

**HİDROKLOROTİYAZİT ve TRİAMTERENİN
KAPİLER ELEKTROFOREZ ile MİKTAR TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

Selen Duygu ÇEÇEN

Eskişehir 2020

**HİDROKLOROTİYAZİT ve TRİAMTERENİN
KAPİLER ELEKTROFOREZ ile MİKTAR TAYİNİ**

Selen Duygu ÇEÇEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2020

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1808S279 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Selen Duygu ÇEÇEN'in "Hidroklorotiyazit ve Triamterenin Kapiler Elektroforez ile Miktar Tayini" başlıklı tezi 08.01.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Dr. Öğr. Üy. Arın Gül DAL POÇAN	
Üye	: Dr. Öğr. Üy. Elif Mine ÖNCÜ KAYA	
Üye	: Doç.Dr. Erol ŞENER	

Prof.Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

HİDROKLOROTİYAZİT ve TRİAMTERENİN KAPİLER ELEKTROFOREZ ile

MİKTAR TAYİNİ

Selen Duygu ÇEÇEN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2020

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Bu çalışmada hidroklorotiyazit (HCT) ve triamteren (TRM) farmasötik preparatlarından tayini için bir kapiler elektroforez (KE) yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada deteksiyon foto diyot dizisi (DAD) detektörle sağlanmış ve ayırım 75 µm iç çapa ve 40 cm efektif uzunluğa sahip kapiler ile gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar çalışma tamponu olarak 20 mM sodyum dodesilsülfat (SDS) içeren 15 mM borat tamponu (pH 9,00) ve 25 kV potansiyelin uygulanması ile elde edilmiştir. Bu koşullar altında HCT ve TRM'nin göç zamanları sırasıyla 2,75±0,007 dk ve 4,61±0,022 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliği doğruluk, seçicilik, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık ve sağlamlık parametreleri ile incelenmiştir. Yöntemin seçiciliğini göstermek amacıyla HCT ve TRM standartları ile tabletleri asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak yöntem HCT ve TRM içeren tabletlerden miktar tayinine başarı ile uygulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Triamteren, Hidroklorotiyazit, Kapiler elektroforez, Stabilité göstergeli yöntem, Miktar tayini

ABSTRACT

DETERMINATION of HYDROCHLOROTHIAZIDE and TRIAMTERENE by CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Selen Duygu ÇEÇEN

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2020

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Arın Gül DAL POÇAN

In this study, a capillary electrophoresis method was developed for the determination of HCT and TRM from pharmaceutical preparations. Detection was achieved by photo diode array detector and the separation was performed by a capillary with an inner diameter of 75 μm and an effective length of 40 cm. Optimum conditions were obtained by a run buffer of 15 mM borate containing 20 mM SDS (pH 9,00) and applying 25 kV potential. Under these conditions, the migration times of HCT and TRM were observed as $2,75\pm 0,007$ min and $4,61\pm 0,022$ min. Validation of the developed methods were examined by linearity, selectivity, precision, accuracy, sensitivity, stability and robustness parameters. For the selectivity of the method both HCT and TRM standards and tablets were exposed to acidic, basic, oxidative, thermal and photolytic stress conditions. As a result method was successfully applied to the determination of HCT and TRM in tablets.

Keywords: Triamterene, Hydrochlorothiazide, Capillary electrophoresis, Stability indicating method, Determination

ÖNSÖZ

Bu çalışmada TRM ve HCT'nin KE yöntemi ile eşzamanlı miktar tayininin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda yöntem stabilite göstergeli olarak uygulanmıştır.

Yüksek lisans tezim boyunca bana sabır ve ilgiyle yardım eden, her alanda benden yardım ve desteklerini esirgemeyen tez hocam Dr.Öğr.Üyesi Arın Gül DAL POÇAN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan, benimle tüm bilgi ve birikimleri paylaşan hocalarıma ve çalışmada katkılarına,

Hayatımın her alanında yanımda bulunan ve her koşulda bana destek olan sevgili aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durum saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Diüretikler.....	3
2.2. TRM'nin Farmakolojik Özellikleri	3
2.3. TRM'nin Farmakokinetik Özellikleri.....	3
2.4. HCT'nin Farmakolojik Özellikleri.....	4
2.5. HCT'nin Farmakokinetik Özellikleri	4
2.6. Kullanılan Yöntemler	4
2.6.1. KE yöntemi	4
2.6.2. MEKK yöntemi.....	7
2.7. TRM'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	7
2.8. HCT'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	8
2.9. TRM ve HCT'nin Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar	8
3. GEREÇLER.....	16
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	16
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	16
4. YÖNTEMLER	17
4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı.....	17
4.2. KE Yöntemi	17

4.2.1. Cihazla ilgili koşullar	17
4.2.2. Çalışma tamponu.....	18
4.2.3. Optimizasyon alışmaları	18
4.2.3.1. Tampon bileşimi ve derişimi.....	18
4.2.3.2. pH	19
4.2.3.3. Organik özücü oranı	19
4.2.3.4. Potansiyel	19
4.2.4. Validasyon alışmaları	19
4.2.4.1. Doğrusallık.....	19
4.2.4.2. Seçicilik.....	20
4.2.4.2.1. Asidik stres.....	20
4.2.4.2.2. Bazik stres	20
4.2.4.2.3. Oksidatif stres	20
4.2.4.2.4. Termal stres	21
4.2.4.2.5. Fotolitik Stres	21
4.2.4.3. Kesinlik.....	21
4.2.4.4. Doğruluk.....	21
4.2.4.5. Duyarlılık.....	22
4.2.4.6. Kararlılık	22
4.2.4.7. Sağlamlık.....	22
4.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	22
5. BULGULAR VE YORUM.....	23
5.1. Yöntemin Optimizasyonu	23
5.1.1. Tampon bileşimi ve derişimi	24
5.1.2. pH.....	26
5.1.3. Organik özücü.....	27
5.1.4. Uygulanan potansiyel.....	27
5.1.5. IS	28
5.2. Validasyon.....	29
5.2.1. Doğrusallık.....	29
5.2.2. Seçicilik.....	31
5.2.3. Kesinlik.....	37
5.2.4. Doğruluk.....	38

5.2.5. Duyarlılık	40
5.2.6. Kararlılık.....	40
5.2.7. Sağlamlık.....	40
5.2.8. Sistem uygunluk testleri.....	41
5.3. Yöntemin Uygulanması	42
6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	44
KAYNAKÇA.....	47
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. KE yönteminde elektroozmotik akığ Ėenma	5
Şekil 2.2. KE sisteminin Ėenatik gösterimi.....	6
Şekil 2.3. TRM'nin açık kimyasal formülü	8
Şekil 2.4. HCT'nin açık kimyasal formülü.....	8
Şekil 5.1. ĖalıĖma tamponu incelemesi.....	24
Şekil 5.2. ĖalıĖma tamponu bileğimi incelemesi	25
Şekil 5.3. ĖalıĖma tamponu deriğimi incelemesi.....	25
Şekil 5.4. ĖalıĖma tamponu pH incelemesi	26
Şekil 5.5. ĖalıĖma tamponundaki organik çözücü oranı incelemesi	27
Şekil 5.6. Uygulanan potansiyelin incelemesi	28
Şekil 5.7. Optimum koğullar altında HCT ve TRM'ye ait elektroferogram.....	29
Şekil 5.8. TRM'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi.....	30
Şekil 5.9. HCT'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi	30
Şekil 5.10. HCl'ye maruz bırakılan HCT'ye ait elektroferogram	32
Şekil 5.11. HCl'ye maruz bırakılan TRM'ye ait elektroferogram	32
Şekil 5.12. NaOH'a maruz bırakılan HCT'ye ait elektroferogram	33
Şekil 5.13. NaOH'a maruz bırakılan TRM'ye ait elektroferogram.....	33
Şekil 5.14. H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan HCT'ye ait elektroferogram	34
Şekil 5.15. H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan TRM'ye ait elektroferogram.....	34
Şekil 5.16. Isıya maruz bırakılan HCT ve TRM'ye ait elektroferogram.....	35
Şekil 5.17. UV'ye maruz bırakılan HCT ve TRM'ye ait elektroferogram.....	35
Şekil 5.18. Tablete uygulanan tüm stres koğularına ait elektroferogramlar	36
Şekil 5.19. TRM ve HCT içeren tablet analizine ait elektroferogram.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Literatürdeki stabilite göstergeli yöntem uygulanmış çalışmaları.....	11
Çizelge 4.1. Uygulanan stres koşulları	21
Çizelge 5.1. TRM'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	31
Çizelge 5.2. HCT'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	31
Çizelge 5.3. Stres koşulları altında bulunan HCT ve TRM miktarları	36
Çizelge 5.4. Stres koşulları altında bulunan tabletteki HCT ve TRM miktarları	37
Çizelge 5.5. TRM'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	37
Çizelge 5.6. HCT'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri.....	38
Çizelge 5.7. TRM'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri	38
Çizelge 5.8. HCT'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri.....	39
Çizelge 5.9. HCT ve TRM'nin kararlılık verileri	40
Çizelge 5.10. Yöntemin sağlamlık verileri	41
Çizelge 5.11. TRM ve HCT'nin sistem uygunluk verileri	41
Çizelge 5.12. TRM ve HCT tabletlerinin miktar tayini verileri	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a	: Eğim
AO	: Alan oranları
As	: Asimetri faktörü
b	: Kesim
BH	: Bağıl hata
BSS	: Bağıl standart sapma
DAD	: Foto diyot dizisi
GA	: Güven aralığı
h	: Hacim
HCT	: Hidroklorotiyazit
ICH	: Uluslararası Uyum Konferansı
IS	: Ğ standart
KE	: Kapiler elektroforez
LIF	: Lazer indüklenmiğ floresans
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
MEKK	: Misel elektrokinetik kapiler kromatografi
MS	: Kütle spektrometresi
n	: Deney sayısı
N	: Tabaka sayısı
Ort	: Ortalama
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Döngü/dakika
Rs	: Ayrım gücü
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
ss	: Standart sapma
TRM	: Triamteren
USP	: Amerikan Farmakopesi
UV	: Mor ötesi
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasında doping amaçlı kullanılan bazı diüretiklerin KE ile analizleri hedeflenmiştir. Bu amaçla diüretiklerden TRM ve HCT seçilmiştir.

TRM distal tubuluslar üzerinde etkili potasyum tutucu bir diüretiktir. Etkileri bakımından amiloride benzer; fakat ondan farklı olarak magnezyumun üriner atılımını artırır. TRM görece zayıf bir diüretik ve antihipertansiftir. Özellikle potasyum desteğini tolere edemeyen veya potasyum desteğine cevap vermeyen hastalarda hipokaleminin kontrol altına alınmasında kullanılır (Rx-Media, 2019). HCT ise ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiyazit yapılı bir diüretiktir. Tiyazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlama veya diğer ilaçlarla beraber kullanılırlar. TRM ile tiyazit grubu diüretik olan HCT'nin sabit dozlu kombinasyonu hafif ve orta derecede esansiyel hipertansiyonun tedavisinde kullanılır. Kombinasyondaki her iki bileşen birlikte aditif hipertansif etki gösterirler. Hem TRM hem de HCT Dünya Anti-Doping Ajansı'nın 2019 yılı kullanımını her zaman yasaklı maddeler listesinde „idrar söktürücüler ve diğer maskeleyici maddeler“ başlığı altında yer almaktadır (Rx-Media, 2019).

Literatürde TRM ve HCT'nin miktar tayinine yönelik yapılmış pek çok çalışma bulunmasına karşın her iki maddenin stabilite göstergeli bir KE yöntemi ile analizleri bulunmamaktadır.

KE yöntemi, iletken bir çözelti içindeki yüklü/yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan etkisiyle bir kapiler içerisinde hareket etmesine dayanan bir yöntemdir. KE'nin diğer ayırım yöntemlerine göre yüksek verimlilikte olması, çok küçük hacimlerde örneklerle çalışabilmesi, madde sarfiyatının az olması ve hızlı ayırım yapabilmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Baker, 1995).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration) kılavuzuna göre stabilite göstergeli yöntem; aktif bileşenlerin (ilaç etkin maddesi veya ilaç ürünü) doğru ve kesin bir şekilde ölçülmesini sağlayan bir analitik prosedür olarak tanımlanmaktadır. Stabilite testleri; ilaç etkin maddesi veya ilaç ürününün kalitesinin sıcaklık, nem ve ışık gibi çevresel faktörlerin etkisi altında zamanla nasıl değiştiğine dair kanıt oluşturur.

Aktif bileşenin istikrarı „olası bir değışiklik olmaması“ anlamına gelmez. Ancak „kontrollü ve kabul edilebilir değışiklik“ anlamına gelir.

Bu çalışmada TRM ve HCT'nin eđ zamanlı analizleri için bir KE yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin optimizasyonunun ardından yöntemin geçerliliği doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık, sağlamlık ve kararlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemin seçiciliğinin gösterilmesi ağamasında çeşitli stres koşulları uygulanarak analitlerin etkilenip etkilenmediği belirlenmiştir. Daha sonra yöntem TRM ve HCT içeren farmasötik preparatlara uygulanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Diüretikler

Diüretik ilaçlar karbonik anhidraz inhibitörleri, kıvrım diüretikleri, potasyum tutucu diüretikler ve tiyazit grubu diüretikler olmak üzere 4 gruba ayrılır. TRM potasyum tutucu diüretikler, HCT ise tiyazit grubu diüretikler arasında yer alır.

2.2. TRM'nin Farmakolojik Özellikleri

TRM, amiloride benzer şekilde aldosterondan bağımsız olarak böbrek distal tubuluslarında sodyum-potasyum iyon değiş tokuş mekanizmasını inhibe eder. Distal tubuluslarda sodyum transportunu doğrudan inhibe ederek sodyumun reabsorbsiyonunu engellediğine inanılmaktadır (Rx-Media, 2019).

Böylece membranda potasyumun pasif distal tübüler salgılanmasını bloke eden bir elektriksel potansiyel farkı doğur ve potasyum tutucu etkisi buna bağlıdır. Potasyum kaybının minimal olduğu durumlarda TRM potasyum mekanizmasını çok hafif düzeyde değiştirir (Rx-Media, 2019).

Buna karşın, potasyumun renal klirensi kıvrım diüretikleri veya mineralokortikoidler tarafından artırıldığında TRM potasyum atılımında önemli bir azalma meydana getirir (Rx-Media, 2019).

Sodyum, bikarbonat, kalsiyum, magnezyum, klorür ve suyun üriner atılımındaki artma hafif bir diüreze neden olur. TRM karbonik anhidraz aktivitesini inhibe etmez. Genel olarak bakıldığında diüretikler sol ventrikül hipertrofisi ve glikoz toleransının kötüleşmesine neden olurlar ve lipid profili üzerinde bozucu etki yaparlar (Rx-Media, 2019).

2.3. TRM'nin Farmakokinetik Özellikleri

TRM oral yoldan verilir. Gastrointestinal kanaldan hızla, fakat değişken bir şekilde absorbe edilir. Biyoyararlanımı yaklaşık %30-70 oranındadır. Etkisi 2-4 saatte görülür; doruk düzeye 6-8 saatte çıkar ve 12-16 saat kadar devam eder. TRM plasentayı ağız, fakat insanda anne sütüne geçip geçmediği bilinmemektedir. Hayvanlarda yapılan araştırmalar az miktarda da olsa anne sütüne geçtiğini ortaya koymuştur. TRM'nin en azından bir aktif metabolite metabolize edildiği bilinmektedir. Ana ilaç ve

metabolitinin %50'den daha az bir bölümü idrarla atılır. Yaklaşık%21'i değığmeden elimine olur. Geri kalan bölümü safra ve feçes yoluyla elimine edilir. TRM'nin yarı ömrü böbrek fonksiyonu normal olan hastalarda yaklaşık1-2 saattir. Bu süre böbrek hastalığı had safhada olan hastalarda 10 saate kadar uzayabilir. Bazı aktif metabolitlerinin yarı ömrü böbrek fonksiyonu normal olan hastalarda 12 saat olarak bulunmuştur (Rx-Media, 2019).

2.4. HCT'nin Farmakolojik Özellikleri

HCT ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiyazit yapılı bir diüretiktir. Kıvrım diüretiklerinden farklı olarak, böbrek yetmezliği olan hastalarda etkinliği zayıflar. HCT diabetes insipidus ve hiperkalsüri tedavisi içinde de kullanılır.

HCT'nin hipertansiyonun bağılangç tedavisinde tek bağınaya da diğeri ilaçlarla kombine kullanılır. TRM ile kombine tabletleri hafif ve orta derecede yüksek kan basıncı tedavisine endikedir (Rx-Media, 2019).

2.5. HCT'nin Farmakokinetik Özellikleri

HCT'nin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu verildiğı farmasötik Çıkile ve verilen doza bağı olarak değığkenlik gösterir. Sistemik biyoyararlanımı yaklaşık%50-60'tır. Etkisi oral yolla verildikten 2 saat sonra bağılar ve pik etki 4 saatte gözlenir. Toplam etki süresi 6-12 saattir. HCT plasentayı ağımasınarağmen kan-beyin engelini ağıamaz. Anne sütüne geçebilir. HCT metabolize olmaz ve esas olarak idrarla değığmeden atılır; verilen dozun %61'i 24 saatte elimine olur (Rx-Media, 2019).

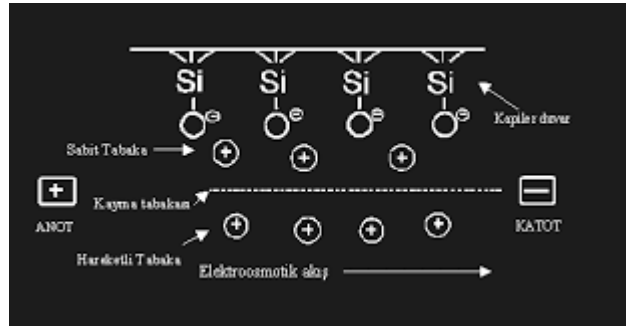
2.6. Kullanılan Yöntemler

2.6.1. KE yöntemi

Yüklü taneciklerin (iyonlar, koloidal tanecikler gibi) elektrik alan etkisiyle farklı hızlarda hareket etmelerinden yararlanılarak ayrılmasına yarayan bir metottur. KE'de bir kapiler boru belli pH'ta iletken bir sıvı ile doldurulur. Bu, numunenin ayrılacağı tampon çözeltilidir. Numune kapilere injeksiyonla uygulanır. Kapiler üzerinde bir yüksek voltaj meydana getirilir ve oluğanelektrik alandan dolayı, numune bileğenleri kapiler boyunca farklı hızlarda hareket ederler. Pozitif bileğenler negatif elektroda, negatif bileğenler pozitif elektroda göç ederler. Kapilere belirli bir yerden bir detektörle

bakıldığında, önce hızlı olan bileşenlerin, daha sonra da yavaş olan bileşenlerin geçtiği görülür (http-1).

Elektroozmotik akışmada çözeltisinin yanında çalışmatamponunun da elektrik alanının etkisi altında kapiler içinde hareket etmesidir. Elektroozmotik akışın yönü negatif yüklü katoda doğrudur. Böylece de girişvialinden, kapilere, detektöre ve çıkışvialine doğru akış olur. Katyonlar elektroozmotik akışın daha hızlı hareket ederek, nötr maddeler elektroozmotik akış ile aynı hızda ve anyonlar ise elektroozmotik akışın daha yavaş hareket ederler. Elektroozmotik akış şekil 2.1."de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. KE yönteminde elektroozmotik akış şeması (http-2)

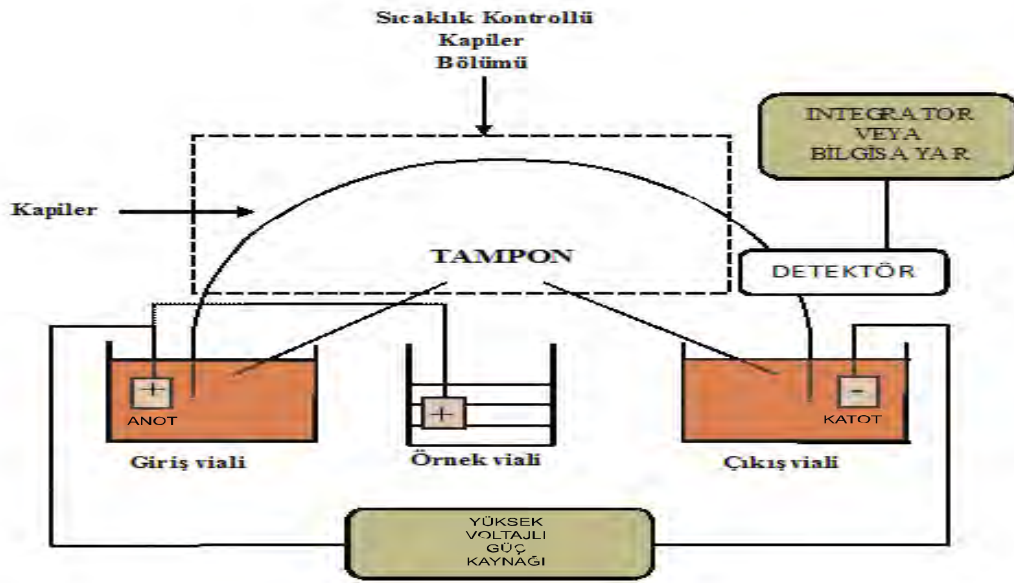
Pozitif yüklü katyonlar katoda yani negatif yüklü elektrota, negatif yüklü anyonlar ise anoda yani pozitif yüklü elektroda geç ederler. Elektroforetik hızları iyonların yük/kütle oranına bağlıdır. Aynı yüke sahip iyonlardan küçük bir iyon, kendisinden büyük bir iyonla göre daha hızlı geç eder. Nötr moleküller elektrik alanından etkilenmezler.

Ayrılan moleküller kapiler sonuna yerleştirilen bir detektör yardımı ile analiz edilirler. Detektör çıktısı, zamana karşı detektör yanıtının bir grafiğidir ve buna elektroferogram adı verilir.

Elektroforezde bileşenlerin iletken ortam içinde zonlar halinde hareket ettiği düşünülür. Fakat kapilere bir bileşik girdiğinde bir miktar dağılma ve dolayısıyla zonların yayılması söz konusu olur. Bu dağılma göç yönüne paralel, göç yönüne dik veya termal dağılma şeklinde olabilir. Elektrik alan uygulanması, iletken çözeltide Joule ısınmasına neden olur. Kapilerin daha sıcak olan merkezindeki moleküller daha soğuk olan kapiler duvarına yakın moleküllere göre daha hızlı geç ederler. Göç yönüne paralel ve göç yönüne dik dağılma, zon yayılması üzerine az etkilidir. Fakat termal dağılma,

zon yayılmasında büyük paya sahiptir. Termal dağılmayı azaltmak için tampona bir jel gibi stabilite edici ajan eklenmesi, kapilerin çevrilerek kullanılması ya da kapilerin çapının azaltılması uygulanmalıdır.

KE'nin ana bileşenleri örnek, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, detektör, yüksek voltajlı güç kaynağı ile bilgisayar gibi bir bilgi işleme cihazıdır. KE sisteminin ana bileşenleri şekil 2.2.'de sunulmuştur.



Şekil 2.2. KE sisteminin şematik gösterimi (Baker, 1995)

Elektroforez, girişvial'i, kapiler ve çıkışvialinin bir elektrolit ile doldurulmasıyla gerçekleştirilmektedir. Genellikle sulu bir tampon çözeltisi elektrolit olarak kullanılır. Kapiler girişörnek vialinin içine yerleştirilir, örnek koyulur ve daha sonra kapiler giriştekrar girişvialine alınır ve girişve çıkışvial'i arasına elektrik alanı uygulanır. Çözünen maddeler, kapiler boyunca göç ederler ve detektörler tarafından tespit edilirler. Detektör çıkışlar bilgisayara gönderilir ve çıkan veriler bir elektroferogram olarak görüntülenir.

Çözünen maddeleri kapiler içinde farklı hızlarda hareket ettikleri için detektör önünde farklı zamanlarda geçerler. Elektroferogramda, ayrılmış bileşikler, pikler halinde farklı göç zamanlarında görünürler.

KE'nin diğer ayırım yöntemlerine göre yüksek verimlilikte olması, çok küçük hacimlerde örneklerle çalışabilmesi, reaktif sarfiyatının az olması ve hızlı ayırım yapabilmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Baker, 1995).

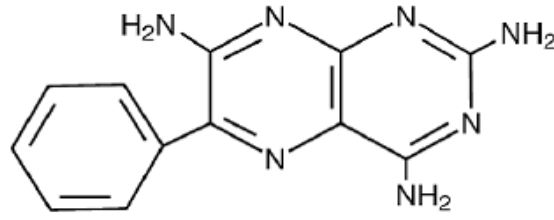
2.6.2. MEKK yöntemi

Ölk kez 1984 yılında Shigeru Terabe vd. tarafından sunulan miselsi elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKK), kapiler elektromigrasyon tekniklerinin yüksüz analitlerin ayrılması potansiyelini genişletmiştir. Etkileyici ayırma verimliliği ve esnekliği ile MEKK özellikle ilaç ve biyomedikal alanlarında popüler bir teknik haline gelmiştir.

Kritik misel konsantrasyonlarının üstünde, bir elektrolit çözeltisine eklenen yüzey aktif cismi monomerleri, misel adı verilen agregatlar oluşturur. Bireysel miseller ayrılan çözünenlerden önemli ölçüde daha büyük değildir. Küçük boyutları ve büyük sayıları nedeniyle, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler. Yapıları dinamiktir, misel içindeki bir yüzey aktif cismi monomerinin ortalama kalıbsuresi 1 ms veya daha azdır. MEKK'de ayrılma, analitlerin miseller ve sulu faz arasında elektroosmotik akı varlığında bölünmesine dayanır. Miseller yalancı-durağan bir faz olarak işlev görür. Analit-misel etkileşiminin mekanizması esas olarak hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ile belirlenir. MEKK bağlamında kapiler elektroforetik tekniklerin avantajlarından yararlanmak için geliştirilmiştir, (yüksek verimlilikler, sadece çok az miktarda numune ve reaktif gereksinimi, hızlı analiz süresi), benzer yapıdaki nötr çözünenlerin ayrılmasında kullanılabilir. Bazı bir KE aleti kullanılır ve ayrımlar genellikle hidrodinamik enjeksiyondan sonra kaplanmamış erimiş silika kapiler kolonlarında gerçekleştirilir.

2.7. TRM'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

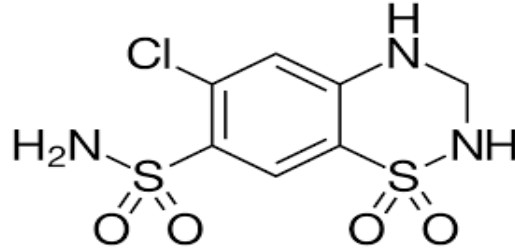
TRM sarı renkli, kokusuz bir tozudur. İngiliz Farmakopesi'ne göre çözünürlükleri: Su, alkol ve kloroformda çok hafif çözünür; eterde pratik olarak çözünmez. Amerikan Farmakopesi (USP)'ye göre formik asitte 1:30 ve metoksietanolde 1:85 oranında çözünür; asetik asit, alkol ve seyreltik mineral asitlerde çok hafif çözünür; su, kloroform, eter ve seyreltik alkali hidroksitlerinde pratik olarak çözünmez. Asitlendirilmiş çözeltileri mavi renkte flüoresans gösterir. (Rx-Media, 2019).



Şekil 2.3. TRM'nin açık kimyasal formülü (http-5)

2.8. HCT'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

HCT beyaz ve beyaza yakın renkte, kokusuz veya çok az kokulu kristalize bir tozdur. Suda çok hafif veya hafif çözünür; alkolde az çözünür; asetonda çözünür; dimetilformamid, n-butilamin ve alkali hidroksit çözeltilerde çözünür; eter, kloroform ve seyreltik mineral asitlerde çözünmez. Molekül ağırlığı 297,74 g/mol'dür. Kapalı formülü ise C₇H₈ClN₃O₄S₂'dir (Rx-Media, 2019).



Şekil 2.4. HCT'nin açık kimyasal formülü (http-6)

2.9. TRM ve HCT'nin Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

Bu çalışmam kapsamında literatürdeki çalışmaların fazlalığı nedeni ile çalışmalar; HCT ve TRM'nin eş zamanlı analizinin gerçekleştirildiği çalışmalar, HCT ve/veya TRM'nin KE yöntemi ile analiz edildiği çalışmalar ve HCT ve/veya TRM'nin stabilite göstergeli olarak analizlerinin gerçekleştirildiği çalışmalar olarak sınırlandırılmıştır.

Luis vd., (2002, s.223) diüretiklerin analizinde kullanılan bir elektroforetik yöntem geliştirmiştir. Klortalidon, furosemit, HCT ve TRM yüzey aktif madde olarak SDS içeren bir çalışmatamponu kullanılarak 5 dk içinde MEKK yöntemi ile ayrılmış ve daha sonra bir DAD detektörü kullanılarak spektrofotometrik olarak

saptanmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusalılık parametreleri incelenmiştir.

Kargosha ve Sarrafi, (2001, s.273) TRM ve HCT'nin eş zamanlı tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir. Yöntem valide edilmiş ve farmasötik formlara başarıyla uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusalılık parametreleri incelenmiştir.

Chen vd.,(2016, s.451) HCT, TRM ve rezerpinin sıçan plazmasından tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik (YPSK) bir yöntem geliştirmiştir. Ayrım 250×4,6 mm boyutunda ve 5 µm partikül çapına sahip C18 kolon ile sağlanmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril ve %0,2'lik asetik asit çözeltileri gradient sistem ile kullanılmıştır. Bu koşullar altında alıkonma zamanları HCT ve TRM için sırasıyla 10,5 dk ve 6,9 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliği doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik ve doğruluk parametreleri ile gösterilmiştir.

Karimi, Gholivand ve Amiri, (2019) TRM ve HCT'nin eş zamanlı tayini için elektrokimyasal bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde camı karbon elektrot bazlı yeni bir yöntem kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem analitlere ve dozaj formlarına başarıyla uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusalılık parametreleri incelenmiştir.

Hudari, Souza ve Zaroni, (2018, s.652) yaptıkları çalışmada adsorbent sıyırma voltametri ile HCT ve TRM'nin hemodiyaliz örneklerinden tayinini gerçekleştirmiştir. Karbon nanotüp ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotta oksidasyon HCT ve TRM için sırası ile 1,01 V ve 1,17 V'ta gözlenmiştir. Yöntemin geliştirilmesi için bir YPSK yöntemi geliştirilmiş ve yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda elektrokimyasal yöntemin daha duyarlı olduğu bulunmuştur.

Hillaert ve Bossche, (2003, s.329) KE ve MEKK yöntemleri ile HCT ve altı anjiyotensin-II reseptörünün (kandesartan, eprosartan mesilat, irbesartan, losartan potasyum, telmisartan ve valsartan) aynı anda analizini hedeflemiştir. KE ve MEKK yöntemleri, farmasötik formülasyonlardaki kombine HCT anjiyotensin-II reseptörünün kalitatif ve kantitatif tayini için uygundur. Anjiyotensin-II reseptörüne bağlı olarak, iki yöntemden biri ya da her ikisi en az biri ya da kombinasyonları için kullanılabilir. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusalılık parametreleri incelenmiştir.

Horstkötter vd., (2002, s.223) TRM ve ana metabolitinin doğrudan belirlenebilmesi için iki KE yöntemi geliştirmiştir. Analitler mor ötesi (UV) detektör ve lazer indüklenmiş floresans (LIF) detektör ile 325 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Her iki deteksiyon tekniğinin sonuçları karşılaştırıldığında; LIF detektörle yapılan analizde tayin sınırının (LOQ) (50 ng/mL) UV detektöre (400 ng/mL) göre sekiz kat daha düşük olduğu belirlenmiştir. Endojen idrar bileşiklerine bağlı herhangi bir girişim gözlemlenmediğinden, doğrudan idrar analizi yapılmıştır. Analizlerin basit ve hızlı olduğu gözlemlenmiştir. KE-UV yöntemi 10 dk, KE-LIF yöntemi 2,5 dk'dan kısa sürmüştür. Her iki yöntem de doğrulanmış ve gönüllülerden alınan idrar üzerine uygulanmıştır. Bu yayında KE-LIF yönteminin insan idrarı üzerine uygulanmasının sonuçları sunulmuştur.

Gonzalez, Bacerra ve Lasema, (1996, s.145) Dünya Doping Mücadele Ajansı'nda yasaklı dört diüretik ilacın (TRM, amilorid, bendroflumetiozid ve bumetanid) analizi için bir KE yöntemi geliştirmiştir. Detektör olarak flüoresans detektör kullanılmıştır. Bu çalışmada pH'ın; göç zamanı, pik yüksekliği ve pik alanı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Analizler pH 8,0'da yürütülmüştür. Optimum koşullar altında analiz 8 dk'dan kısa sürmüştür. TRM için analizler, 370-434 nm dalga boyu aralığında yürütülmüştür. Gözlenebilirlik sınırı (LOD) değeri TRM için 0,5 fmol olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusallık parametreleri incelenmiştir.

Riekkola ve Jumppanen, (1996, s.151) diüretiklerin KE yöntemi ile belirlenmesine yönelik araştırmaları derlemiştir. KE ve MEKK yöntemlerinin kullanıldığı analizler incelenmiş ve yöntemlerin üstünlükleri tartışılmıştır. Analizde matris problemleri varsa MEKK'nin KE'ye üstün olduğu görülmüştür. Analizlerde, borat-SDS-asetonitril, titrisol, asetat, glisin, borat-SDS tamponlarının kullanıldığı görülmüştür. Analizlerde UV ve LIF detektörlerin kullanıldığı görülmüştür. Analizler 200 nm'den 337 nm'ye kadar geniş bir dalga boyu aralığında yürütülmüştür. 4,5- 10,6 pH aralığında çalışıldığı görülmüştür. Bu çalışmada KE'nin YPSK'ya, MEKK'nin KE'ye üstün olduğu durumlar araştırılmıştır.

Siren vd., (2008, s.215) altı diüretik ilacın (bentiazid, bumetanid, etakrinik asit, furosemid, klorotiazid, HCT) ve probenesidin metanolde ayrılmasına yönelik bir KE yöntemi geliştirmiştir. Analiz 214 nm'de yürütülmüştür. 30 kV voltaj uygulanmıştır.

Sıcaklık 25 °C'de tutulmuştur. 50 mbar basınçta hidrodinamik enjeksiyon uygulanmıştır. 7,9 mM asetik asit/asetat tamponu kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusallık parametreleri incelenmiştir.

Wang vd., (2003, s.1507) HCT ve rutin analizine yönelik bir KE yöntemi geliştirmiştir. Amperometrik detektör kullanılmıştır. HCT için LOD değeri 2×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır. Optimum koşullar altında analiz 12 dk'dan kısa sürmüştür. Analizler pH 7,0-10,0 aralığında 25 mmol $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/50\text{mmol}$ NaH_2PO_4 tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusallık parametreleri incelenmiştir.

Zheng vd., (2008, s.15) indapamid, bumetanid ve HCT analizine yönelik bir KE yöntemi geliştirmiştir. Amperometrik detektör kullanılmıştır. pH 8,98'de $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ tamponu kullanılmıştır. Optimum koşullar altında analiz 10 dk'dan kısa sürmüştür. HCT için LOD değeri 20 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusallık parametreleri incelenmiştir.

Çizelge 2.1. Literatürdeki stabilite göstergeli yöntem uygulanmış çalışmalar

Kaynak ve Madde	Asidik Stres	Bazik Stres	Oksidatif Stres	Termal Stres	Fotolitik Stres
Ali vd. (2016) HCT	1 M HCl 100 °C 1 saat, %10,10 bozunma	1 M NaOH 100 °C 1 saat, %7,20 bozunma	%30 H_2O_2 100 °C 1 saat, %65,17 bozunma	80 °C 48 saat, %0,98 bozunma	Gün ışığı 48 saat, bozunma yok
Alzoman vd. (2013) HCT	1 M HCl 5 saat, %31,57 bozunma	1 M NaOH 5 saat, %33,10 bozunma	%30 H_2O_2 1 saat, %35,90 bozunma	80 °C 4 saat, bozunma yok	Gün ışığı 24 saat, bozunma yok
Belal vd. (2013) HCT	1 M HCl 90 °C 1 saat	1 M NaOH 90 °C 1 saat	%5 H_2O_2 80 °C 1 saat	90 °C 18 saat	254 nm 60 saat
Belal vd. (2001) HCT	2 M HCl su banyosu, 1 saat	2 M NaOH su banyosu, 1 saat			
Diego vd. (2017) HCT	0,1 N HCl 70 °C 3 saat, %36,3 bozunma	0,1 N 70 °C 5 saat, %6,3 bozunma	%3 H_2O_2 7 gün	70 °C %75 bağıl nem 30 gün	1,2 milyon lux saat, 200 watt

Çizelge 2.1 (Devam). *Literatürdeki stabilite göstergeli yöntem uygulanmış çalışmalar*

Diego vd. (2013) HCT	0,1 N HCl 70 °C 24 saat	0,1 N NaOH 70 °C 24 saat	%6 H ₂ O ₂ 7 gün	70 °C 30 gün	365 nm 10 gün
Diego vd. (2011) HCT	0,1 N HCl 60 °C, 5.5 saat, %19,1 bozunma	0,1 N NaOH 60 °C 5.5 saat, %17,8 bozunma	%6 H ₂ O ₂ 70 °C 5.5 saat, bozunma yok	70 °C 32 gün	365 nm 8 gün
Desai vd.(2019) HCT	1 N HCl 2 saat, %0,06 bozunma	0,1 N NaOH 15 dk., bozunma yok	%3 H ₂ O ₂ 2 saat, bozunma yok	80 °C 5 gün, %0,05 bozunma; 40 °C %75 bağıl nem 10 gün %0,06	2,9 milyon lux saat, 103,9 watt, %0,07 bozunma
Dubey vd. (2012) HCT	0,01 N HCl 60 °C 2 saat, %5,79 bozunma	0,01 N NaOH 60 °C 2 saat, %6,72 bozunma	%5 H ₂ O ₂ 60 °C 1 saat, %8,77 bozunma	80 °C 2 saat, %7,13 bozunma	Gün ışığı 16 saat, %8,74 bozunma
Hegazy vd. (2011) HCT	0,1 N NaOH 2 saat			60 °C 4 saat	
Rao vd.(2009) HCT	0,1 N HCl 70 °C 4 saat	0,1 N NaOH 70 °C 4 saat	%5 H ₂ O ₂ 4 saat	80 °C 24 saat	1,2 milyon lux saat, 200 watt
Elkarbane vd.(2015) HCT	1 M HCl 22 °C 60 dk.	1 M NaOH 22 °C 60 dk.	%3 H ₂ O ₂ 22 °C 30 dk.	70 °C 4 saat bozunma yok,;40°C %75 bağıl nem 6 ay,%10 bozunma	
El Kimary vd.(2016) TRM	0,5 M HCl 100 °C 2 saat, %21.48 bozunma	0,5 M NaOH 100 °C 1 saat, %72,35 bozunma	%10 H ₂ O ₂ 80 °C 1 saat, %28,88 bozunma	100 °C 6 saat bozunma yok; nemli ısı 100 °C 6 saat %1,22 bozunma	Gün ışığı 5 gün, bozunma yok; UV 254 nm %1,34 bozunma, UV 365 nm %0,09 bozunma
Patil vd.(2011) HCT	1 N HCl 60 °C 2 saat, %0,5 bozunma	0,1 N NaOH 60 °C 2 saat, %44,03 bozunma	%30 H ₂ O ₂ 60 °C 2 saat, %35,61 bozunma	80 °C 28 saat	UV 254 nm 24 saat, bozunma yok; UV 366 nm 48 saat, bozunma yok

Çizelge 2.1 (Devam). *Literatürdeki stabilite göstergeli yöntem uygulanmış çalışmalar*

Fiori vd.(2003) TRM					UVA-UVB 365 nm, 254 nm+ 365 nm
Ganipisetty vd.(2016) HCT	0,1 N HCl 60 °C 1 saat, %2,61 bozunma	0,01 N NaOH 60 °C 30 dk, %0,78 bozunma	%3 H ₂ O ₂ , %2,13 bozunma	60 °C 72 saat, %4,53 bozunma	1,2 milyon lux saat 226 nm 24 saat, %0,26 bozunma
Gawande vd.(2013) HCT	1 N HCl 80 °C 2 saat	1 N NaOH 80 °C 2 saat	%15 H ₂ O ₂ 80 °C	70 °C 3 gün	1,25 milyon lux saat 200 watt
Hari vd.(2016) HCT	1 M HCl %0,41 bozunma	1 M NaOH, %0,49 bozunma	%3 H ₂ O ₂ %0,49 bozunma		
Ilango vd.(2013) HCT	0,1 M HCl 50 °C 1 saat, %3 bozunma	0,1 M NaOH 50 °C 1 saat, %18 bozunma	%3 H ₂ O ₂ 50 °C 1 saat, %5 bozunma	60 °C 1 saat (nemli)	365 nm UV 24 saat
Jain vd.(2011) HCT	1 N HCl 105 °C 30 dk, %14,29 bozunma	2 N NaOH 105 °C 90 dk, %32,8 bozunma	%10 H ₂ O ₂ 105 °C 45 dk, %36,24 bozunma	100 °C 48 saat	254 nm, 366 nm, UV 48 saat
Joshi vd.(2010) HCT	0,25 N HCl 60 °C 1 saat	0,25 N NaOH 60 °C 1 saat	%10 H ₂ O ₂ 60 °C 4 saat	60 °C 15 gün	
Kalyani vd.(2016) HCT	1,5 N HCl 2 saat	0,1 N NaOH 8 saat	%1 H ₂ O ₂ 30 °C 24 saat	70 °C 24 saat	UV lamba 2 saat
Karvelis vd.(2014) HCT	1 M HCl 25 °C, %81.7 bozunma	1 M NaOH 25 °C, %69,6 bozunma	%5 H ₂ O ₂ 25 °C, %46,2 bozunma		
Kurbanoğlu vd.(2014) HCT	0,1 N HCl 3 saat, %42 bozunma	0,1 N NaOH 1 saat, %18 bozunma	%30 H ₂ O ₂ 1 saat, %33 bozunma	75°C 1 saat, %5 bozunma	
Lusina vd. (2005) HCT				50°C, %80 nem, 4 hafta	
Satheesh vd.(2011) HCT	1 N HCl 80 °C, 1 gün	1 N NaOH, 80 °C, 1 gün	%3 H ₂ O ₂ , 35 °C, 1 gün	105 °C, 2 gün	UV 254 nm, 2 gün

Çizelge 2.1 (Devam). *Literatürdeki stabilite göstergeli yöntem uygulanmış çalışmalar*

Salem vd. (2019) HCT	0,1 N HCl 70 °C 3 saat, %36,3 bozunma	0,1 N 70 °C 5 saat, %6,3 bozunma	%3 H ₂ O ₂ 7 gün	70 °C %75 bağıl nem 30 gün	1,2 milyon lux saat, 200 watt
Shaalan vd.(2013) HCT	1 M HCl, 90 °C 1 saat, %75 bozunma	1 M NaOH, 90 °C 1 saat, %30 bozunma	%5 H ₂ O ₂ 80 °C, 1 saat, %30 bozunma	90 °C 18 saat, bozunma yok	UV 254 nm 60 saat, %13 bozunma
Shakya vd. (2016) HCT	1 N HCl, bozunma yok	1 N NaOH, bozunma yok	%40 H ₂ O ₂ , %7.5 bozunma		UV 2 saat, bozunma yok
Slijivic vd. (2017) HCT	1 M HCl 70 °C 1 saat, %10,52 bozunma	1 M NaOH 70 °C 3 saat, %6,27 bozunma	%30 H ₂ O ₂ 3 saat, %10 bozunma	70 °C 3 saat, %8,64 bozunma	Gün ışığı 2 hafta, bozunma yok
Srikanth Reddy vd.(2015) HCT	0,2 N HCl 25 °C 10 dk, %0,4 bozunma	0,2 N NaOH 25 °C, %0,4 bozunma	%5 H ₂ O ₂ 85 °C 30 dk, %0,4 bozunma	105 °C 24 saat, %0,5 bozunma	1,2 milyon lux saat, 200 watt, %0,5 bozunma
Srinivasu vd.(2018) HCT	1 N HCl 80 °C 2 saat, %2,24 bozunma	0,1 N NaOH 80 °C 2 saat, %5,91 bozunma	%1 H ₂ O ₂ 80 °C 2 saat, %1,56 bozunma		
Tagliari vd.(2007) HCT	0,1 N HCl 60 °C 2 saat, %17 bozunma	0,1 N NaOH 60 °C 2 saat, %17 bozunma	%3 H ₂ O ₂ karanlıkta 24 saat, %9 bozunma	80 °C 72 saat, bozunma yok	
Vojta vd.(2015) HCT	0,5 M HCl 50 °C 2 saat	0,2 M NaOH 50 °C 2 saat	%30 H ₂ O ₂ 50 °C 2 saat	65 °C 18 saat	Gün ışığı 18 saat
Rao vd.(2016) HCT	0,1 N HCl, bozunma yok	0,1 N NaOH, bozunma yok	%3 H ₂ O ₂ , bozunma yok	60 °C, bozunma yok	
Sangoi vd.(2011) HCT	0,2 M HCl 3 saat, %25 bozunma	0,2 M NaOH 3 saat, %17 bozunma	%10 H ₂ O ₂ 6 saat, %18 bozunma		UV-C 254 nm 72 saat, %2 bozunma

Çizelge 2.1 (Devam). *Literatürdeki stabilite göstergeli yöntem uygulanmış çalışmalar*

Xu vd.(2019) HCT	0,1 M HCl 3 gün, bozunma yok	0,1 M NaOH 3 gün, bozunma yok	%3 H ₂ O ₂ 3 gün, %5,1 bozunma	%85 nem 80 °C 3 gün %20,6 bozunma	1,2 milyon lux saat, 200 watt, bozunma yok
Mahajan vd.(2012) HCT	1 mol, 1 mL HCl 80 °C, %15 bozunma	1 mol 1 mL NaOH 80 °C, %15 bozunma	%3 ve %6 H ₂ O ₂ 80 °C	70 °C 3 gün	1,25 milyon lux saat, 200 watt
Phechkraj ang vd.(2017) HCT	1 M HCl 80 °C	1 M NaOH 80 °C	%30 H ₂ O ₂	80 °C	Gün ışığı 14 gün
Rane vd.(2010) HCT	1 N HCl 48 saat	1 N NaOH 48 saat	%30 H ₂ O ₂ 48 saat	80 °C 48 saat	UV 254 nm 48 saat, UV 366 nm 48 saat

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Disodyum hidrojen fosfat	: Fluka, Almanya
Fosforik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
HCT	: Referans Kimya, Türkiye
Hidrojen peroksit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
SDS	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum asetat	: Merck, Almanya
Sodyum borat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum dihidrojen fosfat	: Fluka, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
TRM	: Referans Kimya, Türkiye

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
Etüv	: Venticell, Almanya
Hassas terazi	: Mettler Toledo, Çiçiçe
Kapiler elektroforez	: Agilent Technologies, CE7100, A.B.D.
Kapiler	: Agilent Technologies, A.B.D.
Otomatik pipet	: Eppendorf, Almanya
pH metre	: Mettler Toledo, Çiçiçe
ğırına filtresi	: Macherey Nagel, Almanya
Ultra saf su cihazı	: Millipore, A.B.D.
Ultrasonik banyo	: Sonorex, Almanya
UV lamba	: Vilber Lourmat, Fransa
Vorteks karıçtırıcı	: Jeio Tech, Kore

4. YÖNTEMLER

4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Geliştirilecek yöntemde kullanılmak üzere öncelikle HCT ve TRM için uygun çözücü araştırılmıştır. Literatür bilgileri ve ön denemeler sonucunda her iki madde için de metanol çözücü olarak belirlenmiştir. Daha sonra her iki maddeden de uygun miktarda tartım alınarak metanolde çözülmüştür. Çözeltiler vorteks karıştırıcıda 10 dk karıştırıldıktan sonra 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Bu şekilde her iki maddenin de 10^{-3} M düzeyinde ana stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltiler alüminyum folyoya sarılı halde -18°C 'de buzdolabında saklanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu stok çözeltiler üzerinden yapılmıştır.

Çalışmada seyreltme çözeltisi olarak kullanılan çalışma tamponunun 1/10 oranında su ile seyreltilmiş çözeltisi kullanılmıştır.

4.2. KE Yöntemi

4.2.1. Cihazla ilgili koşullar

Yöntemde deteksiyon DAD detektör ile 225 nm ve 230 nm'de gerçekleştirilmiştir. Ayrımında için 75 μm iç çapa sahip 40 cm efektif uzunlukta (48,5 cm toplam) çıplak silika kapiler kullanılmıştır. Kapilerin şartlanması için ilk kullanımında 30 dk 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile yıkanmıştır.

Cihazın her açılışında ise kapiler 10 dk 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkanmıştır. Örneklerin analizleri arasında şartlandırma sırasıyla 2 dk 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi, 2 dk distile su ve 2 dk çalışma tamponu ile yıkama olacak şekilde sağlanmıştır. Cihazın günlük kullanımı sonrasında kapiler sırasıyla 10 dk 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi ve 5 dk distile su ile yıkandıktan sonra 2 dk hava çekilerek bırakılmıştır.

Enjeksiyonlar 10 s süre ile 50 mbar basınç altında gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. Çalışma tamponu

Yöntemde pH 3,0-9,0 aralığında çeşitli tamponlar kullanılmıştır. pH 3,0, 6,0, 7,0 ve 8,0 çeşitli fosfat tamponları ile pH 4,0 ve 5,0 asetat tamponu ile ve pH 9,0 borat tamponu ile hazırlanmıştır. Fosfat tamponları hazırlanırken kullanılacak pH'ya göre disodyum hidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat ve fosforik asit uygun miktarlarda kullanılmıştır. Asetat tamponları için sodyum asetat ve asetik asitin uygun miktarları ile istenilen pH sağlanmıştır. Borat tamponları için ise sodyum tetraborat ve HCl kullanılmıştır. Bu tamponların her biri için 50 mM'lık ana stoklar hazırlandıktan sonra gerekli seyreltmeler su ile yapılarak istenilen derişim ve pH sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan anyonik sürfektanın hazırlanması için uygun miktarda SDS tartılarak suda çözümü ve bu şekilde 100 mM'lık ana stok hazırlanmıştır. Buradan gerekli seyreltmeler su ile yapılmıştır.

Tüm yıkama ve çalışma tamponu çözeltileri analiz öncesinde 0,45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra cihaza verilmiştir.

4.2.3. Optimizasyon çalışmaları

KE yönteminin optimizasyonu için çalışmatamponunun bileşimi ve derişimi, pH, organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel parametreleri incelenmiştir. Optimizasyon çalışmalarıında 10^{-6} M düzeyindeki TRM ve HCT çözeltileri ile analizler gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.1. Tampon bileşimi ve derişimi

Yöntemdeki çalışmatamponunun bileşimi ve derişimine karar vermek amacıyla öncelikle 10, 20 ve 30 mM SDS içeren 10 mM borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. TRM ve HCT çözeltileri 27,5 kV potansiyel altında 3'er kez analiz edilmiştir. Analiz sonunda elde edilen piklerin pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirilerek uygun derişimdeki SDS'ye karar verilmiştir. Tampon derişimini belirlemek için ise 20 mM SDS içeren 10 mM, 15 mM ve 20 mM derişimde 3 ayrı borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmış ve TRM ve HCT çözeltileri 27,5 kV potansiyel altında 3'er kez analiz edilmiştir. Analiz sonunda elde edilen piklerin pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirilerek uygun derişimdeki borat tamponuna karar verilmiştir.

4.2.3.2. pH

Çalışmatamponunun pH'nın belirlenmesi amacıyla pH'ı 8,50, 9,00 ve 9,50 olan 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu hazırlanmıştır. Bu 3 farklı tampon ile TRM ve HCT'nin 3'er defa 27,5 kV potansiyel altında analizi gerçekleştirilmiştir. Pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirilerek yeterli ayırımın sağlandığı uygun pH seçilmiştir.

4.2.3.3. Organik çözücü oranı

Çalışma tamponundaki organik çözücü oranının ayırma katkısını incelemek amacıyla sırasıyla %5, %10, %15 (h/h) oranında metanol içeren 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. TRM ve HCT çözeltilerinin 27,5 kV potansiyel altında 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Pik morfolojileri ve analiz süresi değerlendirilerek organik çözücü oranına karar verilmiştir.

4.2.3.4. Potansiyel

Uygulanacak potansiyelin belirlenmesi amacı ile TRM ve HCT çözeltilerinin 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu (pH 9,00) ile 22,5 kV, 25,0 kV ve 27,5 kV potansiyel altında 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda gözlenen analiz süreleri ve pik morfolojileri değerlendirilerek çalışma potansiyeline karar verilmiştir.

4.2.4. Validasyon çalışmaları

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla yöntemin doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık, sağlamlık ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Validasyon hesaplamaları için alan oranları (AO) ($AO = \frac{\text{Alan}_{\text{madde}}}{\text{Göç zamanı}_{\text{madde}}}$) kullanılmıştır.

4.2.4.1. Doğrusallık

Analit derişimleri ile elde edilen sinyaller arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığının incelenmesi için TRM ve HCT'nin yaklaşık 2×10^{-5} M- 2×10^{-8} M

aralığında 11 farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu derişimler TRM için $2,62 \times 10^{-8}$ M, $5,24 \times 10^{-8}$ M, $8,73 \times 10^{-8}$ M, $2,18 \times 10^{-7}$ M, $5,46 \times 10^{-7}$ M, $9,10 \times 10^{-7}$ M, $1,82 \times 10^{-6}$ M, $3,64 \times 10^{-6}$ M, $6,07 \times 10^{-6}$ M, $8,67 \times 10^{-6}$ M ve $1,24 \times 10^{-5}$ M ve HCT için $2,21 \times 10^{-8}$ M, $4,43 \times 10^{-8}$ M, $7,38 \times 10^{-8}$ M, $1,84 \times 10^{-7}$ M, $4,61 \times 10^{-7}$ M, $7,68 \times 10^{-7}$ M, $1,53 \times 10^{-6}$ M, $3,07 \times 10^{-6}$ M, $5,12 \times 10^{-6}$ M, $7,32 \times 10^{-6}$ M ve $1,05 \times 10^{-5}$ M şeklindedir. Bu 11 çözelti optimum koşullar altında analiz edilmiştir.

Yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra yöntemin kalibrasyonu için TRM ve HCT'nin son derişimleri sırasıyla $2,18 \times 10^{-7}$ M, $5,46 \times 10^{-7}$ M, $9,10 \times 10^{-7}$ M, $3,64 \times 10^{-6}$ M, $6,07 \times 10^{-6}$ M, $8,67 \times 10^{-6}$ M ve $1,84 \times 10^{-7}$ M, $4,61 \times 10^{-7}$ M, $7,68 \times 10^{-7}$ M, $3,07 \times 10^{-6}$ M, $5,12 \times 10^{-6}$ M, $7,32 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde 6 farklı çözelti hazırlanmıştır ve bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 3'er analizi gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.2. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin incelenmesi amacı ile hem HCT ve TRM standart çözeltileri hem de analitleri içeren farmasötik preparat çeşitli stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Tüm stres koşulları 3'er kez tekrarlanmış ve buna göre bozunma miktarları hesaplanmıştır.

4.2.4.2.1. Asidik stres

5×10^{-6} M son derişimine sahip HCT ve TRM çözeltileri sırasıyla oda sıcaklığında ve 60°C su banyosunda ayrı ayrı 60 dk süre ile 1 M HCl'ye maruz bırakılmıştır. HCT ve TRM içeren tablete de aynı koşullar altında asidik stres uygulanıp analiz edilmiştir.

4.2.4.2.2. Bazik stres

5×10^{-6} M son derişimine sahip HCT ve TRM çözeltileri sırasıyla oda sıcaklığında ve 60°C su banyosunda ayrı ayrı 60 dk süre ile 1 M NaOH'a maruz bırakılmıştır. HCT ve TRM içeren tablete de aynı koşullar altında bazik stres uygulanıp analiz edilmiştir.

4.2.4.2.3. Oksidatif stres

5×10^{-6} M son derişimine sahip HCT ve TRM çözeltileri sırasıyla oda sıcaklığında ve 60°C su banyosunda ayrı ayrı 60 dk süre ile %3 H_2O_2 'ye maruz bırakılmıştır. HCT ve TRM içeren tablete de aynı koşullar altında oksidatif stres uygulanıp analiz edilmiştir.

4.2.4.2.4. Termal stres

5×10^{-6} M son deriġimine sahip HCT ve TRM çözeltileri ayrı ayrı 60°C etüvde 60 dk bekletilip analiz edilmiġtir. HCT ve TRM içeren tablete de aynı koŷullar altında termal stres uygulanıp analiz edilmiġtir.

4.2.4.2.5. Fotolitik Stres

5×10^{-6} M son deriġimine sahip HCT ve TRM çözeltileri ayrı ayrı UV lamba altında 24 saat süre ile bekletilip analiz edilmiġtir. HCT ve TRM içeren tablete de aynı koŷullar altında fotolitik stres uygulanıp analiz edilmiġtir.

Çizelge 4.1. Uygulanan stres koŷulları

	ASÖĖĖ	BAZĖĖ	OKSÖĖATĖ	TERMAL	FOTOLĖĖĖ
HCT	1 M HCl, oda sıcaklığı 60 dk.; 1 M HCl, 60°C 60 dk.	1 M NaOH, oda sıcaklığı 60 dk.; 1 M NaOH, 60°C 60 dk.	%3 H_2O_2 , oda sıcaklığı 60 dk.; %3 H_2O_2 , 60°C 60 dk.	60°C etüv, 60 dk.	UV lamba, 24 saat
TRM	1 M HCl, oda sıcaklığı 60 dk.; 1 M HCl, 60°C 60 dk.	1 M NaOH, oda sıcaklığı 60 dk.; 1 M NaOH, 60°C 60 dk.	%3 H_2O_2 , oda sıcaklığı 60 dk.; %3 H_2O_2 , 60°C 60 dk.	60°C etüv, 60 dk.	UV lamba, 24 saat
TABLET	1 M HCl, 60°C 60 dk.	1 M NaOH, 60°C 60 dk.	%3 H_2O_2 , 60°C 60 dk.	60°C etüv, 60 dk.	UV lamba, 24 saat

4.2.4.3. Kesinlik

Yöntemin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için TRM ve HCT'nin son deriġimleri sırasıyla $1,82 \times 10^{-6}$ M ve $1,53 \times 10^{-6}$ M olacak Ėilde hazırlanan çözeltiler gün içi ve günler arası olmak üzere 6'Ėa kez analiz edilmiġtir.

4.2.4.4. Doğruluk

Yöntemin doğruluk çalıġması için son deriġimleri $5,12 \times 10^{-6}$ M, $1,54 \times 10^{-6}$ M ve $4,61 \times 10^{-7}$ M HCT ve $6,07 \times 10^{-6}$ M, $1,82 \times 10^{-6}$ M ve $5,46 \times 10^{-7}$ M TRM olacak Ėilde 3 set TRM ve HCT çözeltileri hazırlanmıġtır. Her setin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'Ėa kez analizi gerçekteġtirilmiġtir.

4.2.4.5. Duyarluluk

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi amacıyla sinyal/gürültü (S/N) oranları kullanılmıştır. Hesaplamalarda S/N oranı LOD değeri için 3,3; LOQ değeri için 10,0 olarak alınmıştır.

4.2.4.6. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için son derişimleri 2×10^{-6} M olan TRM ve HCT kullanılmıştır. Bu amaçla taze hazırlanmış çözelti ile $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiş ve alüminyum folyo ile sarılı halde -18°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltileri 3'er kez analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.2.4.7. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlık çalışması için TRM ve HCT içeren 2×10^{-6} M derişimdeki çözelti optimum koşullarda küçük değışiklikler yapılarak analiz edilmiştir. Değiştirilen koşullar tampon derişimi, anyonik sürfektan derişimi ve pH olarak belirlenmiş ve her koşulda 3'er deney yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar optimum koşullarla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4.3. Yöntemlerin Uygulanması

Yöntemin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla 50 mg TRM ve 25 mg HCT içeren Trianseril® tablet piyasadan temin edilmiştir. 10 tane tablet tartılıp ortalama tablet ağırlığı belirlenmiştir (242,02 mg). Tabletler toz edildikten sonra ortalama bir tablet ağırlığı kadar tartım alınmıştır. Daha sonra metanolde çözülüp vorteks karıştırıcıda 10 dk süre ile karıştırılmıştır. Ultrasonik banyoda 10 dk bekletilen tablet çözeltisi 10 dk 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından uygun miktarda alınarak kalibrasyon aralığına denk gelecek şekilde 1/10 oranında seyreltilmiş çalışma tamponu ile seyreltilmiştir. Çözelti analizden önce $0,45 \mu\text{m}$ 'lik filtre ile filtre edilmiştir. 6 kez tekrarlanan analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR VE YORUM

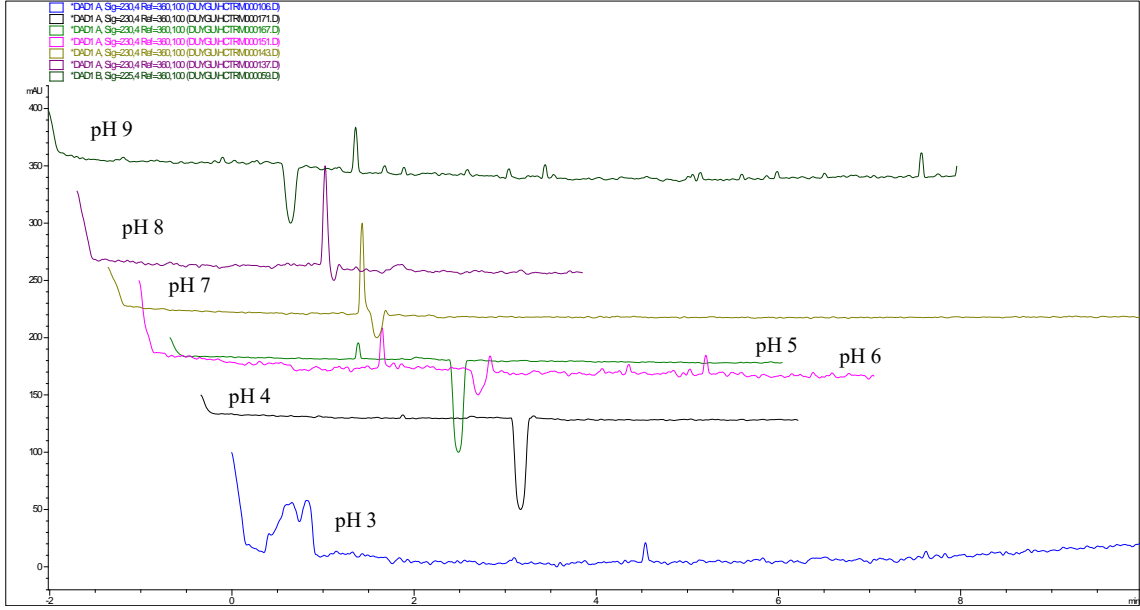
5.1. Yöntemin Optimizasyonu

KE yönteminde deteksiyon DAD detektör ile sağlanmıştır. Literatürde TRM ve HCT'nin miktar tayini için yapılmış çalışmalarda çok farklı dalga boylarının (214-325 nm) kullanıldığı görülmüştür. Bu nedenle DAD detektörde 210-325nm'lerde her iki madde için elde edilen pikler incelenmiş ve analizde HCT için 225 nm ve TRM için 230 nm'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

Ayrım için 75 µm iç çapa sahip 40 cm efektif ve 48,5 cm toplam uzunlukta kapiler kullanılmıştır. Kapiler sıcaklığı tüm çalışmada boyunca 20°C'ta sabit tutulmuştur. Örnekler 10 s süre ile 50 mbar basınç altında sisteme verilmiştir. Yöntemin optimizasyonu ve validasyonu sağlandıktan sonra geliştirilen yöntem HCT ve TRM içeren preparatlara uygulanmıştır.

TRM ve HCT'nin KE yöntemi ile miktar tayini için her iki analit için optimum analiz koşulları araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılacak çalışma tamponu bileşimini ve derişimini, çalışma tamponunun pH'ı, çalışma tamponundaki organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel parametreleri incelenerek ayırım için en uygun koşullar belirlenmiştir. Yöntemin optimizasyon çalışmaları sırasında TRM ve HCT'nin son derişimleri $2,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır.

Öncelikle HCT ve TRM'nin eş zamanlı analizini sağlamak amacı ile pH 3-9 aralığında farklı tamponlar kullanılmıştır. pH 3,0, 6,0, 7,0 ve 8,0 çeşitli fosfat tamponları ile pH 4,0 ve 5,0 asetat tamponu ile ve pH 9,0 borat tamponu ile hazırlanmıştır. Şekil 5.1'de HCT ve TRM karışımını içeren örneğin bu pH'larda elde edilen elektroferogramları sunulmuştur.

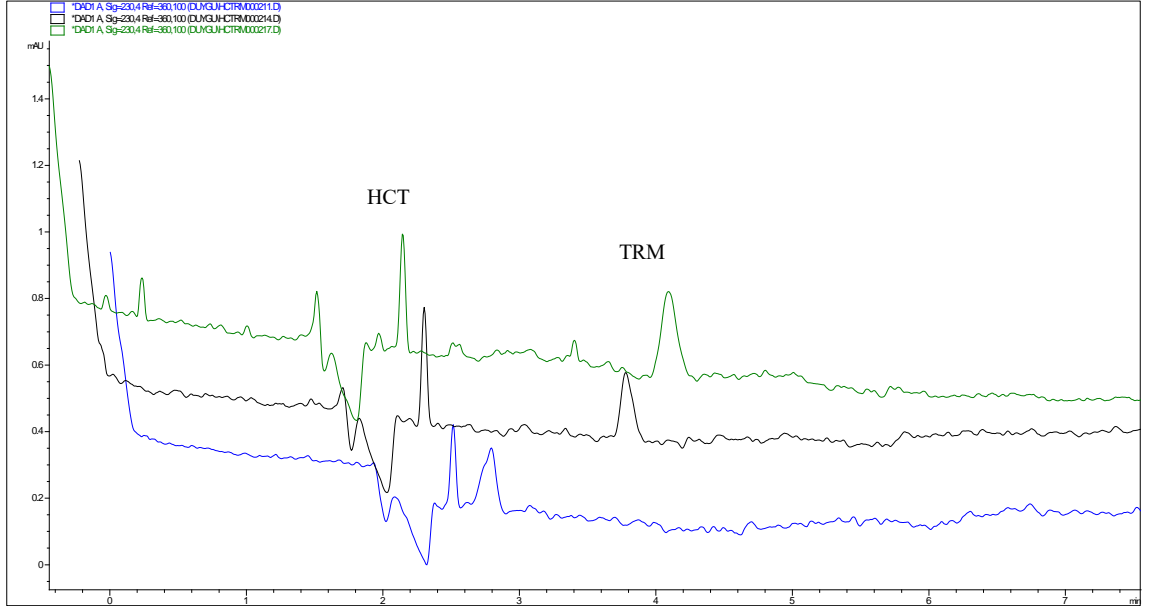


Şekil 5.1. Çalışma tamponu incelemesi

Şekil 5.1.'den de görüldüğü gibi asidik koşullarda TRM piki gözlenirken, nötr koşullarda her iki maddenin de pikleri gözlenememiştir. Bazı koşullarda ise yalnız HCT pikine rastlanmıştır. Bu durum karşısında çalışma tamponuna anyonik bir sürfektan (SDS) eklenmesi ile her iki maddenin de gözlenebileceği düşünülmüştür. Elektrozmozun da ayırma yapacağı katkıdan yararlanmak amacı ile bazı ortamlarda borat tamponuna SDS eklenmesi ile yapılan ön denemelerde ayırım sağlanmıştır ve çalışmaya temel dayandırılmıştır.

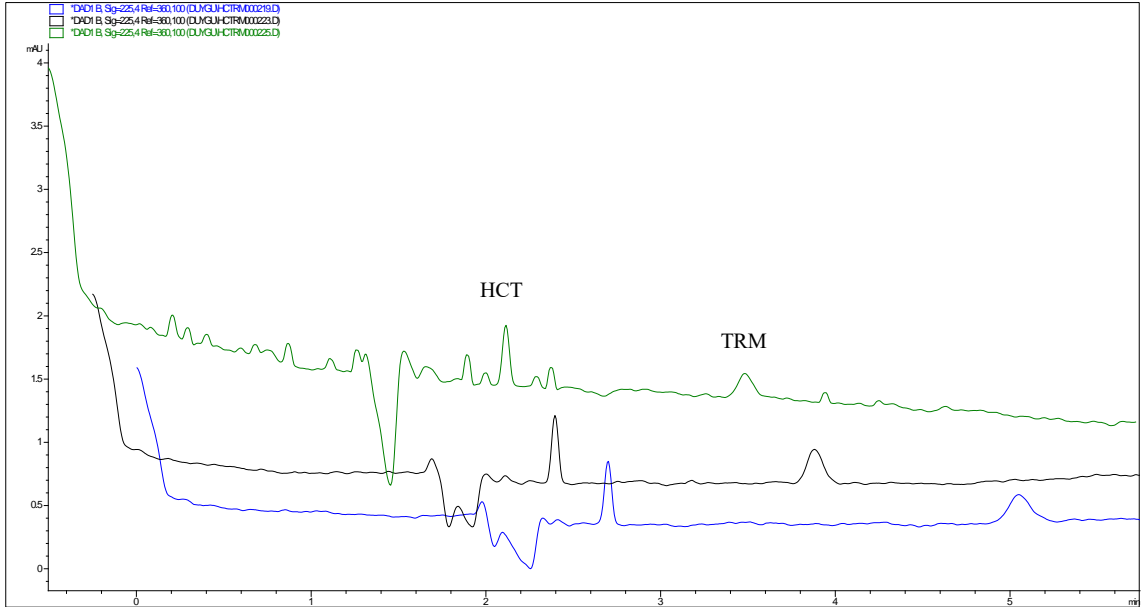
5.1.1. Tampon bileşimi ve derişimi

Tampon bileşimi ve derişimini belirlemek amacı ile öncelikle sırasıyla 10, 20 ve 30 mM SDS içeren 10 mM borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmıştır. 10^{-6} M düzeyindeki TRM ve HCT çözeltileri 27,5 kV potansiyel altında 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.2.'de bu analizlere ait elektroferogramlar görülmektedir.



Şekil 5.2. Çalışma tamponu bileşimi incelemesi

Tampon derişimini belirlemek için 20 mM SDS içeren 10 mM, 15 mM ve 20 mM derişimle 3 ayrı borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmış ve 10^{-6} M düzeyindeki TRM ve HCT çözeltileri 27,5 kV potansiyel altında 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.3.'te bu analizlere ait elektroferogramlar görülmektedir.

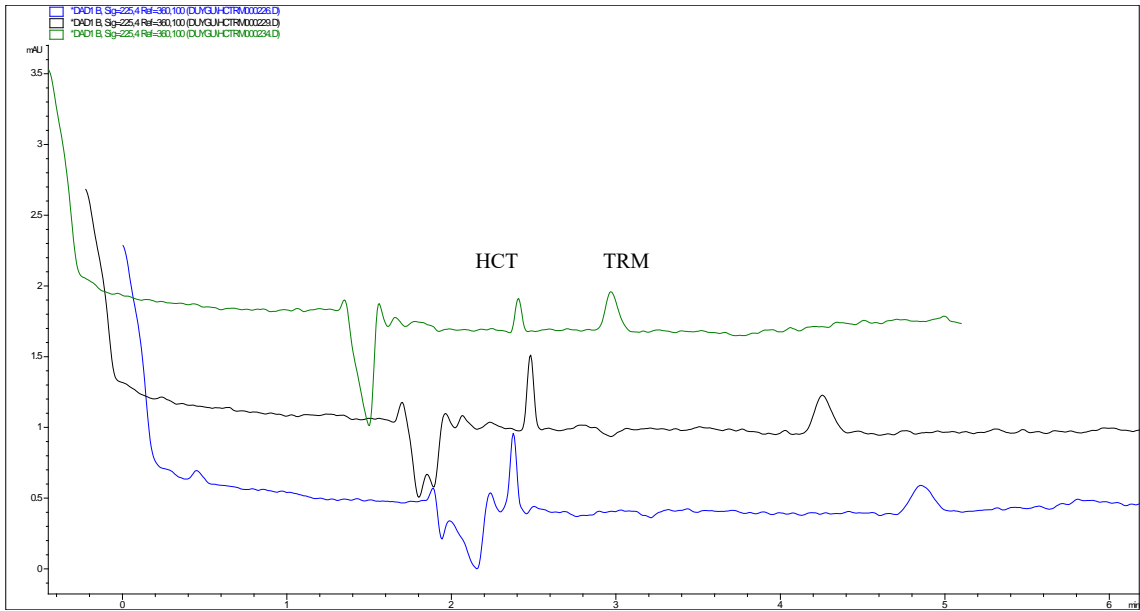


Şekil 5.3. Çalışma tamponu derişimi incelemesi

Tampon derişimindeki artışla birlikte analiz süreleri de artmıştır. Aynı zamanda üretilen akım da yükselmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda çalışmanın 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu ile yürütölmesine karar verilmiştir.

5.1.2. pH

Çalışma tamponu pH'nın, TRM ve HCT'nin elektroforetik davranışı üzerine etkisini incelemek amacı ile pH'ı 8,50, 9,00 ve 9,50 olan 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu hazırlanmıştır. Bu 3 farklı tampon ile TRM ve HCT'nin KE'de 3'er defa analizi gerçekleştirilmiştir. ğekil 5.4.'te bu analizlere ait elektroferogramlar verilmiştir.

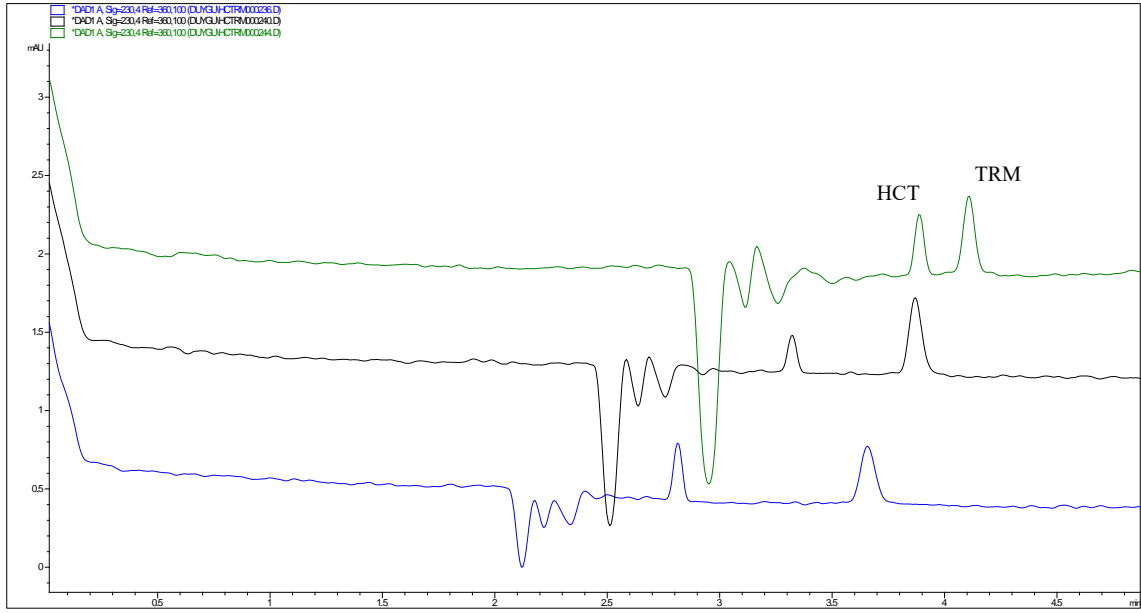


şekil 5.4. Çalışma tamponu pH incelemesi

pH'ı 9,50 olan alışmatamponu ile yapılan analizlerde akımın çok yükseldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca bu pH'da maddelerin ayrılması için yeterli ayırım gücü (Rs) değeri sağlanamamıştır. pH 8,50'de ise TRM'nin pik alanında küçülme olduğu ve HCT'nin elektroozmoza iyice yaklağtığı gözlenmiştir. Bu veriler ıĝında çalışma tamponunun pH'ı 9,00 olarak seçilmiştir.

5.1.3. Organik çözücü

Çalışma tamponunda organik çözücü bulunması ile ayrımın iyileştirilmesi amacı ile sırasıyla %5, %10, %15 (h/h) oranında metanol içeren 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmış ve 3'er analiz gerçekleştirilmiştir. Bu tampon ile 27,5 kV potansiyel altında analiz edilen TRM ve HCT'ye ait elektroferogramlar şekil 5.5.'te sunulmuştur.

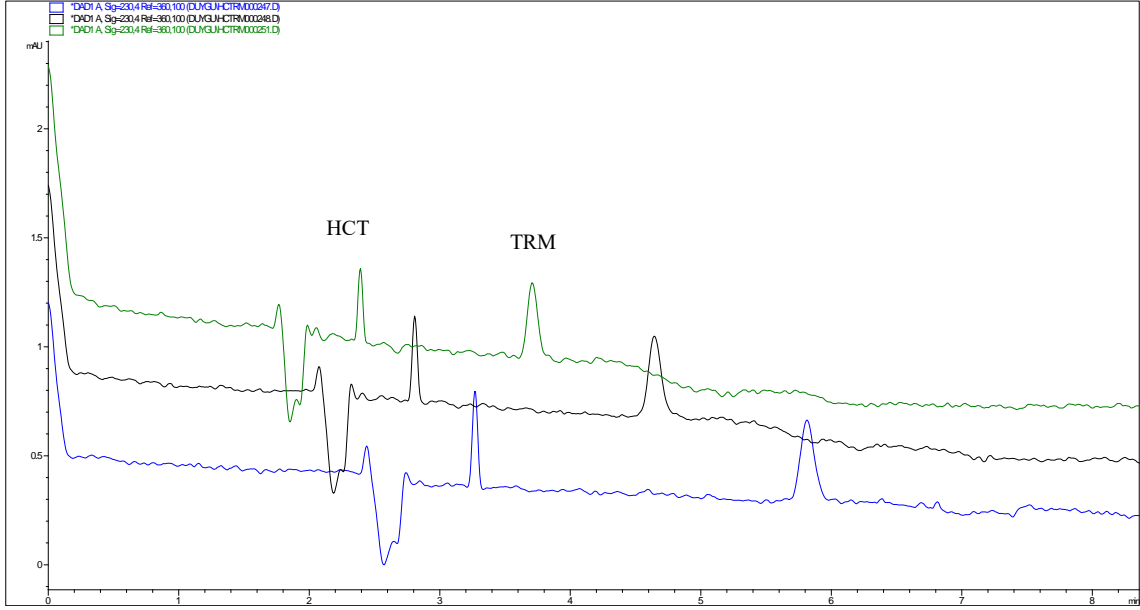


Şekil 5.5. Çalışma tamponundaki organik çözücü oranı incelemesi

Çalışma tamponunda bulunan organik çözücü miktarının artması ile pikler arasındaki R_s değeri düşmüştür. En düşük düzeyde organik çözücü bulunması ile de göç zamanlarında anlamlı fark yaratmadığı ve pik alanlarında küçülmeye sebep olduğu için; organik çözücü kullanmamaya karar verilmiştir.

5.1.4. Uygulanan potansiyel

Aletsel parametrelerden olan uygulanan potansiyelin optimizasyonu için TRM ve HCT'nin 22,5 kV, 25,0 kV ve 27,5 kV potansiyel altında 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu (pH 9,00) ile 3'er kez analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.6.'da bu analizlere ait elektroferogramlar verilmiştir.



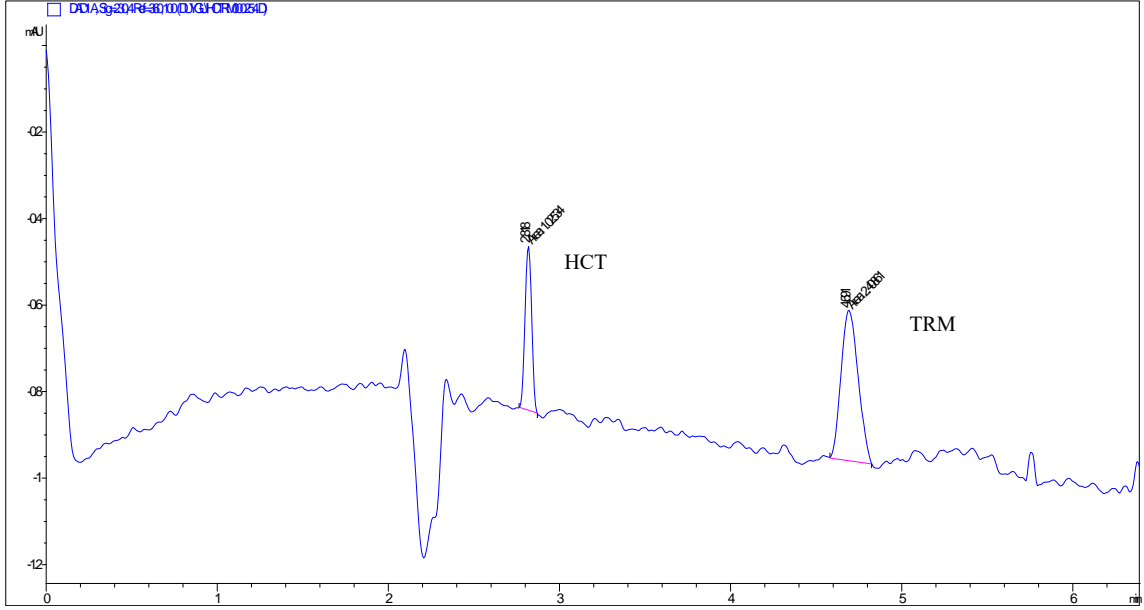
Şekil 5.6. Uygulanan potansiyelin incelemesi

KE’de mümkün olan en yüksek potansiyelin uygulanması ile en kısa sürede ayrımlar sağlanabilir. Yapılan analizlerde de potansiyelin artması ile birlikte analiz sürelerinin kısaldığı görülmüştür. Yüksek potansiyel uygulanması ile doğabilecek Joule ısınması sorunlarından kaçınmak amacı ile çalışmanın 25,0 kV potansiyelde yürütülmesine karar verilmiştir.

5.1.5. IS

İncelenen parametreler sonucunda TRM ve HCT’nin 20 mM SDS içeren 15 mM borat tamponu (pH 9,00) ve 25,0 kV potansiyel altında analiz edilmesi ile en uygun koşulların sağlandığı görülmüştür. Deneyin optimum koşulları belirlendikten sonra yöntemin güvenilirliğini arttırmak amacı ile bir IS araştırılmıştır. İncelenen maddeler (benidipin, granisetron, zofenopril, almotriptan, eletriptan, frovatriptan ve telmisartan) arasında göç zamanı ve pik morfolojisi makul bir madde gözlenmemiştir. Bu nedenle çalışmada IS kullanılmamasına karar verilmiştir.

Şekil 5.7.’de optimum koşullarda analiz edilen HCT ve TRM’ye ait elektroferogram sunulmuştur.



Şekil 5.7. Optimum koşullar altında HCT ve TRM'ye ait elektroferogram

Bu koşullar altında HCT ve TRM için göç zamanları sırası ile $2,75 \pm 0,007$ dk ve $4,61 \pm 0,022$ dk olarak belirlenmiştir. Maddelerin hesaplanan elektroforetik hareketlilikleri ise HCT için $-9,22 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sV}$ ve TRM için $-2,82 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{sV}$ 'dir.

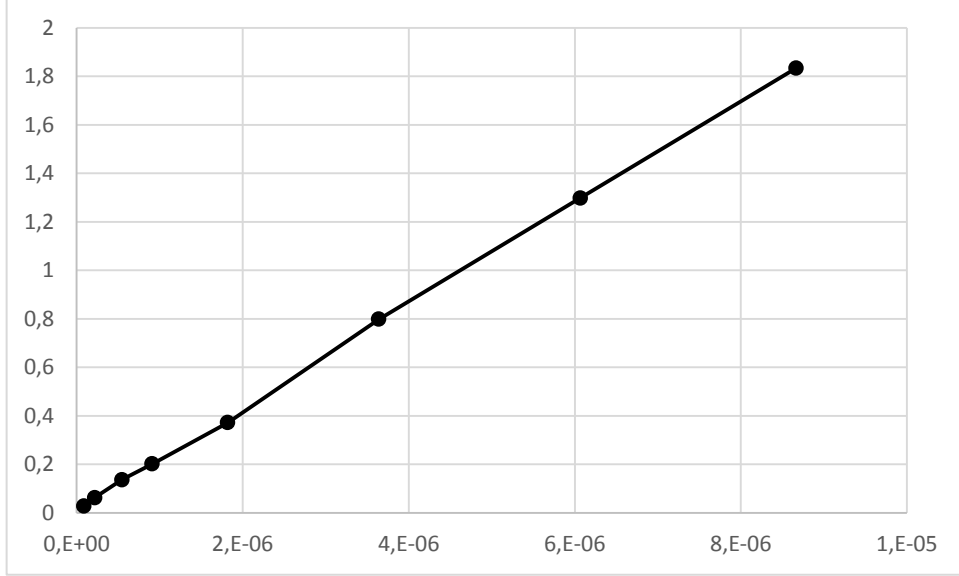
5.2. Validasyon

Optimum koşullar belirlendikten sonra geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla yöntemin doğrusalılık, seçicilik, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Hesaplamalarda AO değerleri kullanılmıştır. Ayrıca yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile tabaka sayısı (N), R_s ve asimetri faktörü (A_s) parametreleri hesaplanmıştır.

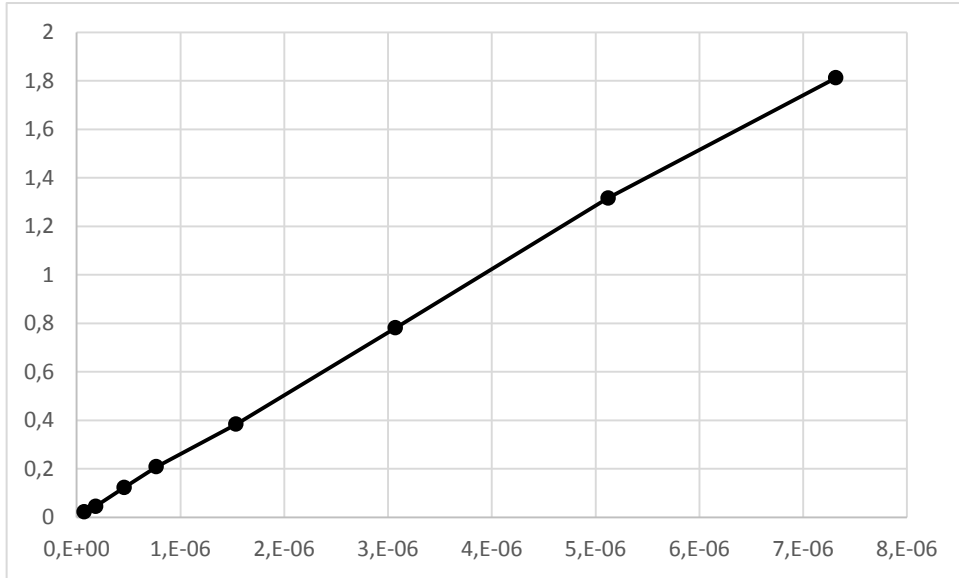
5.2.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığının incelenmesi amacıyla; $2,62 \times 10^{-8}$ - $1,24 \times 10^{-5}$ M aralığında 11 farklı TRM çözeltisi, $2,21 \times 10^{-8}$ - $1,05 \times 10^{-5}$ M aralığında 11 farklı HCT çözeltisi hazırlanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda TRM için yöntemin $8,73 \times 10^{-8}$ - $8,66 \times 10^{-6}$ M aralığında doğrusal olduğu belirlenmiş ve yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9997$) bir doğru ($y=211895x + 0,006$) elde edilmiştir. HCT için yöntemin $7,37 \times 10^{-8}$ - $7,32 \times 10^{-6}$ M aralığında doğrusal olduğu belirlenmiş ve

yüksek korelasyon katsayısına sahip ($r=0,9996$) bir doğru ($y=250334x + 0,004$) elde edilmiştir. Şekil 5.8. ve 5.9.’da elde edilen bu doğrular sunulmuştur.



Şekil 5.8. TRM'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi



Şekil 5.9. HCT'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi

Çalışılabilecek doğrusal aralık belirlendikten sonra TRM'nin $2,18 \times 10^{-7}$ - $8,66 \times 10^{-6}$ M aralığında ve HCT'nin $1,84 \times 10^{-7}$ - $7,32 \times 10^{-6}$ M aralığında 6 farklı derinlikte 3 set

çözeltileri hazırlanarak gün içi ve günler arası olmak üzere analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5.1. ve 5.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. TRM'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	201550	205140	203418	203369
b	-0,009	-0,008	0,011	-0,002
r	0,9994	0,9993	0,9996	0,9993

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelge 5.2. HCT'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri

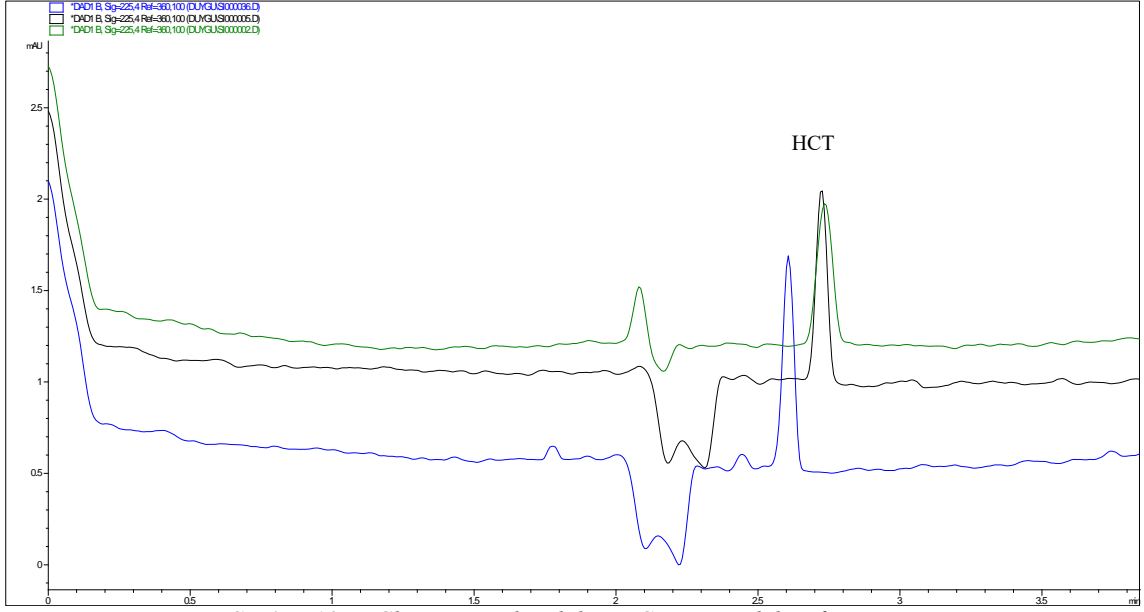
	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	246717	244885	247722	246441
b	-0,011	0,002	0,013	0,001
r	0,9997	0,9999	0,9996	0,9996

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

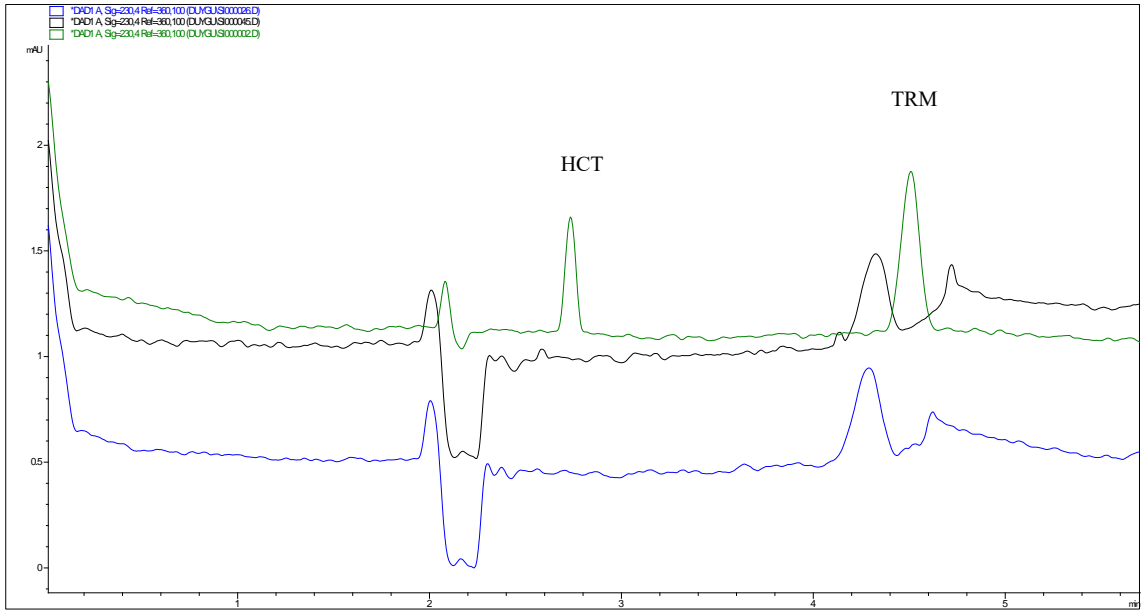
Çizelgelerden de görüldüğü gibi gün içi ve günler arası yapılan istatistiksel değerlendirmelerde hem sifıra oldukça yakın kesim noktaları hem de yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edilmiştir.

5.2.2. Seçicilik

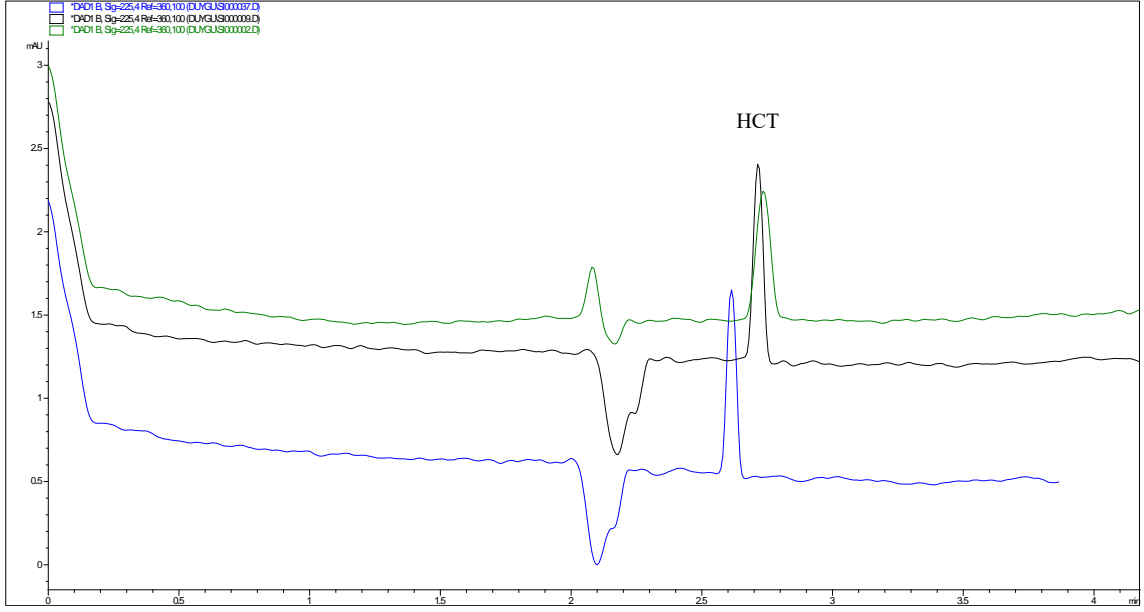
Yöntemin seçiciliğini göstermek amacıyla HCT ve TRM standartları ile kombine preparatları çeşitli stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Analizler 3'er kez tekrar edilmiştir. Elde edilen elektroferogramlarda stres koşulları sonucunda herhangi bir girişim yapan madde varlığı araştırılmıştır. Ayrıca sonuçlar HCT ve TRM miktarları açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Şekil 5.10.-17.'de HCT ve TRM standartlarının maruz bırakıldığı stres koşullarına ait elektroferogramlar sunulmuştur. Tüm grafiklerde en üstte standart HCT ve TRM çözeltilerine ait bir elektroferogram karşılaştırma amaçlı verilmiştir.



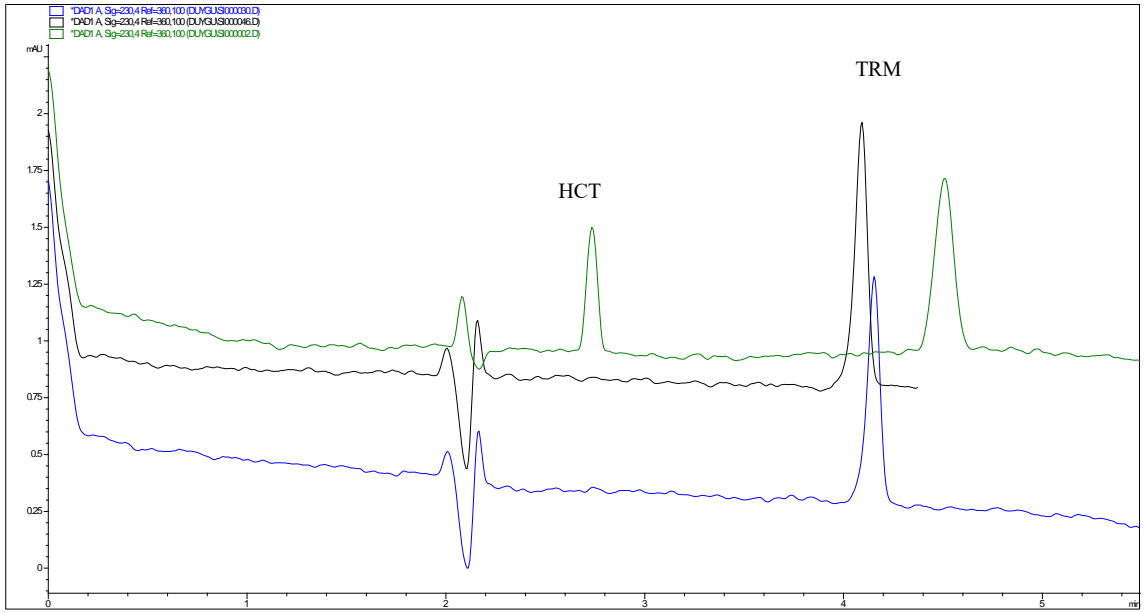
Şekil 5.10. HCl'ye maruz bırakılan HCT'ye ait elektroferogram



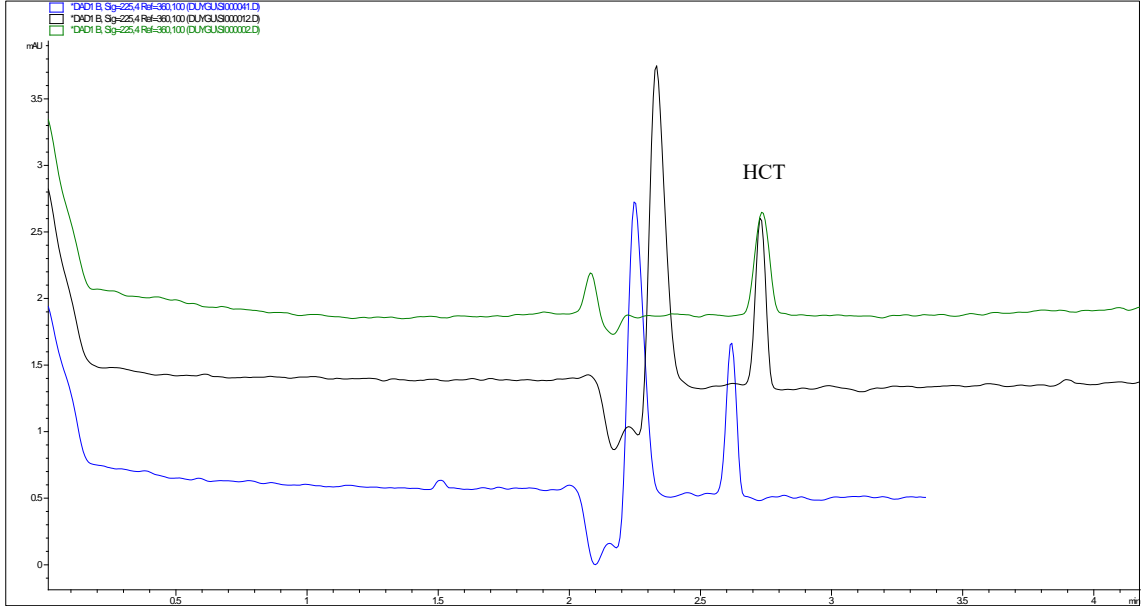
Şekil 5.11. HCl'ye maruz bırakılan TRM'ye ait elektroferogram



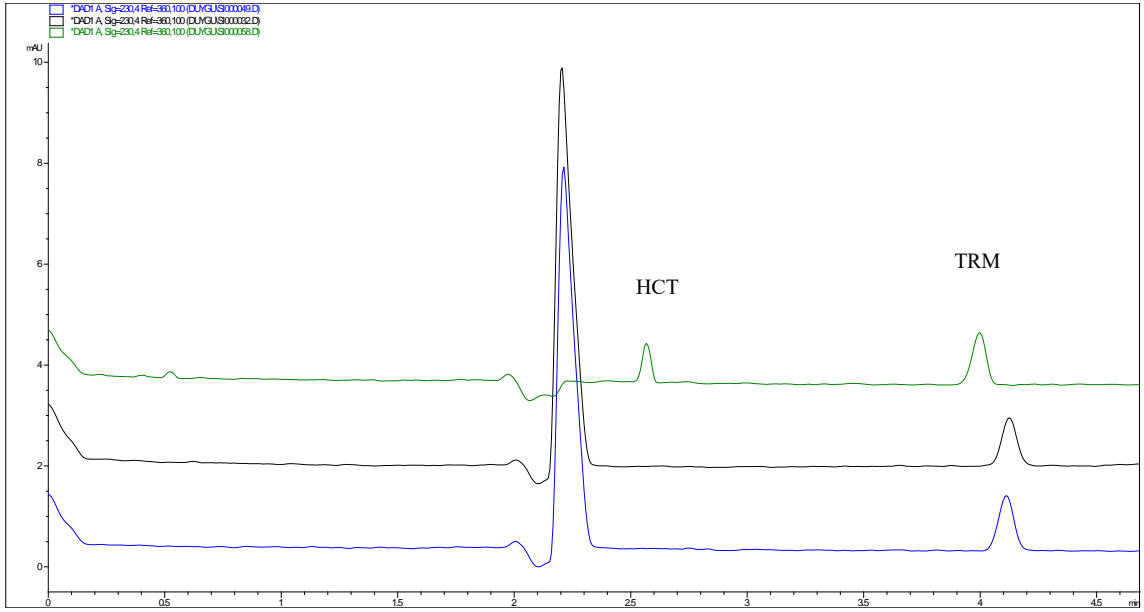
Şekil 5.12. NaOH'a maruz bırakılan HCT'ye ait elektroferogram



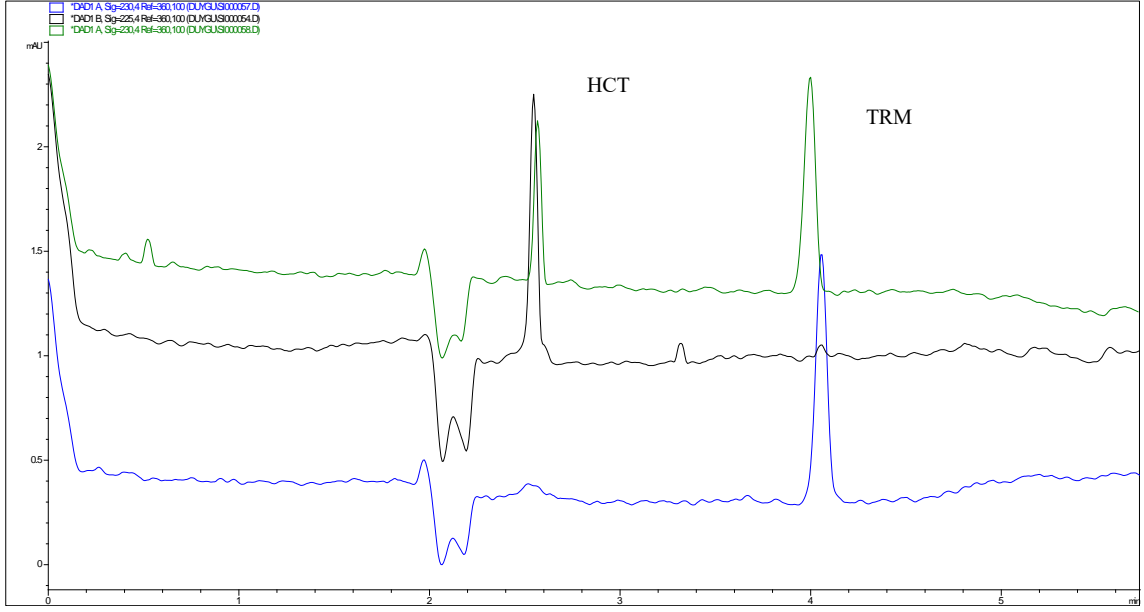
Şekil 5.13. NaOH'a maruz bırakılan TRM'ye ait elektroferogram



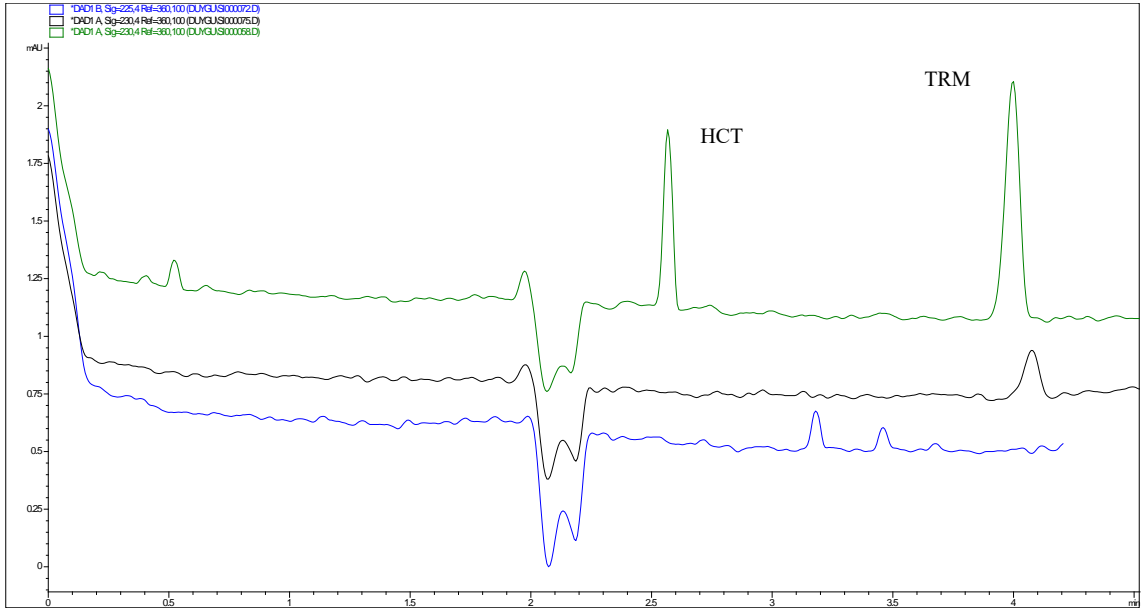
Şekil 5.14. H_2O_2 'ye maruz bırakılan HCT'ye ait elektroferogram



Şekil 5.15. H_2O_2 'ye maruz bırakılan TRM'ye ait elektroferogram



Şekil 5.16. Isıya maruz bırakılan HCT ve TRM'ye ait elektroferogram



Şekil 5.17. UV'ye maruz bırakılan HCT ve TRM'ye ait elektroferogram

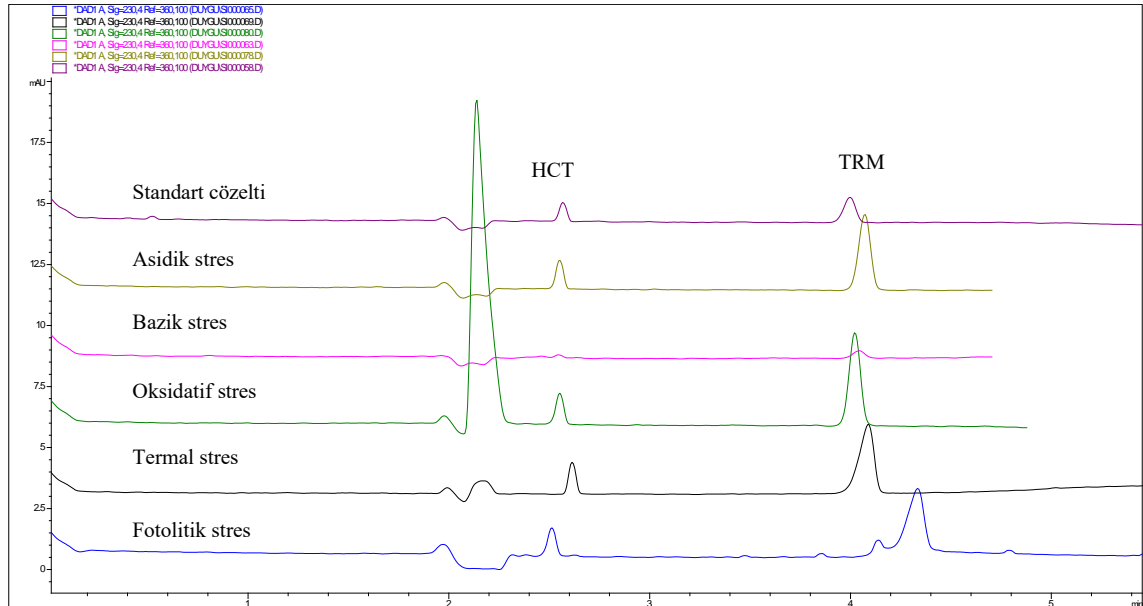
gekillerden de görüldüğü üzere çeşitli stres koşullarında incelenen HCT ve TRM'ye ait piklerin bu koşullardan etkilenmediği görülmüştür. Fakat bazı koşullarda maddelerin % miktarlarında optimum koşullara göre farklılıklar olduğu görülmüştür. Çizelge 5.3.'te maddelerin çeşitli stres koşulları altında bozunma oranlarına ait yapılan istatistiksel değerlendirmeler sunulmuştur. Değerlendirmelerde maddelerin en çok

fotolitik koşular altında bozunmaya uğradığı belirlenmiştir. Bozunma ürünlerinin belirlenebilmesi için MS gibi detektörlere ihtiyaç duyulduğundan alışmabu aamadan daha ileriye taınamamıştır.

Çizelge 5.3. Stres koşulları altında bulunan HCT ve TRM miktarları

Koşul	% HCT	% TRM
Asidik (Oda sıcaklığı)	95,88	64,03
Asidik (60°C)	118,24	77,52
Bazik (Oda sıcaklığı)	103,00	107,37
Bazik (60°C)	95,30	95,60
Oksidatif (Oda sıcaklığı)	117,11	94,06
Oksidatif (60°C)	107,05	81,42
Termal (60°C)	117,02	104,81
Fotolitik	12,26	16,02

Daha sonra standart çözeltilere benzer şekilde tablet içerisindeki HCT ve TRM'nin bozunma profilleri incelenmiştir. Şekil 5.18.'de tablete uygulanan stres koşularına ait elektroferogramların optimum koşularda elde edilen bir elektroferogramla karşılaştırılması sunulmuştur.



Şekil 5.18. Tablete uygulanan tüm stres koşullarına ait elektroferogramlar

Tabletlere uygulanan stres koşuları sonucunda yapılan istatistiksel değerlendirmeler izelge 5.4."te sunulmuştur. Tabletlerin analizleri sonucunda en çok bozunmanın termal stres altında olduğu gözlenmiştir. Fakat bozunma ürünlerinin yapısını tayin edebilecek özellikteki analitik yöntemler ya da detektörler kullanılmadığı için çalışma daha ileriye taşınmamıştır.

Çizelge 5.4. Stres koşulları altında bulunan tabletteki HCT ve TRM miktarları

Koşul	% HCT	% TRM
Asidik (60 C)	113,37	97,51
Bazik (60 C)	104,44	111,03
Oksidatif (60 C)	110,81	113,78
Termal (60 C)	27,61	13,42
Fotolitik	98,50	99,25

5.2.3. Kesinlik

Yöntemin kesinliğini göstermek amacı ile hazırlanan $1,82 \times 10^{-6}$ M ve $1,53 \times 10^{-6}$ M deriğine sahip TRM ve HCT zeltisi gün içi ve günler arası olacak kilde analiz edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler izelge 5.5. ve 5.6."da sunulmuştur.

Çizelge 5.5. TRM'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	0,391	0,389	0,378	0,386
ss	0,003	0,005	0,004	0,007
%BSS	0,809	1,357	1,261	1,861
GA (%95)	$\pm 0,015$	$\pm 0,026$	$\pm 0,023$	$\pm 0,053$

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Çizelge 5.6. HCT'nin KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	0,390	0,398	0,391	0,393
ss	0,005	0,006	0,005	0,006
%BSS	1,412	1,643	1,444	1,655
GA(%95)	±0,027	±0,032	±0,027	±0,048

Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Değerlendirmeler sonucunda tüm % BSS değerleri %2'nin altında bulunmuş ve geliştirilen yöntemin her iki maddenin analizi açısından da kesin olduğu gösterilmiştir.

5.2.4. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla $5,46 \times 10^{-7}$, $1,82 \times 10^{-6}$, $6,06 \times 10^{-6}$ M derişim düzeylerinde TRM çözeltisi ve $4,60 \times 10^{-7}$, $1,53 \times 10^{-6}$, $5,12 \times 10^{-6}$ M derişim düzeylerinde HCT çözeltisi gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şer kez analiz edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.7. ve 5.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.7. TRM'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri

	Eklenen (M)			
		$5,46 \times 10^{-7}$	$1,82 \times 10^{-6}$	$6,06 \times 10^{-6}$
I. gün (n=6)	Bulunan (Ort±ss)	$5,85 \times 10^{-7} \pm 1,06 \times 10^{-8}$	$1,87 \times 10^{-6} \pm 2,44 \times 10^{-8}$	$6,23 \times 10^{-6} \pm 6,23 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	107,23	102,78	102,84
	%BH	7,23	2,78	2,84
	%BSS	1,81	1,30	0,99
II. gün (n=6)	Bulunan (Ort±ss)	$5,82 \times 10^{-7} \pm 1,13 \times 10^{-8}$	$1,85 \times 10^{-6} \pm 3,26 \times 10^{-8}$	$6,26 \times 10^{-6} \pm 4,28 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	106,67	102,07	103,29
	%BH	6,67	2,07	3,29
	%BSS	1,95	1,75	0,68
III. gün (n=6)	Bulunan (Ort±ss)	$5,91 \times 10^{-7} \pm 3,59 \times 10^{-9}$	$1,84 \times 10^{-6} \pm 2,98 \times 10^{-8}$	$6,17 \times 10^{-6} \pm 6,83 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	108,29	101,41	101,79
	%BH	8,29	1,41	1,79
	%BSS	0,60	1,61	1,10

Çizelge 5.7 (Devam). TRM'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri

Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$5,46 \times 10^{-7}$	$1,82 \times 10^{-6}$	$6,06 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$5,86 \times 10^{-7} \pm 9,44 \times 10^{-9}$	$1,85 \times 10^{-6} \pm 2,93 \times 10^{-8}$	$6,22 \times 10^{-6} \pm 6,76 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	107,40	102,09	102,64
	%BH	7,40	2,09	2,64
	%BSS	1,61	1,57	1,08

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma

Çizelge 5.8. HCT'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,60 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,68 \times 10^{-7} \pm 4,81 \times 10^{-9}$	$1,61 \times 10^{-6} \pm 3,01 \times 10^{-8}$	$5,20 \times 10^{-6} \pm 6,19 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	101,44	105,02	101,60
	%BH	1,44	5,02	1,60
	%BSS	1,02	1,86	1,18
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,60 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,75 \times 10^{-7} \pm 7,82 \times 10^{-9}$	$1,62 \times 10^{-6} \pm 2,51 \times 10^{-8}$	$5,24 \times 10^{-6} \pm 4,17 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	103,06	105,33	102,44
	%BH	3,06	5,33	2,44
	%BSS	1,64	1,54	0,79
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$4,60 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,82 \times 10^{-7} \pm 7,48 \times 10^{-9}$	$1,58 \times 10^{-6} \pm 2,75 \times 10^{-8}$	$5,19 \times 10^{-6} \pm 6,49 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	104,59	102,94	101,38
	%BH	4,59	2,94	1,38
	%BSS	1,55	1,74	1,24
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$4,60 \times 10^{-7}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$5,12 \times 10^{-6}$
	Bulunan (Ort±ss)	$4,75 \times 10^{-7} \pm 8,86 \times 10^{-9}$	$1,60 \times 10^{-6} \pm 3,09 \times 10^{-8}$	$5,21 \times 10^{-6} \pm 5,87 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	103,03	104,43	101,81
	%BH	3,03	4,43	1,81
	%BSS	1,86	1,92	1,12

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, ss: Standart sapma, BH: Bağlı hata, BSS: Bağlı standart sapma

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda % geri kazanım değerleri her iki maddenin tüm derişim düzeyleri için %101,38 ile %108,29 aralığında bulunmuştur. Ayrıca elde edilen %BSS değerlerinin de %2'nin altında olduğu görülmüştür. Böylelikle geliştirilen yöntemin incelenen maddeler için iyi bir kesinlik ve doğruluğa sahip olduğu kanıtlanmıştır.

5.2.5. Duyarlılık

Çalışmanın duyarlılığının belirlenebilmesi için S/N oranları kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Yöntemin LOQ değerleri TRM ve HCT için sırasıyla $9,90 \times 10^{-8}$ M (25,05 ng/mL) ve $9,80 \times 10^{-8}$ M (29,13 ng/mL) olarak bulunmuştur. Yöntemdeki LOD değerleri ise TRM ve HCT için sırasıyla $3,26 \times 10^{-8}$ M (8,26 ng/mL) ve $3,23 \times 10^{-8}$ M (9,61 ng/mL) olarak hesaplanmıştır.

5.2.6. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için taze hazırlanan HCT ve TRM çözeltilerinin analiz sonuçları -18°C 'de karanlıkta 1 ay bekletilmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 24 saat bekletilmiş HCT ve TRM çözeltilerinin analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.9.'de verilmiştir.

Çizelge 5.9. HCT ve TRM'nin kararlılık verileri

		Taze çözelti	24 saat	1 ay
HCT	Ort (n=3)	0,504	0,495	0,493
	ss	0,34	0,88	1,22
	%BSS	0,33	0,87	1,22
	%Geri kazanım	102,08	100,23	99,91
TRM	Ort (n=3)	0,411	0,418	0,408
	ss	0,67	1,59	0,59
	%BSS	0,66	1,55	0,59
	%Geri kazanım	100,52	102,36	99,96

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

Hesaplanan %BSS ve % geri kazanım değerleri ile incelenen zaman aralığında HCT ve TRM çözeltilerinin kararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2.7. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığının gösterilebilmesi amacı ile optimum analiz koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarının nasıl etkilendiği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar optimum koşullarda elde edilen sonuçlara istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmeler Çizelge 5.10.'da sunulmuştur.

Çizelge 5.10. Yöntemin sağlamlık verileri

	Tampon Derişimi (mM)	Anyonik Sürfektan Derişimi (mM)	Tampon pH'ı	HCT		TRM	
				Ort±ss (n=3)	%BSS	Ort±ss (n=3)	%BSS
Optimum Koşullar	15	20	9,0	0,54±0,00	0,87	0,49±0,01	1,09
1. Koşul	14	20	9,0	0,56±0,01	1,55	0,48±0,00	0,45
2. Koşul	16	20	9,0	0,55±0,00	1,22	0,52±0,00	0,62
3. Koşul	15	19	9,0	0,56±0,00	0,77	0,44±0,01	1,71
4. Koşul	15	21	9,0	0,54±0,00	0,38	0,48±0,01	1,15
5. Koşul	15	20	8,9	0,56±0,00	0,29	0,50±0,00	0,90
6. Koşul	15	20	9,1	0,53±0,00	0,37	0,48±0,01	1,92

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, ss: Standart sapma, %BSS: %Bağıl standart sapma

Elde edilen %2'den küçük bulunan %BSS değerleri ile yöntemde yapılan küçük değışikliklerin yöntemi etkilemediğı ve önerilen yöntemin sağlam bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2.8. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile hesaplanan parametreler ve kabul sınırları Çizelge 5.11.'de verilmiştir.

Çizelge 5.11. TRM ve HCT'nin sistem uygunluk verileri

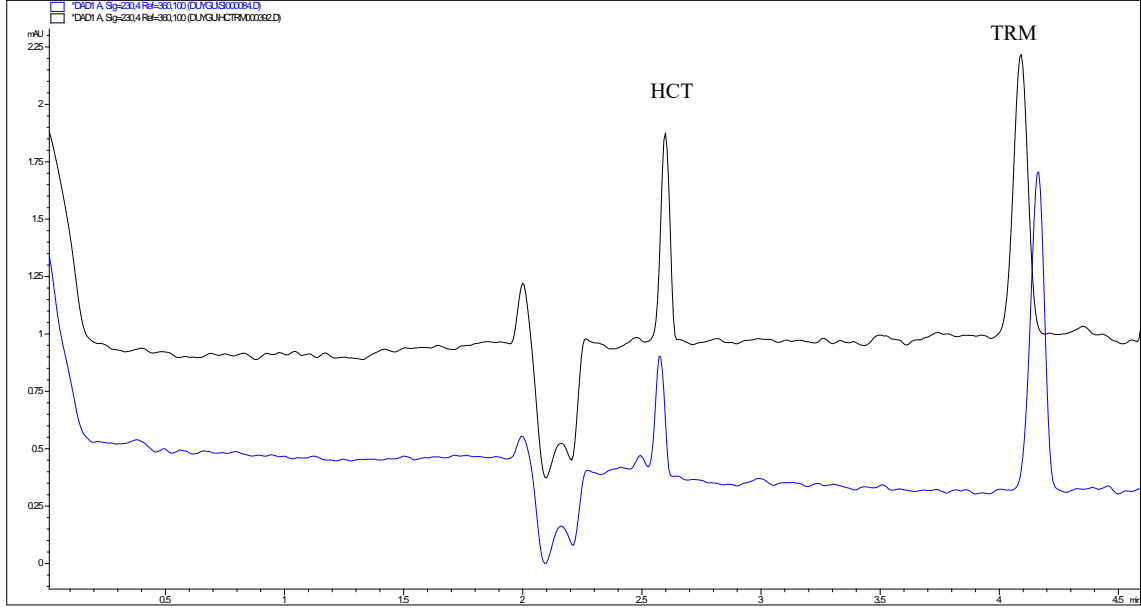
	N		Rs	As	
	TRM	HCT		TRM	HCT
Hesaplanan Değer	151329	112454	26	1,040	1,076
Kabul Sınırı		>2000	>1,5	0,95<As<1,2	

N: Tabaka sayısı, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü

Yapılan hesaplamalarla geliştirilen yöntemin her iki madde için de kabul kriterlerini yakaladığı ve sistem uygunluğunu sağladığı gösterilmiştir.

5.3. Yöntemin Uygulanması

HCT ve TRM'nin farmasötik preparatlarından miktar tayini için 50 mg TRM ve 25 mg HCT içeren Trianseril® tablet kullanılmıştır. Bu ticari tablettten kalibrasyon aralığına denk gelecek şekilde hazırlanan çözelti optimum koşullarda 6 kez analiz edilmiştir. Şekil 5.19.'da bu analizlerden birine ait elektroferogram verilmiştir.



Şekil 5.19. TRM ve HCT içeren tablet analizine ait elektroferogram

Yapılan tablet analizlerinde geliştirilen KE yöntemindeki standart maddelerin pik karakteristiklerini taşıyan elektroferogramlar elde edilmiştir. KE yöntemi ile TRM ve HCT'nin tabletlerden miktar tayinine yönelik istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.12.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.12. TRM ve HCT tabletlerinin miktar tayini verileri

TRM	Ort Bulunan (n=6)	50,16 mg
	ss	0,72
	%BSS	0,71
	%Geri Kazanım	100,52
HCT	Ort Bulunan (n=6)	25,29 mg
	ss	0,90
	%BSS	0,89
	%Geri Kazanım	101,14

Ort: Ortalama, n: Deneş sayısı, ss: Standart sapma, %BSS: %Bağıl standart sapma

Yapılan değerlendirmelerde her iki tabletin deriğimdüzeyleri için % geri kazanım değerlerinin yaklağık%100 düzeyinde olduğu bulunmuğur. Bu ğilde geliğtirilen KE yöntemin TRM ve HCT'nin tabletlerinden miktar tayini için kullanılabileceği gösterilmiğtir.

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Bu çalışmada TRM ve HCT'nin farmasötik preparatlarından miktar tayini için basit, hızlı ve duyarlı bir KE yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemin seçicilik parametresi çeşitli stres koşullarını içerecek şekilde validasyonu gösterilmiş ve tabletlerden tayine uygulanmıştır.

KE yönteminde deteksiyon HCT için 225 nm TRM için 230 nm'de DAD ile sağlanmıştır. Ayrım 40 cm efektif (48,5 cm toplam) uzunluğa ve 75 µm iç çapa sahip kapiler ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda TRM ve HCT 20 mM SDS içeren 15 mM borat (pH 9,00) ve 25 kV potansiyel altında analiz edilmiştir. Yöntemde IS kullanılmamıştır. Bu koşullar altında göç zamanları HCT ve TRM için sırasıyla 2,75±0,007 dk ve 4,61±0,022 dk olarak gözlenmiştir.

Yöntemin validasyonu Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) tarafından belirlenen kriterler doğrultusunda doğrusalılık, seçicilik, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, kararlılık ve sağlamlık parametreleri ile incelenmiştir. Daha sonra geliştirilen yöntem için sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır. Yöntemin seçiciliği için TRM ve HCT standart çözeltileri ayrı ayrı ve birlikte buldukları farmasötik dozaj formu olan tablet halinde; asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Yapılan analizler sonucunda bozunma ürünlerine rastlanmıştır. Fakat bunların yapı tayinleri bu tez kapsamında gerçekleştirilmemiştir. Bunun için MS gibi detektör ve/veya yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan validasyon çalışmalarında TRM ve HCT'nin incelenen uzun dönemde dahi kararlı oldukları bulunmuştur. Yöntemlerin TRM ve HCT için doğrusal oldukları aralıklar belirlendikten sonra kesinlik ve doğrulukları gösterilmiştir. Yöntemlerin seçiciliği açısından hem optimizasyon hem de validasyon aşamalarında DAD detektörün farklı dalga boyları ile çalışabilme özelliğinden yararlanılmış ve girişim yapan herhangi bir sinyale rastlanmamıştır.

Yöntemin LOQ değerleri TRM ve HCT için sırasıyla $9,90 \times 10^{-8}$ M (25,05 ng/mL) ve $9,80 \times 10^{-8}$ M (29,13 ng/mL) olarak bulunmuştur. Daha sonra geliştirilen yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile N, Rs, As gibi çeşitli parametreler hesaplanmış ve kabul edilen sınırlar içerisinde oldukları gösterilmiştir.

Geliştirilen ve valide edilen yöntemlerin uygulaması TRM ve HCT'nin piyasadaki farmasötik preparatlarında gösterilmiştir. Bu amaçla yerel eczaneden satın alınan ve 50 mg/25 mg TRM/HCT içerdiği bildirilen Trianseril® tablet kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemde hesaplanan % geri kazanım değerleri %100 düzeyinde bulunmuştur. Yöntemin uygulanması görece daha az karmaşık olan farmasötik preparatlarda yapıldığı için tabletlerin çözeltilerinin hazırlanması aşamasında santrifüj ve filtrasyondan başka bir aşamaya gerek duyulmamıştır.

Literatürde KE yöntemi ile TRM ve HCT'nin eşzamanlı analizini gerçekleştiren tek yöntem Luz Luis vd. (2002, s.223) tarafından yapılan çalışmadır. Çalışmada her ne kadar analiz süresinin 5 dk'dan kısa sürdüğü bildirilse de çalışmada sunulan elektroferogram incelendiğinde TRM pikinin simetrisinin önden kuyruklanmaya bağlı olarak son derece bozuk olduğu görülmüştür. Geliştirilen yöntemin validasyonu yalnız doğrusalılık, kesinlik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde hesaplanan LOD değerleri bu tez çalışmasında bulunan değerlerin yaklaşık 100 katı düzeyindedir. Dolayısı ile burada geliştirilen yöntem hem validasyon parametrelerinin ICH tarafından belirlenen kriterlere uygun olması hem de daha düşük duyarlılık düzeyi ile literatürdeki bu yönteme göre daha üstündür.

Literatürde TRM ve HCT'nin eşzamanlı analizleri için bu çalışmada bir spektrofotometrik (Kargosha ve Sarrafi, 2001, s.273), iki elektrokimyasal (Karimi, Gholivand ve Amiri, 2019; Hudari, Souza ve Zaroni, 2018, s.652) ve bir de kromatografik (Chen vd., 2016, s.451) çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan yalnız kromatografik yöntemde hesaplanan LOD değerleri burada önerilen yöntemden daha düşüktür. Fakat analiz süresi açısından yöntemler karşılaştırıldığında kromatografik yöntemde HCT için alıkonma zamanının yaklaşık 11 dk, TRM için ise 7 dk civarında olduğu görülmüştür. Dolayısı ile analiz süresi açısından burada geliştirilen yöntem çok daha hızlı bir yöntemdir.

HCT veya TRM'nin çeşitli detektörler kullanılarak KE yöntemi ile analiz edildiği çalışmaları incelendiğinde analiz süresi açısından HCT'nin yaklaşık 2,5 dk göç zamanına sahip olduğu bir çalışma (Sangoi vd., 2011, s.1859) ve TRM'nin 1,38 dk göç zamanına sahip olduğu bir çalışmanın (Horstkötter vd., 2002, s.107) burada önerilen analizden daha kısa sürdüğü görülmüştür. Burada önerilen yöntem bu iki çalışmadaki tüm KE yöntemlerinden (Gonzalez, Becerra ve Laserna, 1996, s.145; Hillaert

ve Van den Bossche, 2003, s.329; Siren vd., 2008, s.215; Wang vd., 2003, s.1507; Zheng vd., 2008, s.15; Alzoman vd., 2013, s.951) daha hızlıdır. Duyarlılıklar açısından ise yalnız flüoresans detektör kullanarak yapılan bir çalışmada(Gonzalez, Becerra ve Laserna, 1996, s.145) LOD değerinin 9×10^{-8} M olarak hesaplandığı bildirilmiş ve yöntemin bu yöntemden daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Literatür araştırması sonucunda TRM ve HCT için geliştirilen stabilite göstergeli bir KE yöntemi bulunmamaktadır. Bu açıdan burada önerilen yöntemin literatüre bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile geliştirilen yöntem basit, ucuz, duyarlı ve hızlı olması nedeni ile TRM ve HCT'nin hem tek bağlama hem de eşzamanlı tayinleri için önerilmektedir. Ayrıca burada önerilen yöntemlerin TRM ve HCT'nin çeşitli biyolojik sıvılardan tayini için de bir temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Ali, T.A., Mohamed, G.G., Aglan, A.A., Heakal, F.A. (2016). RP-HPLC Stability-indicating Method for Estimation of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44 (1), 1601-1608.
- Alzoman, N.Z., Sultan, M.A., Maher, H.M., Alshehri, M.M., Olah, I.V. (2013). Validated Stability-Indicating Capillary Electrophoresis Method for the Separation and Determination of a Fixed-Dose Combination of Carvedilol and Hydrochlorothiazide in Tablets. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 96 (5), 951-959.
- Baker, D.R. (1995). *Capillary electrophoresis*. New York: John Wiley&Sons Inc.
- Belal, F., Al Zaagi, I.A., Gadkariem, E.A., Abounassif, M.A. (2000). A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 335-342.
- Belal, T.S., Shaalan, R.A., El Yazbi, F.A., Elonsy, S.M. (2013). Validated Stability-Indicating HPLC–DAD Determination of the Antihypertensive Binary Mixture of Carvedilol and Hydrochlorothiazide in Tablet Dosage Forms. *Chromatographia*, 76, 1707-1720.
- Chen, X., Theng, W., Miao, L., Wu, Y., Chen, D., Huang, L., Pan, J., Wang, N., Fang, J., Liang, Y. (2016). Simultaneous Analysis of Hydrochlorothiazide, Triamterene and Reserpine in Rat Plasma by HPLC and DSPE. *Chromatographia*, 79, 451-456.
- Desai, P.R., Mehta, P.J., Chokshi, A.B. (2019). Stability Indicating RP- HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Quantification of 15 Organic Impurities of Olmesartan Medoxomil, Amlodipine and Hydrochlorothiazide in Combined Dosage Form. *Chromatographia*, 82, 819-833.
- Diego, M.D., Godoy, R., Mennickent, S., Vergara, C., Miranda, D., Navarro, P. (2018). Stability-Indicating Liquid Chromatographic Methods with Photodiode Array Detection and Light Scattering Detection for Simultaneous Determination of

- Candesartan and Hydrochlorothiazide. *Journal of Chromatographic Science*, 56 (2), 99-107.
- Diego, M.D., Mennickent, S., Godoy, G., Miranda, V. (2011). A Validated Stability-Indicating LC Method for Simultaneous Determination of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Samples. *Current Pharmaceutical Analysis*, 7, 248-252.
- Diego, M.D., Soto, J., Mennickent, S. (2014). Stability-Indicating LC Method for the Simultaneous Determination of Lisinopril and Hydrochlorothiazide. *Journal of Chromatographic Science*, 52, 1193-1197.
- Dubey, N., Jain, A., Raghuwanshi, A.K., Jain, D.K. (2012). Stability-Indicating HPTLC Method for Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate, Hydrochlorothiazide and Olmesartan Medoxomil in Combined Tablet Dosage Forms. *Journal of Planar Chromatography*, 25 (5), 475-480.
- Durga Rao, D., Satyanarayana, N.V., Sait, S.S., Reddy, R.Y., Mukkanti, K. (2009). Simultaneous Determination of Losartan Potassium, Atenolol and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations by Stability-Indicating UPLC. *Chromatographia*, 70, 647-651.
- El-Kimary, E.I. (2016). Stability-Indicating HPLC–DAD Method Development, Validation, and Stress Degradation Studies For Triamterene and Xipamide in Their Combined Tablet Dosage Form. *Acta Chromatographica*, 28 (1), 79-98.
- Elkarbane, M., Al- Kamarany, M.A., Bouchafra, H., Azougagh, M., Cherrah, Y., Hubert, P., Heyden, Y.V., Bouklouze, A. (2015). Total Error-Based Validation Including the Experimental Design-Based Robustness Evaluation of a Stability-Indicating Method for the Simultaneous Quantification of Hydrochlorothiazide and Valsartan in Tablet Formulations. *Acta Chromatographica*, 27 (2), 195-214.
- Fiori, J., Ballardini, R., Andrisano, V., Cavrini, V. (2003). Photostability studies on the furosemide/triamterene drug association. *Il Farmaco* 58, 867-873.
- Ganipisetty, V.N.R., Jalandhar, D., Gnanadev, G. (2016). A novel reversed phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of potential impurities of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in a fixed dosage form. *Separation Science and Technology*, 51 (8), 1362-1369.

- Gawande, V.T., Miniyar, P.B., Bhandari, D.D., Ghag, M.K., Rajput, D.B., Mahajan, A.A. (2014). Simultaneous Estimation of Quinapril Hydrochloride and Hydrochlorothiazide from Pharmaceutical Formulation by Using UV, IR and RP-HPLC. *Asian Journal of Chemistry*, 26 (13), 3799-3804.
- Gündüz, T. (2002). *İnstrümental analiz (6)*. Ankara: Gazi Kitabevi.
- Hari, K.M., Dattatraya, B.R., Pandurang, H.P. (2016). Development and validation of TLC densitometric method for the stability indicating study of metoprolol succinate and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3 (5), 429-434.
- Hudari, F.F., Souza, J.C., Zanoni, M.V.B. (2018). Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 179, 652-657.
- Gonzalez, E., Becerra, A., Laserna, J.J. (1996). Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone electrophoresis using fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 68, 145-150.
- Hegazy, M.A., Metwaly, F.H., Abdelkawy, M., Abdelwahab, N.S. (2011). Validated Chromatographic Methods for Determination of Hydrochlorothiazide and Spironolactone in Pharmaceutical Formulation in Presence of Impurities and Degradants. *Journal of Chromatographic Science*, 49, 129-135.
- Hertzog, D.L., McCafferty, J.F., Fang, X., Tyrrell, R.J., Reed, R.A. (2002). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation Products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 747-760.
- Hillaert, S., Bossche, W. (2003). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 329-339.
- Horstkotter, C., Kober, S., Spahn-Langguth, H., Mutschler, E., Blaschke, G. (2002). Determination of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in human urine by capillary electrophoresis using ultraviolet absorbance and

- laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 769, 107-117.
- Ilango, K., Kumar, P.S.S. (2013). Application of a Stability-Indicating HPTLC Method for Simultaneous Quantitative Determination of Olmesartan Medoxomil and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 363741-8.
- ICH Steering Committee (2005) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1)*. Harmonized Tripartite Guideline.
- Jain, P.S., Patel, M.K., Gorle, A.P., Chaudhari, A.J., Surana, S.J. (2012). Stability-Indicating Method for Simultaneous Estimation of Olmesartan Medoxomile, Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide by RP-HPLC in Tablet Dosage Form. *Journal of Chromatographic Science*, 50,680-687.
- Joshi, S.J., Karbhari, P.A., Bhoir, S.I., Bindu, K.S., Das, C. (2010).RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52, 362-371.
- Kalyani, K., Anuradha, V., Vidyadhara, S., Sasidhar, R., Kumar, T.G. (2016). A Stability Indicating RP-HPLC for the Simultaneous Estimation of Hydrochlorothiazide, Amlodipine Besylate and Telemisartan in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Oriental Journal of Chemistry*, 32 (3), 1631-1637.
- Kayaalp, S.O., (2009). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji (12)*.Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- Karimi, R., Gholivand, M.B., Amiri, M. (2019). Monitoring of triamterene and hydrochlorothiazide at carbonic materials modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 847, 113176.
- Kargosha, K., Sarrafi, A.H.M. (2001). Spectrophotometric simultaneous determination of triamterene and hydrochlorothiazide in Triamterene-H tablets by multivariate calibration methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 273-279.
- Karvelis, D., Kalogria, E., Panderi, I. (2014).A Stability-Indicating HPLC Method for the Quantification of Aliskiren and Hydrochlorothiazide in a Pharmaceutical

- Formulation. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 97 (6), 1519-1525.
- Khan, H.N., Puja, K., Javeria, S., Zameeruddin, M.D., Mangulkar, A.G., Bharkad, V.B. (2017). Stability Indicating Dissolution Method Development for Estimation of Methyldopa and Hydrochlorothiazide in Combine Dosage Form. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4 (09), 3024-3032.
- Kurbanoglu, S., Miguel, P.R.S., Uslu, B., Ozkan, S.A. (2014). Stability- Indicating UPLC Method for the Determination of Bisoprolol Fumarate and Hydrochlorothiazide: Application to Dosage Forms and Biological Sample. *Chromatographia*, 77, 365-371.
- Luis, M.L., Corujedo, S., Blanco D., Fraga, J.M.G., Jimenez, A.I., Jimenez, F., Arias, J.J. (2002). Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of diuretics in pharmaceutical formulations. *Talanta*, 5, 223-231.
- Lusina, M., Cindric, T., Tomaic, J., Peko, M., Pozaic, L., Musulin, N. (2005). Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 291, 127-137.
- Mahajan, A.A., Thaker, A.K., Mohanraj, K. (2012). LC, LC-MS/MS Studies for the Identification and Characterization of Degradation Products of Hydrochlorothiazide and Establishment of Mechanistic Approach towards Degradation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23 (3), 445-452.
- Patil, K.R., Shinde, D.B. (2011). Stability-indicating LC method for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in dosage form. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57 (1), 1017-1021.
- Phechkrajang, C.M., Quynh, P.T.N., Suntonsurk, L. (2017). Forced degradation studies of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide using a validated stability-indicating HPLC-UV method. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 51 (5), 416-424.
- Rane, V.P., Patil, K.R., Sangshetti, J.N., Yeole, R.D., Shinde D.B. (2010). Stability Indicating LC Method for Simultaneous Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Chromatographic Science*, 48, 595-600.

- Rao, B.V., Vidyadhara, S., Sasidhar, R. (2016). A Novel Stability Indicating RP-HPLC Method Development and Validation for The Simultaneous Estimation of Losartan Potassium, Ramipril and Hydrochlorothiazide in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 11 (5), 255-265.
- Reddy, R.S., Krishna, R.M., Vekaria, N.A., Rao, S.V., Mantena, B.P.V. (2015). Method Development and Validation for the Determination of Potential Impurities Present in Olmesartan Medoxomil and Hydrochlorothiazide in Fixed Dose Combination Drug Product by Using Reverse Phase – Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode-Array Detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, 1343-1354.
- Riekkola, M.L., Jumppanen, J.H. (1996). Capillary electrophoresis of diuretics. *Journal of Chromatography A*, 735, 151-164.
- Rx-MediaPharma® İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı (2019).
- Salem, M.Y., Hassan, N.Y., Fayez, N.M., Sabour, S.A., Ali, E.S. (2019). Stability-indicating methods for determination of hydrochlorothiazide in combination with some antihypertensive drugs in the presence of its main impurities. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16, 1217-1224.
- Sangoi, M.S., Sangoi, M.W., Oliveria, P.R., Rolim, C.M.B., Steppe M. (2011). Simultaneous determination of aliskiren and hydrochlorothiazide from their pharmaceutical preparations using a validated stability-indicating MEKC method. *Journal of Separation Science*, 34, 1859-1866.
- Satheesh, B., Pulluru, S.K., Nitin, K., Saravanan, D. (2011). Simultaneous determination of eprosartan, hydrochlorothiazide, and their related compounds in pharmaceutical dosage forms by UPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34, 1885-1900,
- Shalan, R.A., Belal, T.S., Elyazbi, F.A., Elonsy, S.M. (2013). Validated stability-indicating HPLC-DAD method of analysis for the antihypertensive triple mixture of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their tablets. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1381-1394
- Shakya, A.K. (2016). Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for Determination of Valsartan and

- Hydrochlorothiazide Using Quality by Design. *Oriental Journal of Chemistry*, 32 (2), 777-788.
- Siren, H., Shimmo, R., Sipola, P., Abenet, S., Riekkola, M.J. (2008). Capillary electrophoresis of diuretics and probenecid in methanol. *Journal of Chromatography A*, 1198-1199, 215-219.
- Slijivic, J., Protic, A., Otasevic, B., Golubovic, J., Zecevic, M., Krmar, J. (2017). Multicriteria Optimization Methodology in Stability-Indicating Method Development of Cilazapril and Hydrochlorothiazide. *Journal of Chromatographic Science*, 55 (6), 625-637.
- Skoog, D.A., West, D.M. ve Holler, F.J. (1999). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. (Çev: E. Kılıç ve F. Köseoğlu) Ankara: Bilim Yayınları.
- Srinivasu, T., Annapurna M.M. (2018). Development of a New Validated Stability Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 12 (1), 333-339.
- Tagliari, M.P., Stulzer, H.K., Murakami, F.S., Kuminek, G., Valente, B., Oliveria, P.R., Silva, M.A.S. (2008). Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method to Quantify Hydrochlorothiazide in Oral Suspension for Pediatric Use. *Chromatographia*, 67, 647-652.
- U.S. Pharmacopeia National Formulation 39 (2016). *The National Formulary 34* (2.baskı). Rockville: United States Pharmacopieial Convention.
- Vojta, J., Jedlicka, A., Coufal, P., Janeckova, L. (2015). A new, rapid, stability-indicating UPLC method for separation and determination of impurities in amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their combined tablet dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 109, 36-44.
- Wang, Q., Ding, F., Li, H., He, P., Fang, Y. (2003). Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1507-1514.
- Xu, Q. (2019). Advancing USP compendial methods for fixed dose combinations: A case study of metoprolol tartrate and hydrochlorothiazide tablets. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9, 77-82.

Zheng, X., Lu, M., Zhang, L., Chi, Y., Zheng, L., Chen, G. (2008). An online field-amplification sample stacking method for the determination of diuretics in urine by capillary electrophoresis-amperometric detection. *Talanta*, 76,15-20.

http-1:<http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/259.pdf> (Erişimtarihi: 06.06.2019)

http-2:http://yunus.hacettepe.edu.tr/~enemutlu/belgeler/CE_ (Erişimtarihi: 05.06.2019)

http-3:<http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/259.pdf> (Erişimtarihi: 06.06.2019)

http-4: <https://slideplayer.biz.tr/slide/12645634/> (Erişim tarihi: 05.06.2019)

http-5: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00384> (Erişim tarihi:09.09.2019)

http-6:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrochlorothiazide> (Erişim tarihi: 05.06.2019)