi yer almıştır. Modern gaz ve sıvı kromatografisinin temellerini ise A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge(1941), buhar hareketli fazın sıvı hareketli faz kadar etkili kullanılabileceğini göstererek atmışlardır (White, 1990).

Kromatografik ayırmada örnek, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınır. Hareketli faz katı bir yüzeyde ya da kolonda sabitleştirilmiş hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinde geçirilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasını hedefler. Örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Analitin kolon boyunca hareket etmesi, sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengeleri, dağılımına bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır (Hamilton, 1982; Bidlingmeyer, 1992). İyonik etkileşimler,

- a) İyonlar arasında kulombik kuvvetler,
- b) İyon-indirgenmiş iyon etkileşimleri,
- c) Dipol-dipol etkileşimleri,
- d) Dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri,
- e) Nötral atom ya da moleküller arası kuvvetlerdir.

Dipol-dipol etkileşimleri, dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri ve nötral atom ya da moleküller arası kuvvetler Van der Waals kuvvetleri olarak da tanımlanmaktadır. Ayrıca en iyi koşulların sağlanabilmesi için, sabit faz yapısı, hareketli faz bileşimi ve sıcaklığın dağılıma etkisi ayarlanabilir.

Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter kendi adını taşıyan ve kromatografik kolondaki ayırma olaylarını matematiksel olarak tanımlayan bir eşitlik bulmuştur (Bidingmeyer, 1992).

$$H=A+B/u+C \quad (1.1)$$

Eşitlik 1.1’de;

H: Tabaka yüksekliği(cm)

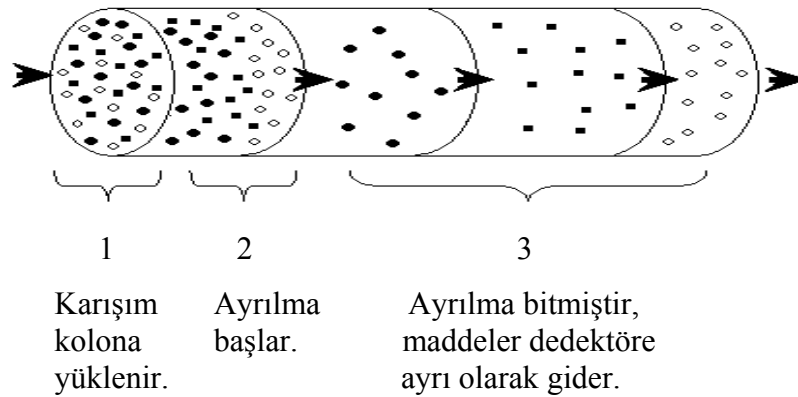
A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B: Boyuna difüzyon

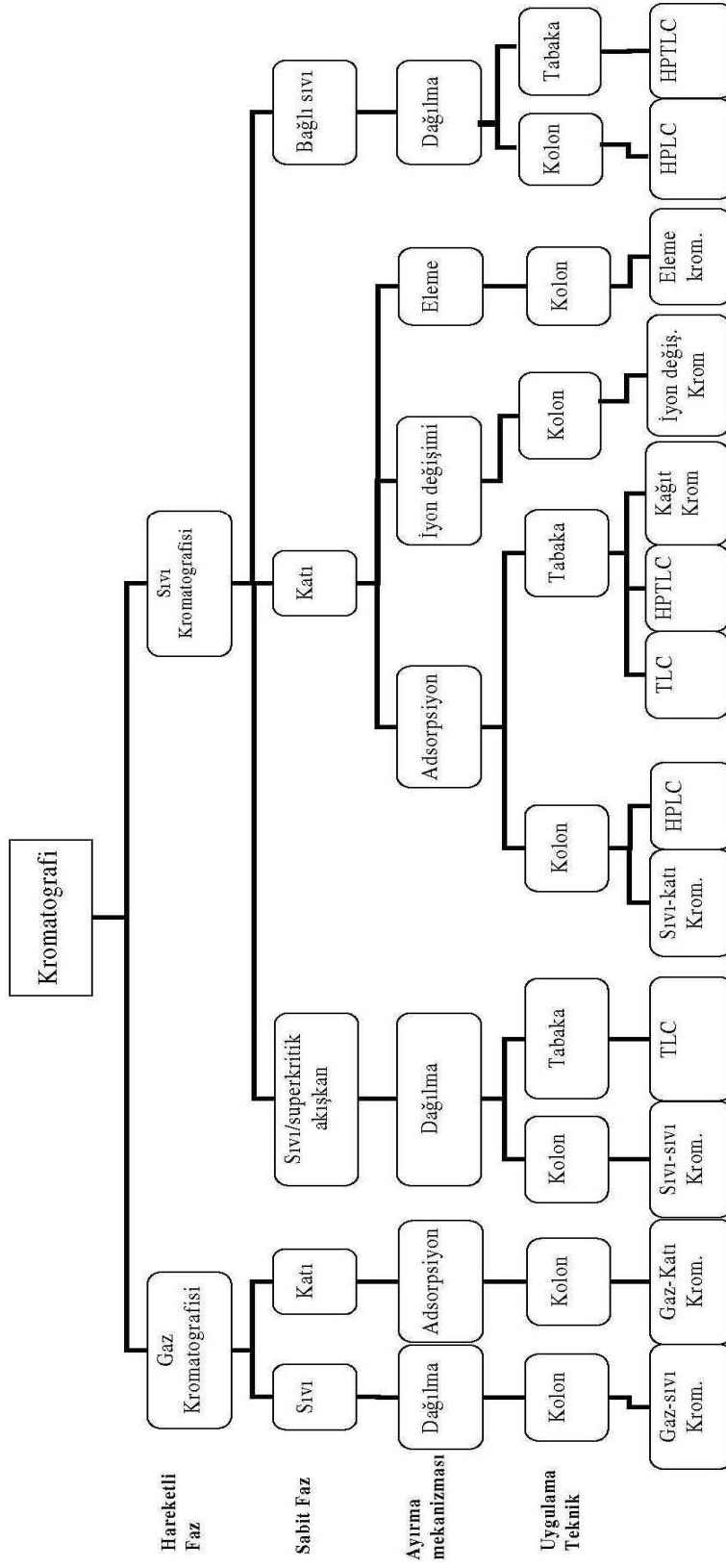
C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı, u:Çizgisel hız

Karışımında bulunan maddelerin kolon boyunca ayrılması ve hareketli faz akış hızıyla kolondan geçmesi Şekil 1.3’de gösterilmiştir.

Kromatografi sistemi iki ana grupta toplanır; hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına bağlı olarak sıvı, süperkritik akışkan ve gaz kromatografisidir. Kromatografik yöntemler hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına, sabit fazın katı ya da sıvı olmasına, kromatografik ayırımın mekanizmasına ve ayırma tekniğine göre isimlendirilirler (Adamovics, 1997)(Şekil 1.4).



Şekil 1.3. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi



Şekil 1.4. Kromatografik sistemin sınıflandırılması (Sewel, 1987)

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, TLC: İnce tabaka kromatografisi

HPTLC: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi

### 1.5.1.Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon; çözünmüş maddenin katı faz üzerinde tutunmasıdır. Bu kromatografi çeşidinde analiz edilen madde gaz halinde ise yöntem gaz-katı, sıvı halde ise sıvı-katı kromatografisidir. Adsorpsiyon özelliği gösteren maddelere adsorban denir ve burada tutunma yüzeyseldir. Adsorpsiyon sırasında çözücü içinde maddeler adsorbe ya da desorbe olabilir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon hızlarının farkı toplam adsorpsiyon olarak tanımlanır. Adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları birbirine eşit ise denge halindedir ve bu durumda madde kolonda sabit hızla ilerler. Sabit faz ile hareketli faz arasındaki bir A çözüneni için kütle aktarımı şu şekilde ifade edilebilir (Skoog, 1998):

$$A_{\text{hareketli faz}} \Leftrightarrow A_{\text{sabit faz}} \quad (1.2)$$

Çözünen maddenin adsorpsiyon katsayısı veya dağılma katsayısı K; maddenin adsorbandaki molar derişiminin ( $C_1$ ), maddenin hareketli fazdaki derişimine ( $C_2$ ) oranı ile tanımlanır.

$$K = \frac{C_1}{C_2} \quad (1.3)$$

K değerinin büyük olmasının anlamı, karışım içindeki maddenin adsorban tarafından daha iyi tutunduğunu, karışım halinde olan K değeri daha düşük maddelere göre daha yavaş ilerlediğini gösterir. K değerinin küçük olması ise maddenin hareketli faza daha fazla ilgi duyduğunu göstermektedir (Hamilton, 1982).

### 1.5.2.İyon Çifti Kromatografisi

Bu yöntemde dağılma kromatografisiyle ayrılamayan moleküllerin ayrılması sağlanır. İyon-çifti oluşturma kromatografisinde iyonlaşabilen ve iyonik moleküllere, hareketli faza eklenen uygun bir karşı iyon ile iyon çifti oluşturularak lipofilik karakter kazandırılır ve sabit faza olan ilgi artar.

İyon çifti oluşturulan maddeler pik kuyruklamasını engellemeyi ve pik keskinliğini arttırmayı sabit faz üzerindeki artık silanol gruplarını örterek sağlarlar. Genelde iyon çifti maddesi olarak ; tersiyer aminler, kuaterner aminler, alkil sülfonik asitler, alkil sülfonatlar kullanılır (Sewell, 1987).

### 1.5.3.İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi tıpkı iyon-çifti kromatografisi gibi iyonik ya da iyonlaşabilen maddelerin ayrılmasında yararlanılan bir tekniktir. Bu kromatografide belirli pH değerlerinde iyon veya iyonik yapı verebilen moleküller (organik baz ya da organik asitler) ya da iyonik yapılar ( $K^+$  ,  $Na^+$  ,  $SO_4^-$ ) ayrılır. Sabit faz ile ayrılacak madde arasında iyonik bağ ne kadar kuvvetli ise o kadar güçlü bir alıkonma sağlanır. Sulu tuz çözeltileri ve az miktarda alkol içeren polar hareketli faz çözeltileri ile asidik ya da bazik gruplar bağlanmış sabit fazlar kullanılmaktadır.

Ayırım  $pK_a$ 'ya yani analizi yapılacak maddenin iyonik yapısına bağlıdır. Maddenin adsorplanmasından sonra desorpsiyon hareketli fazın pH değerinin ya da hareketli fazdaki tuz çözeltinin bileşiminin değiştirilmesiyle sağlanır. Peptitlerin ve proteinlerin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Sıklıkla kullanılan katyon ve anyon değiştiriciler Çizelge 1.1'de verilmiştir (Skoog, 1998; Hamilton, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995; Adamovics, 1997).

Çizelge 1.1. Katyon ve Anyon Değiştiriciler

Anyon Değiştiriciler	Katyon Değiştiriciler		Polimer Temelli Değiştiriciler	
			Hidrofobik	Hidrofilik
Sitrat Sülfat Oksalat İyodür Nitrat Kromat Bromür Tiyosiyanat Klorür Format Asetat Hidroksit Florür	Ba <sup>+2</sup> Pb <sup>+2</sup> Sr <sup>+2</sup> Ca <sup>+2</sup> Ni <sup>+2</sup> Cd <sup>+2</sup> Cu <sup>+2</sup> Co <sup>+2</sup> Mg <sup>+2</sup> UO <sub>2</sub> <sup>+2</sup> Te <sup>+2</sup>	Ag <sup>+</sup> Cs <sup>+</sup> Rb <sup>+</sup> K <sup>+</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> H <sup>+</sup> Li <sup>+</sup>	i. Polisitiren ii. Polimetilmetakrilat (%20 Çapraz bağlı divinil benzen içermektedir)	i. Selüloz ii. Dekstran (Ticari adı sephadex)

#### 1.5.4. Eleme Kromatografisi

Eleme kromatografisiyle ayırmada molekülün büyüklüğü önem taşır. Molekülün büyüklüğü hakkında da bilgi edinilebilir. Çözücünün viskozitesi çalışma sıcaklığında düşük olmalıdır ve seçilen hareketli fazın organik bileşiminin analiz edilecek örneği iyi dağıtması gerekir. Çözücü piki ise karışımdaki maddelerden sonra gelir. Çoğunlukla üç çeşit jel kullanılmaktadır; aerojeller, zerojeller ve zerojel-aerajeller. Eleme kromatografisinde kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri Çizelge 1.2'de verilmiştir (Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995).

Çizelge 1.2. Eleme kromatografisinde kullanılan çözücüler ve fiziksel özellikleri

Çözücü	GB Cut-off (nm)	Viskozite (cP) <sup>20°C</sup>	Maks. Akış Hızı ml/dk	Kırılma İndeksi
Hegzan	210	0,326	7,2	1,375
Tetrahidrofur	220	0,550	4,0	1,407
Diklorometan	220	0,440	5,3	1,424
p-Dioksan	220	1,439	1,6	1,422
Siklohegzan	220	0,980	2,4	1,426
Dikloroetan	225	0,840	2,8	1,444
Trikloroetan	225	1,200	2,0	1,479
Kloroform	245	0,580	4,0	1,446
Karbon tetraklorür	265	0,969	2,4	1,463
Benzen	280	0,652	3,6	1,501
Toluen	285	0,590	4,0	1,497
Ksilen	290	0,810	2,9	1,497
N,N-Dimetilformamid	295	0,924	2,5	1,429
m-kresol*	-	184,200	-	1,540
1,2,4-triklorobenzen*	-	0,50	4,0	1,570

\*Standart yüksek sıcaklık çözücülerini, GB cut-off:Görünür bölge, bu dalga boyunun altında çözücü kullanılamaz.

### 1.5.5.Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinir ve temelinde birbiri ile karışmayan iki sıvı faz arasında maddelerin dağılması ilkesi yatar. Sabit faz katı yüzey üzerinde kolon dolgu maddesi üzerine tutturulmuş ince bir sıvı film tabakasıyken, diğer sıvı hareketli fazdır. Karışımdaki maddelerin sabit faz içerisinde kısmen çözünmesi gerçekleşir (solvofobik etki). Burada maddelerin sabit fazdaki çözünürlükleri fazla, hareketli faz içerisindeki çözünürlükleri ise az olmalıdır. Yoksa maddelerin ayrımı gerçekleşmez ve hareketli faz ile beraber atılırlar.

Sabit faz ile hareketli faz farklı polariteye sahip olduklarında örnek molekülleri de farklı çözünürlüklere sahip olabilmektedirler. Bu iki fazın polarite farklılığına göre dağılma kromatografisi iki kısımda incelenebilir; bunlar ters-faz sıvı kromatografisi ve normal-faz sıvı kromatografisidir (Moreira, 1999; White, 1990; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992;).

## 1.Ters-Faz Sıvı Kromatografisi

Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz sabit faza göre daha fazla polardır. En çok kullanılan kimyasal olarak bağlanmış fonksiyonel grup taşıyan sabit fazlardan biri ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan) dır. Bunun yanı sıra fonksiyonel grup olarak daha kısa zincirli (C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub> gibi), fenil ve siyano (CN) bağlanan sabit fazlar da kullanılır.

Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz bileşeninin bir parçası olan tampon çözeltiler çok önemlidir. Bu çözeltileri hazırlarken suyun oldukça saf olması gerekir. Diğer önemli hareketli faz bileşenleri ise, suyla karışabilen organik çözücülerdir. Hareketli fazlarda kullanılan organik çözücüler ile polariteleri ve ilgili detaylar Çizelge 1.3'de verilmiştir.

Ters-faz sıvı kromatografisinde genellikle apolar maddelerin ayrımı gerçekleştirilir. Uzun zincirli sabit fazlar (C<sub>18</sub>) daha apolar maddelerin, kısa zincirli sabit fazlar (C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>) ise daha polar maddelerin ayrılmasında kullanılır. Buna göre polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurken, apolar maddelerde kısa zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar (Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995).

Çizelge 1.3.Çözücülerin fiziksel özellikleri

	KI	GB (nm) cut- off	Viskozite (cP)	KN (°C)	$\delta$	$P'$
n-Pentan	1,358	210	0,23	36,0	7,1	0,0
n-Hegzan	1,375	210	-	68,7	7,3	0,0
n-Heptan	1,388	210	0,41	98,4	7,4	0,0
Siklohegzan	1,427	210	1,00	81,0	8,2	0,0
Karbon disülfid	1,626	380	0,37	45,0	10,0	1,0
Karbon tetraklorit	1,466	265	0,97	76,7	8,6	1,7
_zopropil eter	1,368	220	0,37	69,0	7,0	2,2
2-kloropropan	1,378	225	0,33	34,8	-	-
Toluen	1,496	285	0,59	110,6	8,9	2,3
1-kloropropan	1,389	225	0,35	46,6	8,3	-
Klorobenzen	1,525	280	0,80	132,0	9,6	2,7
Benzen	1,501	280	0,65	80,1	9,2	3,0
Bromoetan	1,424	225	0,41	38,4	8,8	3,1
Etil eter	1,353	220	0,23	34,6	7,4	2,9
Kloroform	1,443	245	0,57	61,2	9,1	4,4
Diklorometan	1,424	245	0,44	41,0	9,6	3,4
Tetrahidrofuran	1,408	222	0,55	65,0	9,1	4,2
1,2-Dikloroetan	1,445	230	0,79	84,0	9,7	3,7
Metil etil keton	1,381	330	0,43	79,6	-	4,5
Aseton	1,359	330	0,32	56,2	9,4	5,4
Dioksan	1,422	220	1,54	104,0	9,8	4,8
Etil asetat	1,370	260	0,45	77,1	-	4,3
Metil asetat	1,362	260	0,37	57,1	9,2	-
Pentan-1-ol	1,410	210	4,10	137,3	-	-
Dimetil sülfoksit	1,478	270	2,24	190,0	12,8	6,5
Anilin	1,586	325	4,40	184,0	-	6,2
Nitrometan	1,394	380	0,67	100,8	11,0	6,8
Asetonitril	1,344	210	0,37	80,1	11,8	6,2
Piridin	1,510	305	0,94	115,5	10,4	5,3
Propan-2-ol	1,380	210	2,30	82,4	10,2	4,3
Etanol	1,361	210	1,20	78,5	11,2	5,2
Metanol	1,329	210	0,60	65,0	12,9	6,6
Etilen glikol	1,427	210	19,90	198,0	14,7	5,4
Asetik asit	1,372	251	1,26	118,5	12,4	6,2
Su	1,333	<190	1,00	100	23,3	9,0

KI :Kırılma indeksi

GB cut-off :Görünür bölge, bu dalga boyunun altında çözücü kullanılamaz

Viskozite :Viskozite (Centipois)

KN :Kaynama noktası

$\delta$  :Hildebrand çözünürlük parametresi

$P'$  :Polarite indeksi, Rohrschneider's verileriyle hesaplanan

## 2.Normal-faz Sıvı Kromatografisi

Normal-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polaritesi sabit faz polaritesinden daha düşüktür. Polar sabit fazlar kullanılır. Hareketli faz içerisinde genelde metilen klorür, dietil eter, kloroform veya hekzan gibi polaritesi düşük çözücüler bulunmaktadır. En çok kullanılan sabit fazlar ise; silika ve alüminadır. Ters ve normal-faz sıvı kromatografilerinin farklılıkları Çizelge 1.4’de verilmiştir (Skoog, 1998; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995).

Çizelge 1.4. Ters ve Normal-faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması

	<b>Ters-Faz Kromatografisi</b>	<b>Normal-Faz Kromatografisi</b>
<b>Sabit faz polaritesi</b> <b>Çözücü polaritesi</b> <b>Örnek ayrılma zamanı</b> <b>Çözücü polarite artışının etkisi</b>	Düşük Ortadan yükseğe Polar olanlar önce Ayrılma zamanını artırır	Yüksek Düşükten ortaya Düşük polarlar önce Ayrılma zamanını azaltır

İlaçlar genellikle apolar yapıda oldukları için ters-faz sıvı kromatografisi, normal-faz sıvı kromatografisine göre daha çok tercih edilir. Bunun yanı sıra kromatografik ayırmada söz konusu olan solvofobik olayların etkisi, hareketli faz içerisinde konulan çözücülerin ucuz olması, sulu tampon çözeltilerin oranının yüksek tutulması, uygulamanın ve sistem kontrolünün daha kolay olması gibi sebeplerden dolayı ters-faz sıvı kromatografisi tercih edilir.

Ters ve Normal-faz sıvı kromatografide kullanılan sabit ve hareketli fazlar Çizelge 1.5’de verilmiştir.

Çizelge 1.5. Ters ve Normal-faz sıvı kromatografide kullanılan sabit ve hareketli fazlar

Sabit faz	Hareketli Faz
<b>Normal-Faz Sıvı Kromatografisi</b>	
$\beta,\beta'$ -oksidipropionitril	Pentan, siklopentan, hegzan, izooktan, %10-20(v/v) kloroform, tetra hidro furan, asetonitril, dioksan
1,2,3,-Tris(2-siyanoetoksi)propan (Fraktonitril)	
Dimetilsülfoksit	İzooktan
Su-etilen glikol	Hegzan, karbontetra klorür
Etilendiamin	Hegzan
Su	Butanol
Nitrometan	Hegzan, karbontetra klorür
<b>Ters-Faz Sıvı Kromatografisi</b>	
Hidrokarbonlar	Metanol-su
Dimetilpolisiloksan	Asetonitril-su
ODS	Asetonitril/ Metanol/su
CN	Asetonitril/ Metanol/su
Fenil	Asetonitril/ Metanol/su
C <sub>2</sub>	Asetonitril/ Metanol/su
NH <sub>2</sub>	Asetonitril/ Metanol/su

### 1.5.6.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Son yıllarda gelişen teknolojiyle ayırmada çok küçük tanecikler (tanecik çapı; 3-10 µm) yaklaşık 5mm çapındaki kolonların kullanılmasını sağlamıştır. Bu gelişmeler kromatografik ayırıcılığın artmasına neden olmuştur. Dolayısıyla kromatografik ayırımın performansı artmakta, ayırım çok kısa sürelerde gerçekleşebilmektedir. Bu durumda kullanılan malzeme miktarı düşmekte ve birim zamanda daha fazla analiz yapılabilmektedir. Bu şartlar altında ayırım işlemi 100-400 atmosfer kolon basıncı altında gerçekleştirilmektedir. Uygulanan işlemler sonucunda kullanılan kromatografik tekniğe yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) adı verilmektedir.

YPSK'nın diğer kromatografik yöntemlere göre bazı avantajları vardır;

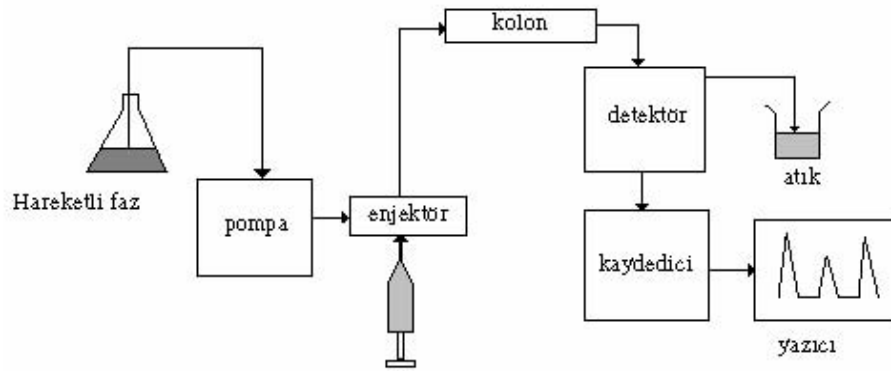
- i. Kolon ayırıcılığı yüksektir.
- ii. İşlem kullanıcıya daha az bağımlıdır ve bu nedenle tekrarlanabilirlik artmıştır.
- iii. Nicel analize uygundur.
- iv. Analiz süresi genelde daha azdır.
- v. Geniş derişim aralıklarında çalışma olanağı sağlayacak kadar esnektir.
- vi. Düşük sıcaklıklarda uygulanır.
- vii. Maddenin geri kazanımı kolaydır.
- viii. Dedektör seçme olanağı vardır.

YPSK ile aminoasitler, nükleik asitler, ilaçlar, karbonhidratlar, proteinler, hidrokarbonlar ve benzeri maddeler analiz edilebilmektedir.

## A.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Sistemi

Bir yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kısımları şunlardır (Şekil 1.5);

1. Hareketli faz haznesi,
2. Bağlantı ekipmanlar ve hareketli faz uygulama sistemi,
3. Hareketli faz pompası,
4. Otomatik örnekleyici,
5. Kolon,
6. Dedektör,
7. Kayıt cihazı.



Şekil 1.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisini kısımları

### 1.Hareketli Faz Haznesi:

Hareketli faz hazne materyalinin hareketli faz ile etkileşmemesi, sistemde korozyona ya da oksitlenmeye yol açmaması gerekir. Hazne ya da pompaya gelen hareketli fazda herhangi bir tanecik, toz veya kabarcık olmamalıdır. Bu yüzden steril edilebilir, materyali cam veya çelikten olan hazneler kullanılır. Kullanılan hareketli fazdan çözülmüş gazların uzaklaştırılması gerekir. Bu yüzden sistemden helyum gibi eylemsiz bir gazın düşük akış hızında geçirilmesi, hareketli fazı sonikatörde bekletme ya da vakumla gaz uzaklaştırma gibi işlemler uygulanır (Skoog, 1998; Hamilton, 1982).

## 2. Bağlantı Ekipmanlar ve Hareketli Faz Uygulama Sistemi

Hareketli faz sisteme gönderilmeden önce 2 µm ya da 5 µm çapındaki tanecikleri süzebilen kağıt ya da çelik filtrelerden geçirilerek tanecikler uzaklaştırılır. Sistemdeki bağlantı ekipmanları dış çapı 1/8, 1/16 inch veya daha geniş olan paslanmaz çelikten veya teflondan borularla sağlanmaktadır. Hareketli faz akışı, bağlantı elemanları (fitting), ferüller ve sıkıştırıcı vida (nut) ile sabitleştirilmiş paslanmaz çelik borularla sağlanmaktadır (Hamilton, 1982).

YPSK’inde hareketli faz sisteme iki şekilde gönderilir: **(i)** Gradient elüsyon ve **(ii)** İzokritik elüsyon. Sisteme gönderilen akış ve bileşim sabit ise bu ayırma *izokritik elüsyon* olarak adlandırılır. Eğer hareketli fazın bileşimi veya akış hızı zamanla değişiyorsa yapılan ayırma işlemine *gradient elüsyon* denilmektedir.

## 3.Hareketli Faz Pompası:

Bir YPSK sisteminde kullanılan pompanın şu özellikleri göstermesi gerekmektedir;

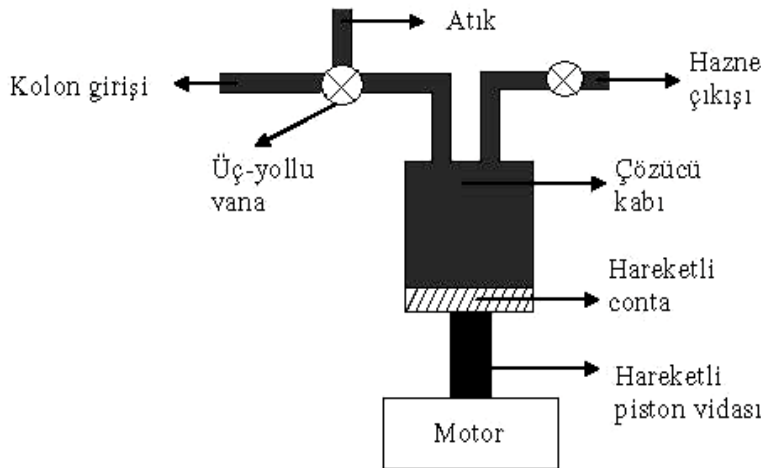
- i. Üst basınç sınırının 400 atm ( $\approx 400\text{bar} \approx 6000 \text{ lb}_f/\text{in}^2$ ) olması gerekmektedir,
- ii. Normal çalışma basıncı  $\approx 100\text{-}200$  atm olmalıdır,
- iii. “pulssuz” veya “puls” düşürücü ile birlikte kullanılmalıdır,
- iv. Sinyal/gürültü oranı yüksek olmalıdır,
- v. Analitik uygulamalar için 1-10 ml/dk aralığında akış sağlamalıdır,
- vi. Kullanılan çözeltilere karşı eylemsiz olmalıdır,
- vii. Sistem ölü hacmi düşük olmalıdır,
- viii. Çözelti değiştirmek kolay olmalıdır,
- ix. Bakımı ve tamiri kolay olmalıdır,
- x. Conta, halka, valf gibi kolay aşınan parçaların dayanıklı ve yedek parçaları kolay bulunabilir olmalıdır.

Ayrıca pompada akış denetleyiciler bulunur. Bunlar, akışla oluşan basıncı ölçüp sabit bir basınç değeriyle karşılaştıran ve aradaki fark belirlenen sınırları geçtiğinde pompa akış hızının ayarlanmış akışı sabit tutacak şekilde ayarlayan cihazlardır. Yüksek basınç altında kolondan geçen akışın hızı, sıvıların bastırılmaz katsayılarındaki farklılıklarından dolayı ayarlanan akış hızı gibi olmayabilir. Böylece hareketli faz akışı sırasında kolon geçirgenliğinden, viskozite değişikliğinden kaynaklanan değişmelerin düzenlenmesi sağlanır.

Bir YPSK sisteminde kullanılan pompalar iki kısımda incelenebilir; sabit basınç pompaları ve sabit akış pompaları. Çalışma farklılığına göre ise, bu pompalar; pistonlu pompalar, şırınga pompalar ve pnömatik pompalar olarak üç çeşittir (Skoog, 1998; Hamilton, 1982).

#### a) Sabit Hacim Pompaları

Motor kontrollü tek vuruşlu şırınga ile ya da bir veya iki pistonun ileri-geri hareketiyle hareketli fazın pompalandığı küçük bir silindirden oluşan pompalardır. Tek vuruşlu şırınga pompası Şekil 1.6'da verilmiştir. Bu pompanın en önemli üstünlüğü,  $7500 \text{ lb}_f/\text{in}^2$  basınçlara bile dayanabilmesidir.

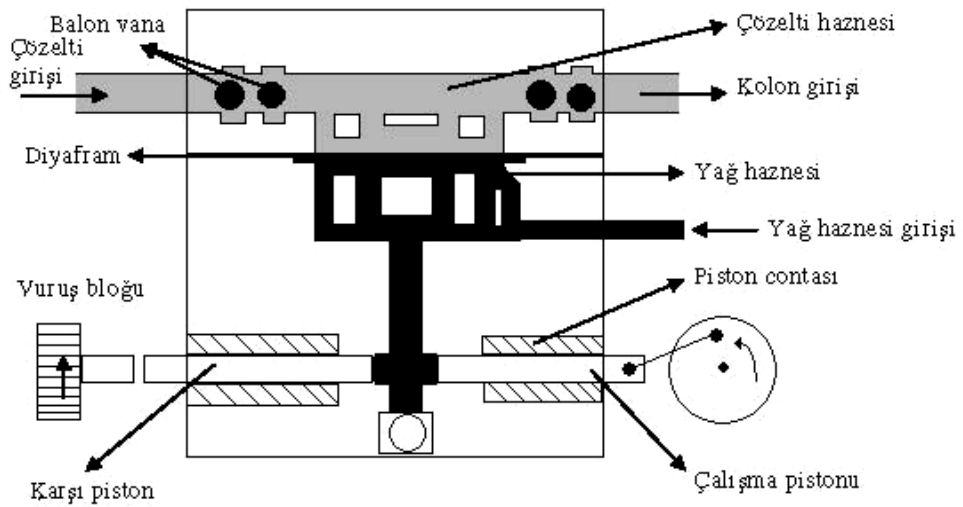


Şekil 1.6. Tek vuruşlu şırınga sabit hacim pompası

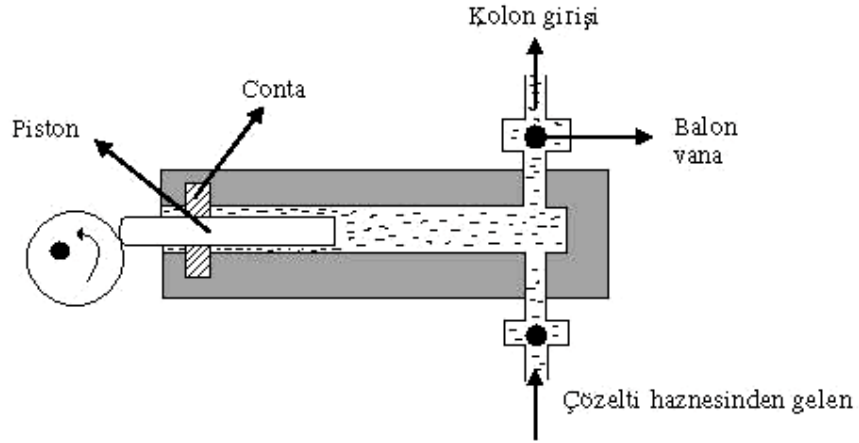
Bu pompaların dezavantajı ise; sınırlı sayıda ve hacimde (yaklaşık 250ml) çözücü ile çalışılıyor olmasıdır. İki şırıngalı sistemler ise yüksek maliyetleri nedeniyle pek kullanılmamaktadır.

Piston ve diyaframların kullanıldığı pompaların materyali paslanmaz çeliktir ve çözücü sadece paslanmaz çelikten olan diyafram ile temastadır. Bu sistemin en önemli parçaları çözücü haznesindeki giriş ve çıkış kontrol vanalarıdır. Bu vanaların görevi akışı sabit, doğru ve düzenli bir şekilde sisteme göndermektir. En büyük dezavantajları ise , kontrol contalarının aşınması , pulsaların oluşması ve bunun da zemin gürültüsü olarak gözlenmesidir. Puls oluşumunu gidermek için puls denetleyiciler kullanılır ya da birden fazla vana kullanılır.

Tek pistonlu ve iki pistonlu pompalar olarak iki çeşidi kullanılmaktadır. İki pistonlu diyafram pompasının (Şekil 1.7) ve tek pistonlu sabit hacim pompasının şekilleri (Şekil 1.8) şematik olarak aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 1.7. İki pistonlu diyafram pompası

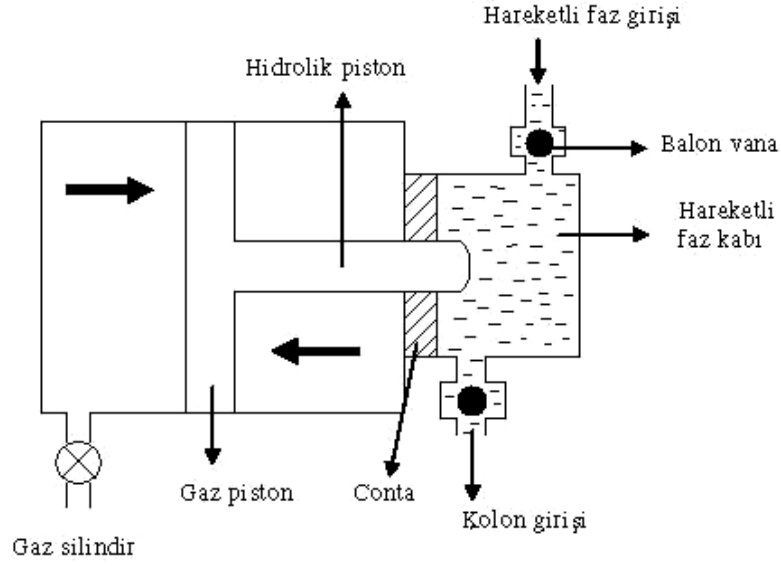


Şekil 1.8. Tek pistonlu pompa

### b) Sabit Basınç Pompaları

Sabit basınç pompalarının en büyük avantajları maliyetinin düşük olması, pulssuz akış sağlaması ve kolay kullanılabilir olmalarıdır. Dezavantajı ise; sabit hacim pompaları kadar doğru hacim ölçemezler ve tekrarlanabilirlikleri düşüktür.

Pnömatik pompalarda akışkan madde, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, portatif bir kap içine konur. Sistemden hareketli faz geçirildiğinde sabit basınç kontrollü pompalar, çözücü viskozitesindeki değişikliklere ve kolon geçirgenliğine karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle gradient elüsyon çalışmaları için uygun değildir. Bir pnömatik yükseltici pompa Şekil 1.9'da şematik olarak verilmiştir.



Şekil 1.9. Pnömatik yükseltici pompa

#### 4.Otomatik Örnekleyici

Analizi yapılacak olan örnek sisteme doğru ve tekrarlanabilir olarak gönderilmelidir. Sisteme gönderilen örneğin enjeksiyonunda kullanılan enjektörler; şırınga enjektörler, vana-sarım (valve-loop) enjektörler ve şırınga-sarım (syringe-loop) enjektörlerdir. Enjeksiyon sırasında sistem basıncını düşürmeden ve hareketli faz akışını durdurmadan veya akış hızını değiştirmeden örnek sisteme gönderilmelidir. Şırınga enjektörler  $1500 \text{ lb}_f/\text{in}^2$  basınca kadar sisteme örnek gönderebilirler. Fakat bu enjektörlerde hareketli faz akışı bir süre durdurulur. Bu sebepten dolayı kolay kullanılabilir olmasına rağmen tekrarlanabilirliği düşük olduğu için şırınga enjektörler tercih edilmemektedir.

Vana-sarım enjektörler  $7000 \text{ lb}_f/\text{in}^2$  basınca kadar sisteme örnek enjeksiyonu yapabilirler. Belirli bir hacimde sarım kullanılır. Örneğin sisteme enjeksiyonu sırasında hareketli faz akışında duraksama veya akış hızında bir değişim olmaz. Sarım hacimleri  $10\text{-}1000 \mu\text{l}$  arasında değişir. Yüksek hacimde örnek enjeksiyonu yapıldığında tayin edilen maddenin düşük derişimlerine kadar inilebilmektedir, fakat

bu, sisteme yani kolona aşırı madde yüklemesi yapılmasından dolayı bant genişlemesine ve pik keskinliğinin azalmasına neden olur. Bu nedenle düşük hacimdeki enjeksiyonlar daha avantajlıdır. Bu tip enjektörlerde sistem tekrarlanabilirliği yüksektir, çalışma basınç üst sınırı yüksektir, otomatik örnekleyicilerle kullanımı mümkün olduğu için birim zamandaki, standart enjeksiyon sayısı daha fazladır.

Şırınga enjektörler ise, 0.5-5 µl arasında enjeksiyonlar yapılabilen mikro enjektörlere sahiptir. Örnek kabı olmadan sıfır ölü hacimle enjeksiyon yapabilir, küçük hacimlerde dahi kesinlik ve doğruluk değerleri yüksektir (Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987).

## **5.Kolon**

Sıvı kromatografisinde kullanılan kolonlar, kullanılan hareketli faz bileşenlerinden etkilenmeyen ve bileşenlerle etkileşmeyen, oksitlenmeyen ve korozyona uğramayan malzemelerden yapılmıştır. Bunun için özel paslanmaz çelik, teflon ve cam kullanılır. Genellikle kullanılan kolonlar 2.1, 3.2, 4.1 ve 4.6 mm çapında, boyu ise 10-30 cm arasındadır. Aynı boydaki kolonlar için kolon çapı artarsa kolona gönderilen madde miktarı da artmaktadır. Analiz sırasında birden fazla kolon birbiri ile kombine kullanılarak analizin kalitesi arttırılabilir. En sık kullanılan kolonlar 25cm boyunda ve 4,6 mm iç çapında, 5 µm çapında tanecik dolgu maddesi ile doldurulmuş kolonlardır.

Son yıllarda firmalar yukarıda anlatılan kolon boyutlarından farklı olarak iç çapı 1-4,6 mm olan uzunluğu 5-10 cm olan kolonlar üretmektedir. Dolgu maddesinin tanecik çapı da 1,7 µm'ye kadar düşürülmüştür (Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987).

### **Kolon Dolgu Maddeleri:**

Sıvı kromatografisinde iki çeşit kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar, film dolgular ve gözenekli dolgulardır. Film dolgular cam veya polimer malzemeden yapılmış, gözeneksiz, küresel ve çapları 30-40 µm arasında değişen taneciklerdir. Bu taneciklerin yüzeyine, silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır.

Bazı uygulamalar için uygun bir sıvı, absorpsiyon ile katı yüzeye tutturularak, ilave bir katman halinde sabit faz olarak kaplanır. Ayrıca organik temelli bir yüzey katmanı oluşturulmak amacıyla kimyasal işlemler de uygulanmaktadır.

Sıvı kromatografisinde kullanılan gözenekli taneciklerin çapları 3-50 µm arasında değişebilmektedir. Tanecikleri oluşturan reçinelerden biri olan silika, en yaygın olarak kullanılanlardan biridir. Bu tanecikler yarı geçirgendir, çapları 10-50 µm ve yüzey alanları 1-25 m<sup>2</sup>/g arasında değişmektedir. Bu analitik uygulamalarda bir dezavantajdır. Mikro gözenekli taneciklerin yüzey alanları ise 200-300 m<sup>2</sup>/g'a kadar çıkabilmektedir ve çapları da 3-10 µm arasındadır. Yüzey alanı arttıkça ayırma kapasitesi artmaktadır. Tanecik boyutu küçüldükçe kolon geri basıncı da artmaktadır.

Bu ilişki Eşitlik 1.4'de gösterilmiştir.

$$\text{Basınç} \propto \left( \frac{1}{d_p} \right)^{1.8} \quad d_p: \text{ Tanecik çapı} \quad (1.4)$$

Silika bazı kimyasal işlemlerle türevlendirilerek bağlı sabit fazlar elde edilmektedir;

i.Silikat ester oluşumu (Si-O-Si):Oluşumunda yüzey silanol grupları (Si-OH) alkolle tepkimeye sokulmaktadır.



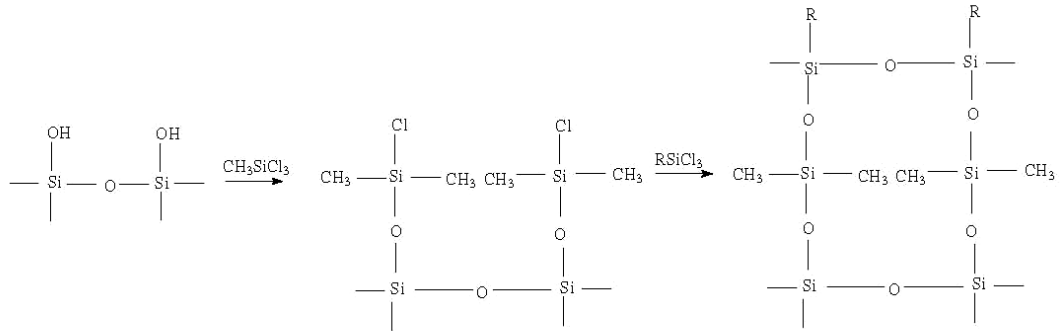
ii.Silikon bağları oluşumu (Si-O-Si-R<sub>3</sub>):Yüzey silanol grupları organoklorosilan ile tepkimeye girmektedir.



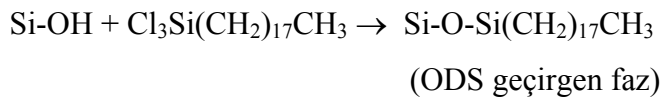
iii.Silikon-karbon bağları oluşumu:Yüzey silanol grupları tionil klorür ile tepkimeye sokularak organolityum bileşikleri oluşturulmaktadır. Oluşturulan organik gruplar doğrudan silika yüzeyine bağlanır.



Ayrıca silika, yüzeyi hidrolizlenerek hidroksil grupları takılır ve metiltriklorosilan ile aşağıda gösterildiği gibi tepkimeye sokulur.



Doygun hidrokarbon polimer tabakaları, siyanoetilsilikon polimer tabakaları ve naylon kaplı silika da kullanılmaktadır. Örneğin, 18 karbon zincirli sabit faz elde edilmesinde aşağıdaki tepkimeler kullanılmaktadır.



Benzer şekilde CN bağılı faz elde etmek için aşağıdaki tepkime uygulanmaktadır.



Bu polimerler hareketli faz akışı ile silika yüzeyinden çıkartılamazlar ve kalıcıdır. Silika gruplarına (C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>) diğer fonksiyonel grupların, örneğin fenil (SiPh<sub>2</sub>), alkil fenil (SiC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH=CH<sub>2</sub>), ve floro-eter eklenmesi ile farklı fonksiyonel grupları içeren sabit fazlar elde edilebilir (Hamilton, 1982).

### 6.Sıvı Kromatografi Dedektörleri:

Sıvı kromatografisinin güncel olarak kullanılmasını sağlayan en büyük gelişme hassas ölçümler sağlayan dedektörlerin geliştirilmesi ve bu dedektörlerin “on-line” kullanımlarının mümkün olmasıdır. Sıvı kromatografisinde örnek ile hareketli faz fiziksel özellikleri yönünden benzerlik gösterir. Buna göre iki çeşit dedektör geliştirilmiştir (Skoog, 1998; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995).

i.Örnek ve hareketli faz özelliklerine göre dedektörler;

- a. Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans dedektör, Foto diyot dizi (FDD) ve İnfrared absorbans dedektörleri),
- b. Radyoaktivite dedektörü,
- c. Elektrokimyasal dedektör,
- d. Ayırım sonrası tepkime dedektörü,
- e. Kütle spektrometrisi.

ii.Örnek özelliklerinin ölçülmesine göre dedektörler;

- a. Dielektirik sabiti dedektörü,
- b. İletkenlik dedektörü,
- c. Yoğunluk ölçümü dedektörü,
- d. Refraktif indeks dedektörleridir.

YPSK sisteminde sıkça kullanılan dedektör çeşidi UV/GB dedektör, FDD, fluoresans dedektör ve elektrokimyasal dedektördür.

### **UV/GB Dedektör**

UV/GB ışınının absorblanması ilkesine dayanan dedektör çeşididir. Genellikle üç tip lamba kullanılır. Döteryum lambası; 190-400 nm dalga boyu aralığında, Kuartz-iyot/tungsten lambası; 350-700 nm dalga boyu arasında ve civa lambası; 254, 280, 313, 334, 365 dalga boylarında ışın yayarlar. Değişken dalga boyunda ışın yayabilen lamba kullanılan dedektörlerin bazı avantajları vardır. Bunlar;

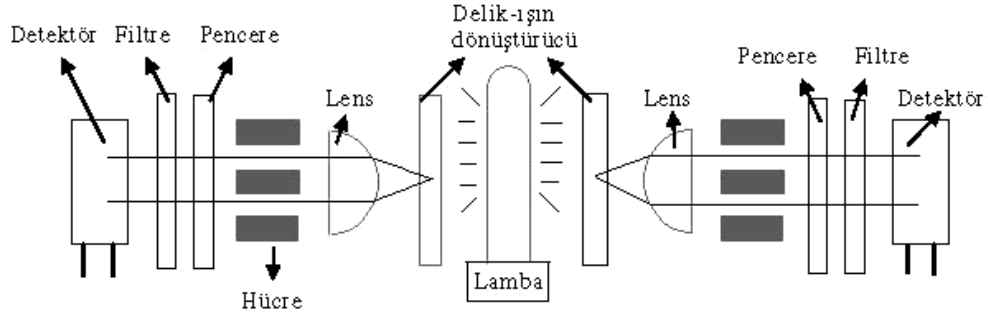
- i. Aynı anda çoğu madde için yüksek değerlerde absorbans elde edilir. Bu durumda duyarlılık artar,
- ii. Seçicilik daha yüksektir.
- iii. Gradient elüsyon için kullanım kolaylığı sağlar.

Absorbans değeri derişimle doğru orantılı bir şekilde artmaktadır. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Genellikle bağlı olmayan elektron içeren bileşikler ya da çift bağ içeren bileşikler saptanabilmektedir. Bir de türevlendirme sonucunda absorpsiyon yapabilen maddeler de bu dedektörle saptanabilir.

UV/GB dedektöründe kullanılan akış hücresi 4 ya da 8 µl hacminde, 1mm çapında ve 10mm uzunluğundadır. Kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek için akış hücrelerinin hacimleri mümkün olduğunca en aza indirilmiştir (Skoog, 1998; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995).

Absorbans dedektörlerinin bir çoğu çift ışın yolludur. Daha sonra bu iki ışının şiddetinin karşılaştırılması amacıyla fotoelektrik dedektörler kullanılır. Şekil 1.10'da UV/GB dedektörü şematik olarak verilmiştir. Işın belirli boşluklardan geçerek

istenen dalga boyuna ayarlanır. Gelen ışının, lens ile odaklanarak hücreye paralel olarak geçmesi sağlanır. Işın filtreden geçtikten sonra dedektöre gelir. Işının şiddeti ile orantılı olarak sinyaller kayıt edilir.



Şekil 1.10. Çift ışın yollu bir UV/GB dedektörü

### **Foto Diyot Dizi Dedektör (FDD)**

Foto diyot dizi dedektörde polikromatik ışın kullanılır. Işın kaynağı olarak tungsten ve döteryum lambası kullanılır. Işık kaynağından gönderilen polikromatik ışınlar akış hücresine gelir, bunlar optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer.

FDD 200-700 nm dalga boyu aralığında 0,1 s aralıklarla spektrum alınabildiğinden FDD ile birden fazla dalga boyunda analiz yapılabilmektedir. Kromatografik piklerin saflığının ya da pik girişiminin olup olmadığının kontrolünde de kullanılabilir. FDD'nin avantajları aşağıda sıralanmıştır (Skoog, 1998).

- i. Piklerin bütün dalga boylarında ölçümleri aynı anda yapılabilir.
- ii. Maksimum absorban yapılan dalga boyları tek bir enjeksiyonla saptanabilir.
- iii. Kromatografik olarak ayrılamamış piklerin nicel analizi yapılabilir.
- iv. Pik kontrolü ve maddenin nicel analizi yapılabilir.

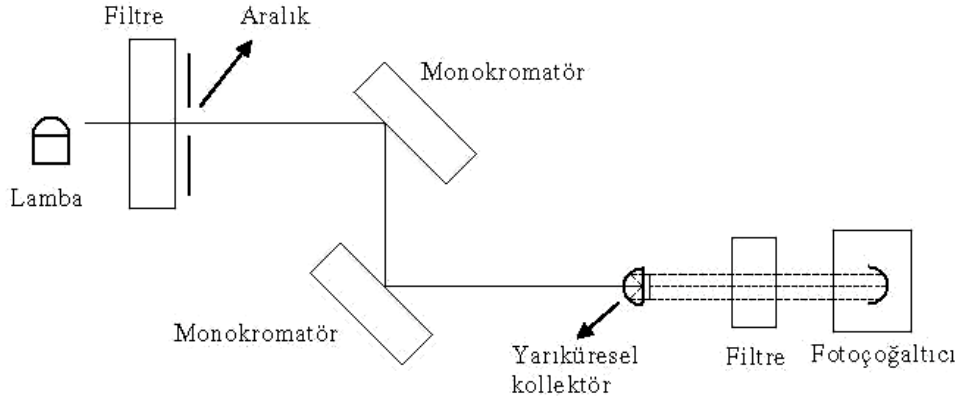
### **Floresans dedektör**

Floresans verebilen maddeler için yüksek seçicilik ve duyarlılıkta saptama sağlayan dedektörlerdir. Düşük floresans veren bileşikler; aromatik amino asitler, kinolonlar, östrogenler, fenoller, aflatoksinler, polinükleer aromatikler, konjüge siklik yapıda olan bileşiklerdir.

Floresans dedektörler türevlendirme yapılarak fluoresean özellik katılmış bir çok maddenin de saptanmasına olanak sağlar. Genel olarak kullanılan türevlendirme ajanı; dansil klorür (5-dimetil-aminonaftalen-1-sulfonyl klorür) ve fluoreseindir.

Dansil klorür primer ve sekonder aminler ve fenollerle, fluoresein ise; primer aminler ve biojenik amino asitler ile tepkime vermektedir.

Floresans dedektörde iki dalga boyu seçilmesi saptamada seçiciliği artırmıştır. Bunlardan biri; eksitasyon (uyarma) dalga boyudur ve dalga boyu 190-400 nm aralığında (döteryum lambası) ve 350-600 nm aralığında (tungsten lambası) saptanacak madde özelliğine göre ayarlanmaktadır. Diğer emisyon dalga boyudur ve 90°'lik açı ile ölçülmektedir. Emisyon tüm yönlerde olduğu için duyarlılık azalır. Bunu önlemek için yarıküresel kollektör ayna kullanılmaktadır. Bazı fluoreseans dedektörler, absorpsiyon dedektörlerine göre yaklaşık 100 kat daha duyarlıdır. Işık kaynağı olarak civa lambası da kullanılır. Daha gelişmiş cihazlarda ise, ışık kaynağı olarak ksenon lambası kullanılır. Bir floresans dedektör Şekil 1.11'de şematik olarak verilmiştir (Skoog, 1998; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995).



Şekil 1.11. Floresans dedektör

### **Elektrokimyasal dedektör**

Elektrokimyasal dedektörler, duyarlılığı yüksek ve seçici dedektörlerdir. Düşük derişimdeki maddelerin saptanmasına olanak sağlarlar, fakat kullanımları optik dedektörler kadar kolay ve pratik değildir.

Ayrılan maddeler camısı-karbon çalışma elektrodu veya karbon/polimer elektrot üzerinde, sabit potansiyel altında yükseltgenme ya da indirgenmeye maruz bırakılır. Referans elektrot olarak platin elektrot kullanılır. Örnek derişimi elektrot akımı ile doğru orantılıdır. Akım voltaj çıkışı olarak dönüştürülür ve zamanın fonksiyonu olarak gözlemlenir. Elektro aktif olmayan maddelerin analizi mümkün değildir.

### **7. Kayıt Cihazı**

Dedektörden gelen sinyallerin yazılmasında tek kalemli yazıcılar, karmaşık integratörler ya da bilgisayar sistemli veri kaydediciler kullanılır.

Teknolojinin ilerlemesiyle son yıllarda mikroişlemciler ve bilgisayarlar kullanılmaktadır. Bu sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, dedektör, örnek alma sistemi ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik

sistemin tekrarlanabilirliğini arttırmakta ve sistem validasyon parametrelerinde daha doğru sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır (Hamilton, 1982).

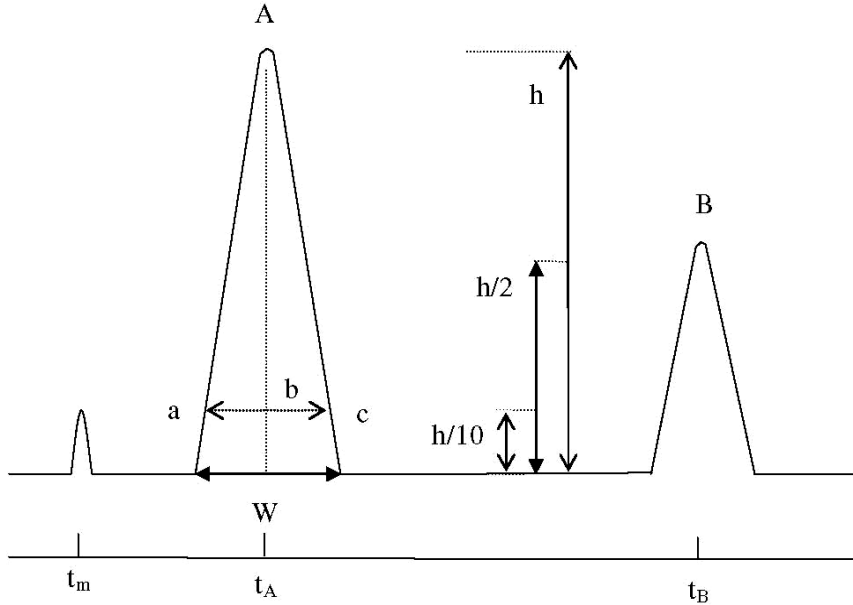
## **B. Temel Kromatografi Parametreleri**

Kromatografik bir sistemde veriler kromatogramlarla yorumlanmaktadır. Kromatogram; tayini yapılan örneğin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir dedektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafikdir. İki bileşenli bir örneğe ait kromatogram Şekil 1.12'de verilmiştir. Bir kromatogramı yorumlamada kullanılan ana parametreler şunlardır;

- i. Alıkonma zamanı,  $t_R$
- ii. Kapasite faktörü,  $k'$
- iii. Seçicilik,  $\alpha$
- iv. Kolon etkinliği,  $N$
- v. Ayırıcılık,  $R$
- vi. Pik simetri oranı,  $PSO$

### **i. Alıkonma Zamanı, $t_R$**

Örneğin enjekte edilmesinden sonra analit pikinin dedektöre gelmesine kadar geçen süreye alıkonma zamanı denir.



Şekil 1.12 YPSK yöntemiyle elde edilen kromatogram

Şekil 1.12’de  $t_m$ ; sabit faz ile etkileşmeyen maddelerin veya hareketli fazın alıkonma zamanını,  $t_A$ ; A maddesinin alıkonma zamanını,  $t_B$ ; B maddesinin alıkonma zamanını göstermektedir. Alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi de denilmektedir. Ayrılamayan piklerin veya hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim ( $V_0$ ) olarakta adlandırılır. Bir maddenin alıkonma hacmi ayırımı yapılacak olan maddenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmidir. Alıkonma hacmi; alıkonma zamanı ile hareketli faz akış hızını ( $F$ ) çarpılması ile hesaplanabilir.

$$V_0 = t_m \times F \quad (1.5)$$

## **ii. Kapasite faktörü, k'**

Kapasite faktörü alıkonma faktörü olarak da bilinmektedir. Kolon içerisinde çözünen maddenin ilerleme hızını ifade eden bir faktördür. A çözüneni için kapasite faktörü,

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad (1.6)$$

Eşitlik 2.6'da  $K_A$ ; A maddesi için dağılma katsayısı,  $V_S$ ; sabit faz hacmi,  $V_M$ ; hareketli faz hacmidir. Dağılma katsayısını ise,  $K$  çözünenin sabit fazdaki molar değişiminin ( $C_S$ ), hareketli fazdaki molar derişimine ( $C_M$ ), oranı ile hesaplanır (Eşitlik 1.7).

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (1.7)$$

Kapasite faktörü, hareketli fazın sabit akış hızında, Eşitlik 1.8'deki gibi alıkonma zamanları kullanılarak da hesaplanabilir. İyi bir ayırım için kapasite faktörü değerinin 1 ile 10 arasında olması gerekmektedir.

$$k' = \frac{t_A - t_M}{t_M} \quad (1.8)$$

Kapasite faktörü maddenin kimyasal ve fiziksel özelliklerine, uygulanan yöntemle göre farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Kromatografik sistemde en önemli parametrelerden biridir.

### **iii. Seçicilik, $\alpha$**

Seçicilik, esas olarak sabit fazın özelliğine göre değişiklik gösterse de seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden birisi de hareketli fazın bileşimidir.

Seçiciliğin matematiksel ifadesi Eşitlik 1.9'da gösterilmiştir. Bu eşitlikte kolonda daha uzun süre tutulan maddeye ait kapasite faktörünün daha kısa süre tutulan maddeye ait kapasite faktörüne oranlanması ile hesaplanabilir. Bu tanıma göre seçicilik daima 1'den büyüktür (Skoog, 1998; White, 1990; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995; Rosing, 2000; Yıldız, 1997).

$$\alpha = \frac{k_B'}{k_A'} \quad (1.9)$$

### **iv. Kolon etkinliği, N**

Kolon verimliliğinin bir ölçüsü olarak, genel olarak birbiri ile bağlantılı iki terim kullanılmaktadır. Bunlar, tabaka yüksekliği, H ve tabaka sayısı N'dir. Bu iki terim arasında Eşitlik 1.10'daki bağıntı vardır,

$$N = \frac{L}{H} \quad (1.10)$$

L, kolon dolgu uzunluğudur. Kolon verimliliği kolon tipi, sabit faz tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına göre değişebilmektedir. Kolonun eşdeğer tabaka sayısı (N), kolon etkinliğinin bir ölçüsüdür. Genel olarak N değerinin hesaplanması Eşitlik 1.11'de gösterilmiştir. Eşitlik 1.12'de ise teorik plaka sayısının hesaplanması verilmiştir. Eşitlik 1.11 ve 1.12'de  $W_A$ , A maddesine ait zemin çizgisindeki pik cm cinsinden genişliğidir (Şekil 1.12)( White, 1990; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995; Rosing, 2000).

$$N = 16 \left( \frac{t_A}{W_A} \right)^2 \quad (1.11)$$

$$N_{et} = 16 \left( \frac{t_A - t_m}{W_A} \right)^2 \quad (1.12)$$

### **v. Ayırıcılık, R**

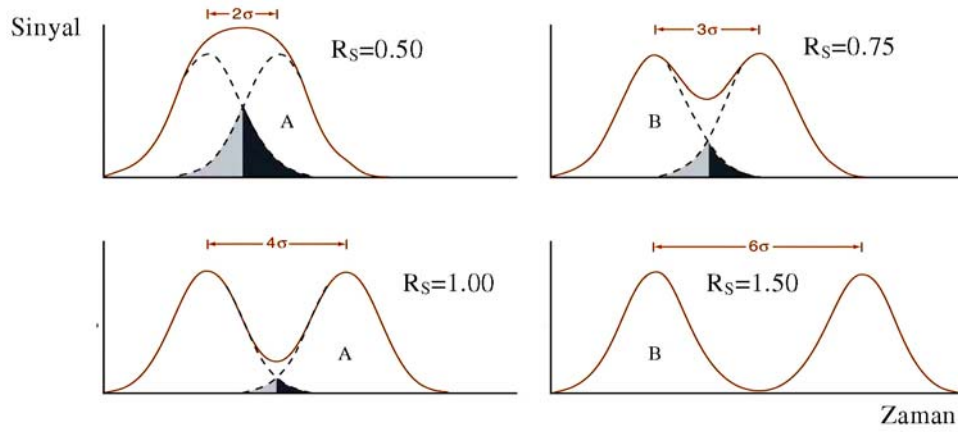
Ayırıcılık kolon etkinliğinin ve çözücü etkinliğinin bir ölçüsüdür. Eşitlik 1.13'de ayırıcılığın matematiksel olarak hesaplanması verilmiştir.

$$R_s = \frac{2(t_B - t_A)}{W_A + W_B} \quad (1.13)$$

ve

$$R = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{k' + 1} \right) \sqrt{N} \quad (1.14)$$

Ayırıcılığın hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Genel olarak birbirini takip eden iki pik için R değeri 1.5 ve üzeri iken tam ayırım sağlanmaktadır. R=1.325 iken maddelerden biri diğeri içine %0.3 oranında girmiş durumda, R=1 iken, maddeler birbiri içine % 4 oranında girmiş durumdadır ve R=0.75'de ayırım olmamaktadır. R=1,5 olduğu zaman maddeler %95 olasılıkla birbirlerinden ayrılmış olarak kabul edilebilir (Şekil 1.13)( Skoog, 1998; White, 1990; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Scott, 1995; Adamovics, 1997).

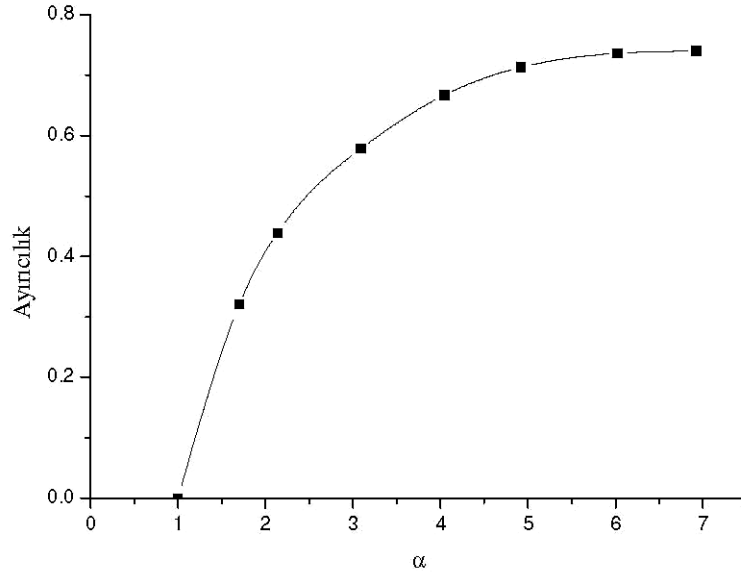


Şekil 1.13. Ayırıcılığın piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi ( $\sigma$ :sabit)

**Seçiciliğin Ayırıcılık Üzerine Etkisi:** Genelde seçicilik arttığı zaman ayırıcılığında artması beklenir. Eşitlik 1.14'deki tek değişken  $\alpha$  olduğunda bu ifade aşağıdaki gibi gösterilebilir (Hamilton, 1982).

$$R = C_1 \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \quad (1.15)$$

$C_1$ ; bir sabittir ve  $\alpha$ 'ya karşı R grafiğe geçirildiğinde  $\alpha$ 'nın artmasıyla R değeri belli bir değere kadar artıp daha sonra sabit kalmaktadır (Şekil 1.14).  $\alpha=1$  olduğunda iki bileşik arasında ayırım gerçekleşmemektedir.

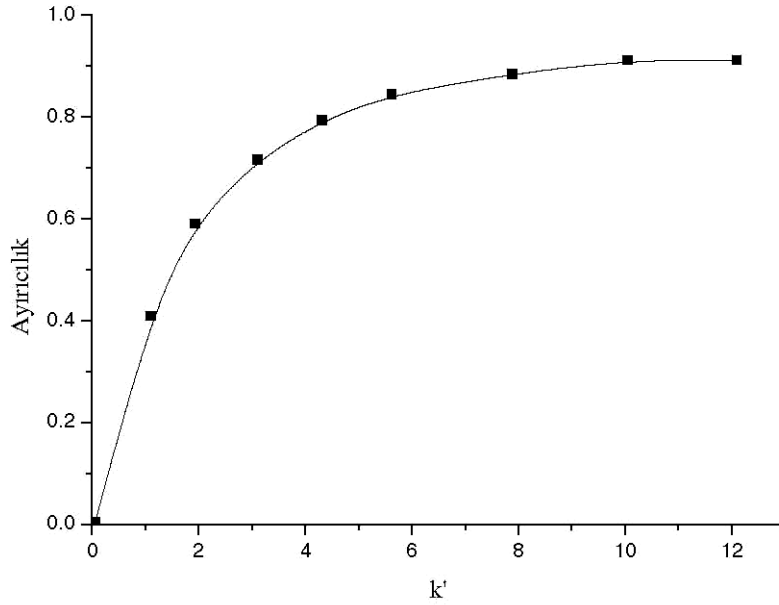


Şekil 1.14. Seçiciliğin ayrımcılık üzerine etkisi

**Kapasite Faktörünün Ayrımcılık Üzerine Etkisi:** Ayrımcılık ile kapasite faktörü arasındaki ilişki tek değişken  $k'$  olduğunda Eşitlik 1.16'daki gibi ifade edilir.

$$R = C_2 \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (1.16)$$

Burada  $C_2$  sabittir ve  $k'=0$  iken ayırım gerçekleşemez. Büyük  $k'$  değerlerinde Eşitlik 1.16'in sağ tarafı 1 olur ve ayrımcılıkta bir farklılık olmaz. Optimum  $k'$  değeri 1 ile 10 arasında olduğunda istenilen ayrımcılığa ulaşılır.  $k'$  ye karşı  $R$  grafiğe geçirildiğinde  $k'$  10 değerine gelene kadar  $R$  değeri artıp daha sonra sabit kalmaktadır (Şekil 1.15) (Hamilton, 1982).



Şekil 1.15. Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi

#### **vi. Pik Simetri Oranı, PSO**

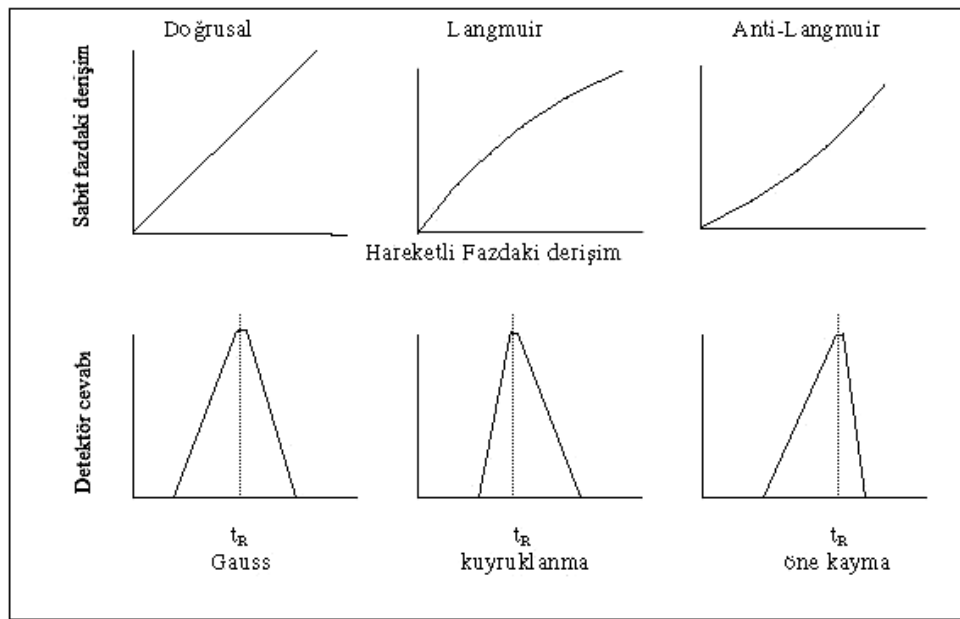
PSO, bir A pikine ait  $bc$  ve  $ab$  uzunluklarının oranlanmasıyla hesaplanır (Şekil 1.12, Eşitlik 1.17). PSO pik yüksekliğinin zemin çizgisinden itibaren % 10'luk kısmından ölçümler yapılarak hesaplanır.

$$PSO = \frac{bc}{ab} \quad (1.17)$$

Düzenli bir kromatogram eğrisinin olması için PSO değerinin '1' olması gerekir. Pratikte ise 0,8-1,2 aralığındaki değerler kabul edilebilir (Hamilton, 1982).

Kromatografide kuramsal olarak kolonda ayrılan maddelere ait bantların Normal dağılım (Gauss dağılımı) göstermesi beklenir. Normal dağılımda sabit fazdaki madde derişimi ile hareketli fazdaki madde derişimi arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Ancak bu her zaman mümkün değildir. Maddeler kolondaki sabit faza tutulduğunda Langmuir ya da anti-Langmuir davranış gözlenmektedir (Şekil

2116). Langmuir izotermi sabit fazda daha fazla miktarda madde bulunduğunu, Anti-Langmuir izotermi ise, tam tersini göstermektedir. Elüsyon eğrisinin önünde ya da arkasında bir alan oluşur ve bu da madde pikinde öne kayma (fronting) ya da kuyruklanma (tailing) şeklinde gözlenir. Sabit fazdaki derişim ile hareketli fazdaki derişim arasında doğrusal bir ilişki olduğunda,  $K$ , dağılma katsayısı sabittir, alıkonma zamanı madde derişiminden bağımsızdır ve gözlenen madde piki çan (Gauss) eğrisi şeklindedir (Hamilton, 1982).



Şekil 1.16. Alıkonma zamanı ve pik şekline etkisi

Genellikle kromatogramlarda geç gelen pikler önce gelen piklere göre daha yayvan ve genişlemiş olurlar. Bu durum pikin şeklini bozacağından istenilen bir durum değildir. Böyle durumlarda pik şeklinde kuyruklanma da gözlenebilir.

## 1.6. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)

Sağlık alanında kullanılan analitik yöntemlerden, ilaç analizlerinde, biyolojik numune analizlerinde, biyodeşdeğerlik, biyoyararlanım çalışmalarında, farmakokinetik bilgilerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, ilaç etken maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde, ilaç etken maddelerinin metabolitlerinin tayininde yararlanılmaktadır.

Bu işlemlerin yapılabilmesi için iyi karakterize edilmiş, güvenilir sonuçların elde edilebileceği tamamen geçerli analitik yöntemlerin kullanılması veya geliştirilmesi gereklidir. Her yeni geliştirilen yöntemin validasyon sonuçları birbirinden bağımsızdır (Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996).

Yöntem validasyonu analitik işlemlerin istenilen kullanım için uygunluğunu gösteren parametrelerdir. Uygulanacak analitik işlemler için hangi tip validasyon karakteristiklerinin kullanılacağı belirlenmelidir. Geliştirilen bir yöntemin veya parametrelerinde ufak değişiklikler yapılmış bir yöntemin geçerli olabilmesi için mutlaka gerekli validasyon testlerinin ve ilgili hesapların yapılmış olması gereklidir (Riley ve Rosanske 1996; Swartz ve Krull 1997; ICH 1994; Snyder ve ark 1997; Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996; Adamovics 1997; Braggio ve ark 1996; Shabir 2003; Papadoyannis ve Samanidou 2004; Ermer 2001; Mc Dowell 1999; Ermer ve Miller 2005; De Bievre ve Gunzler 2005; Vessman 1996).

Amerikan Farmakopesine (The USP 24, 2000) göre validasyon, analizi yapılacak madde için geliştirilen analiz yönteminin seçilen aralıkta uygunluğunu, doğruluğunu, duyarlılığını, tekrar edilebilirliğini ve sağlamlığını belirtmektedir.

### 2.5.1. Validasyonun Genel İşlemleri

1. Cihazın kontrolü ve validasyonu, (tüm donanım ve yazılımlar için geçerlidir)
2. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametrelerde yapılan değişikliklerden sonra yapılan validasyon,
3. Cihaz ve ilgili yöntem seçildikten sonra ve validasyonları yapıldıktan sonra ayırma yöntemleri için gerçekleştirilen Sistem Uygunluk Testleri (SUT). Bu testler FDA ve USP tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir.

Bir analitik yöntemin validasyonu; laboratuvar çalışmaları ile belirlenen ve istenen analitik uygulamaları için gerekli yöntem performans parametrelerinin bulunmasıdır. Bunlar analitik parametreler cinsinden ifade edilir. Bu parametreler hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarda kullanılan yöntemler için geçerlidir (Riley ve Rosanske 1996; Swartz ve Krull 1997; ICH 1994; Snyder ve ark 1997; Ahuya ve Scypinski 2001; Lunte ve Radzik 1996; Adamovics 1997; Braggio ve ark 1996; Shabir 2003; Papadoyannis ve Samanidou 2004; Ermer 2001; Mc Dowell 1999; Ermer ve Miller 2005; De Bievre ve Gunzler 2005; Vessman 1996).

Biyoanalitik yöntemler; kan serum, plazma veya idrar gibi biyolojik sıvılarda etkin maddelerin veya metabolitlerinin; gaz kromatografi (GK), sıvı kromatografisi (SK) veya bunların SK-KS, GK-KS, SK-KS-KS, GK-KS-KS gibi kütle spektrometrisi (KS) kombinasyonları ile elektrokimyasal ve radyokimyasal yöntemlerle miktar tayinlerini içerir.

## 2.5.2. Tipik Validasyon Parametreleri

### Doğruluk

Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir.

Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Bu aynı zamanda biyolojik sıvılardan tüketmenin etkinliğini de gösterir. Kullanılan cihazlardan yapılan ölçümlere dayalı olarak hesaplanır. Biyolojik sıvılarda çalışılırken geri kazanımın % 100 olması gerekmez.

Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişim için yapılır; alçak (tayin alt sınırında veya yakın derişiminde), orta (çalışma derişim aralığının ortasında yer alan bir derişimde) ve yüksek (çalışma derişim aralığının üst sınırlarında veya yakınında yer alan bir derişimde) derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen herbir derişim için minimum 5 tayin yapılmalıdır. Bu tayinlerden minimum 3 tanesi ortalama değerin % 15 inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki derişim için bu sapma % 20 yi geçmemelidir (Riley ve Rosanske 1996).

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir. Bunlar:

#### i. Referans bir yöntemle karşılaştırmak

Geliştirilen analiz yöntemi ile, 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Sonuçlar referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Bu karşılaştırma işlemi için student-t ve Fisher (F) testleri kullanılır. Student-t testi ile iki yöntemin ortalamaları arasındaki, F testi ile de standart sapmaları arasındaki farklılık karşılaştırılır. Hesapla bulunan t ve F değerleri çizelgelerde verilen teorik t ve F değerleri ile kıyaslanır. Hesapla bulunan değerlerin çizelgede yer alan değerlerden küçük oluşu geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas ve doğru olduğunu gösterir. Sonuçların

ortalamaları, % bağıl standart sapma (%BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir (Eşitlik 2.18) (Swartz ve Krull 1997; ICH 1994).

$$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.18.)$$

GD: Gerçek Değer

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$  : Ortalama Değer

### **ii. Kör matriks ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:**

Farmasötik dozaj formları gibi matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrikse değişik derişimlerde eklenir. Bu matriks ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur.

Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

### **iii. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi**

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

## **Kesinlik**

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile bir numuneye aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan herbir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Bunlardan en az 3 deney sonucunun % BSS'ı olarak teorik değerin % 15'inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki derişim için (LOQ) bu sapma % BSS olarak % 20 yi geçmemelidir. Kesinlik üç kısımda düşünölmelidir. Tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility).

### **1. Tekrarlanabilirlik**

Kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliğı ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır (30-40 ölçüm tercih edilmelidir). Bu tekrar edilebilirlik gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak da adlandırılır. Sonuçta, kesinlik elde edilen değerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve %BSS ≤ 1.0 olmalıdır (The USP 24, 2000).

### **2. Orta-Kesinlik**

Orta kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Farklı günlerde, farklı analizciler veya farklı cihazlar kullanılarak saptanabilen değelerdir. Çalışmalar arası, deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değeri çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Bu kesinliğı sağlayan çalışma diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla yapılır. Sonuçta, orta kesinlik elde edilen değerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve %BSS ≤ 2,0 olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değeri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

### 3. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Özellikle yöntem tek biçimliliği (standardizasyonu) çalışmalarında kullanılan bir kesinlik değeridir. Geliştirilecek yöntem farklı laboratuvarlarda da aynı anda kullanılacaksa bu kesinliğin hesaplanması ve değerinin raporda belirtilmesi gerekir. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı analizciler tarafından (En az bir kaç gün ara ile yapılmalıdır) hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçta, tekrar elde edilebilirlik, ölçülen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir ve  $\%BSS \leq 2,0$  olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir (The USP 24, 2000).

### Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Bu kompleks numune karışımlarının analizinde girişim derecesinin de bir ölçüsüdür. Etken madde yanında safsızlıkların, parçalanma ürünlerinin, benzer kimyasal maddelerin veya plasebo bileşenlerin bulunduğu numune ile bulunmadıkları numunede yapılan miktar tayini analizlerde etkin maddenin bulunan derişimleri arasındaki fark olarak ifade edilir. Özellikle stabilite tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır (Adamovics 1997).

Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır. Kütle spektrometri ile birleştirilmiş yöntemlerin kullanılması durumunda girişimin olmadığı kabul edilir.

Seçicilik 2 yolla saptanır:

i- Tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin girişim yapma oranına veya ayırma yöntemlerinde, “Ayrım gücü” ( $R_S$ ) değerlerine bakılır. Bu değer ayırma yöntemleri için  $R_S \geq 2,0$  olmalıdır.

ii- Ayırma yöntemlerinde duyarlı bir dedektör seçilebilir. İncelenecek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan dedektörler Elektrokimyasal veya Radyoaktivite Dedektörleridir. Bu dedektörler belli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin girişim yapma ihtimalini yok ederler.

### **1. basamaktaki işlem için:**

i- Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen maddelerin varlığında aynı anda geliştirilen yöntemle analiz edilir ve cevaptaki değişim incelenir. Maddeler kolona etken madde ile birlikte enjekte edilir ve ayırım gücü değerlerine bakılır ( $R \geq 2,0$  olmalıdır).

ii- İlaç dozaj şekillerinin yardımcı maddeleri, analizi yapılan madde ile birlikte geliştirilen yöntemle analizlenir ve cevap incelenir. Ayırma yöntemlerinde kolona enjekte edilir ve R değerlerine bakılır ( $R \geq 2,0$  olmalıdır).

iii- Maddenin %10-30'unu bozacak kadar süre, 0,1 N HCl (asit); 0,1 N NaOH (baz); 50 °C sıcaklık; UV ışığı veya %3 lük  $H_2O_2$  çözeltisi ile etkileştirilir ve elde edilen çözelti geliştirilen yöntemle analiz edilir, ayırma yöntemlerinde ise kolona enjekte edilir. Sonuçta elde edilen kromatogramdaki piklerin R değerleri  $R \geq 2,0$  olmalıdır.

iv- Geliştirilen yöntemin şartlarında ufak değişiklikler oluşturulur (pH, tampon, iyon şiddeti, sıcaklık gibi). Bu değişiklikler sonucu cevapta bir farklılık olup olmadığı, ayırma yöntemlerinde herhangi bir ilave pik olup olmadığı ve bunun madde pikini etkileyip etkilemediği saptanır.

v- Ayırma yöntemlerinde kütle spektrometrisi dedektörleri gibi duyarlı ve hassas

tekniklerle veya DAD (Fotodiyot dizisi) dedektörü ile değişik dalga boyunda deney anında taramalar yaparak herhangi ilave bir pik olup olmadığını kontrol edilir.

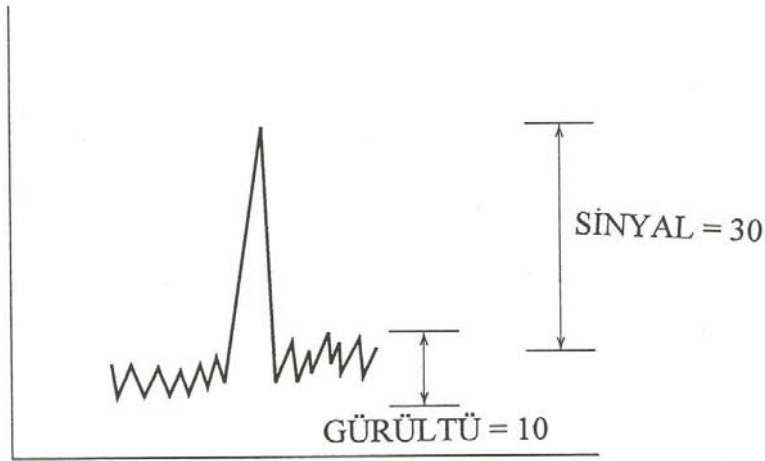
### Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)

Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile *Teşhis Sınırı* saptanmasında Eşitlik 1.19. kullanılır;

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{SS} / m \quad (1.19.)$$

eşitliği kullanılır. Bu eşitlikte SS= Kör çözeltilerinde ( en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlarının veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. Teşhis sınırını hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli

### Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisinde girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir.

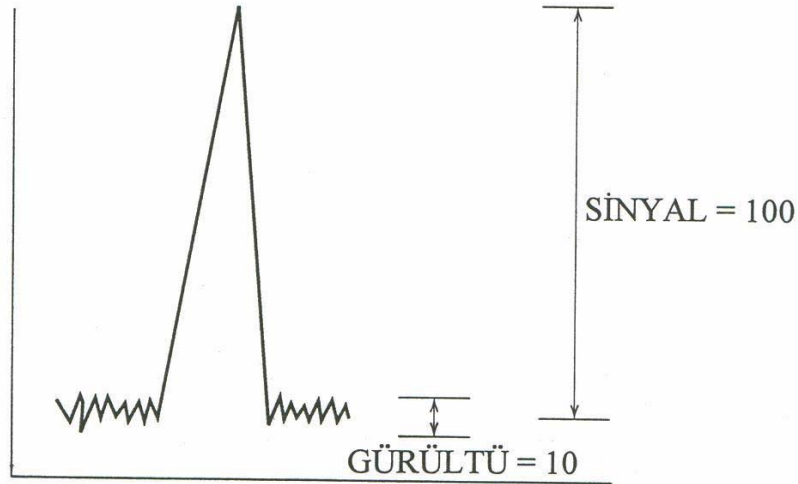
Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tesbiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile *Tayin Alt Sınırı* saptanmasında Eşitlik 1.20. kullanılır;

$$LOQ = 10 \times SS / m \quad (1.20)$$

eşitliği kullanılır. SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir (Şekil 1.18).

SS ve m değerleri LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.



Şekil 1.18. Tayin alt hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli

Biyolojik sıvılarla çalışılırken LOQ'yu belirlemek için aşağıdaki şartların yerine gelmesi gerekir:

- a- Analitin LOQ'daki derişimi için cihazdan ölçülen cevap kör için ölçülen cevabın en az 5 katı olmalıdır
- b- Analit için gözlenen pikin veya alınan cevabın tanımlanabilir ve diğer girişim yapma ihtimali bulunan maddelerden ayrı olması gerekir ayrıca % 20 kesinlik ve % 80-120 doğrulukta tekrar edilebilir olmalıdır.

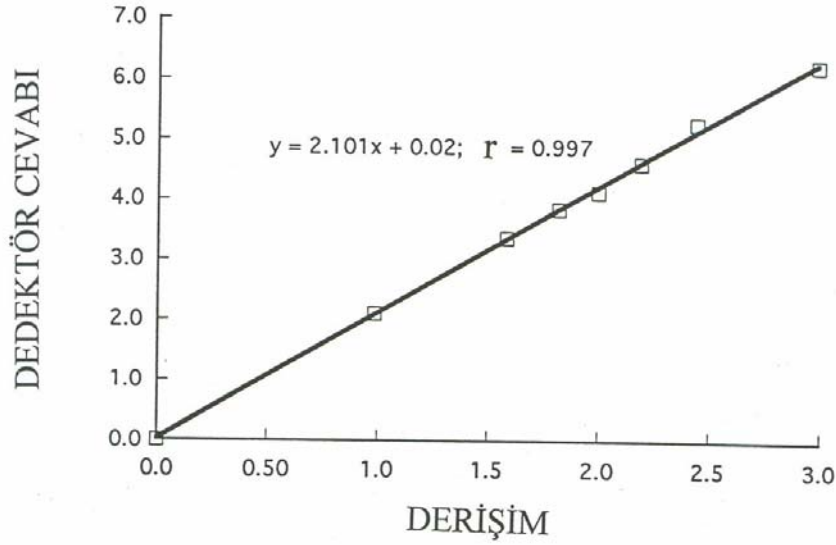
### **Doğrusallık**

Derişime karşı cevabın doğrusal olarak değişmesi ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korrelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametrelerdir. Analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı  $r = 0,999$  ve üzerinde ise ve cevap değerleri çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltilerden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50 sinden düşük ve üst sınır da %150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesişim değerlerinin %BSS ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

### **Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği)**

Analitin bilinen derişimleri ile değişen değişkenin cevapları arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve Tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için (kör hariç) cihazdan ölçülen değerlere göre hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. Kalibrasyon doğrusu (grafığı) ve eşitliği

Biyolojik sıvılarla çalışılırken kalibrasyon eğrisi oluştururken aşağıdaki kriterlerin yerine gelmesi gerekir:

- a- Tayin alt sınırı derişiminden elde edilen cevaplar arasındaki sapma %20 den fazla olmamalıdır
- b- Tayin alt sınırı derişiminin dışında seçilen standart derişimlerden elde edilen cevaplardaki sapmalar % 15' den fazla olmamalıdır.

### Duyarlılık

Duyarlılık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır.

### Çalışma Aralığı

Yeterli doğruluk ve duyarlılıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır. Derişim aralığı genellikle seçilen

yöntemin tipine göre değişir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduktan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçülür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50' sinden düşük ve %150' sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın % 50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

### **Sağlamlık**

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir parametredir.

Örneğin pH 3 de  $\pm 0.1$  kadar bir değişim gösteren bir madde pH 4,5 da değişmeden aynı sonucu veriyorsa pH 4,5 ortam olarak seçilmelidir.

### **Tutarlılık**

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın: Aynı laboratuvarında farklı analizciler tarafından; Aynı laboratuvarında farklı cihazlar tarafından; Farklı laboratuvarında gerçekleştirilmesi; Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; Farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi; aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir.

Orta kesinlikle de benzeşmektedir. % BSS ile ifade edilir. Uluslararası Uyum Konferansı (ICH= International Conferance on Harmonization) bunu yapılması kesin olarak zorunlu işlemler gurubuna dahil etmemiştir.

### **Yöntem Validasyonu İle İlgili Çalışmaların Sunumu**

Bir analitik yöntemin validasyonu; labortauvar çalışmaları ile doğrulanması ve sonuçların deney validasyon raporları olarak sunulması ile tamamlanır. Müracaat sırasında hazırlanacak raporlar aşağıdaki bilgileri kapsamalıdır:

- a- Özet bilgi,
- b- Kullanılan yöntem ile ilgili bilgiler,
- c- Rutin numune analizlerine yöntemin uygulanmasıyla elde edilen biyoanalitik raporlar,
- d- Diğer bilgiler.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Kimyasal Maddeler

- Telmisartan (Cosmo)
- Hidroklorotiazit (Cambrex)
- İrbesartan (Teva)
- Losartan (Nobel)
- Sodyum dihidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , JT. Baker)
- Fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , JT. Baker)
- Asetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , JT. Baker)
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , JT. Baker)
- Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ , JT. Baker)
- Milli-Q saf su

### 2.2. Cihazlar

- YPSK pompası (Waters 2695)
- UV/GB (Waters 2487)
- YPSK Kolonu (Inertsil ODS 3V 5  $\mu\text{m}$  4.6x250 mm)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-2550)
- pH metre (WTW pH 526)
- Ultrasonik banyo (Bandalin Sonorex)
- Hassas terazi (Mettler)
- YPSK saflıkta su cihazı (Sartorius)
- Derin dondurucu (Arçelik)

### 2.3. Cam ve Diğer Malzemeler

- Balon joje (20ml, 100ml) (İsolab)
- Mezur (1000ml, 2000ml) (İsolab)
- Beher (İsolab)

- Enjektör (5ml, 10ml) (Ayset)
- Cam pipet (1ml, 2ml) (Schott)
- 0.45 $\mu$ m PTFE filtre (Wattman)

## 2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

**2.4.1. Telmisartan Stok Çözeltisi:** Analiz işlemlerinde kullanılacak telmisartan stok çözeltisi derişimi 0,8 mg/ml olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Ara stok çözeltiler ise, istenen derişim değerlerine stok çözeltinin hareketli faz ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

**2.4.2. Hidroklorotiazit Stok Çözeltisi:** Analiz işlemlerinde kullanılacak hidroklorotiazit stok çözeltisi derişimi 0,125 mg/ml olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Ara stok çözeltiler ise, istenen derişim değerlerine stok çözeltinin hareketli faz ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

**2.4.3. İrbesartan Stok Çözeltisi:** Analiz işlemlerinde kullanılacak irbesartan stok çözeltisi derişimi 1,0 mg/ml olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Ara stok çözeltiler ise, istenen derişim değerlerine stok çözeltinin hareketli faz ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

**2.4.4. Sistem Uygunluk Çözeltisi:** Telmisartan, hidroklorotiazit ve irbesartan stok çözeltilerinden 1'er ml alınmış 10 ml'lik balonjojeye konulmuştur ve istenilen hacime hareketli faz ile tamamlanarak sistem uygunluk çözeltisi hazırlanmıştır.

**2.4.5. Test Çözeltisi:** Miktar tayini yapabilmek amacıyla 10 tablet duyarlı olarak tartılmış, havanda ezilmiş ve 1 tablete eşdeğer tablet tozu hassas olarak tartılıp 100 ml'lik balonjojeye alınmıştır. Üzerine metanol eklenerek ultrasonik banyoda 10 dk çözünmesi için bekletilmiştir. Hacmine metanolla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45µm PTFE filtreden süzölmüş ve bu süzöntüden 1ml alınarak 10 ml'lik balonjojeye konulmuş, hacmine hareketli faz ile tamamlanmıştır.

**2.4.6. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Çözeltisi:** 1,7 mM derişiminde NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> deiyonize su ile 1000 ml'lik balonjojede hazırlanmıştır. pH'sı derişik fosforik asitle 3,0'e pH metre kullanılarak ayarlanmıştır.

**2.4.7. Hareketli Faz Çözeltisi:** Günlük hazırlanmış 1,7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0)'den hacimce % 54 ile asetonitrilden hacimce % 46 karıştırılarak hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin pH değeri derişik fosforik asitle ayarlandıktan sonra asetonitril ilave edilmiştir. Hareketli faz 0.45 µm filtreden süzöldükten sonra 5 dk ultrasonik banyoda tutulup gazı giderilmiştir.

## **2.5. YPSK Yöntemi**

### **2.5.1 Deneyin Yapılışı**

YPSK sistemine telmisartan ve hidroklorotiaziti enjekte etmeden önce, sistemin dengelenmesi ve kanallarda bulunan havanın giderilmesi amacıyla öncelikle deiyonize su ve YPSK saflıkta asetonitril geçirilir. Bu işlem aynı zaman da bir önceki analizden kalan hareketli fazın temizlenmesi amacıyla da yapılır. Daha sonrasında hareketli fazın kolondan geçirilmesi sağlanır. Böylece kolon ve sistem uygun hale getirilir.

Sistem kapatılırken kolonun temizlenmesi için ilk olarak saf su, daha sonra asetonitril ve en son aşamada asetonitril ve saf su birlikte geçirilir.

### **2.5.2. YPSK Yönteminin Optimizasyonu**

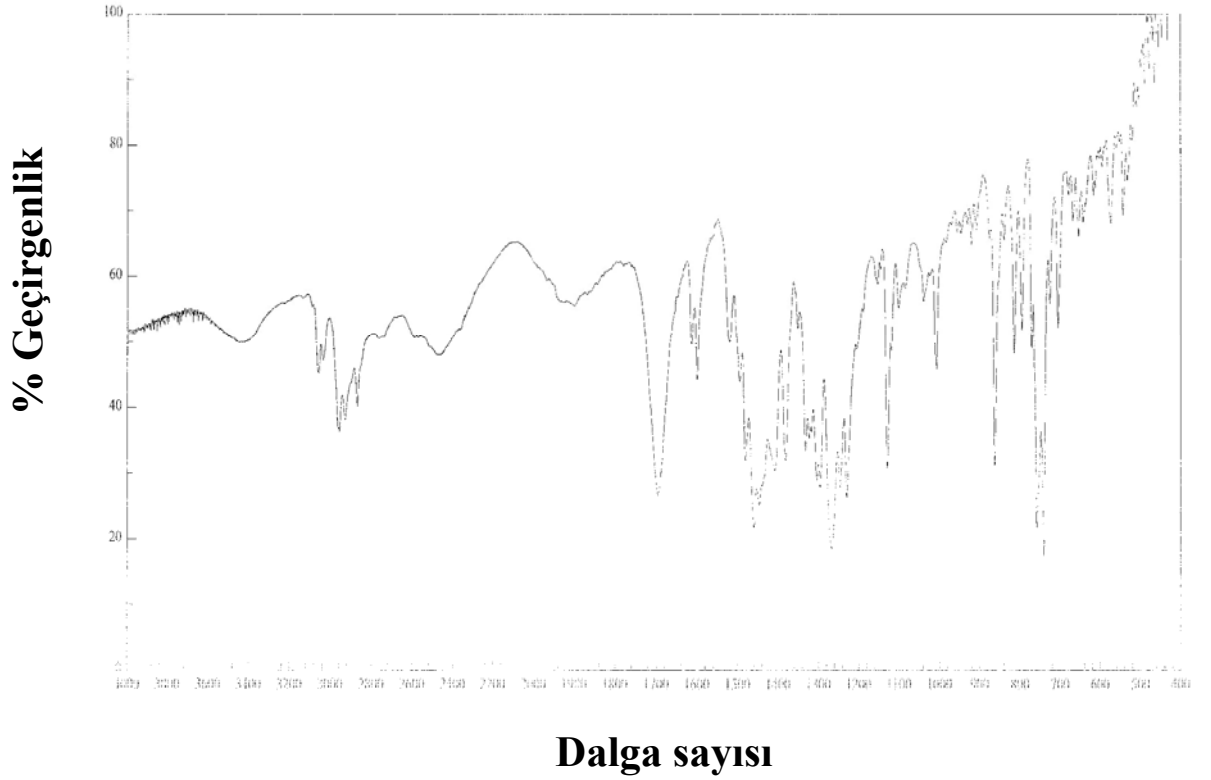
Geliştirilecek yöntem için en iyi ayırımın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar saptanmıştır. Bu amaçla, telmisartan ve hidroklorotiazitin ters-faz sıvı kromatografisiyle ayırımında; sabit faz seçimi, hareketli faz organik düzenleyici seçimi (metanol veya asetonitril), hareketli faz organik düzenleyici oranı (asetonitril oranı; % 44, 45, 46 (h/h)), iç standart seçimi ve hareketli faz akış hızı (1,0; 1,5; 2,0 ml/dk) etkileri incelenmiştir.

### 3. BULGULAR

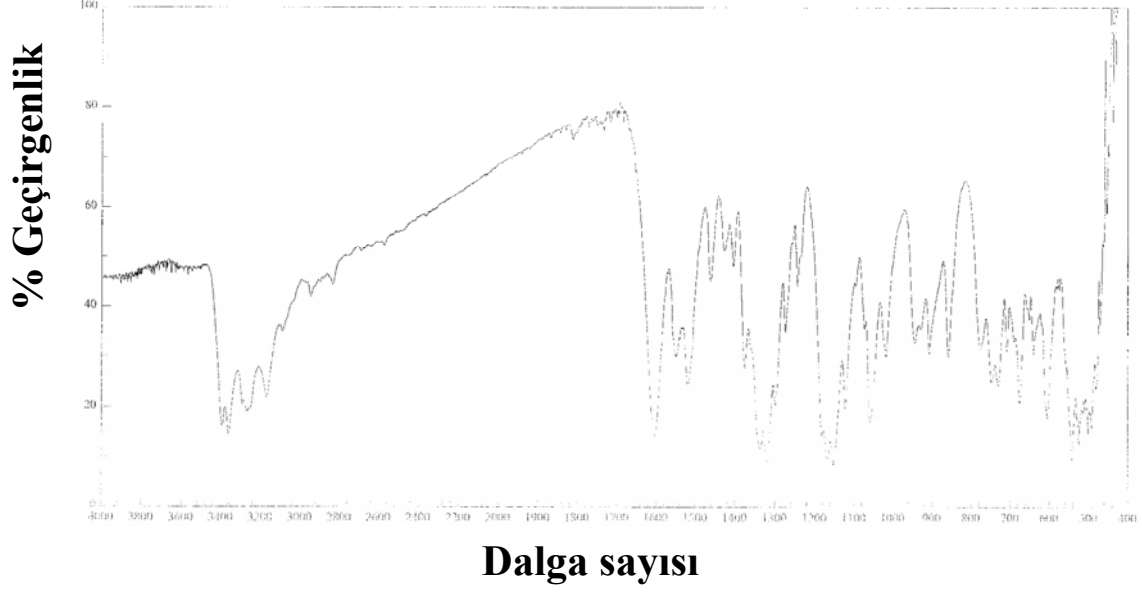
#### 3.1. Saflık Kontrolü

##### 3.1.1. IR Spektroskopisi

Telmisartan ve hidroklorotiazitin saflık kontrollerini yapabilmek için IR (kızıl ötesi) spektroskopisinden yararlanılmıştır (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



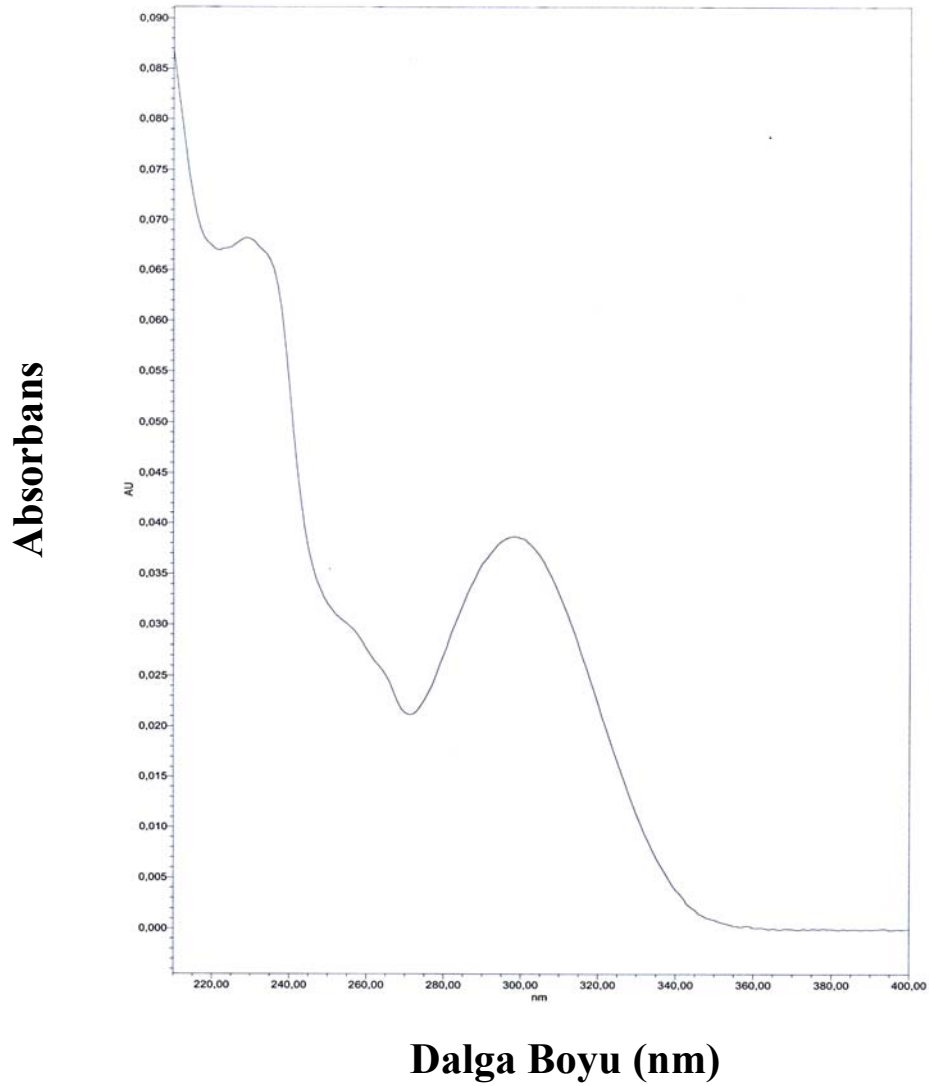
Şekil 3.1. Telmisartanın IR spektrumu



Şekil 3.2. Hidroklorotiazitin IR spektrumu

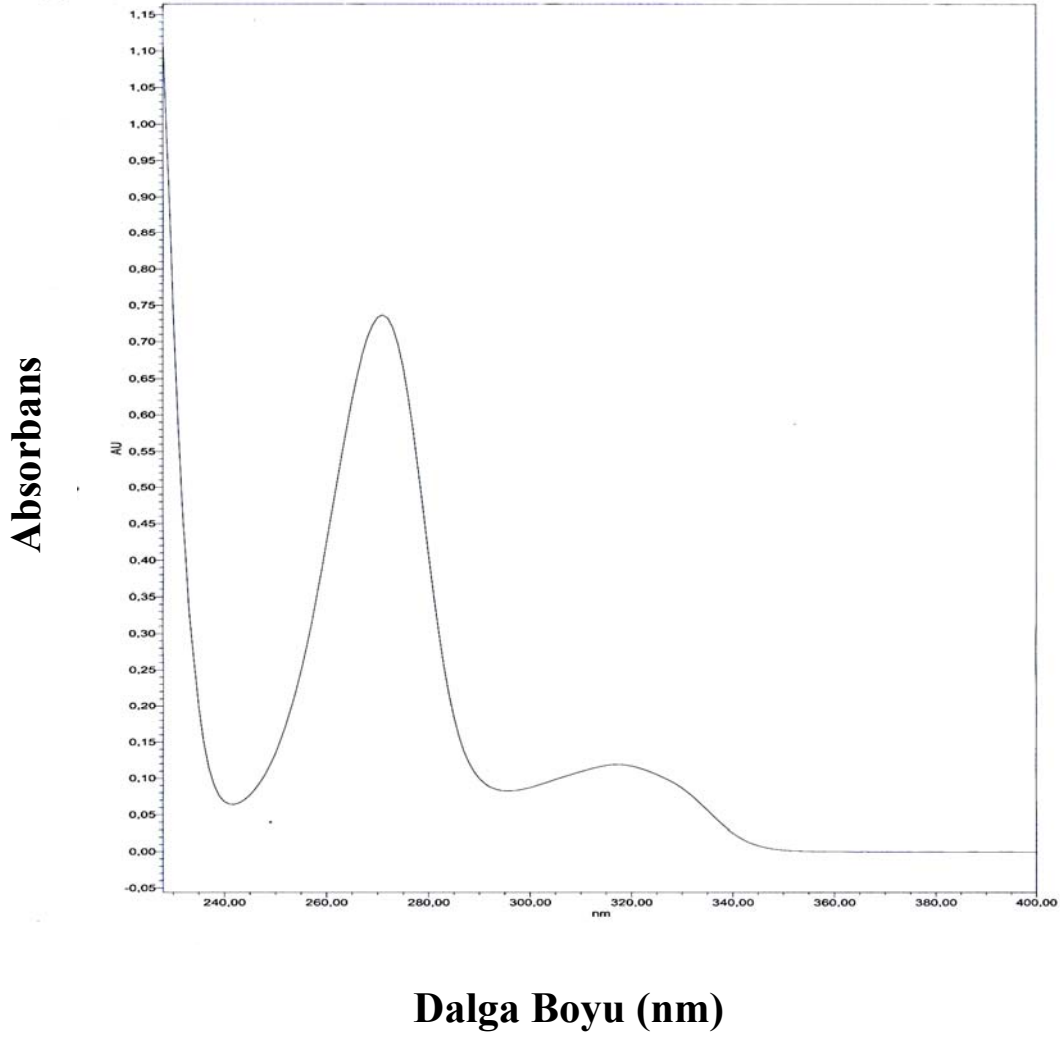
### 3.2. Telmisartan ve Hidroklorotiazitin Dalga Boyu Taraması

Telmisartan metanol ile çözüldükten (80 µg/ml) sonra spektrofotometre ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 298 nm olarak saptanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Telmisartanın 80 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltilisinin UV/GB spektrumu

Hidroklorotiazit metanol ile çözüldükten (12,5 µg/ml) sonra spektrofotometre ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 270 nm olarak saptanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hidroklorotiazitin 12,5 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltilisinin UV/GB spektrumu

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK yönteminde kullanılacak dalga boyunu seçmek için öncelikle her iki maddenin de dalga boyu taraması yapılmıştır. Telmisartanın minimum absorbans yaptığı ve hidroklorotiazitin de maksimum absorbans yaptığı dalga boyu olan 270 nm seçilmiştir.

### **3.3. Geliştirilen YPSK-UV/GB Dedektör Yöntemine Ait Analiz Bulguları**

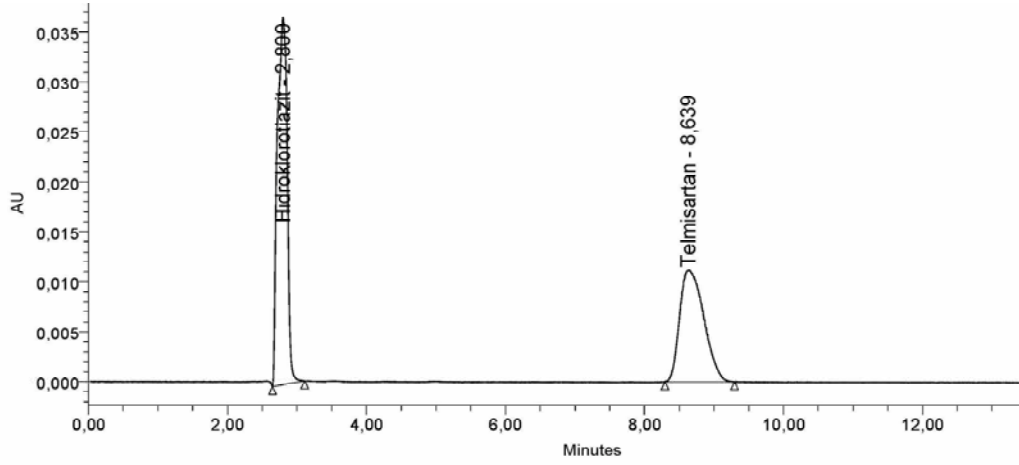
#### **3.3.1. YPSK Sistemi Optimizasyonu**

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, telmisartan ve hidroklorotiazitin kromatografik davranışları öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Analiz sırasında kısa zamanda sonuç alınabilmesi için iç standart seçimi yapılmıştır.

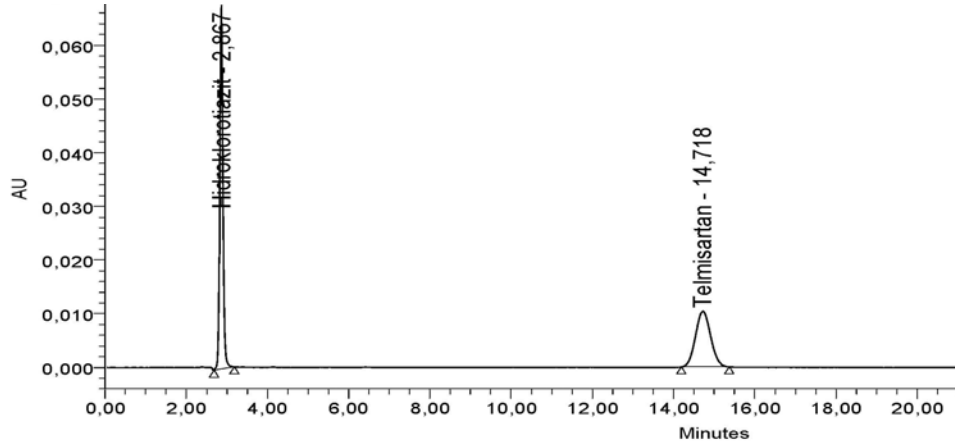
#### **A. Sabit Faz Seçimi**

Geliştirilen yöntemde YPSK ile analiz için iki farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Kolon seçimi sırasında hareketli faz tampon çözeltisi olarak sodyum dihidrojen fosfat (pH 3,0), hareketli faz organik düzenleyici olarakta asetonitril sırasıyla 40:60 (h/h) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C, hareketli faz akış hızı 1,0 ml/dk ve dalga boyu 270 nm şeklinde belirlenmiştir.

Telmisartan ve hidroklorotiazitin yukarıda verilen şartlarla ACE 5 C18 4.6x250 mm kolonu kullanılarak elde edilen kromatogram Şekil 3.5’de verilmiştir. Aynı şartlar kullanılarak Inertsil ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanılmıştır ve kromatogramlar kaydedilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. ACE 5 C18 4.6x250 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 4µg/ml derişiminde Telmisartan ve 0,03 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit.



Şekil 3.6. Inertsil ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 4µg/ml derişiminde Telmisartan ve 0,06 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit.

Her iki kromatogramda pik simetri oranları değerlendirilmiş, ACE 5 C18 4.6x250 mm kolonu kullanıldığında telmisartanın pik simetri oranı 1,4 ; Inertsil ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanıldığında ise 1,1 bulunmuştur. Bu yüzden Inertsil ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu ayırma işleminde kullanılacak kolon olarak seçilmiştir.

## **B. Hareketli Fazın Belirlenmesi**

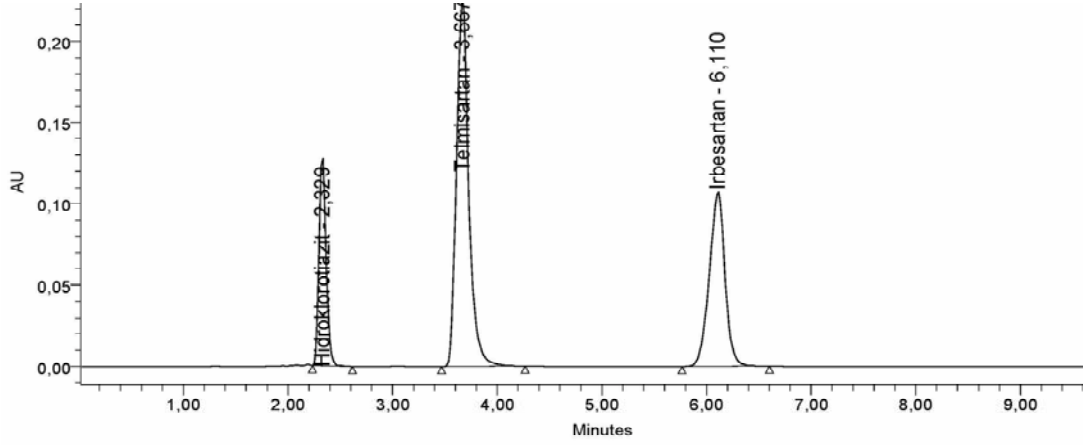
Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir.

### **1.Organik Düzenleyici Türü ve Miktarının Belirlenmesi**

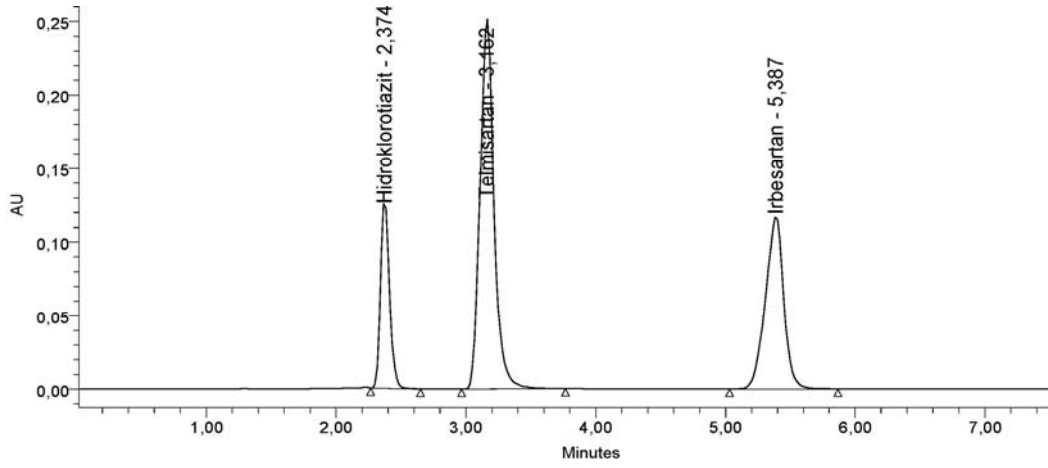
Organik düzenleyici seçimi için hareketli faz organik düzenleyicisi olarak metanol ve asetonitrilin telmisartan ve hidroklorotiazit analizine etkisi incelenmiştir.

Hareketli faza % 60 (hacimce) oranında asetonitril ve metanol eklenmiş, asetonitril içeren hareketli faz ile 2,867'de hidroklorotiazit piki elde edilirken, aynı kromatografik koşullarda, metanol içeren hareketli fazda 1,952 de elde edilmiştir. Fakat telmisartan piki metanol içeren hareketli fazda geç alıkonma zamanında gelmiştir. Akış hızı 2,0 ml/dk'ya çıkarılıp hareketli faz oranı değiştirildiğinde ise hidroklorotiazit 0,816 'de gelmiştir. Çözücü pikleri, hidroklorotiazitin alıkonma zamanında gelebileceği için organik düzenleyici olarak asetonitril seçilmiştir. İyi bir ayırım için en uygun asetonitril oranının saptanması amacıyla hareketli faz çözücü içeriği hacimce % 44, 45 ve 46 olacak şekilde değiştirilmiştir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, 1,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0) içeren hareketli faz (1,5 ml/dk) 30°C kolon sıcaklığında kullanılmıştır.

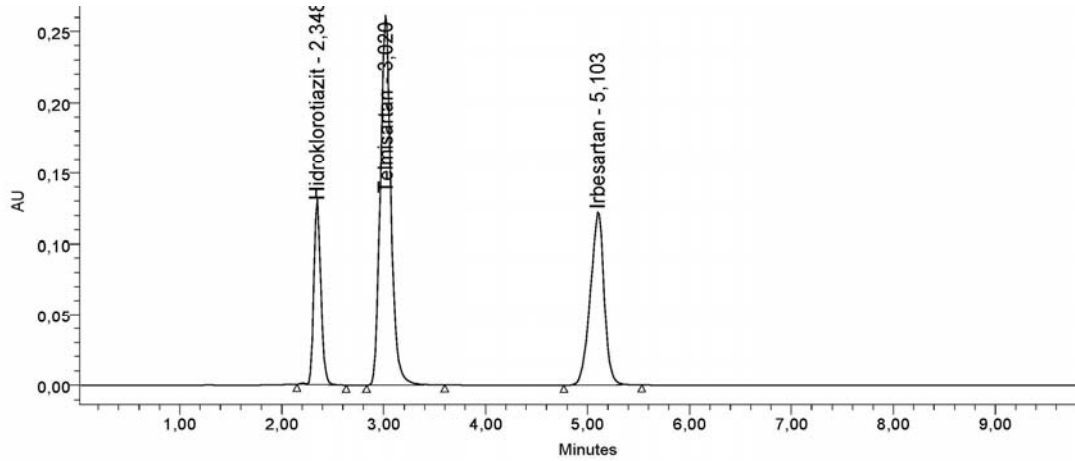
Hareketli fazın asetonitril miktarındaki değişimleri Şekil 3.7, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir. Analizin iyi bir ayırım ile daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi için, iç standart olarak seçilen irbesartan pikinin de daha kısa alıkonma zamanında gelmesinden dolayı Şekil 3.9'daki asetonitril oranının % 46 (h/h) olduğu kromatogram seçilmiştir.



Şekil 3.7. Asetonitril oranının % 44 (h/h) olduğu kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan



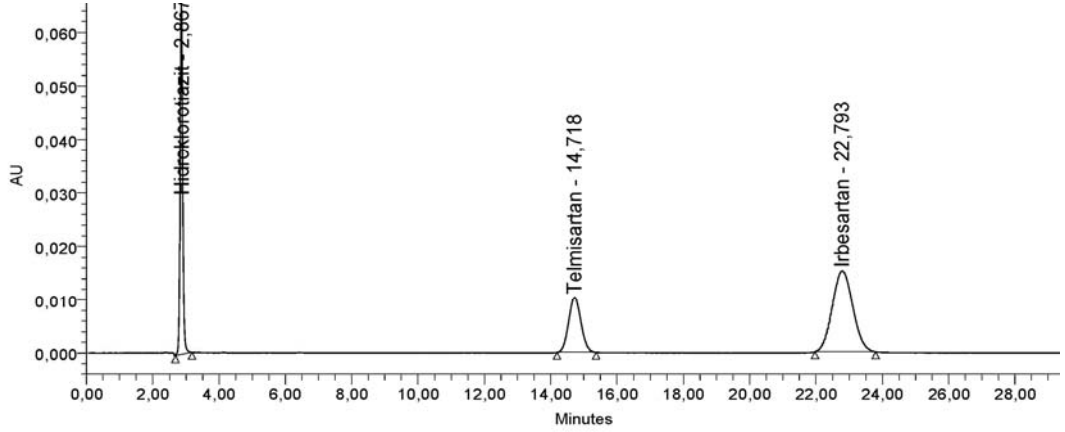
Şekil 3.8. Asetonitril oranının % 45 (h/h) olduğu kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan



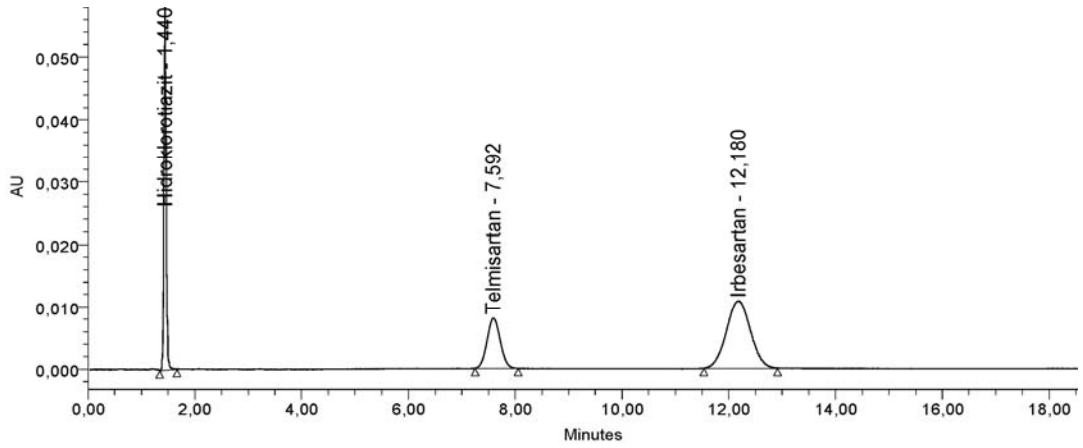
Şekil 3.9. Asetonitril oranının % 46 (hacimce) olduğu kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan

## 2. Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi

Telmisartan ve hidroklorotiazitin analizinde kullanılan hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, asetonitril ve 1,7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (60 :40 h/h ; pH 3,0) içeren hareketli faz, 30°C kolon sıcaklığında farklı akış hızlarında YPSK sistemine verilmiştir. Akış hızı 1,0 ; 1,5 ve 2,0 ml/dk olarak değiştirilmiştir ve kromatogramlar Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de verilmiştir. Hareketli faz YPSK sistemine 1,0 ml/dk akış hızı ile verildiğinde alıkonma sürelerinin uzun olduğu, 2,0 ml/dk akış hızında verildiğinde ise hidroklorotiazitin istenenden daha kısa sürede geldiği saptanmıştır. Bu şartlar göze alınarak optimum akış hızı 1,5 ml/dk olarak seçilmiş ve asetonitril oranının değiştirilmesiyle uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir.



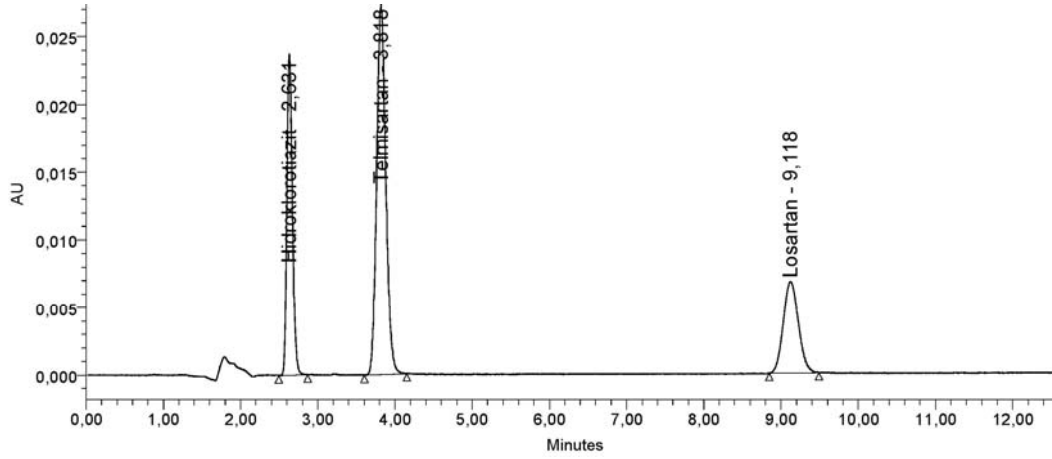
Şekil 3.10. Hareketli faz akış hızının 1.0 ml/dk olduğu kromatogram ; 4µg/ml derişiminde Telmisartan , 0,06 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan



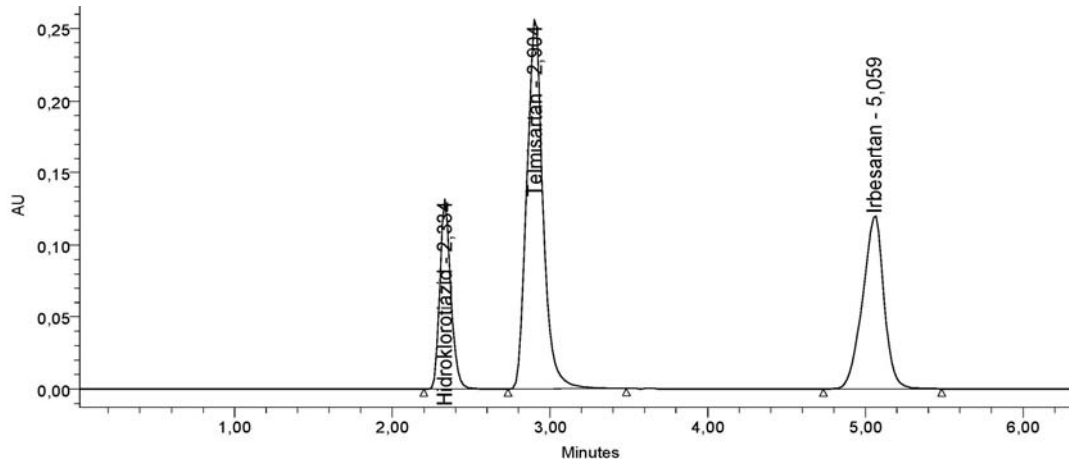
Şekil 3.11. Hareketli faz akış hızının 2,0 ml/dk olduğu kromatogram ; 4µg/ml derişiminde Telmisartan , 0,06 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan

### C. İç Standartın Belirlenmesi

Telmisartan ve hidroklorotiazitin tayini sırasında kullanılacak iç standart seçimi için parasetamol, mirtazapin, losartan ve irbesartan denenmiştir. Losartan ve irbesartanın ; telmisartan ve hidroklorotiazitten ayrımı sağlanmıştır (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Pik simetri oranı, seçicilik ve analiz süresi göz önüne alınarak iç standart olarak irbesartan seçilmiştir. İrbesartanın seçimi sırasında, asetonitril ve 1,7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (40 :60 h/h ; pH 3,0 akış hızı 1,5 ml/dk) içeren hareketli faz, 270 nm dalga boyu ve 30°C kolon sıcaklığı kullanılmıştır.



Şekil 3.12. İç standart olarak Losartanın kullanıldığı kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 20 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde Losartan



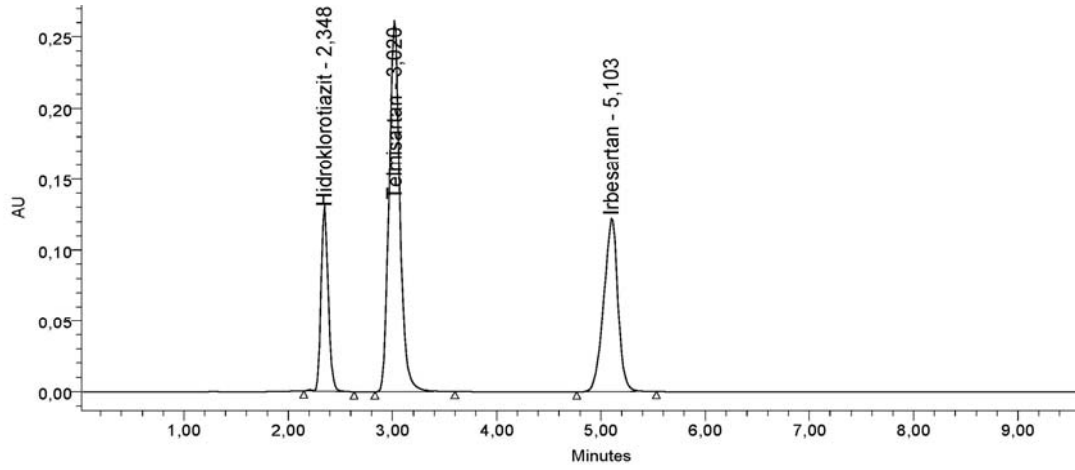
Şekil 3.13. İç standart olarak Irbesartanın kullanıldığı kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde Irbesartan

#### D. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları

Geliştirilen analiz yöntemi için sistem uygunluk testleri YPSK-UV/GB dedektör sistemine enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Bölüm 2.4.4. te anlatıldığı gibi hazırlanan çözeltinin sisteme enjeksiyonundan sonra kromatografik parametreler cihaza hesaplatılmıştır (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.14).

Çizelge 3.1. Sistem Uygunluk Parametreleri

	<b>Telmisartan</b>	<b>Hidroklorotiazit</b>
Kapasite Faktörü ( $k'$ )	2,038	1,441
Seçicilik ( $\alpha$ )	1,414	
Kolon Etkinliği (N)	5087	3942
Ayırıcılık (R)	3,4	
Pik Simetri Oranı (PSO)	1,15	1,19



Şekil 3.14. Sistem uygunluk parametrelerinin hesaplandığı kromatogram ; 80 $\mu$ g/ml derişiminde Telmisartan , 12,5  $\mu$ g/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100  $\mu$ g/ml derişiminde İrbesartan

### 3.3.2. Telmisartan ve Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB Dedektör ile Analizi Yönteminin Validasyonu

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon parametrelerine göre test edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında ; doğrusallık, aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır (ICH, 1996, Eurochem, 1998).

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK ile analiz yönteminde Inertsil ODS 3V (tanecik çapı ; 5 µm, 4.6x250 mm) kolon, 30°C kolon sıcaklığı ile asetoneitril ve NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0 ; 1,7 mM), (46 :54, h/h) içeren hareketli faz (1,5 ml/dk) kullanılmıştır. UV/GB dedektörü ile telmisartan ve hidroklorotiazit için ortak dalga boyu 270 nm olarak seçilmiştir. Bu koşullarda ; telmisartan, hidroklorotiazit ve iç standart olarak seçilen irbesartanın alıkonma zamanları sırasıyla 3,020 ; 2,348 ve 5,103'tür.

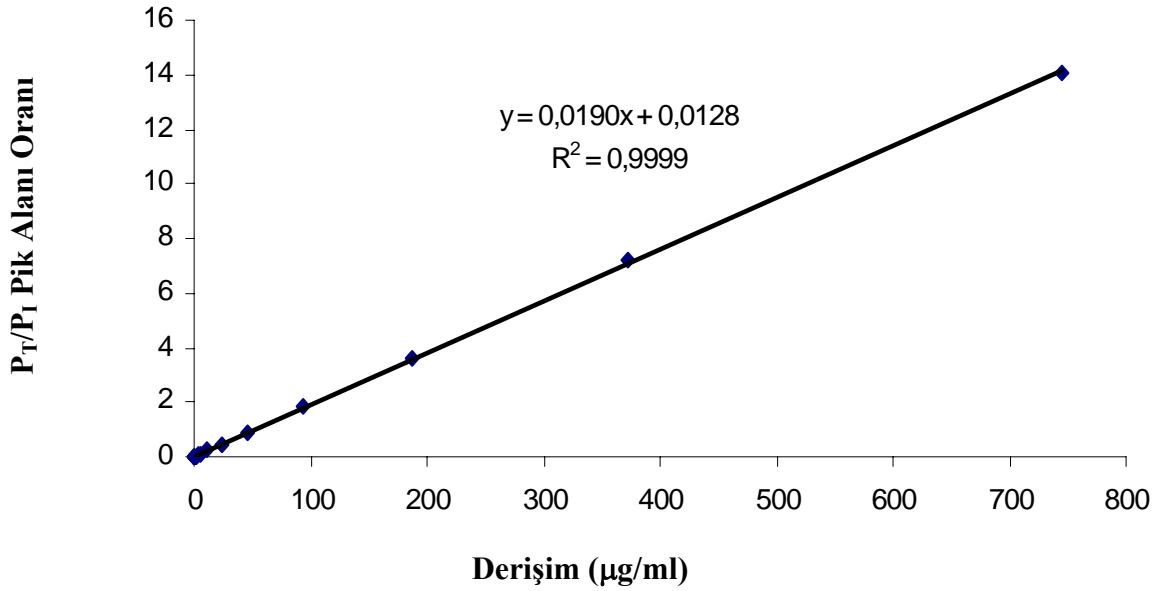
#### 3.3.2.1. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve kalibrasyon eğrisinin saptanmasında telmisartan için 0,0227 µg/ml ile 745 µg/ml (Şekil 3.15), hidroklorotiazit için ise 0,00476 µg/ml ile 156 µg/ml (Şekil 3.16) arasında farklı derişimlerde metanol ile çözülüp hareketli faz ile seyreltilerek çözeltileri hazırlanmıştır ve YPSK'ne enjekte edilmiştir.

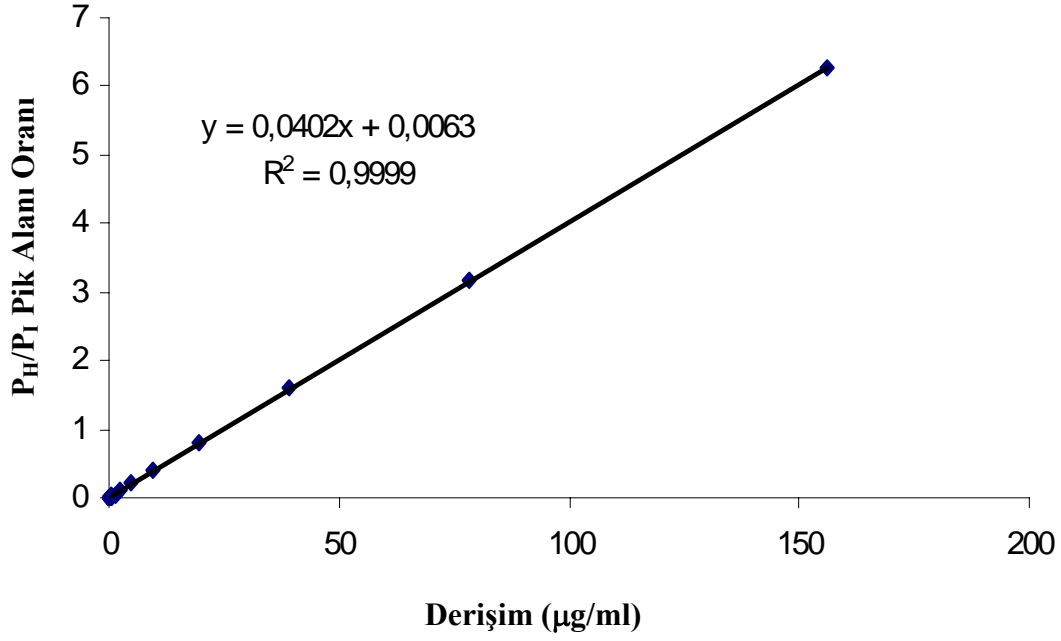
Kalibrasyon eğrisi, her bir derişim değeri için elde edilen telmisartan ve hidroklorotiazitin pik alanının ( $A_T$ ,  $A_H$ ) irbesartan (iç standart) pik alanına ( $A_I$ ) bölünerek elde edilen oranının, telmisartan ve hidroklorotiazit derişimi değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur. Geliştirilen YPSK yöntemi telmisartan için 0,0227 µg/ml ile 745 µg/ml hidroklorotiazit için ise 0,00476 µg/ml ile 156 µg/ml derişimleri arasında doğrusaldır. Telmisartan analizi için tanımlanan YPSK-UV/GB

dedektör yönteminde doğrusal aralık eğri denklemi  $y = 0,0190x + 0,0128$  ;  $r^2 = 0,9999$  ve hidroklorotiazit için ise  $y = 0,0402x + 0,0063$  ;  $r^2 = 0,9999$  olarak saptanmıştır.

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yönteminde teşhis sınırı (LOD) telmisartan için;  $0,00424 \mu\text{g/ml}$  (sinyal/gürültü;  $S/G=62500$ ), hidroklorotiazit için ise  $0,00115 \mu\text{g/ml}$  (sinyal/gürültü;  $S/G=35714$ ) ve tayin alt sınırı (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde ( $< \%2$ ) telmisartan için;  $0,0127 \mu\text{g/ml}$  (Çizelge 3.2), hidroklorotiazit için ise  $0,0035 \mu\text{g/ml}$  olarak saptanmıştır (Çizelge 3.3).



Şekil 3.15. Telmisartan analizi için kalibrasyon doğrusu



Şekil 3.16. Hidroklorotiazit analizi için doğrusal aralık

Çizelge 3.2. Telmisartanın YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisi özellikleri (n=16)

Regresyon Denklemi*	$y = 0,0190x + 0,0128$
Eğimin Standart Hatası	0,0006
Kesişimin Standart Hatası	0,0113
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9999
Determinasyon Katsayısı (r <sup>2</sup> )	0,9999
Kalibrasyon Aralığı (µg/ml)	0,0227-745
Teşhis Sınırı (µg/ml)	0,00424
Tayin Alt Sınırı (µg/ml)	0,0127

\*  $y = bx + a$  ; x : µg/ml biriminde derişim, y : telmisartan/iç standart alan oranı değerleri, a : kesişim, b : eğim

Çizelge 3.3. Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisi özellikleri (n=16)

Regresyon Denklemi*	$y = 0,0402x+0,0063$
Eğimin Standart Hatası	0,0001
Kesişimin Standart Hatası	0,0044
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9999
Determinasyon Katsayısı ( $r^2$ )	0,9999
Kalibrasyon Aralığı ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,00476-156
Teşhis Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,00115
Tayin Alt Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,0035

\*  $y = bx + a$  ; x :  $\mu\text{g/ml}$  biriminde derişim, y : hidroklorotiazit/iç standart alan oranı değerleri, a : kesişim, b : eğim

### 3.3.2.2. Sentetik Karışım

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yönteminde iki etken maddenin birbirlerine olan etkilerini incelemek amacıyla birinin derişimi sabit tutulup, diğer etken maddenin derişimi değiştirilerek sentetik karışım yapılmıştır. Telmisartan derişimi 80 µg/ml oranında sabit tutulmuş, hidroklorotiazitin derişimi 1,245; 3,135; 6,2; 9,4 ve 12,5 µg/ml oranlarında değiştirilerek % geri kazanım çalışması yapılmıştır. Aynı işlem hidroklorotiazitin derişimi 12,5 µg/ml oranında sabit tutularak, telmisartanın derişimi 8,1; 20,2; 40,2; 59,9 ve 80,0 µg/ml oranlarında değiştirilip uygulanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren sentetik karışımın YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait % geri kazanım sonuçları (n=5)

	<b>İlave Edilen Madde Miktarı (µg/ml)</b>	<b>Bulunan Madde Miktarı (µg/ml)</b>	<b>% Geri Kazanım</b>
Telmisartan	8,10	8,30	102,47
	20,20	20,50	101,49
	40,20	39,90	99,25
	59,90	59,50	99,33
	80,00	80,70	100,88
			X <sub>ort</sub> : 100,68
			SS:1,39
			%BSS:1,38
		%Bias:-0,68	
Hidroklorotiazit	1,25	1,21	97,19
	3,14	3,20	102,07
	6,20	6,05	97,58
	9,40	9,22	98,09
	12,50	12,33	98,64
			X <sub>ort</sub> : 98,71
			SS:1,95
			%BSS:1,98
		%Bias:1,29	

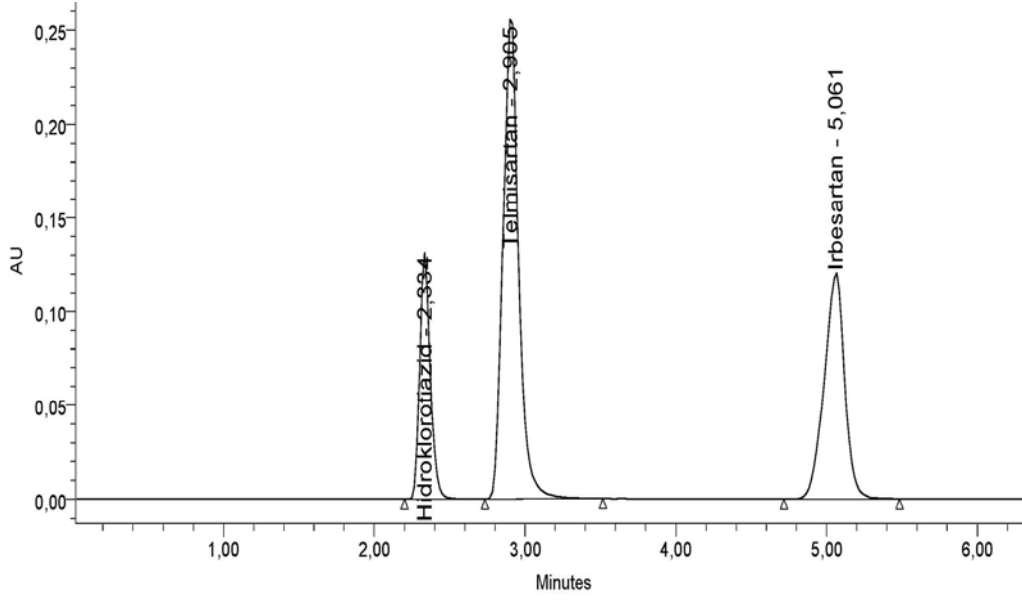
### 3.3.2.3. Dozaj Formlarına Uygulama ve Geri Kazanım

Telmisartan ve hidroklorotiazitin tayini için geliştirilen YPSK-UV/GB dedektör yöntemi piyasa preparatlarına uygunlanmıştır. Tablet katkı maddelerinin yöntemi bir etkisinin olup olmadığını anlamak için de geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 2.4.5. anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve saf telmisartan ve hidroklorotiazit içeren çözeltiler ile aynı anda analizi yapılmıştır. Bu eğrilerden okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği telmisartan ve hidroklorotiazit miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.5'te, kromatogramı ise Şekil 3.17'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren Micardis Plus (80+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait bulgular (n=5)

Numune No.	Tablette Bulunan Etken Madde Miktarı (mg)	
	Telmisartan	Hidroklorotiazit
1	80,10	12,45
2	80,03	12,30
3	79,80	12,60
4	79,10	12,40
5	80,30	12,56
$X_{ort}$	79,87	12,46
SS	0,46	0,12
%BSS	0,58	0,97
%Bias	0,17	0,30



Şekil 3.17. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren Micardis Plus (80+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kromatogram ; 80µg/ml derişiminde Telmisartan , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiazit ve 100 µg/ml derişiminde İrbesartan

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 2.4.5. anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan telmisartan ve hidroklorotiazit içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf telmisartan ve hidroklorotiazit ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanım bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren Micardis Plus (80+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait % geri kazanım sonuçları (n=5)

	<b>İlave Edilen Madde Miktarı (mg)</b>	<b>Bulunan Madde Miktarı (mg)</b>	<b>% Geri Kazanım</b>
Telmisartan	80,00	79,10	98,86
	80,00	80,10	100,13
	80,00	81,20	101,50
	80,00	78,50	98,13
	80,00	80,40	100,50
			X <sub>ort</sub> : 99,83
			SS:1,34
			%BSS:1,34
			%Bias:0,18
Hidroklorotiazit	12,50	12,20	97,60
	12,50	12,60	100,80
	12,50	12,30	98,40
	12,50	12,70	101,60
	12,50	12,40	99,20
			X <sub>ort</sub> : 99,52
			SS:1,66
			%BSS:1,67
			%Bias:0,48

### 3.3.2.4. Doğruluk ve Kesinlik

Telmisartanın ve hidroklorotiazitin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları; telmisartanın 0,045 µg/ml ve 46,5 µg/ml derişimlerinde, hidroklorotiazitin ise 0,019 µg/ml ve 9,76 µg/ml derişimlerinde gerçekleştirilmiş, gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Gün içi çalışmaları iki farklı derişim düzeyinde ve altı bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise iki farklı derişim düzeyinde altı bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Çizelge 3.7. Telmisartanın YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları

Eklenen Telmisartan miktarı (µg/ml)	Gün İçi	Günler Arası
	Telmisartan alanı/iç standart alanı oranı	Telmisartan alanı/iç standart alanı oranı
0,045	0,000631	0,000620
	0,000624	0,000634
	0,000635	0,000621
	0,000611	0,000610
	0,000625	0,000636
	0,000609	0,000621
<b>X<sub>ort</sub></b>	<b>0,000623</b>	<b>0,000624</b>
<b>SS</b>	<b>0,000011</b>	<b>0,000010</b>
<b>%BSS</b>	<b>1,687000</b>	<b>1,560000</b>
46,5	0,895	0,882
	0,898	0,885
	0,891	0,89
	0,890	0,889
	0,891	0,881
	0,894	0,892
<b>X<sub>ort</sub></b>	<b>0,893</b>	<b>0,887</b>
<b>SS</b>	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>
<b>%BSS</b>	<b>0,343</b>	<b>0,508</b>

Çizelge 3.8. Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektörle analizi yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları

Eklenen Hidroklorotiazit miktarı (µg/ml)	Gün İçi	Günler Arası
	Hidroklorotiazit alanı/iç standart alanı oranı	Hidroklorotiazit alanı/iç standart alanı oranı
0,019	0,00328	0,00312
	0,00321	0,00301
	0,00333	0,00314
	0,00336	0,00306
	0,00324	0,00317
	0,00330	0,00315
<b>X<sub>ort</sub></b>	<b>0,00329</b>	<b>0,00311</b>
<b>SS</b>	<b>0,00006</b>	<b>0,00006</b>
<b>%BSS</b>	<b>1,696</b>	<b>1,967</b>
9,76	0,396	0,385
	0,397	0,381
	0,398	0,387
	0,391	0,39
	0,39	0,383
	0,389	0,392
<b>X<sub>ort</sub></b>	<b>0,394</b>	<b>0,386</b>
<b>SS</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>
<b>%BSS</b>	<b>1,001</b>	<b>1,082</b>

### 3.3.2.5. Cihaz Tekrarlanabilirliği

Kullanılan YPSK-UV/GB dedektör sisteminin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için doğrusal aralık içerisinde bir derişiminde hazırlanan standart telmisartan ve hidroklorotiazit çözeltilisinin aynı gün içerisinde 6 tekrarlı analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10’da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. Telmisartanın YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine cihaz tekrarlanabilirliği analiz bulguları

<b>Madde Miktarı (µg/ml)</b>	<b>Telmisartan alanı/iç standart alanı oranı</b>
80	1,6315
	1,6318
	1,6314
	1,6316
	1,6318
	1,6317
	X <sub>ort</sub> : 1,6320
	SS: 0,0002
	BSS: 0,0100

Çizelge 3.10. Hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine cihaz tekrarlanabilirliği analiz bulguları

<b>Madde Miktarı (µg/ml)</b>	<b>Hidroklorotiazit alanı/iç standart alanı oranı</b>
12,5	0,5639
	0,5638
	0,5640
	0,5648
	0,5649
	0,5639
	X <sub>ort</sub> : 0,5640
	SS: 0,0005
	BSS: 0,0850

#### 4.TARTIŞMA

Telmisartan yağda çözülebilen, tetrazol yapısı taşımayan anjiyotensin II (Tip1) reseptör blokörüdür. Diğer benzeri ilaç moleküllerinden daha kuvvetli biçimde kalp, karaciğer ve böbreklerde bulunan AT<sub>1</sub> reseptörlerine bağlanarak uzun süreli bir koruma sağlar. Kanda bulunan ve vücuttaki kan basıncını artıran ATII hormonunu daha etkili baskıladığı için daha uzun süreli etki göstermektedir. Hidroklorotiazit ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazit grubu bir diüretiktir. Tiazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine kullanılırlar. Tiazit grubu diüretikler böbrek tubulus epitelyumundan sodyum iyon transportunu inhibe ederek sodyum, klor ve suyun atılımını artırır. Tez kapsamında Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in YPSK yöntemi ile aynı anda analizleri için hızlı, duyarlı ve ekonomik bir analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmış ve gerekli optimizasyonlar ve yöntem geçerlik testleri yapılmaya çalışılmıştır.

Uygulanacak yönteme ait deneylere başlamadan önce Telmisartan ve Hidroklorotiazit standart maddelerinin saflığını araştırmak amacı ile UV ve IR spektrumları alınmıştır. Sonuçta elde edilen bulgular ışığında maddelerin bu çalışmayı etkileyebilecek herhangi bir safsızlık içermediğine ve çalışmaların bu maddelerle yürütülebileceği sonucuna varılmıştır.

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, telmisartan ve hidroklorotiazitin kromatografik davranışları öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Analiz sırasında kısa zamanda sonuç alınabilmesi için iç standart seçimi yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemde YPSK yöntemi ile analiz için iki farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz

pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir. Organik düzenleyici seçimi için hareketli faz organik düzenleyicisi olarak metanol ve asetonitrilin telmisartan ve hidroklorotiazit analizine etkisi incelenmiştir. Hareketli faza % 60 (h/h) oranında asetonitril ve metanol eklenmiş, asetonitril içeren hareketli faz ile 2,867 dk.da hidroklorotiazit piki elde edilirken, aynı kromatografik koşullarda, metanol içeren hareketli fazda 1,952 dakikada elde edilmiştir. Fakat telmisartan piki metanol içeren hareketli fazda geç alıkonma zamanında gelmiştir. Akış hızı 2,0 ml/dk'ya çıkarılıp hareketli faz oranı değiştirildiğinde ise hidroklorotiazitin 0,816 dakikada gelmiştir. Çözücü pikleri, hidroklorotiazitin alıkonma zamanında gelebileceği ve pikin içerisine karışabileceği için organik düzenleyici olarak asetonitril seçilmiştir. Elde edilen sonuçlardan organik düzenleyicisi olarak asetonitrilin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

İyi bir ayırım için en uygun asetonitril oranının saptanması amacıyla hareketli faz çözücü içeriği % 40' a (h/h) ilave olarak % 44, 45 ve 46 (h/h) olacak şekilde değiştirilmiştir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, 1,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0) içeren hareketli faz (1,5 ml/dk) 30°C kolon sıcaklığında kullanılmıştır. Hareketli fazın asetonitril miktarındaki değişimleri Şekil 3.7, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir. Analizin iyi bir ayırım ile daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi için, iç standart olarak seçilen irbesartan pikinin de daha kısa alıkonma zamanında gelmesinden dolayı Şekil 3.9'daki asetonitril oranının % 46 (h/h) olduğu hareketli faz çalışma ortamı olarak seçilmiştir.

Kolon seçimi sırasında hareketli faz tampon çözeltisi olarak sodyum dihidrojen fosfat (pH 3,0) ve hareketli faz organik düzenleyici olarak da asetonitril, 40:60 (h/h) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C, hareketli faz akış hızı 1,0 ml/dk ve her iki maddenin analizi için dalga boyu 270 nm şeklinde belirlenmiştir.

Telmisartan ve hidroklorotiazitin yukarıda verilen şartlarla ACE 5 C18 4.6x250 mm kolonu ve Inertsil ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanılmıştır. Her iki kromatogramda pik simetri oranları değerlendirilmiş, ACE 5 C18 4.6x250 mm kolonu kullanıldığında telmisartanın pik simetri oranı 1,4; Inertsil ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanıldığında ise 1,1 olarak saptanmıştır. Bu yüzden Inertsil

ODS 3V 5 µm 4.6x250 mm kolonu ayırma işleminde kullanılacak kolon olarak seçilmiştir.

Telmisartan ve hidroklorotiazitin analizinde kullanılan hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, asetonitril ve 1,7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (60 :40 h/h ; pH 3,0) içeren hareketli faz, 30°C kolon sıcaklığında farklı akış hızlarında YPSK sistemine verilmiştir. Akış hızı 1,0; 1,5 ve 2,0 ml/dk olarak değiştirilmiştir ve kromatogramlar Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de verilmiştir. Hareketli faz YPSK sistemine 1,0 ml/dk akış hızı ile verildiğinde alıkonma sürelerinin uzun olduğu; 2,0 ml/dk akış hızında verildiğinde ise hidroklorotiazitin istenenden daha kısa sürede geldiği saptanmıştır. Bu şartlar göze alınarak optimum akış hızı 1,5 ml/dk olarak seçilmiş ve asetonitril oranının değiştirilmesiyle uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir.

Telmisartan ve hidroklorotiazitin analizi sırasında kullanılacak iç standart seçimi için parasetamol, mirtazapin, losartan ve irbesartan denenmiştir. Losartan ve irbesartanın, telmisartan ve hidroklorotiazitten ayırımı sağlanmıştır (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Pik simetri oranı, seçicilik ve analiz süresi göz önüne alınarak iç standart olarak irbesartan seçilmiştir. İrbesartanın seçimi sırasında, asetonitril ve 1,7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (40 :60 h/h ; pH 3,0 akış hızı 1,5 ml/dk) içeren hareketli faz, 270 nm dalga boyu ve 30°C kolon sıcaklığı kullanılmıştır.

Sonuç olarak Telmisartan ve Hidroklorotiazit’in YPSK ile analiz yönteminde Inertsil ODS 3V (tanecik çapı ; 5 µm, 4.6x250 mm) kolon, 30°C kolon sıcaklığı ile asetonitril ve NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0; 1,7 mM), (46 :54, h/h) içeren hareketli faz; 1,5 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. UV/GB dedektörü ile Telmisartan ve Hidroklorotiazit için ortak dalga boyu 270 nm olarak seçilmiştir. Bu koşullarda ; telmisartan, hidroklorotiazit ve iç standart olarak seçilen irbesartanın alıkonma zamanları sırasıyla 3,020; 2.348 ve 5,103 dk. olarak saptanmış ve analizlere bu şartlarda devam edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin validasyonuna geçmeden önce sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında (Çizelge 3.1) yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gerekli yöntem geçerlilik testleri için kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında ; doğrusallık, aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır (ICH Steering Committee, 1996; Eurochem 1998).

Bu parametrelerden doğrusallık için telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK ile analizi yönteminde telmisartan için 0,0227-745 µg/mL (Şekil 3.15), hidroklorotiazit için ise 0,00476-156 µg/ml (Şekil 3.16) aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, her bir derişim değeri için elde edilen telmisartan ve hidroklorotiazitin pik alanının ( $A_T$ ,  $A_H$ ) irbesartan (iç standart) pik alanına ( $A_I$ ) oranının, telmisartan veya hidroklorotiazit derişimi değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Telmisartan analizi için tanımlanan YPSK-UV/GB yönteminde doğrusal aralık doğru denklemi  $y = 0,0190x + 0,0128$  ;  $r^2 = 0,9999$  ve hidroklorotiazit için ise  $y = 0,0402x + 0,0063$  ;  $r^2 = 0,9999$  olarak saptanmıştır.

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB analizinde teşhis sınırı (LOD) telmisartan için; 0,00424 µg/ml (sinyal/gürültü; S/G=62 500), hidroklorotiazit için ise 0,00115 µg/ml (sinyal/gürültü; S/G=35 714) ve tayin alt sınırı (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde (< %2) telmisartan için; 0,0127 µg/ml (Çizelge 3.1), hidroklorotiazit için ise 0,0035 µg/ml olarak saptanmıştır (Çizelge 3.2).

Telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yönteminde iki etken maddenin birbirlerine olan etkilerini incelemek amacıyla birinin derişimi sabit tutulup, diğer etken maddenin derişimi değiştirilerek sentetik karışım yapılmıştır. Telmisartan 80 µg/ml derişiminde sabit tutulmuş, hidroklorotiazitin 1,245; 3,135; 6,2; 9,4 ve 12,5 µg/ml derişimlerinde % geri kazanım çalışması yapılmıştır. Aynı

işlem hidroklorotiazitin derişimi 12,5 µg/ml de sabit tutularak, telmisartanın 8,1; 20,2; 40,2; 59,9 ve 80,0 µg/ml derişimlerinde uygulanmıştır (Çizelge 3.4).

Telmisartan ve hidroklorotiazitin tayini için geliştirilen YPSK-UV/GB dedektör yöntemi piyasa preparatlarına uygunlanabilirliği ve tablet katkı maddelerinin yönteme bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır. Bunun için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Telmisartan ve hidroklorotiazit içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 2.4.5. anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmış ve her iki maddenin de aynı anda analizi yapılmıştır. Bu eğrilerden okunan pik alan oranı değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği telmisartan ve hidroklorotiazit miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan analiz sonuçları ve gerekli istatistiksel hesaplamalar çizelge 3.5'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında geliştirilen yöntemin tabletlerden her iki maddenin de aynı anda analizinde kullanılabileceği görülmüştür.

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 2.4.5. anlatıldığı gibi bilinen miktarda hazırlanan telmisartan ve hidroklorotiazit içeren tablet numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf telmisartan ve hidroklorotiazit ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda % geri kazanım bulunmuştur. Sonuçlar çizelge 3.6'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre tablet katkı maddelerinin analizimizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Telmisartanın ve hidroklorotiazitin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları; telmisartanın 0,045 µg/ml ve 46,5 µg/ml derişimlerinde, hidroklorotiazitin ise 0,019 µg/ml ve 9,76 µg/ml derişimlerinde gerçekleştirilmiş, gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8'de verilmiştir. Gün içi çalışmaları iki farklı derişim düzeyinde ve altı bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise iki farklı derişim düzeyinde altı bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır. Kullanılan YPSK-UV/GB dedektör

sisteminin de tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için doğrusal aralık içerisindeki bir analiz derişiminde hazırlanan standart telmisartan ve hidroklorotiazit çözeltisinin aynı gün içerisinde 6 tekrarlı analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlardan da yöntemimizin yeterli kesinlik ve doğruluk parametrelerini sağladığı görülmektedir.

Tez konusu seçilirken yapılan literatür taramasında bu ikili karışımın aynı anda analizine ait YPSK yöntemi ile herhangi bir analiz yöntemine rastlanmamışken, ilerleyen dönemlerde 2 adet çalışma saptanmıştır. Leena R. B. ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemle telmisartan, hidroklorotiazit ve rabeprazol etken maddelerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Telmisartan ve hidroklorotiazit'in tayinini 270 nm dalga boyunda, 1ml/dk hızındaki hareketli faz ile yapmışlardır. Hareketli faz olarak asetonitril:metanol (30:70-h/h) kullandıkları bu yöntemi Telmisartan ve hidroklorotiazitin tabletlerden analizine uygulamışlardır. Wankhede SB ve arkadaşları (2007) ise Telmisartan ve hidroklorotiazitin saf etken maddeden ve farmasötik dozaj formlarından analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemini geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak asetonitril : 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 3.0 (60:40-h/h) karışımını, 271 nm dalga boyunu analiz için kullanmışlardır. Alınkonma değerleri telmisartan ve hidroklorotiazit için sırasıyla 5,19 ve 2,97 dk. olarak bulunmuştur. Sabit faz olarak ODS Hypersil C18 (25 cm×4.6 mm I.D) kullanılmıştır. Geliştirdikleri yöntemin gerekli validasyon ve optimizasyon işlemlerini gerçekleştirmedikleri ve çok dar bir kalibrasyon aralığında çalıştıkları literatürün incelenmesiyle anlaşılmıştır.

Her iki yöntemle elde edilen sonuçlarla tarafımızdan geliştirilen yöntemin sonuçları karşılaştırıldığı zaman, geliştirdiğimiz YPSK yönteminin validasyon parametrelerinin tamamen saptanmış, daha düşük tayin aralığı ve tayin limitine sahip, doğru, duyarlı, kararlı bir yöntem olduğu görülmektedir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın ilk kısmında anjiyotensin II (Tip1) reseptör blokörü olan Telmisartan ve tiazit grubu diüretik ilaçlardan olan Hidroklorotiazit için en uygun sabit (kolon) ve hareketli faz kompozisyonu (hareketli faz organik düzenleyicisi maddesinin seçimi) ve akış hızının etkisini saptayabilmek için; pH'ın, organik çözücü cinsinin ve oranının, sabit fazın cinsinin (fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü) etkileri detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Analiz sırasında kısa zamanda sonuç alınabilmesi için uygun bir iç standart seçimi yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemde YPSK yöntemi ile analiz için iki farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan organik düzenleyici olarak asetonitrilin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Analizin iyi bir ayırım ile daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi için, iç standart olarak seçilen irbesartan pikinin de daha kısa alıkonma zamanında gelmesinden dolayı asetonitril oranının % 46 (h/h) olduğu hareketli faz çalışma ortamı olarak seçilmiştir.

Sonuç olarak telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK ile analiz yönteminde Inertsil ODS 3V (tanecik çapı ; 5 µm, 4.6x250 mm) kolonu, 30°C kolon sıcaklığı ile asetonitril ve NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,0; 1,7 mM), (46 :54, h/h) içeren hareketli faz; 1,5 ml/dk akış hızı ve UV/GB dedektörü ile telmisartan ve hidroklorotiazit için ortak dalga boyu 270 nm olarak seçilmiştir. Bu koşullarda ; telmisartan, hidroklorotiazit ve iç standart olarak seçilen irbesartanın alıkonma zamanları sırasıyla 3,020 dk.; 2,348 dk. ve 5,103 dk. olarak saptanmıştır.

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gerekli yöntem geçerlilik testleri için kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul

edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında ; doğrusallık, aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu parametrelerden doğrusallık için telmisartan ve hidroklorotiazitin YPSK ile analiz yönteminde telmisartan için 0,0227-745 µg/mL, hidroklorotiazit için ise 0,00476-156 µg/ml aralığında doğrusallık saptanmıştır. Telmisartan analizi için tanımlanan YPSK-UV/GB yönteminde doğrusal aralık doğru denklemi  $y= 0,0190x+0,0128$  ;  $r^2=0,9999$  ve hidroklorotiazit için ise  $y=0,0402x+0,0063$  ;  $r^2=0,9999$  olarak saptanmıştır. Geliştirilen ve yöntem geçerlilik hesaplamaları yapılmış olan yöntem telmisartan ve hidroklorotiazit etken maddelerini aynı anda içeren farmasötik dozaj formuna uygulanmış ve her iki maddenin de aynı anda analizinde kullanılabileceği görülmüştür. Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tablet katkı maddelerinin analizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında, telmisartan ve hidroklorotiazitin aynı anda analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay, doğru ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve piyasa preparatlarından bu maddelerin aynı anda analizine başarılı bir şekilde uygulanabildiği istatistiksel olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak, tez kapsamında telmisartan ve hidroklorotiazitin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan YPSK yöntemi bu iki maddenin farmasötik dozaj formlarından tayini için önerilmektedir.

İleride yapılacak çalışmalarda telmisartan ve hidroklorotiazitin plazma içerisinde tayini gerçekleştirilecek ve stabilite testleri geliştirilen yöntem ile uygulanacaktır.

## ÖZET

### **Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in YPSK Yöntemleri ile Aynı Anda Analizi**

Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in aynı anda analizi için bir YPSK-UV yöntemi sunulmuştur. Bu yöntemde; bir ters-faz kolonu (Inertsil ODS 3V ; 5 µm, 4.6x150 mm I.D.) 1,5 ml/dk akış hızındaki acetonitril: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon (pH 3,0 ; 1,7 mM) (46 : 54 ; h/h ) karışımından oluşan bir hareketli faz ile 270 nm dalga boyunda iki bileşiğin ayrılması için kullanılmıştır. Kromatografik ayırım 30°C'de yapılmıştır. İç standart olarak irbesartan seçilmiştir, çünkü diğer iç standartlara kıyasla da iyi bir pik şekliyle daha kısa alıkonma zamanı ve daha iyi bir ayırım göstermiştir. Geliştirilen yöntem kısa bir süre içerisinde telmisartan, hidroklorotiazit ve iç standardın iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Bu şartlar kullanılarak, Telmisartan için 3,020 dk; Hidroklorotiazit için 2,348 dk ve Irbesartan için 5,103 dk alıkonma zamanı elde edilmiştir.

Taze hazırlanmış standart çözelti kromatogramında validasyon prosedürünün bir parçası olan ayrışma, seçicilik, asimetri ve kapasite faktörü gibi çeşitli parametreleri kontrol etmek için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Geliştirilen yöntem tamamen valide edilmiştir. Telmisartan için 0,0227-745 µg/ml ve hidroklorotiazit için 0,00476-156 µg/ml derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini ve uygulanabilirliğini göstermek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Yüksek orandaki geri kazanım; yöntemin, ilaçların formülasyonunda kullanılan katkı maddelerinden ve yardımcı maddelerden etkilenmediğini göstermektedir.

Geliştirilen YPSK çalışması, hammaddede ve farmasötik formülasyonlarda telmisartan ve hidroklorotiazitin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan yöntem hızlı, basit, yüksek kesinlik ve doğruluktur. Geliştirilen bu yöntem, ekonomik ve zaman kazandırdığı için, kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Telmisartan, Hidroklorotiazit, Analiz, YPSK, Dozaj Form, Validasyon

## SUMMARY

### **Simultaneous Determination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide By HPLC Techniques**

An HPLC-UV method is presented for the simultaneous determination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide. In this method; a reversed-phase column (Inertsil ODS 3V ; 5  $\mu\text{m}$ , 4.6x150 mm I.D.) with a mobile phase of acetonitril:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 3,0 ; 1,7 mM) (46 : 54 ; v/v ) at 1,5 ml/min flow rate was used to separate both compounds with a detection of 270 nm. The chromatographic separation was performed at 30 °C. Irbesartan was chosen as the internal standard because it showed a shorter retention time with better peak shapes and better resolution, compared to other potential internal standards. The proposed HPLC method gives a good resolution between Telmisartan, Hydrochlorothiazide and internal standard within a short analysis time. Using these conditions, the retention times were obtained as 3,020 min for Telmisartan, 2,348 min for Hydrochlorothiazide and 5,103 min for Irbesartan (IS).

System suitability tests were carried out on the chromatogram of freshly prepared standard solutions to check various parameters such as resolution, selectivity, asymmetry and capacity factors as a part of validation procedure. The proposed methods have been extensively validated. Linearity was obtained in the concentration range of 0,0227-745  $\mu\text{g/mL}$  for Telmisartan and 0,00476-156  $\mu\text{g/ml}$  for Hydrochlorothiazide. In order to demonstrate the validity and applicability of the proposed HPLC method, recovery tests were carried. High percentage recovery shows that the method is free from the interferences of the commonly used excipients and additives in the formulations of drugs.

The present HPLC study purposes a rapid, simple, precise and accurate method for the simultaneous determination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide, in raw material and pharmaceutical formulations. The proposed method is suitable for quality control laboratories, where economy and time are essential.

**Key Words:** Telmisartan, Hydrochlorothiazide, Determination, HPLC, Dosage Form, Validation.

**KAYNAKLAR**

- ABDINE, H., ELSAYED, M.A.H., ELSAYED, Y.M. (1978). Spectrophotometric determination of hydrochlorothiazide and reserpine in combination. *Analyst*. 103: 354-358.
- ADAMOVIĆ, J.A., *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*, Marcel Dekker, New York, 1997.
- AHUYA, S., SCYPINSKI, S. (2001) *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, New York.
- AZUYAMA, C.T. (1990). Sensitive liquid chromatographic method for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Chromatogr.* 532: 168-174.
- 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
- BEBAWY L.I., ABBAS, S.S., FATTAH, L.A., REFAAT, H.H. (2005). Application of first-derivative spectrophotometry, TLC- densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and human plasma. *Farmaco*, 60( 10): 859-67
- BELAL, F., RIZK, M., IBRAHIEM, F., EL-DIN, M.S. (1986). Spectrophotometric determination of benzothiadiazines in dosage forms. *Talanta*. 33(2): 170-172.
- BIDLINGMEYER, B.A. (1992), *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, s. 69-200.
- BRAGGIO, S., BARNABY, R.J., GROSSI, P., CUGOLA, M. (1996) A strategy for validation of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14.375-388.
- 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.
- 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.

- CHEN BM, LIANG YZ, WANG YL, DENG FL, ZHOU P, GUO FQ, HUANG LF. (JUN 1 2005). Development and validation of liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of telmisartan in human plasma. *Anal. Chem. Acta.* 540 (2 ): 367-373.
- 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 BIEVRE, P., GUNZLER, H. Eds. (2005) Validation in chemical measurement Spriger pub., New York.
- 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.
- 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.
- DUPLAY, D.(2007), *Physicians Desk Reference (PDR)*, 61<sup>st</sup> Ed., Published by Thomson Medical Economics Company Inc., Electronic Verison, Montvale, NJ.
- ERMER, J. (2001) Validation in pharmaceutical analysis. Part 1 :An intergrated approach. *J.Pharm.Biomed.Anal.*24,755-767
- ERMER, J. MILLER, J.H. McB. (2005) Method validation in pharmaceutical analysis. 1<sup>st</sup> Ed. Wiley-VCH Pub., Weinheim.
- EUROCHEM (1998), The fitness for purpose of analytical Methods, A laboratory guide to method validation and related topics, United Kingdom.
- 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.
- GONZALES, L., AKESOLO, U., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M. (2002). Application of capillary zone electrophoresis to the screening of some angiotensin II receptor antagonists. *Electrophoresis*, 23(2) : 223-9.
- HAMILTON, R.J., SEWEL, P.A. (1982), Introduction to high performance liquid chromatography, 2 nd ed, Chapman and Hall, New York, s. 1-160.

- HILLAERT,S., VAN DEN BOSSCHE, W. (2002). Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the analysis of a several angiotensin II receptor antagonists. *J Chromatogr. A.*, 979 (1-2) : 323-33
- HILLAERT S, VAN DEN BOSSCHE W. (2003). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2 ): 329-339.
- 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.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH 1994); Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures for Pharmaceuticals; Availability, Fed.Reg., 59, 9750.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH 1996), Validation of analytical procedures: Methodology Q2B, ICH Steering Committee.
- 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.
- LUNTE, S.M., RADZIK, D.M.(1996) *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science Ltd, New York.
- LEENA R. BHAT, RAHUL K. GODGE, ASFAK T. VORA, MRINALINI C. DAMLE (2007), Validated RP-HPLC Method for Simultaneous determination of telmisartan and hidrochlorotiazide in pharmaceutical formulation *J. Chromatogr. & Related Tec.*,3059-3067.
- 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.
- McDOWALL, R.D. (1999) The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. *Anal. Chim. Acta*, 391:149-158.
- MEYER, R. V.(1988), *Practical High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Toronto, Canada.
- NAIDONG, W.(2003), Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases, *J Chromatogr. B*, 796, 209-224.

- NIE, J., ZHANG, M., FAN, Y., WEN, Y., XIANG, B., FENG, Y.Q. (2005). Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 828 (1-2 ): 62-9.
- O'NEIL, M.J. (Senior Ed.) (2001), *The Merck Index*, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13<sup>th</sup> Ed., Merck&Co., Inc., New Jersey.
- 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. Chromatogr. & Rel. Technol.* 21( 11): 1671-1683
- PAPADOYANNIS, I.N., SAMANIDOU, V.F. (2004) Validation of HPLC instrumentation. *J.Liq.Chromatogr.Rel.Tech.* 27,753-783
- POOLE, C, POOLE, S.K.( 2002), Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model, *J. Chromatogr. A*, 965, 263-299.
- 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.
- RILEY, C.M., ROSANSKE, T.W., (1996) Development and Validation of Methods. Elsevier Science Ltd. , New York.
- ROSING, H., MAN, W. Y., DOYLE, E., BULT, A., BEIJNEN, J. H.( 2000), Bioanalytical liquid chromatographic method validation. A review of current practices and procedures, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 23 (3), 329-354.
- RXMEDIAPHARMA (2008), İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Prof.Dr. Levent Üstünes, (Ed.), 2008, Gemaş Yayıncılık.
- SALEM, H., EL-MAAMLI, M., EL-SADEK, M., KHEIR, A.A. (1991). U.V. and U.V. derivative spectrophotometric determination of two-component mixtures. *Spectr. Letters.* 24(3): 451-470.
- SATANA, E., ALTINAY, S., GÖGER, 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.
- SCOTT, P. W. R.( 1995), *Techniques and Practice of Chromatography*, Marcel Dekker, Nc., New York, USA, b:1-5.
- SEWELL, P. A., CLARKE, B., KEALEY, D.( 1987), *Chromatographic Separations*, John Wiley & Sons, London, UK, s. 13-80.
- SHABIR,G.A. (2003) Validation high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Admistration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J.Chromatogr.A.*, 987,57-66.
- SHAIKH, B., RUMMEL, N. (1998). Liquid chromatographic determination of chlorothiazide and hydrochlorothiazide diuretic drugs in bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1039-1043.
- SHEN, J., JIAO, Z., LI, Z.D., SHI, Z.J., ZHONG, M.K. (2005). HPLC determination of telmisartan in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Pharmazie*, 60(6): 418-20.
- SKOOG, D., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. (1998), *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, USA, s. 673-766.
- SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L.: *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley and Sons Inc., New York, 1997.
- 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.
- SWARTZ, M.E., KRULL, I.S., (1997) *Anaytical method development and validation*, Marcel Dekker, New York.
- SWEETMAN S.C. (2007), *Martindale, The Complete Drug Reference*, 35<sup>th</sup> Ed., Pharmaceutical Press, London.
- THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 24th Ed , 2000 [CD-ROM].
- TORREALDAY, N., GONZALES, L., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M., ORTIZ, LASTRA, E. (2003). Experimental design approach for the optimisation of a HPLC- fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin I receptor antagonist telmisartan in urine. *J.Pharm. Biomed. Anal.*, 32( 4-5) : 847-57.

- VESSMAN, J.(1996) Selectivity or specificity? Validation of analytical methos from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 14,867-869
- WANKHEDE SB, TAJNE MR, GUPTA KR, WADODKAR SG (2007), RP-HPLC method for simultaneous estimation of telmisartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. *Indian J Pharm Sci*; 69:298-300
- 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.
- WHITE, R. (1990), *Chromatography/ Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications*, New York and Basel, Marcel Dekker, Inc, s. 1-15.
- YILDIZ, A., GENÇ, Ö., BEKTAŞ, S.( 1997), *Enstrümental Analiz, Yöntemleri*, İkinci baskı, Hacettepe Üniversitesi yayınları, s. 409-428.
- ZHANG,M., WEI,F., ZHANG,Y.F., NIE,J., FENG,Y.Q. (2006). Novel polymer monolithic microextraction using a ploy (methacrylic acid ethylene glycol dimethacrylate) monolithic and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr.A.*, 1102 (1-2) : 294-301.

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

**Soyadı, Adı** : KUTUCU Tuğba  
**Doğum Yeri, Tarihi** : Samsun , 1981  
**Uyruğu** : TC  
**Medeni Durumu** : Bekar  
**Yazışma Adresi** : Esentepe Mah. Toki Evleri B-24 D:11 DÜZCE  
**Telefon** : 05058081655  
**Faks** : 03805123060  
**E-Mail** : [tugba\\_kutucu@yahoo.com](mailto:tugba_kutucu@yahoo.com)

### II. Eğitim

İlkokul: İstiklal İlkokulu (Samsun) 1988-1993  
Ortaokul: Atatürk Lisesi (Samsun) 1993-1996  
Lise: Namık Kemal Lisesi (Samsun) 1996-1999  
Üniversite: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü[İngilizce]  
(Ankara) 1999-2005

### III. Yabancı Dil

İngilizce –Okuma(Çok İyi) – Yazma ( Çok iyi)-konuşma(İyi)

### IV. Mesleki Deneyim

-Nobel İlaç A.Ş. FARGEM (Ar-ge) Ar-ge Uzmanı (Ocak 2006-Hala Çalışıyorum) Analitik Method Geliştirme ve Validasyonu, İlaçların Stabilitesi ve Analizleri, Hammadde Analizleri  
-Dopa Kimya –Satış Temsilcisi (8 Ay) Kimyasal Maddelerin ve Cihazların İhale Usulü Satışı  
-TSE Genel Kimya Laboratuvarı - Kimyager ( Staj )(2Ay) Su Analizleri ve Genel Kimya Laboratuvarında Uygulanan Analizler