

**ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE  
İRBESARTAN VE HİDROKLOROTİAZİD'İN  
FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ TAYİNİ**

**Sema KOYUTÜRK**

Yüksek Lisans Tezi

**ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE  
İRBESARTAN VE  
HİDROKLOROTİAZİD'İN FARMASÖTİK  
PREPARATLARDAKİ TAYİNİ**

**Sema KOYUTÜRK**

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Ocak 2013

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarımın yürütülmesi sırasında engin bilgileriyle beni yönlendiren, anlayışı ve hoşgörüsüyle her zaman bana katkıda bulunan Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR'a,

Çalışmalarım boyunca akademik yeteneklerinin yanında, ihtiyacım olan her an yakın ilgi ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Göksel ARLI'ya,

Araştırmalarım süresince, bilgi birikimi ve tecrübelerini her zaman paylaşan, büyük bir sabırla yardım ve destekleriyle bana katkıda bulunan Sayın Hocam Doç. Dr. Öncü Nafiz CAN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her alanda olduğu gibi, yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında da yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

# ÇEŞİTLİ ANALİTİK YÖNTEMLERLE İRBESARTAN VE HİDROKLOROTİAZİD'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ TAYİNİ

## ÖZET

İrbesartan, bir angiotensin-II reseptör antagonisti ve hidroklorotiazid tiazid sınıfından bir diüretiktir. İrbesartan ve hidroklorotiazid kombinasyonlarının hipertansiyon tedavisi için kullanımı oldukça yaygındır. Bu çalışmanın amacı, irbesartan ve hidroklorotiazidin eş zamanlı analizi için yeni, basit ve duyarlı bir yöntem geliştirmek ve yöntemin farmasötik tablet ve idrar örneklerine uygulanmasını göstermektir. İrbesartan, hidroklorotiazid ve agomelatin (iç standart), foto diyot dizisi dedeksiyonlu yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizlenmiştir. Analizlerde monolitik yapılı ters faz bir analiz kolonu (Chromolith® HR, RP-18e) ile birlikte değişken hareketli faz ve akış hızı programları kullanılmıştır. Analitler 230 nm dalga boyunda toplam 27.5 dakikada analiz edilmiştir. İdrar numuneleri, hiçbir ön hazırlık basamakları uygulanmaksızın, sadece süzme ve seyreltme ile sisteme verilmiştir. Geliştirilen yöntem başarılı bir şekilde farmasötik tablet ve idrar örneklerine uygulanmıştır. Sonuç olarak, irbesartan ve hidroklorotiazidin rutin kalite kontrol analizlerine uygulanabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İrbesartan, hidroklorotiazid, YPSK, farmasötik uygulama, idrar analizi

# DETERMINATION of IRBESARTAN and HYDROCHLOROTHIAZIDE in PHARMACEUTICAL PREPARATIONS with VARIOUS ANALYTICAL METHODS

## ABSTRACT

Irbesartan is an angiotensin-II receptor antagonist and hydrochlorothiazide is a thiazide-class diuretic. Use of irbesartan and hydrochlorothiazide combinations is quite common in the treatment of hypertension. The aim of this study is to develop a new, simple and sensitive method for the simultaneous analysis of irbesartan and hydrochlorothiazide, and to demonstrate the application of the method on pharmaceutical tablet and urine samples. Irbesartan, hydrochlorothiazide and agomelatine (internal standart) were analyzed using high performance liquid chromatography with diode array detection. A reversed-phase analysis column (Chromolith® HR, RP-18e) with mobile phase and flow rate gradient programs were utilized in the analyses. The analytes were detected at 230 nm wavelength within 27.5 minutes. Urine samples were introduced in to the system with only filtration and dilution, without any pre-treatment steps. The developed method was successfully applied to pharmaceutical tablets and urine samples. As a result, its applicability on the routine analyses of irbesartan and hydrochlorothiazide has been demonstrated.

**Key words:** Irbesartan, hydrochlorothiazide, HPLC, pharmaceutical application, urine analysis

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	i
<b>TEŞEKKÜR</b>	ii
<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	v
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	x
<b>SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xiii
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>KAYNAK BİLGİSİ</b>	3
<b>İrbesartan'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri</b>	4
<b>Hidroklorotiazid'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri</b>	5
<b>İrbesartan ve Hidroklorotiazid Analizleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar</b>	6
<b>GEREÇLER</b>	12
<b>Kullanılan Kimyasallar</b>	12
<b>Kullanılan Cihazlar</b>	12
<b>YÖNTEMLER</b>	13
<b>UV-Görünür Alan Spektrofotometrisi Yöntemi</b>	13
<i>Standart çözeltilerin hazırlanışı</i>	13
<i>Analiz parametreleri</i>	13
<b>YPSK Yöntemi</b>	13
<i>Standart çözeltilerin hazırlanışı</i>	13
<i>Hareketli fazın hazırlanışı</i>	14

<i>Analiz parametreleri</i>	14
<b>Örnek Çözeltilerin Hazırlanışı</b>	15
<i>Tablet çözeltisinin hazırlanışı</i>	15
<i>İdrar numunesinin hazırlanışı</i>	15
<b>Sonuçların Değerlendirilmesi</b>	15
<b>Yöntem Geçerliliğinin Tespiti (Validasyon)</b>	15
<i>Sistem uygunluk testleri</i>	16
<i>Doğrusallık</i>	16
<i>Doğruluk</i>	16
<i>Kesinlik</i>	16
<i>Saptama sınırı ve tayin alt sınırı</i>	16
<i>Spesifiklik</i>	18
<b>BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	19
<b>İrbesartan ve Hidroklorotiazid'in UV Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi</b>	19
<b>İrbesartan ve Hidroklorotiazid'in YPSK Yöntemi ile Analizi</b>	24
<i>Yöntem geliştirme</i>	24
<i>YPSK yönteminin validasyonu</i>	49
<b>Geliştirilen Yöntemlerin Numunelere Uygulanması</b>	55
<i>UV-spektrofotometrik yöntemin tabletlere uygulanması</i>	55
<i>YPSK yönteminin tablet ve idrar numunelerine uygulanması</i>	57
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	62
<b>KAYNAKLAR</b>	64
<b>EK 1 Chromolith® High Resolution RP-18e (100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası</b>	66
<b>EK 2 Chromolith® RP-18e (100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası</b>	67

<b>EK 3 Fortis C18 (5 µm, 100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası</b>	68
<b>EK 4 İrbesartan standart maddesinin analiz sertifikası</b>	69
<b>EK 5 Hidroklorotiazid standart maddesinin analiz sertifikası</b>	71
<b>EK 6 Agomelatin standart maddesinin analiz sertifikası</b>	72



## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO VE ADI	SAYFA	
Çizelge 1	Analiz sırasındaki UV parametreleri	13
Çizelge 2	USP eşitlikleri	17
Çizelge 3	IRB ve HCT için doğrusallık çalışmalarının sonuçları	24
Çizelge 4	Kolonların özellikleri	26
Çizelge 5	ACN değişiminin IRB ve HCT'nin alıkonma zamanlarına etkisi	27
Çizelge 6	Tampon miktarının IRB ve HCT'nin alıkonma zamanlarına etkisi	33
Çizelge 7	Değişken hareketli faz sistemi I	36
Çizelge 8	Değişken hareketli faz sistemi II	36
Çizelge 9	Değişken hareketli faz sistemi III	37
Çizelge 10	Değişken hareketli faz sistemi IV	38
Çizelge 11	Değişken hareketli faz sistemi V	39
Çizelge 12	Değişken hareketli faz sistemi VI	41
Çizelge 13	Değişken hareketli faz sistemi VII	44
Çizelge 14	Analitler ve IS'nin farklı kolonlardaki bağıl alıkonma değerleri	47
Çizelge 15	HCT, IRB ve AGO'nun farklı kolonlar ile farklı örneklerde yapılan analizlerinde elde edilen sinyallerinin alıkonma zamanı ve pik normalizasyonu kesinliklerinin karşılaştırması	47
Çizelge 16	Sistem uygunluk testlerinin sonuçları	48
Çizelge 17	Doğruluk çalışmalarının sonuçları	50
Çizelge 18	IRB standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi	51
Çizelge 19	HCT standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının	51

istatistiksel değerlendirmesi

<b>Çizelge 20</b>	İdrar içerisinde IRB için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi	52
<b>Çizelge 21</b>	İdrar içerisinde HCT için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi	52
<b>Çizelge 22</b>	IRB standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi	53
<b>Çizelge 23</b>	HCT standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi	53
<b>Çizelge 24</b>	İdrar içerisindeki IRB için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi	54
<b>Çizelge 25</b>	İdrar içerisindeki HCT için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi	54
<b>Çizelge 26</b>	Co-İrda® ilaç tableti analiz sonuçları	57
<b>Çizelge 27</b>	Belirlenen koşullar altında gerçekleştirilen tablet analizlerinin sonuçları	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 İrbesartan'ın molekül yapısı	4
Şekil 2 IRB'nin sulu asidik çözeltideki absorpsiyon spektrumu	4
Şekil 3 Hidroklorotiazid'in molekül yapısı	5
Şekil 4 HCT'nin sulu asidik (düz çizgi) ve alkali (kesik çizgi) çözeltilerdeki absorbans spektrumu	5
Şekil 5 Değişken hareketli faz sistemi	14
Şekil 6 $1.95 \times 10^{-5}$ M HCT ve $1.99 \times 10^{-5}$ M IRB spektrumları	19
Şekil 7 EtOH yüzdesi değişiminin $1.99 \times 10^{-5}$ M IRB'ye etkisi	20
Şekil 8 IRB için yüzde EtOH-absorbans ilişkisini gösteren grafik	21
Şekil 9 EtOH yüzdesi değişiminin $1.97 \times 10^{-5}$ M HCT'ye etkisi	21
Şekil 10 HCT için yüzde EtOH-absorbans ilişkisini gösteren grafik	22
Şekil 11 $1.99 \times 10^{-6}$ - $1.99 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında %10 HCl ve %20 EtOH içeren IRB çözeltilerinin kalibrasyon spektrumu	23
Şekil 12 $3.90 \times 10^{-6}$ - $3.90 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında %10 HCl ve %20 EtOH içeren HCT çözeltilerinin kalibrasyon spektrumu	24
Şekil 13 %40 ACN içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları	28
Şekil 14 %30 ACN içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları	29
Şekil 15 %30 ACN ve %10 pH=2 tamponu içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları	31
Şekil 16 %30 ACN ve %10 pH=6.3 tamponu içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları	32
Şekil 17 %25 ACN, %10 tampon (0.025 M pH=6.3 fosfat tamponu) içeren hareketli fazla elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları	34

<b>Şekil 18</b>	%25 ACN, %50 tampon (0.025 M pH=6.3 fosfat tamponu) içeren hareketli fazla elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları	35
<b>Şekil 19</b>	$1.5 \times 10^{-5}$ M HCT ve $1.5 \times 10^{-5}$ M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi I'e göre yapılan analizi	36
<b>Şekil 20</b>	$1.5 \times 10^{-5}$ M HCT ve $1.5 \times 10^{-5}$ M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi II'ye göre yapılan analizi	37
<b>Şekil 21</b>	$1.5 \times 10^{-5}$ M HCT ve $1.5 \times 10^{-5}$ M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi III'e göre yapılan analizi	38
<b>Şekil 22</b>	$1.5 \times 10^{-5}$ M HCT ve $1.5 \times 10^{-5}$ M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi IV'e göre yapılan analizi	39
<b>Şekil 23</b>	$1.5 \times 10^{-5}$ M HCT ve $1.5 \times 10^{-5}$ M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi V'e göre yapılan analizi	40
<b>Şekil 24</b>	AGO'nun kimyasal yapısı	40
<b>Şekil 25</b>	Değişken hareketli faz sistemi VI'nin farklı tamponlar ile piklerin alıkonma zamanı üzerine etkisi	42
<b>Şekil 26</b>	Chromolith® HR kolon ile elde edilen kromatogram	43
<b>Şekil 27</b>	Değişken hareketli faz sistemi VI'nin maddelerin idrardan analizi sırasında piklerin alıkonma zamanı üzerine etkisi	43
<b>Şekil 28</b>	Değişken hareketli faz sistemi VII	44
<b>Şekil 29</b>	HCT (0.6 µg/mL, 7.822), IRB (14.4 µg/mL, 22.981) ve AGO (4µg/mL, 23.612) içeren standart çözeltinin kromatogramı (Chromolith® HR kolon ile)	44
<b>Şekil 30</b>	HCT (0.6 µg/mL, 7.692), IRB (14.4 µg/mL, 22.336) ve AGO (4µg/mL, 23.695) içeren standart çözeltinin kromatogramı (Chromolith®, RP-18e kolon ile)	45
<b>Şekil 31</b>	HCT (0.6 µg/mL, 15.556), IRB (14.4 µg/mL, 23.634) ve AGO (4µg/mL, 25.863) içeren standart çözeltinin kromatogramı (Fortis C <sub>18</sub> kolon ile)	46
<b>Şekil 32</b>	Stabilite çalışmasından 1 ay ara ile elde edilen kromatogramlar	56
<b>Şekil 33</b>	Co-İrda® ilaç tableti (300 mg IRB/12.5 mg HCT) spektrumu	57

<b>Şekil 34</b>	Co-İrda® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram	58
<b>Şekil 35</b>	3.0 µg/mL HCT, 72.0 µg/mL IRB ve 4 mg/mL AGO içeren idrar analiziyle elde edilen kromatogram	59
<b>Şekil 36</b>	Co-İrda® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram (Chromolith®, RP-18e kolon ile)	60
<b>Şekil 37</b>	Co-İrda® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram (Fortis C <sub>18</sub> kolon ile)	60
<b>Şekil 38</b>	HCT (0.6 µg/mL, 7.578), IRB (14.4 µg/mL, 22.325) ve AGO (4µg/mL, 23.711) içeren idrar çözeltisinin kromatogramı (Chromolith®, RP-18e kolon ile)	61
<b>Şekil 39</b>	HCT (0.6 µg/mL, 15.577), IRB (14.4 µg/mL, 23.653) ve AGO (4µg/mL, 25.856) içeren idrar çözeltisinin kromatogramı (Fortis C <sub>18</sub> kolon ile)	61

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Abs	: Absorbans
ACN	: Asetonitril
ADE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
AGO	: Agomelatin
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
ARA-II	: Anjiotensin II reseptör antagonistleri
BSS	: Bağlı standart sapma
CAN	: Kandesartan sileksetil
CN	: Siyano
CV	: Siklik voltametri
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
EtOH	: Etanol
HCT	: Hidroklorotiazid
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IRB	: İrbesartan
IS	: İç standart
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
KDV	: Kare dalga voltametri
KE	: Kapiler elektroforez
KFME	: Katı faz mikroekstraksiyonu
KS	: Kütle spektrometresi
KZE	: Kapiler zon elektroforez
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
LOS	: Losartan
MAA-EGDMA	: Metakrilik asit etilen glikol dimetakrilat
MEKK	: Miselli elektrokinetik kapiler kromatografi
MeOH	: Metanol
ODS	: Oktadesil silan

PDA	: Fotodiyod dizisi dedektör
PVDF	: Poliviniliden florür
PN	: Pik normalizasyonu
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
SEM	: Ortalamanın standart sapması
SK/KS	: Sıvı kromatografi/ kütle spektrometrisi
SS	: Standart sapma
TEL	: Telmisartan
USP	: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
UV	: Mor ötesi
VAL	: Valsartan
YPİTK	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi

## GİRİŞ ve AMAÇ

Hipertansiyon, sistemik arteriyel kan basıncının devamlı yükselmesi ile kendini gösteren bir kalp-damar hastalığıdır. Hipertansiyon, zamanla ciddi kardiyovasküler hastalıklara yol açması (konjestif kalp yetmezliği, koroner kalp hastalığı, inme vs.) ve sık görülmesi nedeniyle önemli bir klinik sorun ve sağlığı bozucu önemli bir etken sayılır. Kardiyovasküler riske sistolik ve diyastolik basınçtaki yükselmenin katkısı, yaşa göre, bir dereceye kadar fark gösterir. Şöyle ki, yaşlı hipertansiyonlularda kardiyovasküler morbidite ve mortalite, diyastolik basınçtaki yükselmeden ziyade sistolik basınçtaki yükselme ile daha yakından ilişkilidir. Çeşitli ülkelerde arteriyel hipertansiyonun 40 yaşın üzerindeki nüfus kesiminde görülme sıklığı %15-20 kadardır. 40 yaşın altında seyrek görülür; 40 yaşın üstünde görülme sıklığı yaş ile orantılı bir şekilde artar ve 65 yaşın üzerinde %50'yi geçer. Bazı ırklarda (Amerikan siyahları gibi) 65 yaşından sonra görülme sıklığı %70'i geçer. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1988 yılı itibariyle nüfusun yaklaşık %30'unu teşkil eden 70 milyon kişinin arteriyel kan basıncının 140/90 mmHg düzeyinin üzerinde olduğu ve bunların ancak %54'ünün hipertansiyonlu olduklarını bildikleri ve sadece %11'inde hipertansiyonun yeterli derecede kontrol altına alınmış olduğu kestirilmiştir (Kayaalp, 1995).

Nüfus içinde bireylerin arteriyel kan basıncının dağılımı normal Gauss eğrisine uyar. Bu nedenle, hipertansiyon ile normatansiyon arasındaki sınır, esas olarak itibardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1958'de yaptığı bir yayında yatar ve oturur durumda ölçülen arteriyel kan basıncının 160/95 mmHg (sistolik/diyastolik) düzeyinin üstünde olmasını hipertansiyon olarak tanımlamıştır. Sistolik veya diyastolik basınçtan birinin, yukarıda kendine uyan değer üzerine çıkması hipertansiyon tanımı için yeterlidir; mutlaka ikisinin birden bu değerlerin üzerine çıkması gerekmez. Anılan yayında 140/90 mmHg değeri normal sistolik ve diyastolik kan basıncının üst sınırı olarak teklif edilmiştir. Arteriyel kan basıncı yaşla paralel olarak normal bir yükselme gösterdiğinden DSÖ'nün yaş faktörünü dikkate almayan sınıflandırması eleştiriye uğramıştır. Aşağıdaki sınıflandırma erişkinlerde, uygulama yönünden daha akılcı ve daha değerli bulunmuştur.

- a) Normatansiyon:
  - i) 17-40 yaş arası 140/90 değerinin altı
  - ii) 41-60 yaş arası 150/90 değerinin altı
  - iii) 60 üstünde 160/90 değerinin altı
- b) Hipertansiyon:
  - i) 17-60 yaş arasında 160/90 değerinin üstü
  - ii) 60 yaşını geçenlerde 175/95 üstü
- c) Sınırdaki hipertansiyon:

Yukarıda belirtilen hipertansiyon ve normatansiyon sınırları arasında ölçüm gösteren kişilerde sınırdaki hipertansiyon bulunduğu kabul edilir.

Yukarıda belirtilen riskli arteriyel kan basıncına sahip hipertansiyon hastalarına farklı mekanizmalarda iki veya daha fazla ilacın birlikte kullanıldığı tedaviler uygulanmaktadır. Kombine antihipertansif ilaçların kullanımındaki bu büyük artış, son yıllarda, angiotensin II reseptör antagonistlerini ön plana çıkarmaktadır (Kayaalp, 1995).



Angiotensin II reseptör antagonisti ilaçlar kategorisinde olan İrbesartan (IRB), kan damarlarının daralmasını engelleyerek çalışır ve böylece tansiyonu düşürür ve kan akışını geliştirir (Kayaalp, 2006).

Hidroklorotiazid (HCT), tiazid grubu idrar söktürücüler (diüretikler) arasında yer alır. Vücutta sıvı tutulumuna yol açan aşırı miktarda tuzun vücut tarafından emilimini engellemeye yardımcı olan bir idrar söktürücüdür (Kayaalp, 2006).

HCT ve IRB kombinasyon formları hipertansiyon tedavisi için kullanılır. Piyasada genellikle 300mg/12.5mg veya 150mg/12.5mg İrbesartan/Hidroklorotiazid tablet formları halinde bulunur.

IRB ve HCT'nin birlikte tayini için geliştirilmiş çeşitli yöntemler mevcuttur. Bilimsel çalışmalarda mor ötesi - görünür alan spektrofotometrisi (UV) başta olmak üzere, yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK), kapiler elektroforez (KE) vb. yöntemlerle yapılan analizler yer almaktadır.

Bu iki maddenin eş zamanlı olarak farmasötik preparatlardaki ve idrardaki miktarlarının tespiti için sınırlı sayıda YPSK yöntemi mevcuttur. Çalışmalarda kullanılan hareketli faz sistemi genellikle analiz boyunca sabit bileşimde iken, bu tez çalışmasında maddelerin kimyasal özelliklerine bağlı olarak, değişken hareketli faz sistemi ve değişken akış hızı kullanılmıştır. Ayrıca analizler, yaygın olarak kullanılan C<sub>18</sub> monolitik silika bazlı kolonların yeni nesli olan yüksek ayırma sahip kolonla gerçekleştirilmiştir. Yeni nesil kolonla karşılaştırılmak üzere daha yüksek makropor ve daha düşük mezopor boyutuna sahip birinci nesil monolitik kolon ve geleneksel C<sub>18</sub> kolon da kullanılmıştır. Birinci nesil kolonlara göre daha küçük makropor boyutuna sahip yeni nesil kolon ile maddelerin ayırımı ve pik simetritlerinin diğer kolonlara göre daha iyi olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, analiz edilecek biyolojik numune (idrara), hiçbir ön hazırlık işlemine ihtiyaç duyulmadan (katı-sıvı yada sıvı-sıvı ekstraksiyon vb. olmaksızın) sisteme doğrudan verilmiş ve verimli sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada maddelerin UV-görünür alan spektrofotometrisi ve YPSK yöntemleri ile farmasötik preparatlarda tayinleri karşılaştırılmış ve ayrıca etken maddelerin YPSK ile analizinin idrara uygulanabilirliği araştırılmıştır. Böyle bir çalışmanın geliştirilmesi, IRB ve HCT'nin eş zamanlı analizlerinde kromatografik yönden daha iyi bir ayırım yapılabildiğini göstermiştir. Diğer yandan, idrar numunesinden maddelerin analizi sırasında hiçbir ön işleme ihtiyaç duyulmamasından dolayı zaman yönünden de tasarruf sağlanmıştır. Yöntemler istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve rutin analizlerde kullanılabilirliği tartışılmıştır.

## KAYNAK BİLGİSİ

IRB ve HCT, hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaç etken maddelerindedir. Antihipertansif ilaçlardan olan bu maddelerden IRB anjiotensin reseptör blokörlerinden, HCT ise diüretikler sınıfındadır.

Ağızdan alınabilen peptid yapılı olmayan anjiotensin reseptör blokörleri hipertansiyon tedavisine 1990'ların başında girmiştir. Halen 7 ilaç klinik kullanıma girmiş ve bunlardan beşi (irbesartan, kandesartan, losartan, telmisartan ve valsartan) Türkiye'de pazarlanmıştır. Halen tedavide kullanılan anjiotensin reseptör blokörleri AT<sub>1</sub> reseptörlerin selektif antagonistleridir (Kayaalp, 2006).

Klinik denemelerde antihipertansif etkilerinin, kalsiyum kanal blokörleri, beta-blokörler ve diüretiklerinkine yaklaşık derecede olduğu saptanmıştır. Anjiotensin reseptör blokörleri ile tedavi sırasında renin-anjiotensin sistemi bloke olduğu için kan basıncı sodyuma fazla bağımlı hale gelmiştir. Bu nedenle kanda sodyum düzeyinin düşük olması veya düşük sodyum diyeti, antihipertansif etkinliklerini arttırır. Bundan dolayı diüretiklerle, sık olarak, kombine edilerek kullanılırlar. Kendilerinin de tek başına verildiklerinde natriüretik ve diüretik etkisi vardır. Kombinasyonla, kan basıncı düşmesi ilaçlar tek başına verildiğinden daha fazla olur. Çoğunun düşük doz hidroklorotiazid (12.5 mg) ile kombine preparatı çıkarılmıştır (Kayaalp, 2006).

Anjiotensin reseptör blokörleri halen hipertansiyon tedavisinde kullanılırlar. Konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılabilirler. Diyabetik nefropatide böbreği korurlar. Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü ilaçların öksürük yaptığı hastalarda onlar yerine kullanılabilirler (Kayaalp, 2006). Başlıca yan tesirleri, sersemlik, semptomatik hipotansiyon ve tat duyusunda bozulmadır (Kayaalp, 2006).

Diüretikler ise böbrek tubulusları üzerine olan etkileriyle Na<sup>+</sup> ve su kaybını arttıran ilaçlardır. Antihipertansif olarak daha ziyade tiazid türü diüretikler kullanılır (Kayaalp, 2006). Yapılarında diüretik etkiden sorumlu olan sulfonamid (SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) grubuna ve heterosiklik halkaya sahip ilaçlardır (Dökmeci, 2000).

Tiazidler az toksik olmaları, oral yoldan kullanılmaları ve dehidratasyon oluşturmamaları nedeniyle tedavide çok sık kullanılan diüretiklerdendir (Dökmeci, 2000).

Hafif hipertansiyon olgularında tek başlarına kullanıldıklarında, yaptıkları kan basıncı düşmesi genellikle yeterli derecede olur ve başka bir antihipertansif ilaç kullanılmasına gerek kalmayabilir. Orta ve ağır hipertansiyon olgularında, diğer bir gruptan bir antihipertansif ilaçla birlikte (kombine) kullanılırlar (Kayaalp, 2006).

Tiazidler ve türevleri oral yoldan iyi emilirler. Metabolizmaları arasında bazı farklılıklar vardır. Genellikle metabolitleri inaktifdir. Tiazidlerin prototipi olan hidroklorotiazidin lipitlerde çözünürlüğü az olduğundan emilmesi zordur. Ürik asidin eliminasyon mekanizmasıyla böbrekten atılırlar (Dökmeci, 2000).

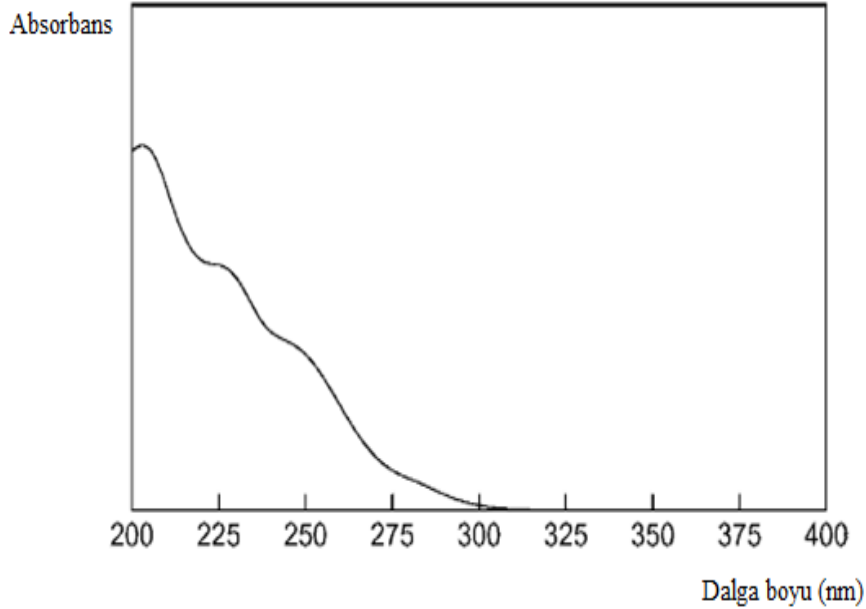
Tiazidlerin aşırı Na<sup>+</sup> kaybı ve hipovolemi, hipokalemi, hiperglisemi, hiperürisemi ve hiperlipidemi gibi yan etkileri mevcuttur (Dökmeci, 2000).

## İrbesartan'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Anjiotensin II reseptör antagonisti bir madde olan IRB, 2-bütül-3-[[20-(1H-tetrazol-5-il)[1,10-bifenil]-4-il]metil]-1,3 diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on olarak adlandırılır. Kapalı formülü  $C_{25}H_{28}N_6O$  ve molekül ağırlığı 428.5 g/mol'dür (Moffat ve ark., 2011).

### Şekil 1. İrbesartan'ın molekül yapısı

IRB beyaz, kristal yapılu katı bir maddedir. Erime noktası 180-181°C'dir. Alkol ve metilen klorür içinde çözünürken suda çözünmez. Apolar ve asidik karakterli olup pKa'sı 4.5'tir. Sulu asit çözeltilerinde (0.2 M HCl) UV maksimum absorptans verdiği dalga boyları 224 ve 246 nm'dir (Moffat ve ark., 2011).



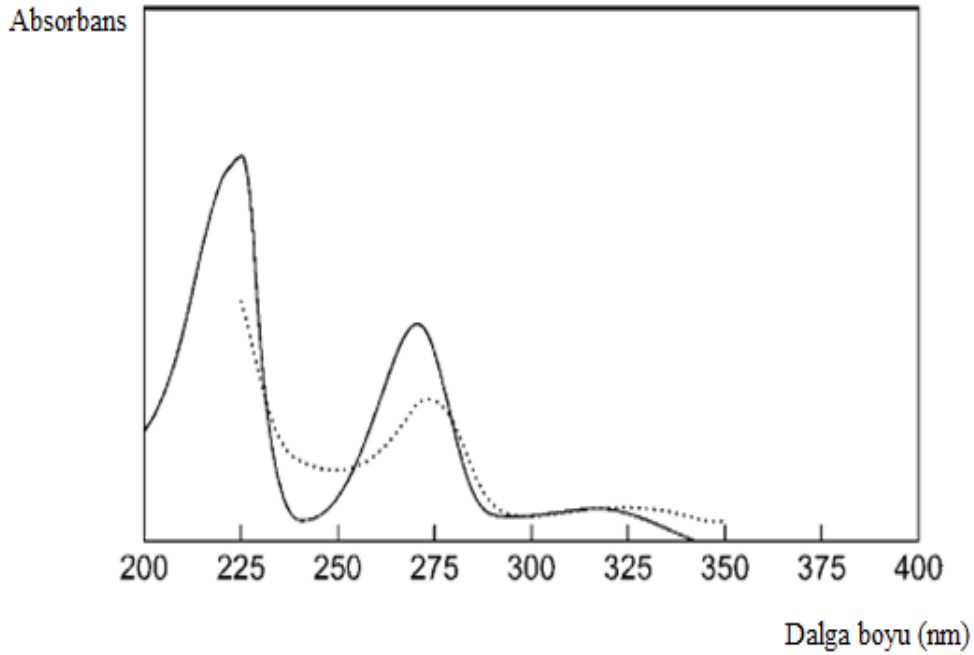
Şekil 2. IRB'nin sulu asidik çözeltideki absorptiyon spektrumu (Moffat ve ark., 2011)

### Hidroklorotiazid'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Tiazid diüretiklerinden olan HCT, 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazidin-7-sülfonamid 1,1-dioksit olarak adlandırılır. Kapalı formülü  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$  ve molekül ağırlığı 297.7 g/mol'dür (Moffat ve ark., 2011).

#### Şekil 3. Hidroklorotiazid'in molekül yapısı

Beyaz, toz halinde kristal olan HCT'nin erime noktası  $273-275^{\circ}C$ 'dir. Pratikte suda, kloroformda ve eterde çözünmezken, 1/200 oranında etanol (EtOH) ve 1/20 oranında asetonda çözünür. Dimetilformamid ve alkali hidroksit çözeltilerinde ise kolay çözünür. Bazik özellik göstermekle birlikte 7.0 ve 9.2 olmak üzere iki tane pKa değerine sahiptir. Sulu asit çözeltilerinde maksimum absorbanstaki dalga boyu 272-324 nm iken, sulu alkali çözeltilerinde 274 nm'dir (Moffat ve ark., 2011).



Şekil 4. HCT'nin sulu asidik (düz çizgi) ve alkali (kesik çizgi) çözeltilerindeki absorbanstaki dalga boyu spektrumu (Moffat ve ark., 2011)

### İrbesartan ve Hidroklorotiazid Analizleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Albero ve ark. (2002), sadece IRB tayininin yanında, HCT varlığında IRB tayini için birinci türev spektrofotometrik yöntemini geliştirmişlerdir. Ölçümler IRB için 263.0 nm'de yapılmıştır. Bu ölçümlerin sonucunda 1.0-12.0 mg/L derişim aralığında IRB için doğrusal aralık gösterilmiş ve LOD değeri 0.15 mg/L olarak belirlenmiştir. IRB varlığında HCT tayini ise direkt spektrofotometrik yöntem ile 317 nm'de yapılmıştır. Kalibrasyon grafiği, HCT'nin 2.0-50.0 mg/L olduğu derişim aralığında doğrusal olarak verilmiştir. Ayrıca LOD değeri de 0.25 mg/L olarak belirlenmiştir. Yöntem, ticari tabletlere başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Joseph-Charles ve ark. (2003), tabletlerden aynı anda IRB ve HCT tayini için ikinci türev spektrofotometrik yöntemini uygulamışlardır. Ölçümler IRB için 230.1 nm'de, HCT için 232.7 nm'de yapılmıştır. Yapılan çalışmada IRB için doğrusallık aralığı 14.4-33.6 mg/L ve LOQ 5.0 mg/L iken, HCT için bu değerler sırasıyla 1.2-2.8 mg/L ve 1.1 mg/L'dir. Yöntemin geçerliliğini, ticari tabletlerde aynı anda IRB ve HCT tayini yapıp sonuçları yüksek geri kazanım, doğruluk ve kesinlik ile vermişlerdir.

Vetuschi ve ark. (2005), alkollü örnekler kullanarak dördüncü türev spektrofotometrik yöntemini geliştirmişlerdir. Tayin sırasında IRB için 250-310 nm, HCT için ise 330-340 nm dalgaboyu aralığını kullanmışlardır. IRB için kalibrasyon aralığı 120-480 µg/mL ve HCT için ise 10-40 µg/mL olarak verilmiştir. Yöntem, standart karışımlara verimli bir şekilde uygulanmıştır.

Sridharan ve ark. (2010), UV spektrometri yöntemi ile standart ekleme metodunu kullanarak kombine tabletlerden IRB ve HCT'nin eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. %30 EtOH içeren sulu çözeltilerde, IRB 234 nm'de, HCT ise 272 nm'de tayin edilmiştir. Validasyon parametreleri ICH yönergelerine göre yapılmıştır. IRB 10-26 µg/mL ve HCT 5-13 µg/mL derişim aralığında doğrusallık göstermiştir. Tablet analizlerinde IRB %99.32±0.631 ve HCT %100.15±0.762 bulunmuştur. Metot, istatistiksel olarak incelenmiş ve kalite kontrol laboratuvarlarında iki maddenin de ilaçlardan rutin analizi için kullanılabileceği gösterilmiştir.

Erk (2003a), antihipertansif ilaçlar olan IRB ve HCT'nin insan plazmasından tayini için basit, hassas ve doğruluğu yüksek olan YPSK yöntemini geliştirmiştir. Çalışmada Supelcosil C<sub>18</sub> (5 µm, 150×4.6 mm) analitik kolon, pH'ı 2.5 olan 10 mM potasyum dihidrojen fosfat:MeOH:ACN (5:80:15, v/v/v) karışimli hareketli faz kullanılmış ve akış hızı analiz süresince 1.0 mL/dk'da sabit tutulmuştur. 275 nm'de dedekte edilen IRB 5.8 dakika kolonda tutunurken HCT 7.8 dakika tutunmuştur. Plazma numunesi hazırlanırken ACN ile protein çöktürmesi yapılmış ve daha sonra ters faz sıvı kromatografiyle analiz edilmiştir. Analiz sırasında iç standart (IS) madde kullanılmamıştır. Doğrusallık aralığı IRB için 10.0-60.0 µg/mL ve HCT için 4.0-20.0 µg/mL olarak verilmiştir. Günler içi ve günler arası yapılan tayinlerde istatistiksel değerler kabul edilebilir düzeyde çıkmıştır. Bu çalışmanın, farmakokinetik çalışmalar için hastalarda bu ilaçların tayininde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Erk (2003b), antihipertansif ilaç olan kandesartan sileksetil (CAN) ve HCT'nin kan plazması ve tablet formlarının analizi için fotodiyod dizisi dedektör (PDA) kullanarak hızlı ve basit bir YPSK metodu geliştirmiştir. Sistemde Supelcosil C<sub>18</sub>

(5 µm, 150×4.6 mm) kolon ve 10mM potasyum dihidrojen fosfat:MeOH:ACN (2:80:18, v/v/v) (pH 2.5) içeren bir hareketli faz kullanılmıştır. Analiz sırasında akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. Maddelerin sisteme verilmesinden sonra, CAN ve HCT 260.0 nm’de dedekte edilmiştir. CAN kolonda 3.5 dakika tutunurken HCT 6.5 dakika tutunmuştur. Analiz sırasında girişim yapan herhangi bir maddeye rastlanmamıştır. Ters faz YPSK sistemine verilmeden önce numuneye sadece ACN ile protein çöktürme işlemi uygulanmıştır. Ayrıca analizde IS kullanılmamıştır. Analiz sonrasında CAN için doğrusallık aralığı 30.0–2500.0 ng/mL, LOD 2.0 ng/mL ve LOQ 11.0 ng/mL olarak verilirken HCT için ise aynı değerler sırasıyla 20.0–1000.0 ng/mL, 3.58 ve 6.75 ng/mL olarak verilmiştir. Basit, hızlı ve herhangi bir ayırma işlemi kullanılmayan bu yöntem ile CAN ve HCT içeren tabletler ile kan plazması başarılı bir şekilde analizlenmiştir.

Şatana ve ark. (2001), valsartan (VAL) ve HCT’nin farmasötik preparatlarından eş zamanlı tayini için birinci türev UV spektrofotometri ve YPSK yöntemlerini geliştirmişlerdir. Türev yöntemi, VAL için 270.6 nm ve HCT için 335 nm’deki 1. türev pikleri ile ilaç derişimi arasındaki doğrusal ilişkiye bağlıdır. Bu yöntemle kalibrasyon grafiği VAL için 12.0–36.1 µg/mL aralığında, HCT için ise 4.0–12.1 µg/mL aralığında verilmiştir. Ayrıca karşılaştırma yöntemi olarak, analizin 225 nm’de UV dedeksiyonuyla yapıldığı YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde ise, ters faz bir kolon ile 0.02 M fosfat tamponu (pH 3.2)-ACN (55:45, v/v) içeren hareketli faz kullanılmıştır. Analiz sonunda VAL için doğrusallık aralığı 0.06–1.8 µg/mL ve HCT için ise 0.07–0.5 µg/mL olduğu görülmüştür. Geliştirilen bu yöntemler, ticari tabletlere ve laboratuarda hazırlanan karışımlara başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Carlucci ve ark. (2000), tabletlerden VAL ve HCT’nin eş zamanlı analizlenebilmesi için ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Analizde ters faz Hypersil ODS (5 µm, 250×4.6 mm) bir kolon ve ACN:asetat tamponu (pH 4.0; 0.1 M) (40:60, v/v) içeren hareketli faz kullanılmıştır. Kromatogramlar PDA dedektör ile 220 nm’de kaydedilmiştir. Validasyon çalışmaları sonucunda VAL için doğrusallık aralığı 5.0-10.0 µg/mL, LOD ise 1.0 µg/mL olarak bulunurken, HCT için sırasıyla bu değerler 0.5-2.0 µg/mL ve 0.05 µg/mL’dir.

Rane ve ark. (2010), sıvı kromatografi (SK) ile stabilite kontrolü için yöntem geliştirmişler ve kombine farmasötik preparatlardan IRB ve HCT’nin eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Kromatografik ayırma sırasında Ace5 C<sub>18</sub> 25 cm analitik kolon ve asetik asit ile pH’ı 5.5’e ayarlanmış 50 mM amonyum asetat:ACN (70:30, v/v) içeren hareketli faz kullanmışlardır. Analiz 1.5 mL/dk akış hızında, 30°C sıcaklıkta, PDA dedektör ile 235 nm’de yapılmıştır. IRB, HCT ve bunların kombine ilaçları üzerine termal, fotolitik, hidrolitik ve oksidatif koşulların etkisi incelenmiştir. IRB ve HCT’nin pik homojenliği PDA dedektör kullanılarak elde edilmiştir. Numunenin kromatogramında ise, bozunma ürünlerinin varlığı bu yöntemle kanıtlanmıştır. IS olarak metil paraben kullanılmıştır. IRB için doğrusallık aralığı 10-200 µg/mL, korelasyon katsayısı 0.998, LOD 0.019 µg/mL, LOQ 0.053 µg/mL iken, HCT için aynı değerler sırasıyla 5-100 µg/mL, 0.999, 0.023 µg/mL ve 0.070 µg/mL olarak hesaplanmıştır. IRB ve HCT için geri kazanım değerleri %100.45-101.25 arasında verilmiştir. Geliştirilen bu yöntemin, IRB ve HCT’nin kantitatif tayinlerine ve

stabilite tayinlerine uygun olduğunun yanında bu maddelerin farmasötik formlarının kalite kontrolünde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Khodke ve ark. (2010), IRB ve HCT'nin eş zamanlı analizi ve stabilite çalışmaları için bir YPİTK yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, silikajel 60F<sub>254</sub> ile kaplı İTK tabakaları ve ACN:kloroform (5:6, v/v) içerikli hareketli faz kullanılmıştır. Çalışılan dalga boyu ise 270 nm olarak seçilmiştir. Bu ilaçların stabilitelerini belirlemek için ise oksidatif, fotolitik, hidrolitik ve termal koşullarda farklı pH değerlerinde çalışılmıştır. İki maddenin de termal ve fotolitik koşullarda bozunmadığı fakat hidrolitik koşullar altında bozunduğu görülmüştür. Yöntemin stabilite kontrolü için basit ve doğru olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu şekilde maddelerin piklerinin saflık profilleri de teyit edilmiştir.

Tutunji ve ark. (2010), insan plazmasında IRB ve HCT'nin eş zamanlı analizi için sıvı kromatografi/kütle spektrometrik (SK/KS) bir yöntem geliştirmişlerdir. Analiz öncesi plazma örneklerine ACN eklenip proteinler çöktürülmüştür. İki analit ve IS olarak kullanılan losartan, ters faz C<sub>18</sub> kolonu (50×4mm, 3µm) ve %2.5 formik asit:MeOH:ACN (40:45:15, v/v/v) içeren hareketli faz kullanılarak 0.70 mL/dk akış hızında analizlenmiştir. IRB için 427→175 ve HCT için m/z 296→269 ve m/z 296→205 geçişlerinde negatif iyon modunda ESI kaynağı kullanılarak maddeler iyonize edilmiştir. Validasyon çalışmalarıyla elde edilen doğrusal aralık IRB için 0.06-6.00 µg/mL, HCT için ise 1.0-112.0 ng/mL'dir. Bu yöntem ile insan plazmasında IRB ve HCT'nin kombine tabletlerinin bioeşdeğerlik çalışmalarına uygulanabileceği gösterilmiştir.

Hillaert ve ark. (2003), kapiler zon elektroforez (KZE) ve miselli elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKK) ile HCT ve altı tane anjiyotensin II reseptör antagonistlerinin (ARA-II) (CAN, eprosartan mesilat, IRB, LOS, TEL ve VAL) eş zamanlı tayini için yöntem geliştirmişlerdir. KZE ve MEKK yöntemleri, farmasötik preparatlardaki HCT/ARA-II kombinasyonlarının kalitatif ve kantitatif tayini için uygun bulunmuştur. ARA-II'lerle olan her kombinasyon için en az iki metot kullanılmış ve bu metotların validasyonu yapılmıştır.

González ve ark. (2002), bazı anjiyotensin II reseptör antagonistleri (ARA II: LOS, IRB, VAL, CAN ve onun metaboliti olan kandesartan M1) için florimetrik dedeksiyon ile YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Analitler ve IS olarak kullanılan bümetanid asidik koşullar altında plasmadan C<sub>8</sub> kartuşlu katı faz ekstraksiyonu ile ekstre edilmiştir. Analitler ve girişim yapan maddeler, µBondapak C<sub>18</sub> ters faz kolon ile oda sıcaklığında ayrılmıştır. En uygun hareketli faz olarak pH=4 olan 5mM asetat tamponu:ACN seçilmiş, akış hızı 1.0 mL/dk'dan 1.2 mL/dk'ya geçişecek şekilde gradient koşullarda çalışılmıştır. Floresans dedektörün eksitasyon dalgaboyu 250 nm ve emisyon dalgaboyu ise 375 nm olarak ayarlanmıştır. Maddeler için validasyon çalışmaları yapılmış ve losartan haricinde (%12) diğer analitlerin bağıl standart sapmaları (BSS) %8 olarak hesaplanmıştır. Plazmadan tayinleri sırasında elde edilen LOQ değerleri CAN ve metaboliti için 3 ng/mL, LOS için 16 ng/mL, IRB ve VAL için 50 ng/mL'dir. Bu şekilde yöntemin, bazı ARA II bileşiklerinin belirli dozlarda oral olarak alınmasından sonra klinik çalışmalar altında hipertansif hastalardan elde edilen plazmalara uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Nie ve ark. (2005), insan plazması ve idrarından çeşitli ARA-II'leri (CAN, LOS, IRB, VAL, TEL) analiz etmek için YPSK ile kombine edilmiş katı faz mikroekstraksiyon (KFME) yöntemini geliştirmişlerdir. Bu mikroekstraksiyon yönteminde polimonolitik bir kapiler (MAA-EGDMA) kullanmışlardır. Bu kapiler sayesinde biyolojik örnekler içerisindeki proteinler başarılı bir şekilde ayrılarak YPSK sistemine gönderilmiştir. Analiz sonucunda doğruluk aralığı TEL için 0.5-200 ng/mL, CAN ve IRB için 5-2000 ng/mL, VAL için 10-2000 ng/mL ve LOS için 50-5000 ng/mL'dir. Korelasyon katsayıları her biri için plazma örneğinde 0.9985'in, idrar örneğinde ise 0.9994'ün üzerindedir. Tayin sınırları ise plazma örneğinde 0.1-15.3 ng/mL, idrar örneğinde ise 0.1-15.2 ng/mL'dir. Tekraredilebilirlik üç derişim için incelenmiş ve BSS'sı %7'den düşük çıkmıştır. Yöntemde kullanılan monolitik kapilerin sağlam ve biyolojik numunelerin direk analizine uygun olduğu gösterilmiştir.

Chang ve ark. (1997), IRB'nin insan plazma ve idrar örneğinden tayini için bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde IRB ve IS madde 100 mg Isolute CN kartuşu kullanılarak katı faz ekstraksiyonu ile örneklerden ekstre edilmiştir. Analizler, eksitasyon dalgaboyu 250 nm ve emisyon dalgaboyu 371 nm olan floresans dedektör altında ODS analitik kolonu kullanılarak yapılmıştır. Hareketli faz olarak pH=3.5 olan zayıf fosfat:ACN (50:50, v/v) kullanılmış ve akış hızı 0.8 mL/dk olarak ayarlanmıştır. İki örnek için de validasyon çalışmaları yapılmış ve doğruluk aralığı iki örnekte de 1-1000 ng/mL bulunmuştur. Her bir örneğin LOQ değeri 1 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Kalite kontrol örnekleriyle yapılan çalışmalarda %95'in üzerinde doğruluk bulunmuştur. Günler içi ve günler arası yapılan çalışmalarda varyasyon katsayısı %8'den düşük çıkmıştır. Ayrıca IRB'nin idrar ve plazma örnekleri içinde -20°C'de en az 7 ay stabil kalabildiği gösterilmiştir.

Fang ve ark. (2005), HCT'nin insan plazma ve idrar örneğinden tayini için hassas ve seçici bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem YPSK-KS/KS'e dayanmaktadır. HCT ve IS olarak kullanılan hidroflumetiazid sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile idrar ve plazmadan ekstre edilmiştir. KS/KS dedeksiyonu negatif iyonizasyon modunda kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemde plazmadaki doğruluk aralığı 1-100 ng/mL iken, idrarda 0.05-20 µg/mL'dir. İki metod için de kabul edilebilir doğrulukta standart eğrisinin bütün derişimlerinde varyasyon katsayısı %5.6'dan düşük çıkmıştır. Plazma ve idrarda yapılan bu çalışma ile Losartan/HCT kombinasyonu tabletlerin farmakokinetik çalışmalarına ışık tutmuştur.

Liu ve ark. (2007), insan plazmasında HCT için hızlı ve hassas bir yöntem olan bir YPSK-KS/KS yöntemi geliştirmişlerdir. Analit ve IS olarak kullanılan IRB MeOH kullanılarak plazmadan çöktürülmüş ve ekstre edilmiştir. Analiz sırasında Phenomenex Kromasil C<sub>18</sub> kolonu ve su:MeOH (27:73, v/v) içeren hareketli faz kullanılmıştır. Validasyon çalışmalarıyla plazmadaki doğruluk aralığı 0.78-200 ng/mL arasında bulunmuştur. Yöntemin, 12 mg HCT tabletinin oral olarak vücuda alınmasından sonra farmakokinetik çalışmaya uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Bae ve ark. (2009), floresans dedektör kullanarak basit ve hızlı bir yöntem olan YPSK ile insan plazmasından IRB analizi yapmışlardır. Numune hazırlama işlemi, 800 ng/mL LOS (IS) içeren 0.1 mL plazma örneğinin 0.4 mL ACN ile proteinlerinin çöktürülmesinden oluşmaktadır. Kromatografik ayırma işlemi



40°C'de Zorbax Xclipse XDB marka C<sub>18</sub> (150×4.6mm, 5 µm) analitik kolonu ile 1.0 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak ACN:%0.1 formik asit (37:63, v/v) kullanılmıştır. Floresans dedektörün eksitasyon dalga boyu 250 nm ve emisyon dalga boyu 370 nm'ye ayarlanmıştır. Yapılan çalışmada IRB'nin alıkonma zamanı 4.4 dk ve LOS'ninki 5.9 dk olarak gözlenmiştir. Validasyon çalışmaları ile doğrusal aralık 10-5000 ng/mL, LOQ değeri 10 ng/mL, varyasyon katsayısı %8.48'den düşük, doğruluk ise %94.4'ten fazladır. IRB'nin geri kazanımı %98.4 iken LOS'un %99.1'dir. Geliştirilen bu yöntemin, 300 mg IRB tabletini vücuduna alan hastalarda farmakokinetik çalışmalar için başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Gupta ve ark. (2011), Britton-Robinson tamponu kullanarak hassas voltametrik bir yöntem geliştirmişlerdir. pH=2.0-12.0 aralığında IRB'nin iyi bir katodik pik verdiği görülmüştür. İndirgenme mekanizmasının kontrollü potansiyel mekanizmasına, kulometriye ve spektral analize dayandığı kabul edilmiştir. En uygun koşullarda validasyon çalışmaları da yapılmış ve IRB için doğrusal aralık  $3.0 \times 10^{-5}$ - $5.7 \times 10^{-3}$  M, LOD değeri de  $5.33 \times 10^{-7}$  M olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile, Britton-Robinson tamponu kullanılarak IRB'nin indirgenme pikinin voltametricde katyonik yüzeye etkisi tanımlanmıştır.

Önceki çalışmalarda camı karbon elektrot kullanılarak HCT'nin voltametric çalışması gerçekleştirilmiş. pH=3.3'te Britton-Robinson tamponundaki madde +1040 mV'ta iyi bir pik vererek yükseltgenmiştir. CV çalışması ile oksidasyon sürecinin tersinir ve difüzyon kontrollü olduğunu gösterilmiştir. Razak (2004), hassas, basit ve zamandan tasarruflu bir yöntem olan diferansiyel puls anodik voltametri yöntemini geliştirmiştir. Bu yöntem ile idrara ve ticari tabletlere ekstraksiyon uygulanmadan ilacın analizi ve validasyonu yapılmıştır. Standart çözeltinin LOD değeri 5.0 ng/mL iken, idrar içinde IRB'nin LOD değeri 14.0 ng/mL'dir. Tabletlerin analizinden elde edilen sonuçlar USP 26'daki HPLC metoduyla yapılan analiz sonuçlarıyla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bozal ve ark. (2009), IRB tayini için diferansiyel puls (DP) ve kare dalga (KD) voltametric yöntemi geliştirmişlerdir. IRB'nin elektrokimyasal davranışı asılı civa elektrodu ile siklik voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (KDV) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Deneyin optimum koşullarının bulunmasında farklı parametreler değiştirilmiş ve en uygun koşullar bulunmuştur. IRB'nin  $8 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-4}$  M derişim aralığında ölçülen akımları her iki yöntem için de iyi bir doğrusallık vermiştir. Ayrıca tekraredilebilirlik, geri kazanım gibi validasyon parametreleri de incelenmiş ve kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntem, insan serum örneğinden ve farmasötik tabletlerden IRB'nin analizine uygulanmıştır.

Yukarıdaki çalışmaların dışında USP 29'da IRB analizi YPSK yöntemi ile verilmiştir. Yöntemde ACN:Fosfat tamponu (pH 3.2) (33:67, v/v) içeren hareketli faz ve 250×4 mm'lik bir kolon kullanılmıştır. 220 nm'de 1.0 mL/dk akış hızında USP saflıkta IRB ve IRB<sub>A</sub> maddelerinin analizleri yapılmıştır. USP saflıktaki IRB 1.0 dk kolonda tutunurken IRB 0.8 dk tutunabilmiştir. Sonuçta iki pik arasındaki ayırımın 2'den büyük ve tekrarlı yapılan analizlerin standart sapması 0.1'den küçük bulunmuştur.

USP 30'da HCT için YPSK yöntemi ile benzotiazidin, klortiazid ve HCT'in eş zamanlı analizi yapılmıştır. ACN:MeOH (3:1, v/v) ve %0.5'lik formik asit çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmış ve bu çözeltiler ile değişken hareketli faz sistemi kullanılarak analizler yürütülmüştür. 3.5 µm, 50×4.6 mm özelliğinde bir kolon içerisinde 1.0 mL/dk akış hızında ve 35°C kolon sıcaklığında analiz yapılmıştır. Bu analiz koşullarında benzotiazidin 0.5 dk, klortiazid 0.8 dk ve HCT 1.0 dk kolonda tutulmuştur. Benzotiazidin ve klortiazid arasındaki ayırım gücü 2'yi, klortiazid ve HCT arasındaki ayırım gücü ise 1.5'i aşmamıştır. Bu üç madde için de kuyruklanma faktörü 1.5'in altındadır. Tekrarlı yapılan çalışmalardan elde edilen standart sapma ise 0.1'den küçük bulunmuştur.

## GEREÇLER

### Kullanılan Kimyasallar

Standart maddeler olarak kullanılan her ikisi de %99 saflıktaki IRB Ulkar Kimya Sanayii ve Ticaret A.Ş. (Türkiye) ve HCT Cambrex Profarmaco Milano S.r.l (İtalya) firması tarafından üretilmiş olup Nobel İlaç A.Ş. (Düzce) firması tarafından tedarik edilmiştir. İç standart olarak kullanılan %98 saflıktaki agomelatin (AGO) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, YPSK saflıktaki ACN Merck KGaA (Almanya) firmasından, fosfat tamponu hazırlamak için kullanılan %99.8 saflıktaki  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve %99.6 saflıktaki  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, YPSK saflıktaki su Merck KGaA (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Co-İrda<sup>®</sup> (300 mg IRB/12.5 mg HCT) ilaç tablet örneği ise Nobel İlaç A.Ş. (Düzce) firmasından sağlanmıştır. Distile etanol laboratuvarımızda tamamı cam malzemeden oluşturulmuş düzenek ile elde edilmiştir.

### Kullanılan Cihazlar

Geliştirilen YPSK yönteminde LC-20AT model LPGE ünitesi takılmış gradient pompa, SIL-20A otomatik örnekleyici, CBM-20A model iletişim ünitesi, CTO-10-ASvp model kolon fırını, SPD-M20A model foto diyot dizisi dedektörü ve DGU-20A5 model gaz giderme ünitesinden oluşan Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü YPSK cihazının yanında Intel Pentium 4 işlemcili bilgisayar ve Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılmıştır.

Spektrofotometrik çalışmalar Shimadzu (Japonya) marka UV-2450 UV-Vis spektrofotometrede yapılmıştır. Ölçümlerde 1 cm ışık yoluna sahip kuvars küvetler kullanılmıştır.

Kimyasal maddelerin tartımında Ohaus (İsviçre) marka Explorer E12140 model analitik terazi, çözeltilerin hazırlanmasında 100-1000  $\mu\text{L}$  ve 20-100  $\mu\text{L}$  aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) marka Research model pipetörler, çözeltilerin partiküllerinden ayrılmasında Eppendorf (Almanya) marka 5810R model santrifüj aleti, çözeltilerin içindeki çözünmüş gazın uzaklaştırılması için Bandelin (Almanya) marka RK 100H model ultrasonik banyo ve çözeltilerin pH'ını ayarlama Seven multi, Mettler Toledo (İsviçre) marka pH metre kullanılmıştır.

YPSK yönteminde analiz sırasında kullanılan Chromolith<sup>®</sup> High Resolution RP-18e (100×4.6 mm) ve Chromolith<sup>®</sup> Performance RP-18e, (100×4.6 mm) kolonlar Merck (Almanya), C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 100×4.6 mm) kolon Fortis (İngiltere) firmasının ürünleridir.

## YÖNTEMLER

### UV-Görünür Alan Spektrofotometrisi Yöntemi

#### *Standart çözeltilerin hazırlanışı*

UV-spektrofotometrik yöntemde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler için ayrı ayrı 21.4 mg IRB ve 14.5 mg HCT tartılmıştır. Her bir standart madde ayrı balon jodelerde 50 mL saf EtOH içerisinde çözülerek yaklaşık  $1 \times 10^{-3}$  M (IRB için  $9.99 \times 10^{-4}$  M, 0.428 mg/mL; HCT için  $9.74 \times 10^{-4}$  M, 0.290 mg/mL) seviyesinde çözeltiler elde edilmiştir.

Seyreltme işlemlerinde 3 M HCl:Su:Etanol (10:70:20, v/v/v) bileşimine sahip seyreltme çözeltisi kullanılmıştır.  $9.99 \times 10^{-4}$  M'lık IRB çözeltisinden 2 mL alınıp seyreltme çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanarak  $1.99 \times 10^{-4}$  M (0.0853 mg/mL) derişimdeki stok çözelti elde edilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri ise bu stoktan seyreltme çözeltisi kullanılarak  $1.99 \times 10^{-6}$ - $1.99 \times 10^{-5}$  M (0.853-8.53 µg/mL) aralığında hazırlanmıştır. Benzer uygulamalar HCT için de gerçekleştirilmiş ve  $3.90 \times 10^{-6}$ - $3.90 \times 10^{-5}$  M (1.16-11.6 µg/mL) aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır.

#### *Analiz parametreleri*

UV-spektrofotometrisi ile yapılan ölçümlerde maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunu tespit edebilmek amacıyla spektrum taraması yapılmıştır. Analiz sırasındaki aletsel parametreler aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 1. Analiz sırasındaki UV parametreleri**

Parametre	Değer
Tarama aralığı	190-400 nm
Ölçüm modu	Absorbans
Tarama modu	Tek
Tarama hızı	Orta
Örnekleme aralığı	0.2 nm
Işık yolu uzunluğu	1.0 cm
Aralık genişliği	0.5 nm

#### **YPSK Yöntemi**

#### *Standart çözeltilerin hazırlanışı*

HCT standart stok çözeltisi için 7.5 mg standart madde tartılıp 50 mL balon jodede %25 ACN kullanılarak çözülmüştür.  $5.04 \times 10^{-4}$  M (0.150 mg/mL) derişiminde çözelti elde edilmiştir.

IRB standart stok çözeltisi için 18 mg standart madde tartılıp 50 mL balon jodede %25 ACN kullanılarak çözülmüştür.  $8.40 \times 10^{-4}$  M (0.360 mg/mL) derişiminde çözelti elde edilmiştir.

IRB standart stok çözeltisinden 10 mL ve HCT standart stok çözeltisinden 1 mL alınıp %25 ACN ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde IRB ve HCT içeren ikili karışım elde edilmiştir. Çözeltideki IRB derişimi  $3.36 \times 10^{-4}$  M (0.144 mg/mL), HCT derişimi ise  $2.02 \times 10^{-5}$  M (6.01 µg/mL)'dir.

IS olarak kullanılan AGO standart stok çözeltisi için 2 mg standart madde tartılıp 25 mL balon jode %25 ACN kullanılarak çözülmüştür.  $3.29 \times 10^{-4}$  M (0.0800 mg/mL) derişiminde çözeltili elde edilmiştir.

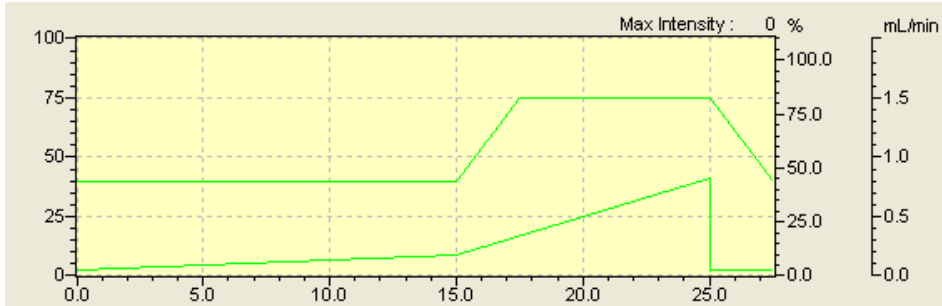
### ***Hareketli fazın hazırlanışı***

Analizler boyunca değişken hareketli fazla elüsyon yapılmıştır. Hareketli faz ACN, 0.025 M pH 6.3 fosfat tamponu ve YPSK saflıktaki su karışımından oluşmaktadır. 0.025 M pH 6.3 fosfat tamponu için 1503.0 mg %99.8 saflıktaki  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve 503.5 mg %99.6 saflıktaki  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılarak 500 mL YPSK saflıktaki suda çözülmüştür. Çözelti içindeki çözülmüş gazların uzaklaştırılması için yaklaşık 5 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Belirtilen çözücülerin istenen oranlarda karıştırılarak sisteme verilmesi YPSK cihazının pompa ünitesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### ***Analiz parametreleri***

YPSK analizleri için ACN, fosfat tamponu ve YPSK saflığında sudan oluşan değişken hareketli faz, sisteme yine değişken akış hızıyla verilmiştir.

Analiz başlamadan önce ACN:Su:Tampon (0.025 M pH 6.3 fosfat tamponu) (3:87:10, v/v/v) bileşimine sahip hareketli faz 0.8 mL/dk akış hızı ile sisteme verilirken, analiz süresince şu programa göre düzenlenmiştir: Analiz boyunca tampon oranı %10 oranında sabit tutulmuştur. ACN oranı ilk 15 dk boyunca %3'ten %10'a, 15-25 dk arasında %10'dan %45'e çıkarılmış ve 25-27.5 dk arasında tekrar %3'e düşürülmüştür. Akış hızı ise ilk 15 dk 0.8 mL/dk'da sabit tutulmuş, 15-17.5 dk arasında 1.5 mL/dk'ya çıkarılmış ve 25. dk'ya kadar 1.5 mL/dk'da sabit tutulmuştur. 25-27.5 dk arası ise tekrar 0.8 mL/dk'ya düşürülmüştür.



**Şekil 5. Değişken hareketli faz sistemi**

Analizlerde monolitik silika bazlı kolonların yeni nesil bir örneği olan Chromolith® High Resolution RP-18e (100×4.6 mm) kolon, Chromolith® Performance RP-18e (100×4.6 mm) kolon ve Fortis C<sub>18</sub> kolon (5µm, 100×4.6 mm) kullanılmıştır.

Enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 40°C olarak uygulanmıştır. Analitlerin dedektör yanıtları 230 nm dalga boyuna ayarlı foto diyot dizisi dedektör ile

ölçülmüştür. Ayrıca dedektör sinyal toplama frekansı 6.25 Hz ve slit genişliği 1.2 nm'dir.

### **Örnek Çözeltilerin Hazırlanışı**

#### ***Tablet çözeltisinin hazırlanışı***

10 tane Co-İrda® (Nobel İlaç A.Ş.) ilaç tableti (300 mg IRB/12.5 mg HCT) tek tek hassas terazide tartılmış ve ortalama tablet ağırlığı hesaplanmıştır. 10 tabletin hepsi kapsülde toz haline getirilmiştir.

UV-görünür alan spektrometrik yöntem için toz haline getirilmiş tabletlerden ortalama tablet ağırlığına (0.6167 g) eşit miktar tartılıp 100 mL seyreltme çözeltisinde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 4000 rpm hızda 10 dk santrifüjlenmiştir. Üstte kalan berrak kısım 0.45 µm PVDF filtreden süzölmüştür. Hazırlanan çözelti içerisindeki teorik IRB derişimi  $7.0 \times 10^{-3}$  M ve HCT derişimi  $4.2 \times 10^{-4}$  M olarak hesaplanmıştır. Elde edilen tablet çözeltisi IRB için 1:1000, HCT için 1:100 oranında seyreltme çözeltisi ile seyreltilip spektrumları alınmıştır.

YPSK analizleri için toz haline getirilmiş tabletlerden ortalama tablet ağırlığına (0.6167 g) eşit miktar tartılıp 100 mL %25 ACN'de çözülmüştür. Bu çözelti 4000 rpm hızda 10 dk santrifüjlenmiştir. Üstte kalan berrak çözelti 0.22 µm gözenek çaplı PVDF filtreden süzölmüştür. Elde edilen çözelti 1:5 oranında %25 ACN ile seyreltilmiştir. Çözelti içerisindeki IRB derişimi  $1.40 \times 10^{-3}$  M (0.6 mg/mL) ve HCT derişimi  $8.40 \times 10^{-5}$  M (0.025 mg/mL) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen tablet çözeltisi vial içerisinde 50:1000 oranında %25 ACN ile seyreltilip sisteme verilmiştir.

#### ***İdrar numunesinin hazırlanışı***

Analizi yapılacak idrar numuneleri sağlıklı bireylerden temin edilmiştir. İdrar numunesinden 10 mL kadar alınıp 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Üst kısımdaki berrak çözelti 0.22 µm gözenek çaplı PVDF filtreden süzölmüştür. Süzölen idrardan 1 mL alınarak YPSK saflıktaki su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Analizler 1:10 oranında seyreltilmiş idrar numuneleri üzerinden yürütölmüştür.

#### **Sonuçların Değerlendirilmesi**

Analizler sonucunda elde edilen her kromatogramdan IRB ve HCT'nin pik normalizasyonu yöntemiyle PN değerleri hesaplanmış ve bu değerler IS pikinin PN değerine oranlanarak analizlerdeki hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır. PN değerleri ve çözeltilerin derişimlerinden yola çıkılıp doğrusallık denklemleri kullanılarak yöntemin LOD ve LOQ değerleri, IRB ve HCT'nin tabletlerdeki ve idrardaki miktarları hesaplanmıştır.

#### **Yöntem Geçerliliğinin Tespiti (Validasyon)**

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'nın (ICH) tavsiye ettiğii şekilde validasyon işlemleri geliştirilen yöntem uygulanmış ve yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı gösterilmiştir. Yöntemin validasyonu için ICH kılavuzunda da belirtildiğii şekilde spesifiklik, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri yapılmıştır.

### ***Sistem uygunluk testleri***

Analizler sırasında kullanılan YPSK cihazının ve analiz kolonlarının performansını gösteren sistem uygunluk parametrelerinin hesaplanması yöntem geliştirme basamağında oldukça önemlidir. Ayırım gücü ( $R_s$ ), kuyruklanma ( $T$ ) ve asimetri faktörü ( $A_s$ ), teorik tabaka sayısı ( $N$ ), kapasite faktörü ( $k$ ) ve seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) gibi parametreler sistem uygunluk parametrelerini oluşturur. Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri IRB, HCT ve IS için USP metoduna göre Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan formüller **Çizelge 2'**de verilmiştir.

### ***Doğrusallık***

Derişime karşı analit cevabının geliştirilen yöntemde doğru orantılı olarak değiştiği ve korelasyon katsayısı ( $r$ ) ile ifade edilen bir parametredir. Analizlerde HCT ( $1.008 \times 10^{-6}$ ,  $2.015 \times 10^{-6}$ ,  $4.030 \times 10^{-6}$ ,  $6.046 \times 10^{-6}$ ,  $8.061 \times 10^{-6}$  ve  $1.008 \times 10^{-5}$  M) ve IRB ( $1.680 \times 10^{-5}$ ,  $3.360 \times 10^{-5}$ ,  $6.721 \times 10^{-5}$ ,  $1.008 \times 10^{-4}$ ,  $1.344 \times 10^{-4}$  ve  $1.680 \times 10^{-4}$  M) için derişime karşı analit cevabının yer aldığı grafikler elde edilmiştir. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve doğrusal regresyon analiziyle eğim, kesim, korelasyon katsayısı, eğim ve kesim değerlerinin %95 güven seviyesindeki olası sınırları hesaplanmıştır. Bunların yanı sıra gruplar arası uyum, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

### ***Doğruluk***

Analizler sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Geri kazanım çalışmalarında gerçek değere ne kadar yaklaşıldığının bir göstergesidir. Boş idrar ve önceden analizlenmiş tablet çözeltisi içerisine düşük, orta ve yüksek seviyelerine denk gelecek şekilde IRB ve HCT ilave edilmiştir. Her derişim seviyesi için üçer set hazırlanıp analizlenmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

### ***Kesinlik***

Geliştirilen YPSK yöntemiyle analizi yapılan etken maddelerin sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Kesinlik çalışmaları günler içi ve günler arası deneyleri içermektedir. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan  $3.360 \times 10^{-5}$  M IRB ve  $2.015 \times 10^{-6}$  M HCT derişimdeki çözeltileri ( $n=8$ ) aynı gün içerisinde ve ardışık üç gün süre ile belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde ortalama, ortalamanın standart hatası (SEM), SS, %BSS, ortalamanın %95 güven seviyesindeki olası sınırları olarak verilmiştir. Bunların yanı sıra gruplar arası uyum, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

### ***Saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ)***

Saptama sınırı (LOD), analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği, ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt derişim

olarak değerlendirilmektedir. Tayin alt sınırı (LOQ) ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği,

Çizelge 2 . USP eşitlikleri

Parametre	Eşitlik	
$N$	$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$	$N$ : teorik tabaka sayısı $t_R$ : alıkonma zamanı $W$ : pik genişliği
$T$	$T = \frac{W_{0.05}}{2 \times \alpha_{0.05}}$	$T$ : kuyruklanma faktörü $W_{0.05}$ : pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$ : pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
$As$	$As = \frac{\beta_{0.10}}{\alpha_{0.10}}$	$As$ : asimetri faktörü $\beta_{0.10}$ : pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0.10}$ : pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
$Rs$	$Rs = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$	$Rs$ : ayırım gücü $t_R$ : alıkonma zamanı $t_{Rp}$ : önceki pikin alıkonma zamanı $W$ : pik genişliği $W_p$ : önceki pikin pik genişliği
$k'$	$k' = \frac{t}{t_0} - 1$	$k'$ : kapasite faktörü $t$ : alıkonma zamanı $t_0$ : ölü zaman
$\alpha$	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$	$\alpha$ : bağıl alıkonma zamanı $k'_1$ : birinci pikin kapasite faktörü $k'_2$ : ikinci pikin kapasite faktörü $t_1$ : birinci pikin alıkonma zamanı $t_2$ : ikinci pikin alıkonma zamanı $t_0$ : ölü zaman



doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyi olarak bilinir. LOD ve LOQ değerleri, ICH'ın tavsiye ettiği standart sapma ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanarak hesaplanmıştır. Kesimin standart sapmasının eğime oranının kullanıldığı hesaplamalarda elde edilen oran değeri saptama sınırı için 3.3, tayin sınırı için ise 10 ile çarpılmıştır. Hesaplama kullanılan istatistiksel veriler doğrusallığın günler arası çalışmalarından elde edilmiştir.

### ***Spesifiklik***

Yöntemin seçiciliği, analizi yapılacak numunede var olan ve bu maddeyle girişim yapabilecek safsızlıkların yanında analiz edilmek istenen maddenin ölçülebilme yeteneği olarak değerlendirilir. IRB ve HCT safsızlıklarının muhtemel etkisini ve tabletlerdeki katkı maddelerinin oluşturabileceği girişimleri incelemek için üç farklı analiz kolonu ile araştırmalar yapılmıştır. Her bir kolon ile elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmış ve herhangi bir pozitif ya da negatif girişime rastlanmamıştır. Ayrıca analitlerin ve IS piklerinin saflıkları PDA dedektör ile kontrol edilmiştir.

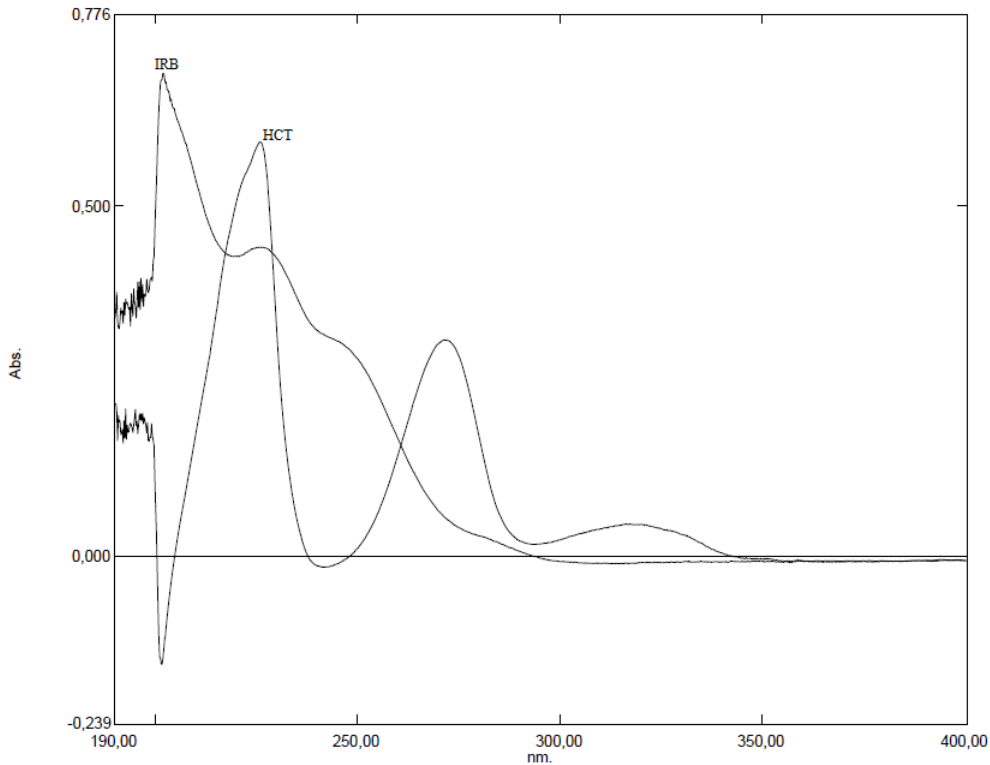
## BULGULAR ve TARTIŞMA

IRB ve HCT'nin farmasötik preparatlardan ve biyolojik numuneden eş zamanlı analizi için yüksek ayırma gücü, doğruluk ve tekrar edilebilirlik özelliklerinden dolayı YPSK tekniği temel alınmıştır. Maddelerin analiz çalışmalarına yöntem geliştirme işlemleri ile başlanmıştır. Yöntem geliştirme sırasında özgün bir çalışma elde edebilmek için hareketli ve sabit fazın seçimi, en uygun analiz koşullarının belirlenmesi ve yöntemin geçerliliğinin sağlanmasından sonra, geliştirilen yöntem ticari tabletlere ve bu etken maddelerin idrardan analizine uygulanmıştır. Geliştirilen YPSK yöntemiyle elde edilen tablet analiz sonuçları UV-spektrofotometri yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

### İrbesartan ve Hidroklorotiazid'in UV Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

Maddelerin tabletlerdeki miktar tayinlerini belirlemek için yapılan çalışmalara evrensel bir yöntem olan UV-görünür alan spektrofotometrisi kullanılarak UV ve görünür bölgedeki davranışlarını incelemekle başlanmıştır. IRB ve HCT'nin her ikisinin de saf suda tamamen çözünmediği fakat alkol içerisinde çözüldüğü dikkate alınarak EtOH içerisinde  $9.99 \times 10^{-4}$  M IRB ve  $9.74 \times 10^{-4}$  M HCT standart stok çözeltileri hazırlanmıştır.

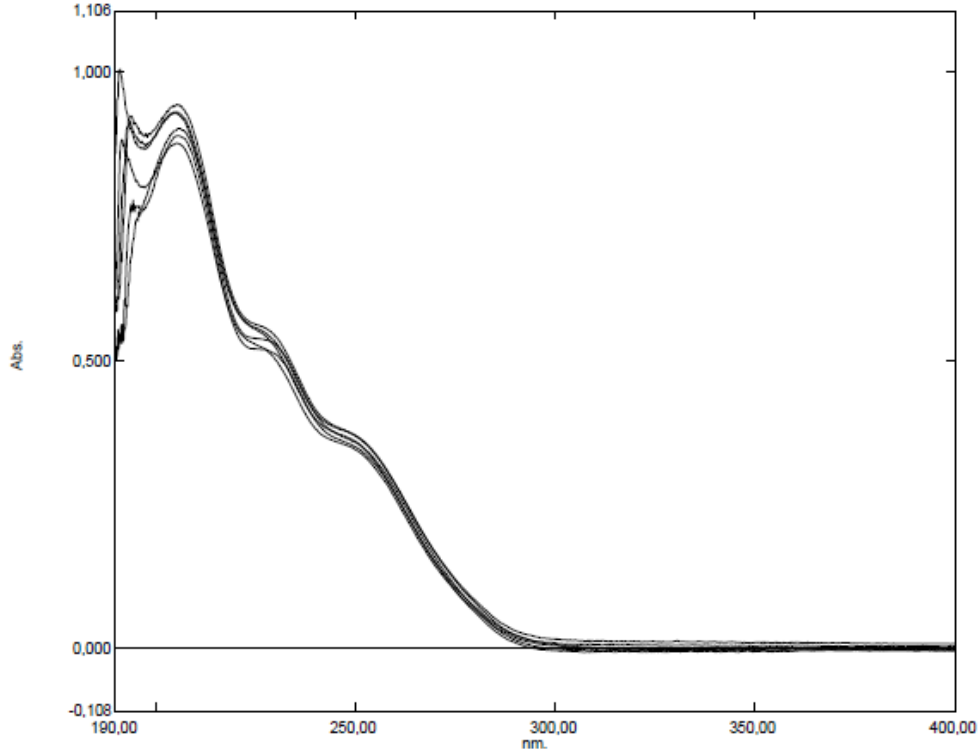
IRB ve HCT'nin eş zamanlı olarak analizlenebilmesi için birbirleriyle girişim yapmadıkları ve en verimli sonuçların alınabileceği dalga boyları seçilmek zorundadır. Bu durum dikkate alındığında, maddelerin standart stok çözeltilerinden uygun seyreltmeler yapılarak spektrumları alınmış ve bu spektrumlar üst üste getirilerek eş zamanlı analizi mümkün kılacak dalga boyları seçilmiştir.



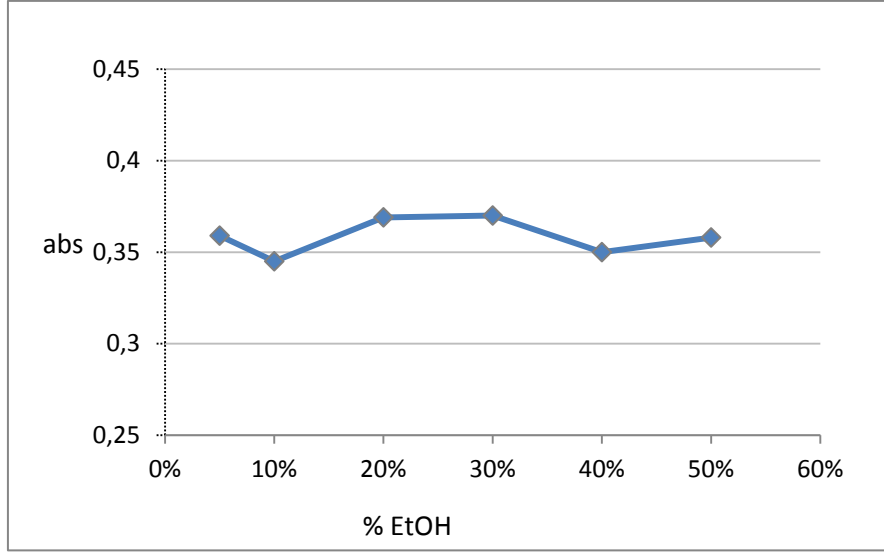
Şekil 6.  $1.95 \times 10^{-5}$  M HCT ve  $1.99 \times 10^{-5}$  M IRB spektrumları

Spektrumdan da görüldüğü üzere IRB 206 ve 226 nm’de belirgin tepe noktaları verirken HCT varlığında IRB analizi ancak 250 nm’de mümkün görünmektedir. Çünkü, 206 nm’de en yüksek absorbanı vermesine rağmen, ileri aşamalarda ortam asitlendirildiğinde pikin şekli bozulmaktadır. 226 nm’de ise HCT’nin 226 nm’de verdiği pikle örtüşmekte ve bu dalga boyunda analizi mümkün olmamaktadır. Aynı şekilde HCT 271 ve 320 nm’de en yüksek absorbanları verirken IRB varlığında analizi 226 nm’de gerçekleştirilebilmektedir. Burada ise, tablet içerisindeki HCT miktarının IRB’ye göre önemli ölçüde az olması ve düşük derişimlerde dahi sinyal alınabilmesi için en yüksek absorbanı yaptığı dalga boyu seçilmiştir.

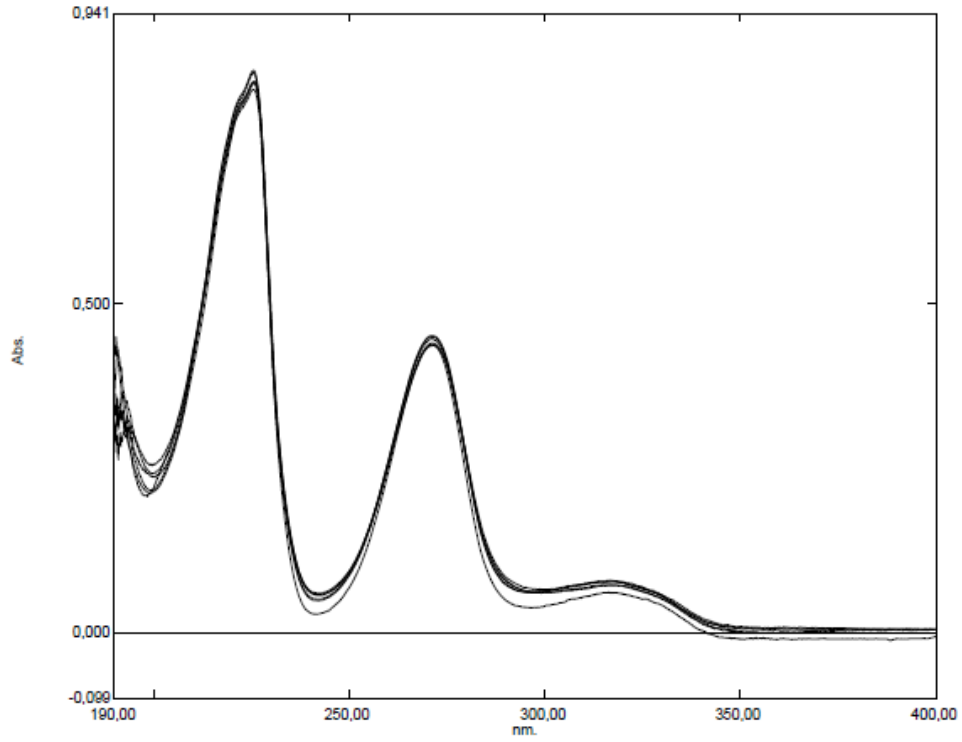
IRB ve HCT standart çözeltileri başlangıçta %100 EtOH ile hazırlanmıştır. Fakat bu durum çalışmanın maliyetini oldukça yükseltecektir. Analiz maliyetlerini düşürebilmek adına, belirli oranlarda EtOH içeren çözeltilerin kullanılmasının IRB ve HCT’nin spektrumları üzerine nasıl etki ettiğinin incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Çalışmanın bu kısmında değişik oranlarda EtOH içeren çözeltiler hazırlanarak düşük EtOH içeriği ile olabildiğince verimli sonuçların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için  $9.99 \times 10^{-4}$  M IRB ve  $9.74 \times 10^{-4}$  M HCT standart stok çözeltilerden yüzde 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 EtOH içerecek şekilde ve her biri aynı derişimde olan yeni çözeltiler hazırlanıp spektrumları alınmıştır.



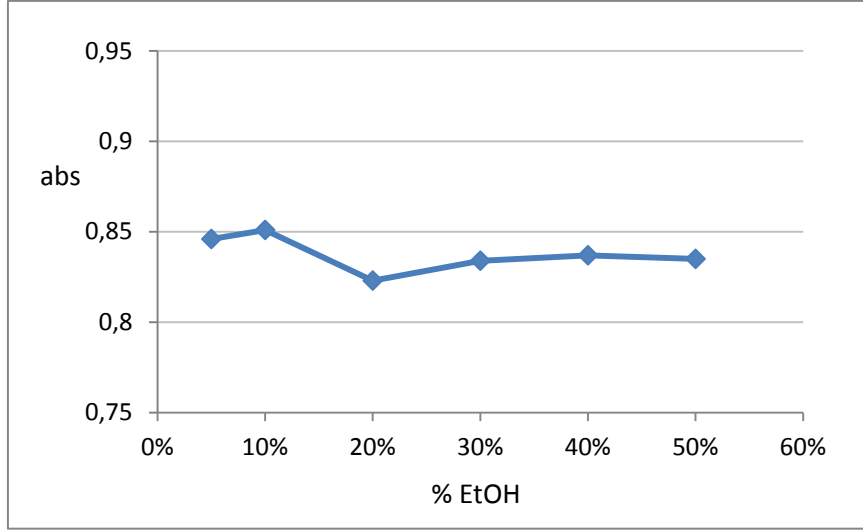
Şekil 7. EtOH yüzdesi değişiminin  $1.99 \times 10^{-5}$  M IRB’ye etkisi



Şekil 8. IRB için yüzde EtOH-absorbans ilişkisini gösteren grafik (sinyaller 250 nm’de kaydedilmiştir)



Şekil 9. EtOH yüzdesi değişiminin  $1.97 \times 10^{-5}$  M HCT’ye etkisi

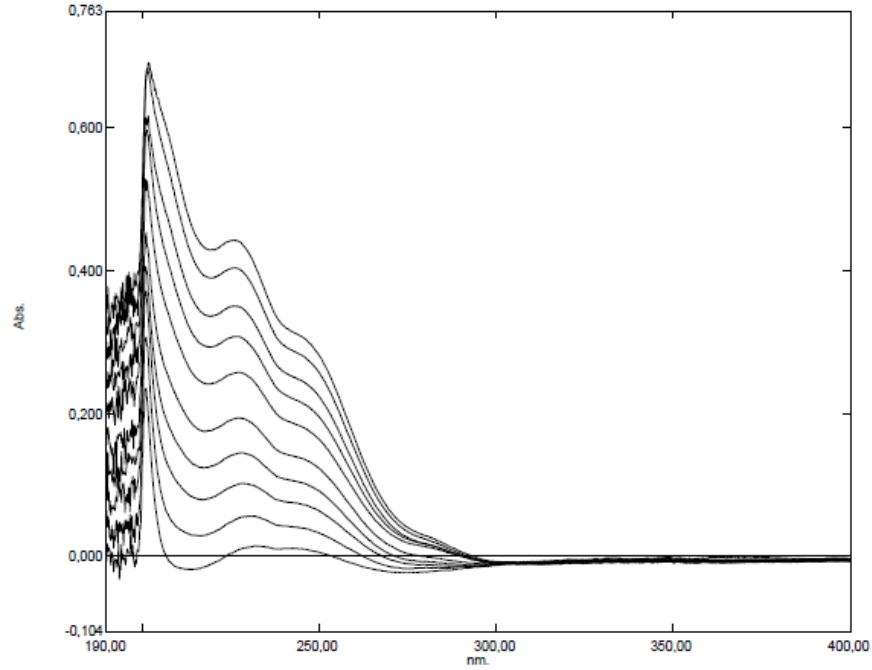


Şekil 10. HCT için yüzde EtOH-absorbans ilişkisini gösteren grafik (sinyaller 226 nm’de kaydedilmiştir)

Bu spektrumlar yardımıyla, IRB için 250 nm’de ve HCT için 226 nm’de absorbanslar okunmuştur. Okunan değerler yüzde EtOH değişimi-absorbans grafiğine geçirilmiştir. IRB’nin %5-20 ve %30-50 EtOH içeren çözeltilerinin absorbanslarında %20-30 EtOH içeren çözeltilerinkine göre daha belirgin farklar oluşmuştur. %20-30 EtOH içeren çözeltilerdeki absorbanslar birbirine çok yakın olduğu ve maksimum absorbansları verdikleri için kabul edilebilirdir. HCT’de ise, %5-20 EtOH içeren çözeltilerin absorbansında bir dalgalanma mevcuttur. Fakat %20-50 EtOH içeren çözeltilerin absorbansları hemen hemen sabit kalmıştır. Her iki madde için ortak düşüldüğünde, madde sarfiyatının en az olacağı, aynı zamanda maksimum absorbansların elde edilebileceği koşullar seçilmelidir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda uygun aralığın yüzde 20-30 EtOH içeren çözelti olduğu görülmüş ve %20 EtOH ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Önceki çalışmalarda, çözücü olarak sadece alkol içeren çözeltinin spektrumu ve çözücünün asidik veya bazik karakterli olduğu bir çözelti spektrumuyla karşılaştırıldığında maddelerin verdiği absorbansların farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu spektrumlar dikkate alındığında maddelerin maksimum absorbans verdiği spektrumun asidik çözelti olduğu görülmüştür (Moffat ve ark., 2011; Joseph-Charles ve ark., 2003). EtOH içeren çözeltinin nötral özelliklere sahip olmasından dolayı çözeltinin asitliğini arttırmak için ortama HCl eklenmesine karar verilmiştir. Ortamın asitliği 3 M HCl ile sağlanmıştır.

Bir sonraki basamakta IRB ve HCT’nin maksimum absorbans verdiği dalga boylarında derişime bağlı doğrusal yanıtlar verip vermediği araştırılmıştır. Her iki madde için de bir seri çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. IRB kalibrasyon seti için  $9.99 \times 10^{-4}$  M’lık standart stok çözeltisi kullanılarak %10 HCl ve %20 EtOH içeren  $1.99 \times 10^{-6}$ - $1.99 \times 10^{-5}$  M aralığında on tane çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin kör çözeltiye (%10 HCl ve %20 EtOH içeren sulu çözelti) karşı 190-400 nm arasında spektrumları alınmıştır.

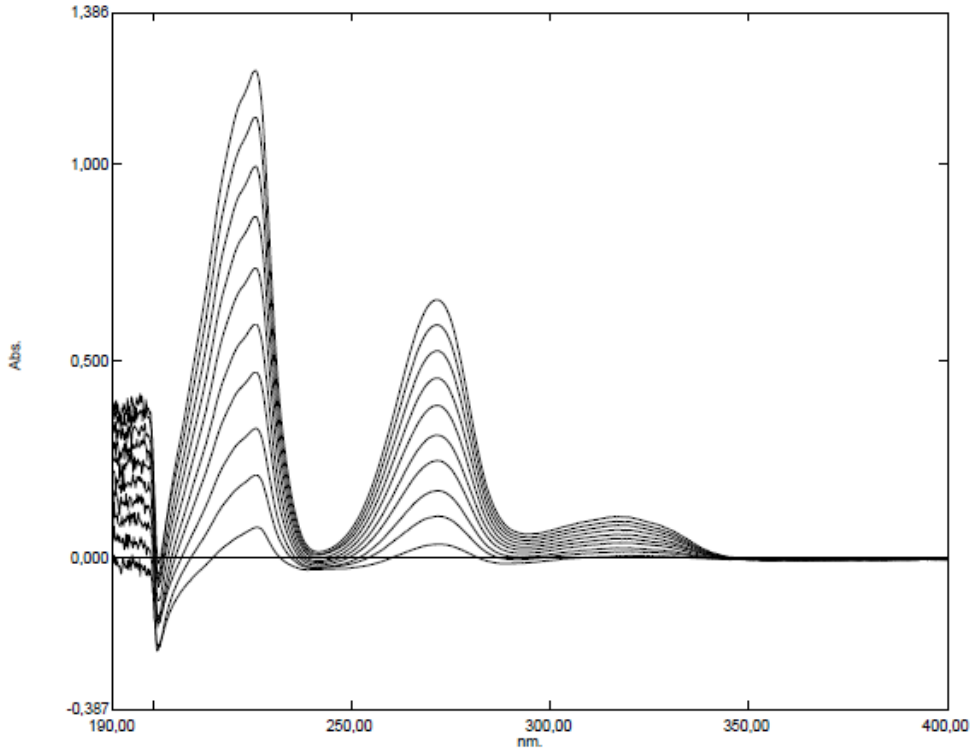


**Şekil 11.  $1.99 \times 10^{-6}$ - $1.99 \times 10^{-5}$  M derişim aralıında %10 HCl ve %20 EtOH ieren IRB çözeltilerinin kalibrasyon spektrumu**

250 nm'de yapılan kalibrasyon sonucunda elde edilen absorbands değerleri, derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. IRB için elde edilen bu kalibrasyon grafiği ile  $A=15878C - 0,0295$  (A: absorbands, C: molarite cinsinden derişim) denklemine uyan  $r=0.9991$  korelasyon katsayısına sahip doğrusallık elde edilmiştir. IRB'nin UV spektrofotometrik yöntemle tayini için 250 nm'de gözlenen pikin analitik açıdan değerlendirilebilir olduğu ve bu derişim aralıında duyarlı tayinlerin yapılabilereği sonucuna varılmıştir.

HCT kalibrasyon seti için  $9.74 \times 10^{-4}$  M'lık standart stok çözeltileri kullanılarak %10 HCl ve %20 EtOH ieren  $3.90 \times 10^{-6}$ - $3.90 \times 10^{-5}$  M aralıında on tane çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin kör çözeltilere (%10 HCl ve %20 EtOH ieren sulu çözeltiler) karşı 190-400 nm arasında spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrum Şekil 12'de verilmiştir.

226 nm'de yapılan kalibrasyon sonucunda elde edilen absorbands değerleri, derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. HCT için elde edilen kalibrasyon grafiği ile  $A=33386C - 0,0539$  (A: absorbands C: molarite cinsinden derişim) denklemleri ve  $r=0.9998$  korelasyon katsayısına sahip doğrusallık elde edilmiştir. HCT'nin UV spektrofotometrik yöntemle tayini için 226 nm'de gözlenen pikin analitik açıdan değerlendirilebilir olduğu ve bu derişim aralıında duyarlı tayinlerin yapılabilereği sonucuna varılmıştir.



Şekil 12.  $3.90 \times 10^{-6}$ - $3.90 \times 10^{-5}$  M derişim aralıında %10 HCl ve %20 EtOH içeren HCT çözeltilerinin kalibrasyon spektrumu

IRB ve HCT için yapılan kalibrasyon çalışmalarının sonuçları Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. IRB ve HCT için doğrusallık çalışmalarının sonuçları

	HCT	IRB
Aralık (M)	$3.900 \times 10^{-6}$ - $3.900 \times 10^{-5}$	$1.990 \times 10^{-6}$ - $1.990 \times 10^{-5}$
Eğim	$33386 \pm 203.6$	$15878 \pm 230.3$
Kesim	$-0.05393 \pm 0.004927$	$-0.02952 \pm 0.002841$
r	0.9998	0.9991
LOQ (M)	$1.476 \times 10^{-6}$	$1.789 \times 10^{-6}$
LOD (M)	$4.870 \times 10^{-7}$	$5.904 \times 10^{-7}$

### İrbesartan ve Hidroklorotiazid'in YPSK Yöntemi ile Analizi

#### Yöntem geliştirme

YPSK analizleri için yapılan yöntem geliştirme işlemlerine, IRB ve HCT'nin kimyasal yapıları ve özellikleri, geçmişte yapılan çalışmalar ve güncel gelişmeler dikkate alınarak hareketli faz ve kolon (sabit faz) seçimiyle başlanmıştır.

Sağlam, basit, hızlı testler geliştirmek amacıyla, yeni ve gelişmiş analitik enstrümanların kullanımı günümüz uygulamalarında önemli bir noktadır. Bu durumda etkili ayırımı geliştirmek için temel yollardan biri, 2 µm'nin altında partiküllere sahip monolitik, polimerik yada hibrit materyalli yeni sabit fazlar kullanmaktır. 2 µm'nin altında partikülleri ve çok dar boşluklarıyla bu kolonlar düşük çözücü tüketimi, daha yüksek kolon verimi ve daha düşük analiz süresi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca monolitik kolonlar, basınç düşmesi yönünden geleneksel C<sub>18</sub> kolonlar ile karşılaştırıldığında, içindeki tek bir monolitik silika çubuğuna sahip eşsiz yapısıyla basınç problemlerini ortadan kaldırır. 3 mL/dk ve daha fazla akış hızında monolitik kolonlar sıradan YPSK sistemleri ile farmasötiklerin analizinde yaygın olarak kullanılır. Yeni hibrit ve polimerik materyal ile dolu kolonlar, özellikle geniş pH aralığı ve etkili ayırımlar için diğer bir seçenektir. Chromolith® YPSK kolonlar, standart bir partiküllü kolonun ayırım süresiyle karşılaştırıldığında mükemmel ayırımlar sağlar, çünkü, çift durumlu bir yapıya sahip, oldukça porlu, monolitik silika çubuklardan yapılmışlardır. Kolon küçük partiküller halinde doldurulmak yerine, tek bir parça, yüksek saflıkta silika jelden oluşmuştur. Daha uzun ömürlü olması ve biyolojik numuneler ile daha düşük matris hassasiyeti göstermesi, Chromolith® kolonların ek avantajlarıdır (Can, 2011; Can ve Arlı, 2010; [http-1](http://1)). Ayrıca monolitik silika bazlı kolonların yeni nesli olan yüksek ayırma sahip Chromolith® HR kolonlar birinci nesil kolonların yaptığı ayırımı daha iyi gerçekleştirmesi, pik simetrisinin daha iyi olması ve makropor boyutunun yaklaşık 1.1 µm civarında olmasından dolayı tercih edilebilir ([http-2](http://2)).

Monolitik silika bazlı kolonların yukarıda bahsedilen avantajları doğrultusunda analizlerde monolitik silika bazlı kolon teknolojisinin yeni geliştirilmiş ürünlerinden olan Chromolith® High Resolution RP-18e (100×4.6 mm), birinci nesil monolitik silika bazlı bir kolon olan Chromolith® Performance RP-18e, (100×4.6 mm) ve Fortis C<sub>18</sub> (5 µm, 100×4.6 mm) kolon kullanılmıştır. Kolonların özellikleri birbirleri ile karşılaştırmalı olarak **Çizelge 4**'te verilmiştir. Analizlere birinci nesil monolitik kolon (Chromolith® Performance RP-18e) ile başlanmıştır.

Sıvı kromatografisindeki en önemli bileşenlerden biri olan hareketli fazın seçimi aşamasında YPSK analizlerinde genel kullanıma sahip çözücülerden olan metanol, ACN, su ve çeşitli tampon tiplerini içeren çözeltiler hareketli faz olarak denenmiştir. IRB düşük polaritede (log P = 10.1) ve HCT yüksek polaritede (log P=-0.1) maddelerdir. Analiz süresi içerisinde iki maddenin de birbirinden ayrılmış bir şekilde kolondan çıkmalarını sağlamak için, ilk olarak, düşük polarlıktan yüksek polarlığa doğru ACN içeren hareketli faz denenmiştir. %50 ACN içeren hareketli faz kullanıldığında HCT piki 1.577 dk'da, IRB piki ise 1.843 dk'da kolondan çıkmıştır. Piklerin birbirlerine çok yakın ve alıkonma zamanlarının çok düşük olmasından dolayı analitlerin kolondan elüsyonlarının daha ileri dakikalara kaydırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Çünkü çalışmanın ileri aşamalarında analizlenecek olan ilaç tabletleri ve bu maddelerin idrardan analizleri sırasında analizin ilk dakikalarında tablet veya idrardan gelen maddelerin verdiği pikler ile girişim yapabilirler.



Çizelge 4. Kolonların özellikleri

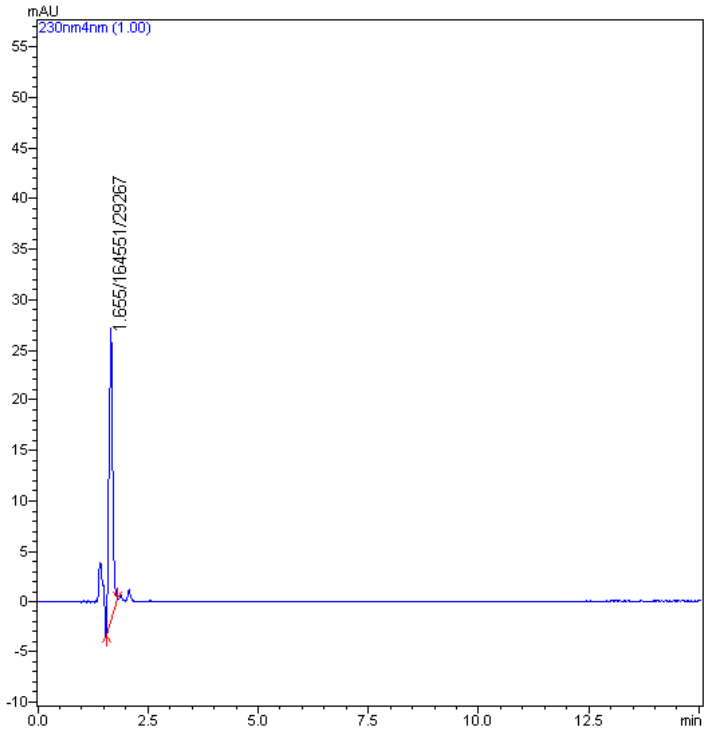
	<b>Chromolith®HR, RP-18e</b>	<b>Chromolith®, RP-18e</b>	<b>Fortis C<sub>18</sub></b>
<b>Partikül boyutu</b>	-	-	5 µm
<b>Kolon uzunluğu</b>	100 mm	100 mm	100 mm
<b>Kolon iç çapı</b>	4.6 mm	4.6 mm	4.6 mm
<b>Makropor/ Mezopor Büyükülüğü</b>	1.15 µm / 15 nm	1.5 µm / 13 nm	-
<b>Yüzey Alanı (m<sup>2</sup>/g)</b>	250	250	380
<b>Karbon Yüzdesi (%)</b>	18	18	17
<b>Toplam Geçirgenlik (%)</b>	-	80	-
<b>Por Hacmi</b>	1 mL/g	1 mL/g	-
<b>0.8 mL/dk'de Kolon Basıncı</b>	37 bar	11 bar	28 bar
<b>1.5 mL/dk'de Kolon Basıncı</b>	69 bar	20 bar	56 bar
<b>pH aralığı</b>	2.0-7.5	2.0-7.5	1.0-11.0

IRB ve HCT'nin en azından analiz ilk dakikalarında kolonda tutunması sağlanıp bu girişimlerin engellenebileceği düşünülmüştür. Bu noktada hareketli fazın polaritesinin artırılmasının alıkonma zamanları üzerine etkisi incelenmiştir. Sabit sıcaklık (40°C) ve sabit akış hızında (1.0 mL/dk) yüzde 40, 30, 20, 15 ACN ve %10 pH 2 fosfat tamponu içeren hareketli fazlar denenmiştir. İncelemelerde  $3 \times 10^{-5}$  M derişimde IRB ve HCT içeren kalite kontrol çözeltileri kullanılmıştır.

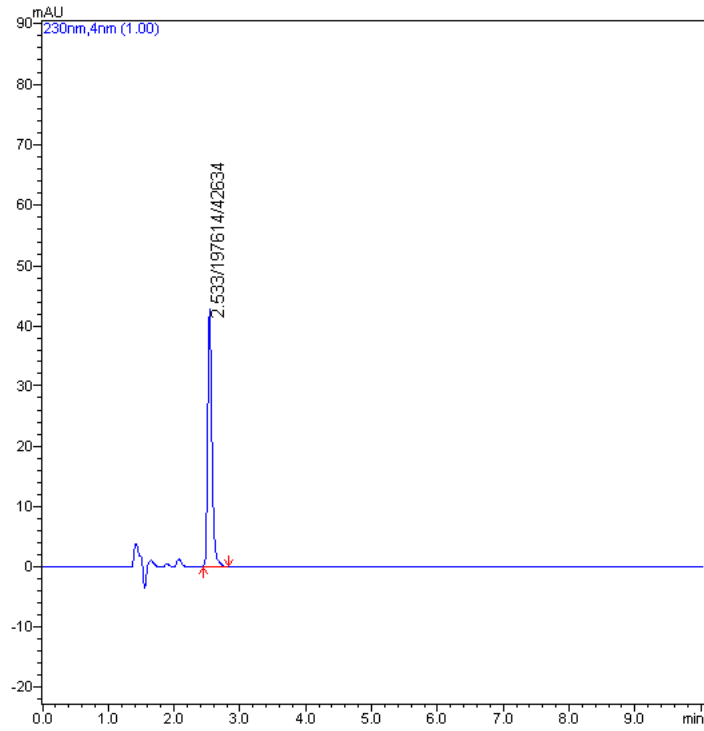
ACN değişiminin maddelerin alikonma zamanlarına etkisinin sonuçları **Çizelge 5**'te verilmiştir.

**Çizelge 5. ACN değişiminin IRB ve HCT'nin alikonma zamanlarına etkisi**

HAREKETLİ FAZ	MADDE	ALIKONMA ZAMANI (dk)	ALAN
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (40:50:10, v/v/v)	IRB	1.843	200801
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (50:40:10, v/v/v)	IRB	2.533	197614
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (60:30:10, v/v/v)	IRB	5.759	198810
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (80:20:10, v/v/v)	IRB	6.25	200477
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (75:15:10, v/v/v)	IRB	Pik gözlenmedi	
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (40:50:10, v/v/v)	HCT	1.577	158141
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (50:40:10, v/v/v)	HCT	1.655	164551
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (60:30:10, v/v/v)	HCT	1.798	127231
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (80:20:10, v/v/v)	HCT	2.134	139783
Su: ACN: Fosfat tamponu (0.025 M, pH=2) (75:15:10, v/v/v)	HCT	2.528	142242

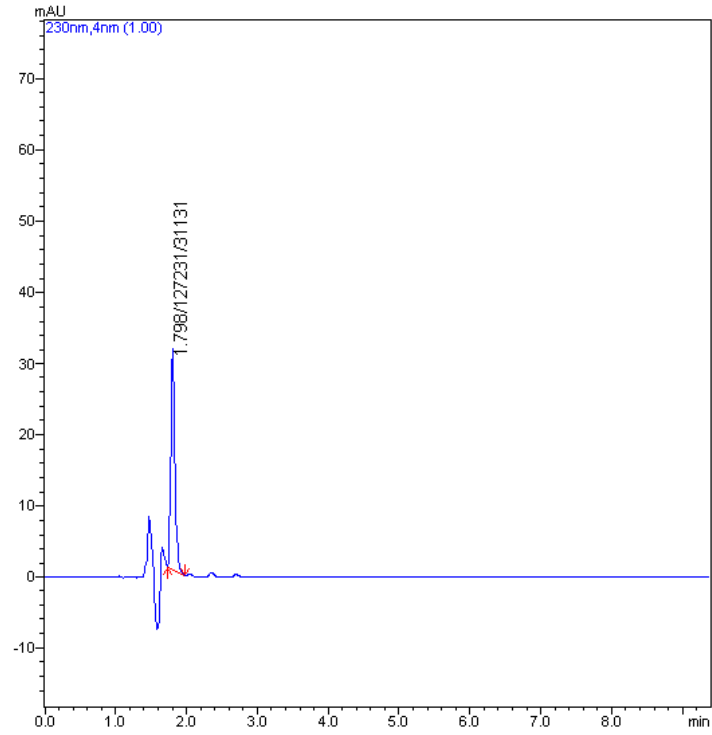


(a)

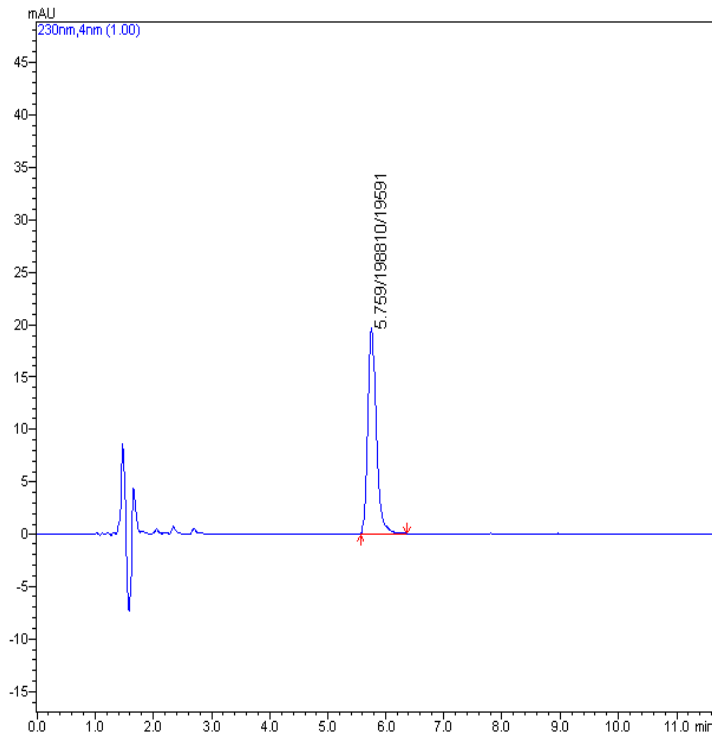


(b)

Şekil 13. %40 ACN içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları



(a)



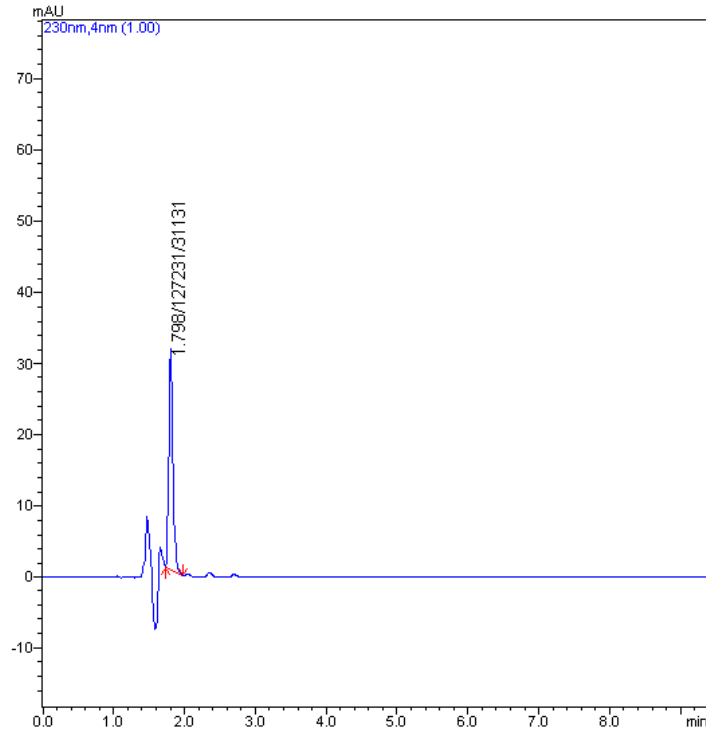
(b)

Şekil 14. %30 ACN içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları

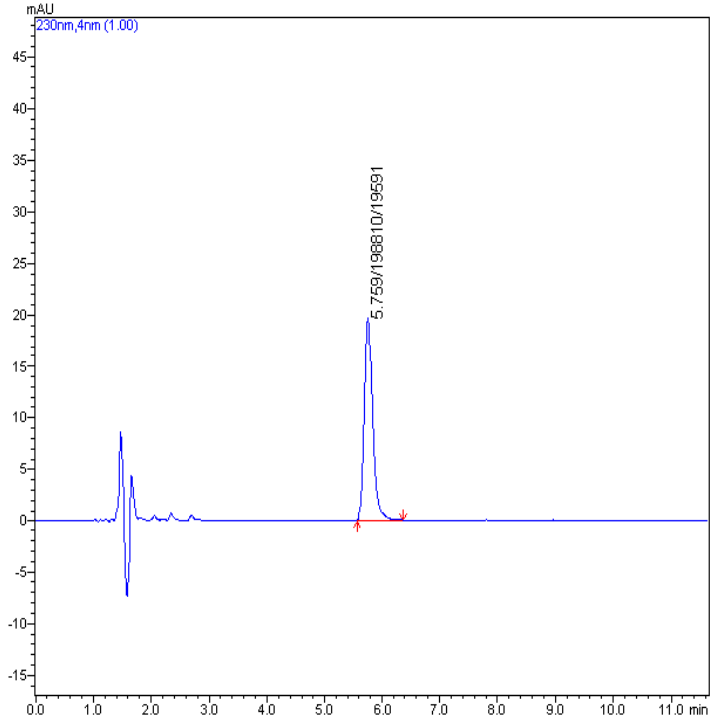
Sonuçlar, ACN yüzdesi değişiminin HCT'nin alıkonma zamanını önemli ölçüde etkilemezken, IRB'nin alıkonma zamanı üzerinde oldukça etkili olduğunu

göstermiştir. IRB apolar özelliğe sahip olduğu için hareketli faz içeriğinin polarlığının artması maddenin kolondaki tutunma süresini de arttırmıştır.

Yukarıda anlatılan çalışmalarla eş zamanlı olarak yapılan incelemelerde maddelerin birbirinden çok farklı asidik özelliklere sahip olması nedeniyle (IRB için  $pK_a = 4.5$ , HCT için  $pK_{a1} = 7.0$  ve  $pK_{a2} = 9.2$ ) ve pik şekillerinin iyileştirilmesi için, önceden yapılan çalışmalar baz alınarak, hareketli faza 0.025 M fosfat tamponu eklenmesine karar verilmiştir. Maddelerin  $pK_a$  değerleri dikkate alınarak hem asidik hem de bazik tamponlar denenmiştir İlk çalışmalar pH=2 fosfat tamponu üzerinden yürütülmüştür. Asidik özellik gösteren IRB'nin pH=2 değerinde iyonlaşmamış halde, bazik özellik gösteren HCT'nin ise iyonize halde bulunacağı ön görülmüş ve bu durumun IRB'nin ve HCT'nin kolonda tutunmasını nasıl etkileyeceği araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda **Şekil 15**'teki kromatogramlar elde edilmiştir.



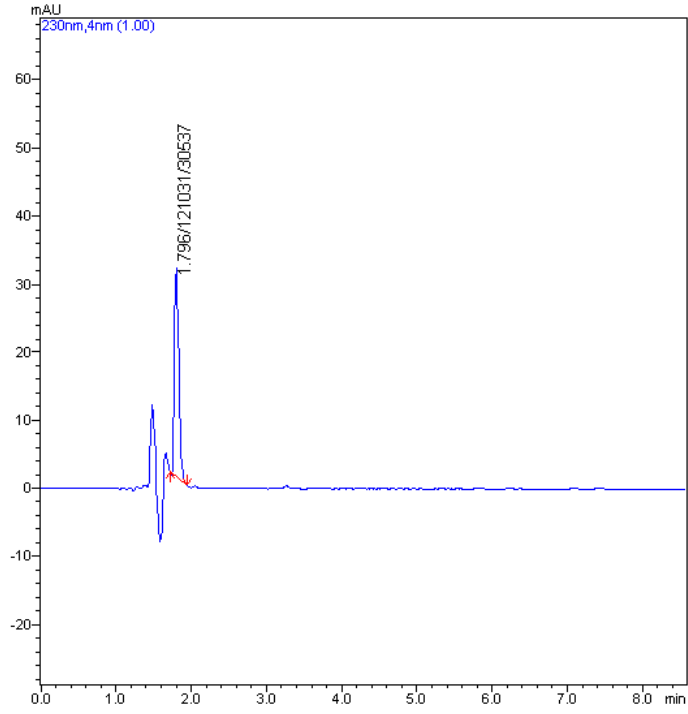
(a)



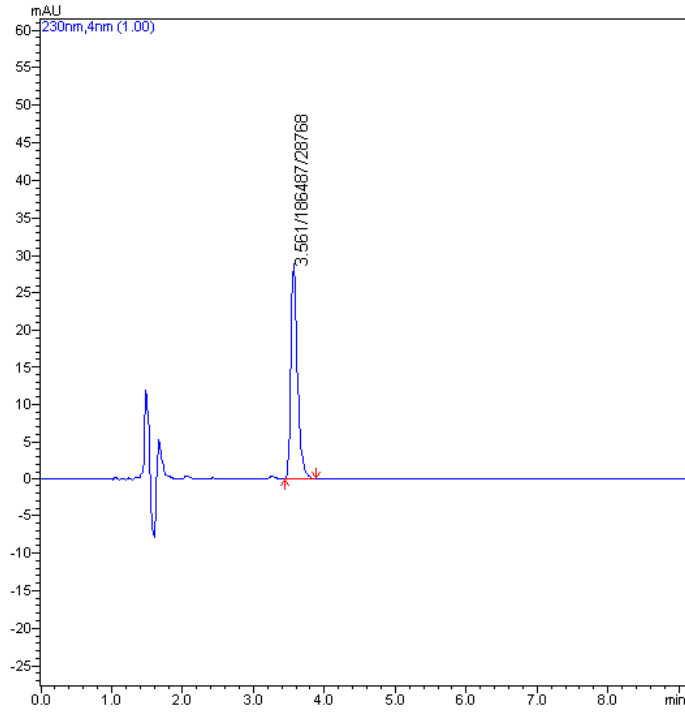
(b)

Şekil 15. %30 ACN ve %10 pH=2 tamponu içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları

Aynı hareketli faz kullanılarak tampon pH=6.3'e çıkarıldığında ise Şekil 16'daki kromatogramlar elde edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 16. %30 ACN ve %10 pH=6.3 tamponu içeren hareketli faz ile elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları

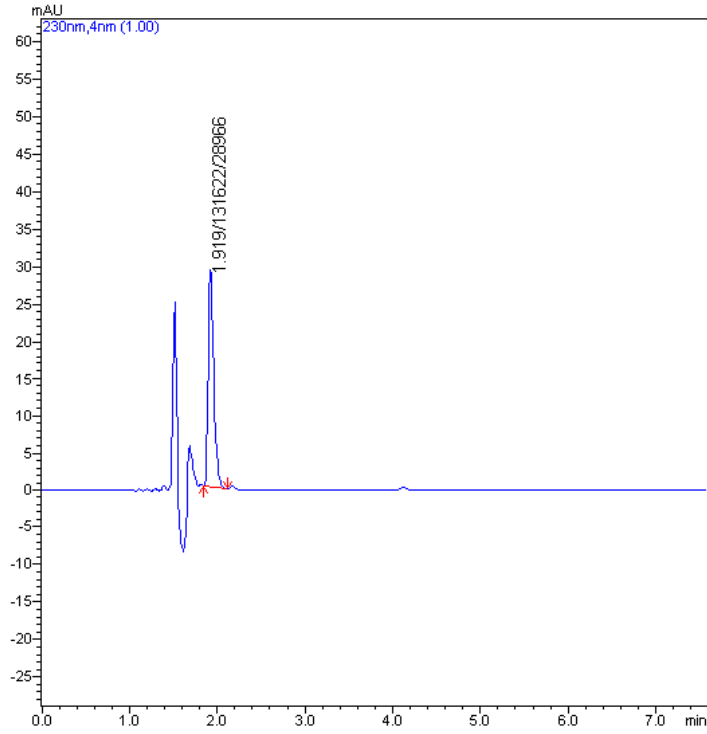
pH değişimine bağlı olarak yürütülen çalışmalarda ortam pH'sının asidik bölgeden nötral bölgeye doğru değiştirilmesinin IRB alıkonma zamanı üzerine etkisinin yüksek olduğu ve pH bazik değerlere kaydıkça IRB'nin kolondan çıkış süresinin kısaldığı tespit edilmiştir. Bu durum IRB'nin zayıf asidik karakteri nedeniyle pH=2 ortamında zayıf iyonizasyonu ve dolayısıyla kolon içi ligandlara daha iyi tutunması anlamına gelmektedir. Ancak HCT için benzer bir durum gözlenmemiştir. Bunun nedeni ise HCT'nin bazik karakterli olmasından kaynaklanmaktadır. HCT asidik bölgede iyonize olmasına rağmen kolon içinde tutunamamış ve analiz ilk dakikalarında kolondan çıkmıştır.

Hareketli fazın içindeki tampon miktarı değişiminin madde piklerinin alıkonma zamanına etkisi de incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir. Tampon miktarının değişiminden elde edilen kromatogramlar ise Şekil 17 ve 18'de verilmektedir.

Tampon miktarının artırılması HCT'nin alıkonma zamanını hemen hemen hiç etkilemezken IRB'nin alıkonma zamanını oldukça arttırmıştır. Bu artışa bağlı olarak IRB'nin kolon içinde daha uzun süre kalması nedeniyle bant genişlemesinin artması sonucu eğri altı alanı değişmemekle birlikte, pik yayvanlaşmış ve yüksekliği azalmıştır.

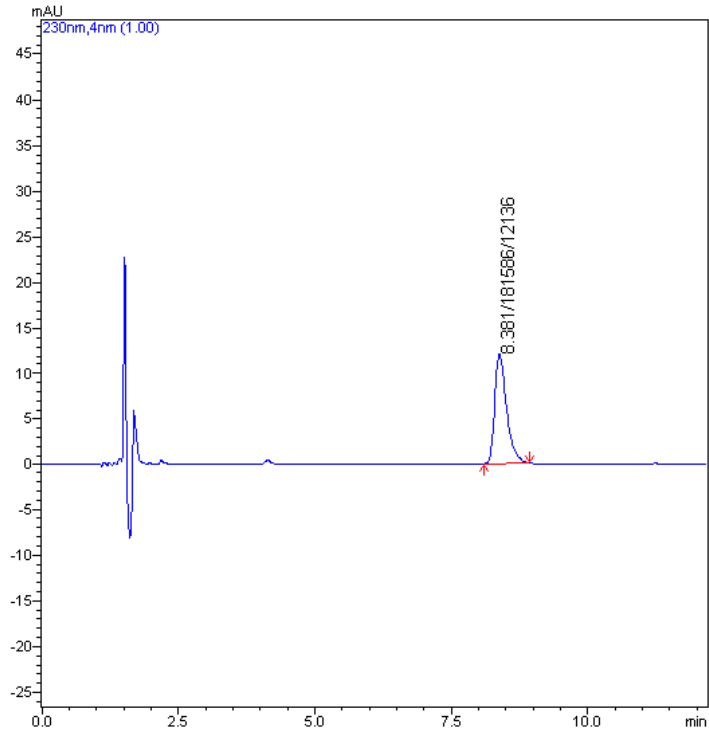
Çizelge 6. Tampon miktarının IRB ve HCT'nin alikonma zamanlarına etkisi

HAREKETLİ FAZ	DERİŞİM (M)	MADDE	ALIKONMA ZAMANI (dk)	ALAN
Su:ACN:Tampon(0.025 M, pH=6.3) 65:25:10, v/v/v	$3 \times 10^{-5}$	IRB	8.381	181586
Su:ACN:Tampon(0.025 M, pH=6.3) 15:25:50, v/v/v	$3 \times 10^{-5}$	IRB	11.078	183767
Su:ACN:Tampon(0.025 M, pH=6.3) 65:25:10, v/v/v	$3 \times 10^{-5}$	HCT	1.919	131622
Su:ACN:Tampon(0.025 M, pH=6.3) 15:25:50, v/v/v	$3 \times 10^{-5}$	HCT	1.920	131458



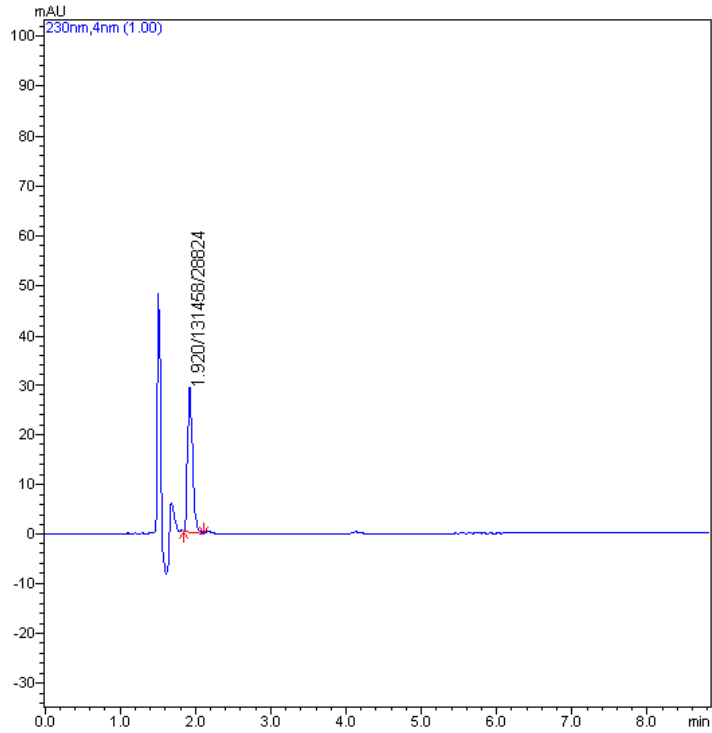
(a)



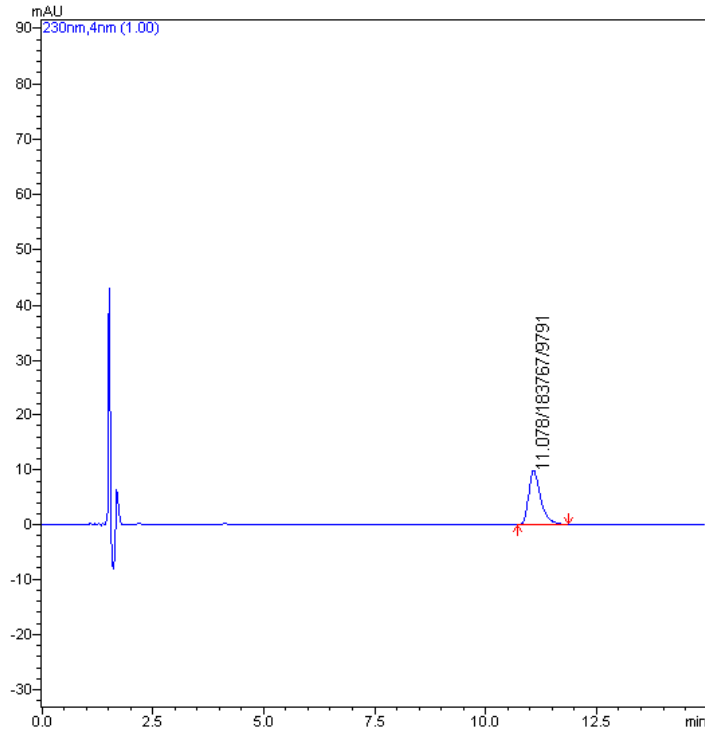


(b)

Şekil 17. %25 ACN, %10 tampon (0.025 M pH=6.3 fosfat tamponu) içeren hareketli fazla elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları



(a)



(b)

Şekil 18. %25 ACN, %50 tampon (0.025 M pH=6.3 fosfat tamponu) içeren hareketli fazla elde edilen HCT (a) ve IRB (b) kromatogramları

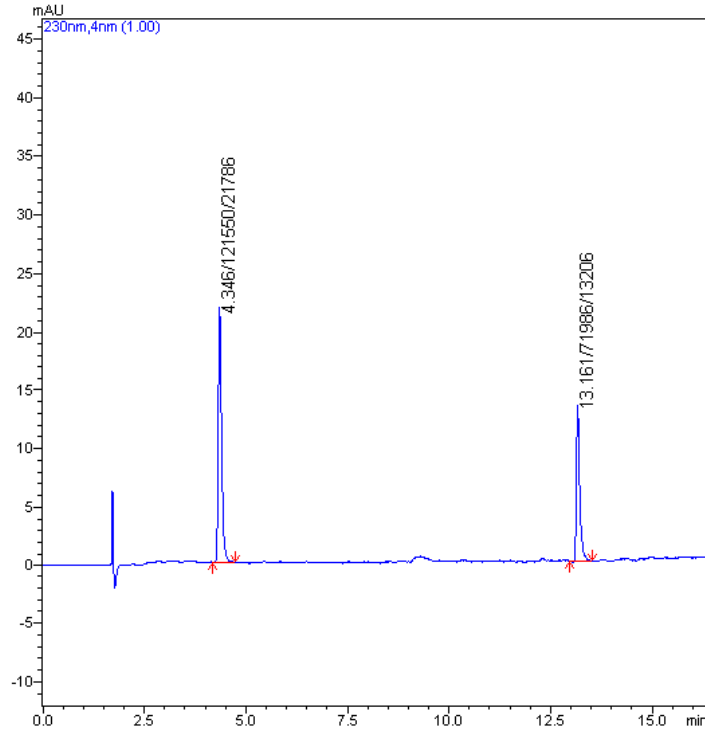
Buraya kadar yapılan çalışmaların hepsi izokratik koşullarda gerçekleşmiştir. İzokratik sistemin, özellikle HCT'nin alıkonma zamanını ötelemede yeterli olmadığı görülmüştür. Yani, maddenin tablet ve idrar numunesinden analizleri düşünüldüğünde, erken gelen HCT pikine olabilecek girişimlerden dolayı analizlenmesinin zor olacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, IRB ve HCT'nin polarite farkından dolayı eş zamanlı analizlerini gerçekleştirebilmek için değişken hareketli faz sisteminin daha uygun olabileceği düşünülmüştür. Bu yüzden de hareketli faz içeriğinin ve akış hızının analiz süresince değiştiği sistemler denenmiştir.

Hareketli fazın yüksek polariteye sahip olduğu bileşimler HCT için uygunken, düşük polaritede olduğu bileşimler IRB için en kabul edilebilir sonuçları vermiştir. Yani, IRB piki %20'den daha düşük ACN oranlarının kullanıldığı hareketli faz sistemleri ile kolondan ayrılmazken, HCT, ACN oranının düşmesiyle orantılı olarak kolondan geç ayrılmıştır. Bu durum dikkate alındığında, sabit sıcaklık, basınç ve akış hızında, ilk olarak farklı oranlarda değişen ACN içeren çeşitli değişken hareketli faz sistemleri kullanılarak IRB ve HCT eş zamanlı analiz edilmiştir.

Değişken hareketli fazın kullanıldığı ilk sistem Çizelge 7'de verilmiş ve Şekil 20'deki kromatogram elde edilmiştir.

Çizelge 7. Değişken hareketli faz sistemi I

Zaman (dk)	ACN (%)	0.025 M pH=6.3 Fosfat tamponu (%)	Akış hızı (mL/dk)
0	5	10	1.0
0-15	5→40	10	1.0
15-20	40→5	10	1.0

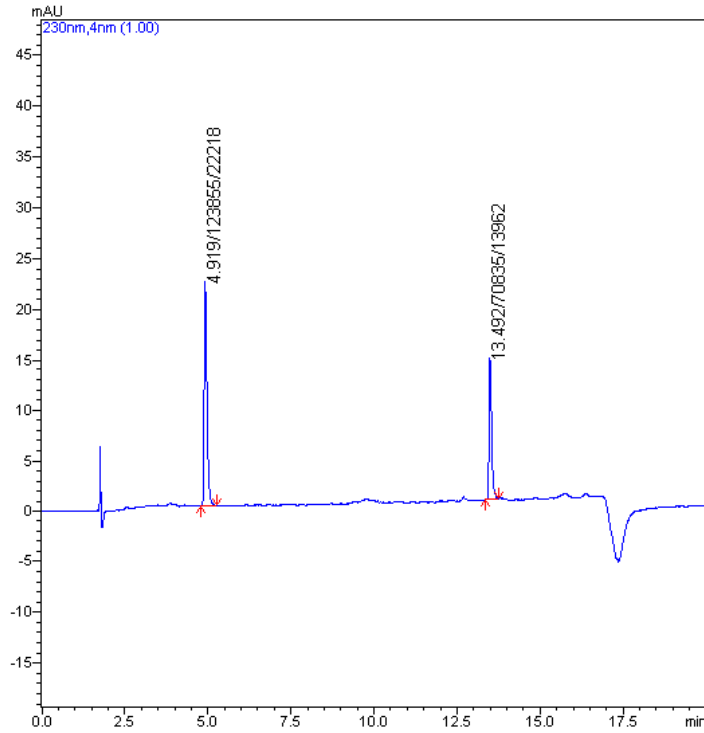


Şekil 19.  $1.5 \times 10^{-5}$  M HCT ve  $1.5 \times 10^{-5}$  M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi I'e göre yapılan analizi, HCT piki 4.346 dk, IRB piki 13.161 dk

ACN miktarının biraz daha düşürülmesinin HCT'nin alıkonma zamanını arttıracığı ön görülmüş ve aşağıdaki değişken hareketli faz sistemi hazırlanmıştır.

Çizelge 8. Değişken hareketli faz sistemi II

Zaman (dk)	ACN (%)	0.025 M pH=6.3 Fosfat tamponu (%)	Akış hızı (mL/dk)
0	3	10	1.0
0-15	3→40	10	1.0
15-20	40→3	10	1.0

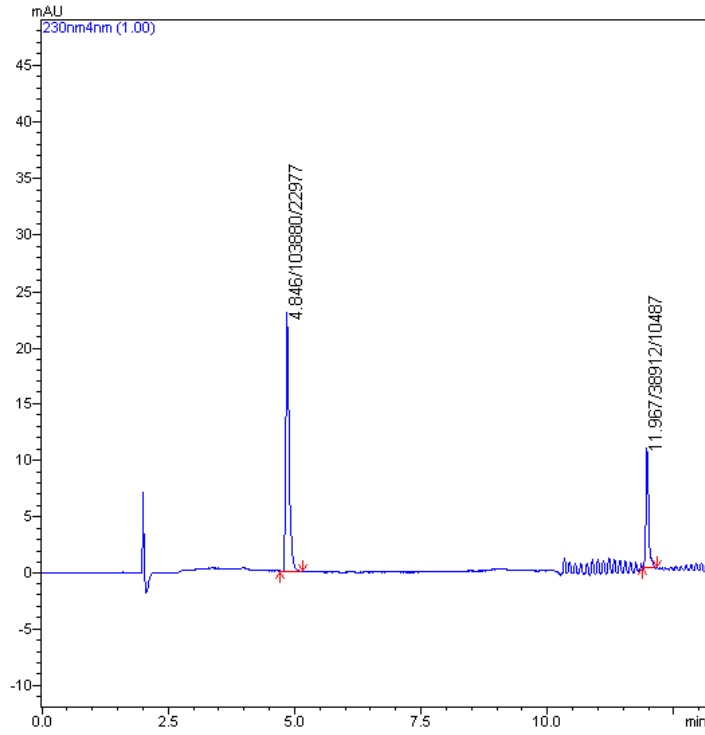


**Şekil 20.  $1.5 \times 10^{-5}$  M HCT ve  $1.5 \times 10^{-5}$  M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi II'ye göre yapılan analizi, HCT piki 4.919 dk, IRB piki 13.492 dk**

Yukarıdaki çalışmalarda hareketli faz içerisindeki ACN oranının HCT'nin kolondan çıkışının geciktirilmesi amacıyla %3'e kadar düşürülmesine rağmen, maddenin alıkonması daha fazla arttırılamamıştır. Dolayısıyla, sadece ACN oranı üzerinde değişiklikler yapmanın istenen sonuçları elde etme yolunda yetersiz kalacağı düşünülmüştür. Bu nedenle HCT'nin alıkonma zamanını arttırmak için yukarıda belirtilen uygulamalara ek olarak akış hızında da analiz boyunca değişimlere gidilmiştir. Akış hızının önceki denemelerdeki başlangıç değeri olan 1.0 mL/dk'dan daha düşük değerlere ayarlanması HCT'nin kolonda daha fazla tutunarak alıkonma zamanını arttıracığı düşünülmüştür. Fakat bunun yanında düşürülen akış hızı ile birlikte IRB'nin de alıkonma zamanının artışı engellemek ve daha erken gelmesini sağlamak için akış hızının artmasının gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu yüzden, hareketli faz bileşimindeki ACN oranı değişimindeki artışa benzer şekilde analiz süresi boyunca akış hızı da artırılmıştır. Akış hızı değişimi, analiz süresi içerisinde farklı zamanlarda gerçekleşecek şekilde bir programa göre gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 9. Değişken hareketli faz sistemi III**

Zaman (dk)	ACN (%)	0.025 M pH=6.3 Fosfat tamponu (%)	Akış hızı (mL/dk)
0	3	10	0.8
0-15	3→40	10	0.8→2.0
15-20	40→3	10	2.0

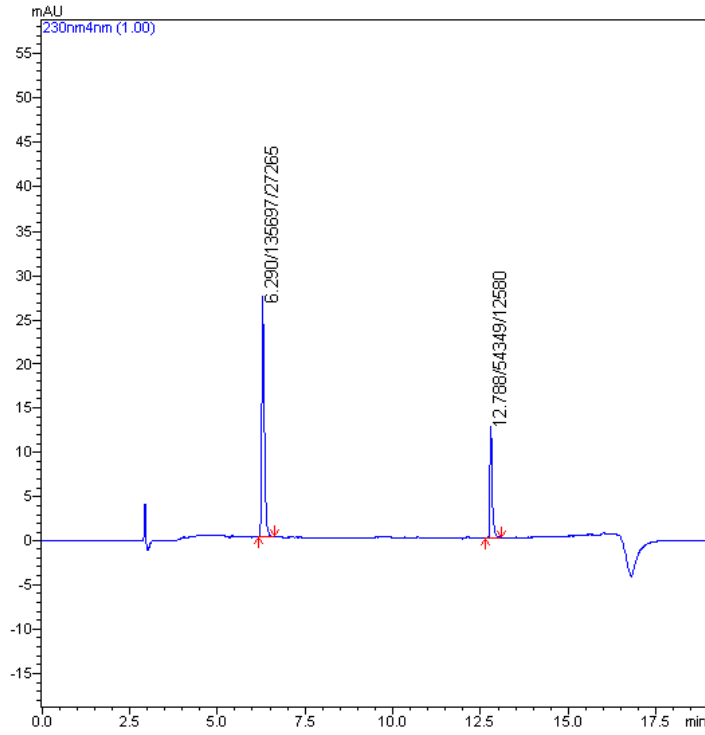


**Şekil 21.  $1.5 \times 10^{-5}$  M HCT ve  $1.5 \times 10^{-5}$  M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi III'e göre yapılan analizi, HCT piki 4.846 dk, IRB piki 11.967 dk**

Yukarıdaki hareketli faz sisteminde akış hızı 2.0 mL/dk'ya ulaştıkça 10. dakikadan sonra cihaz kaynaklı olarak temel çizgide belirgin bir bozulmaya yol açmaktadır. Bunu gidermek için akış hızı düşürüldüğü ve tepe noktası 1.5 mL/dk'ya kadar artırıldığı yeni bir sistem hazırlanmıştır.

**Çizelge 10. Değişken hareketli faz sistemi IV**

Zaman (dk)	ACN (%)	0.025 M pH=6.3 Fosfat tamponu (%)	Akış hızı (mL/dk)
0	3	10	0.8
0-15	3→40	10	0.8→1.5
15-20	40→3	10	1.5



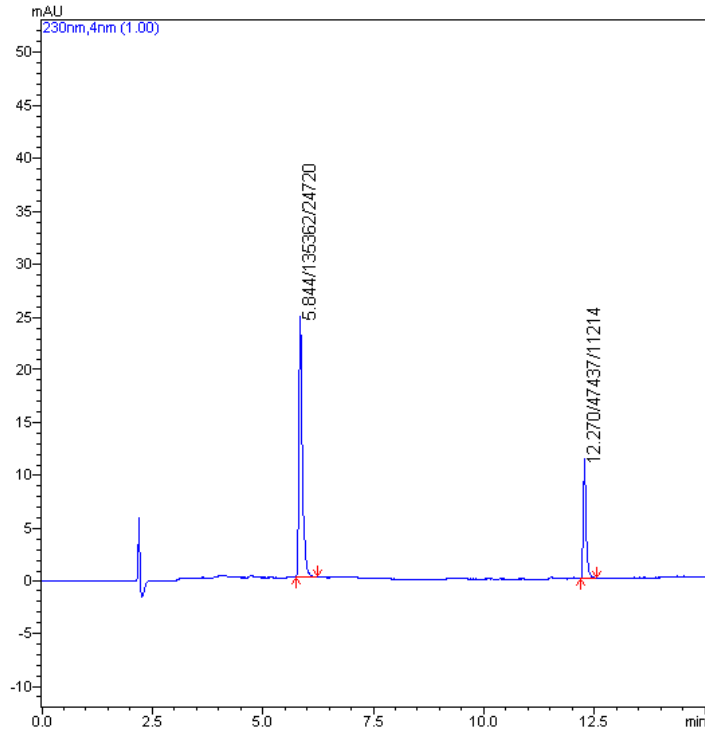
Şekil 22.  $1.5 \times 10^{-5}$  M HCT ve  $1.5 \times 10^{-5}$  M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi IV'e göre yapılan analizi, HCT piki 6.290 dk, IRB piki 12.788 dk

Elde edilen sonuçların HCT alıkonma zamanı için yeterli olmadığı düşünülerek akış hızı değişiminin kademeli olarak artırıldığı farklı sistemler denenmiştir.

Çizelge 11. Değişken hareketli faz sistemi V

Zaman (dk)	ACN (%)	0.025 M pH=6.3 Fosfat tamponu (%)	Zaman (dk)	Akış hızı (mL/dk)
0	3	10	0-5	0.8
0-15	3→40	10	5-10	0.8→1.5
15-20	40→3	10	10-15	1.5
			15-20	0.8

Belirli bir süre akış hızınının 1.5 mL/dk'da sabit tutulması, IRB'nin alıkonma zamanının daha fazla artmaması ve hatta HCT piki ile birbirlerine yaklaştırılması içindir.



**Şekil 23.  $1.5 \times 10^{-5}$  M HCT ve  $1.5 \times 10^{-5}$  M IRB içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi V'e göre yapılan analizi, HCT piki 5.844 dk, IRB piki 12.270 dk**

Analizde IRB'nin alıkonma zamanı hemen hemen hiç değişmezken, HCT, diğer çalışmalara göre yine erken gelmiştir. Bu çalışmalar ile yeterince verimli bir ayırım elde edilemediği düşünülüp aynı anda ACN değişiminin de kademeli olarak değiştirilmesine karar verilmiştir.

Yukarıdaki çalışmalarla eş zamanlı olarak analiz sırasında meydana gelen hataları en aza indirmek için standartlara referans olarak kimyasal açıdan benzer bir madde (IS) bilinen miktarda eklenir. Bu şekilde analiz sırasında referans madde de hatalardan aynı oranda etkileneceği için analiz koşullarına bağlı hatalar en aza indirilmekte ve daha doğru, kesin sonuçlar elde edilmektedir.

Bu durumda, IS olabilecek maddeler araştırılmış ve polarite, çözünürlük, dedekte edilebilirlik ve alıkonma zamanı yönünden en uygun maddenin agomelatin olduğu düşünülmüştür.

**Şekil 24. AGO'nun kimyasal yapısı**

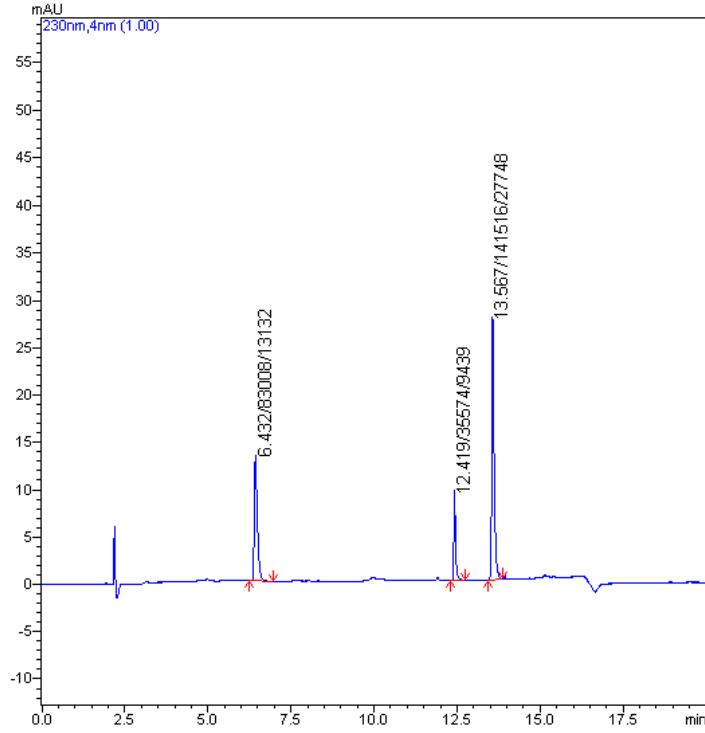
Antidepresif ilaçlar sınıfında bulunan AGO, N-[2-(7-metoksinaftalen-1-il)etil]etanimidik asit olarak isimlendirilir. Kapalı formülü  $C_{15}H_{17}NO_2$ , molekül ağırlığı 243.3 g/mol ve log P değeri 2.83 olarak verilmektedir.

Çözeltilere analizler sırasında IS olarak kullanılan AGO da ilave edilmiştir. Değişken hareketli faz sistemleri hazırlanırken AGO'nun alıkonma zamanının da göz önünde bulundurulması ve hatta IRB ve HCT piklerinin IS pikine göre ayarlanması gerektiği düşünülmüştür.

IS ile ilgili ilk çalışmada IRB, HCT ve AGO'nun, değişken hareketli fazın kullanılmasıyla yapılan eş zamanlı analizlerinde asidik ve bazik pH'nın etkisi incelenmiştir. Değişken hareketli faz sisteminde pH=2 ve pH=6.3 fosfat tamponları varlığında IRB, HCT ve AGO'nun alıkonma zamanları üzerine etkisi araştırılmıştır.

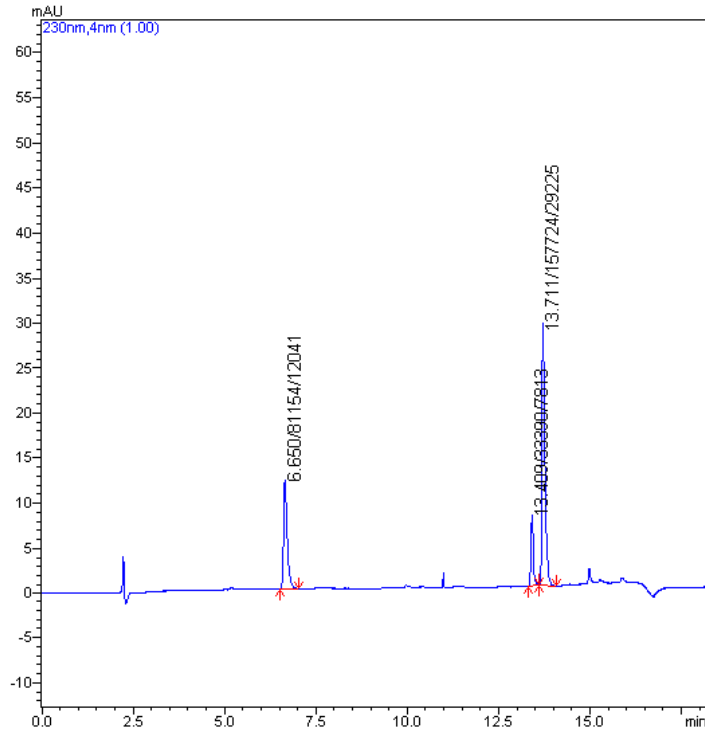
**Çizelge 12. Değişken hareketli faz sistemi VI**

Zaman (dk)	ACN (%)	0.025 M Fosfat tamponu (%)	Zaman (dk)	Akış hızı (mL/dk)
0	3	10	0-5	0.8
0-5	3→10	10	5-10	0.8→1.5
5-15	10→45	10	10-15	1.5
15-20	45→3	10	15-20	1.5→0.8



**(a) pH 6.3 fosfat tamponu**





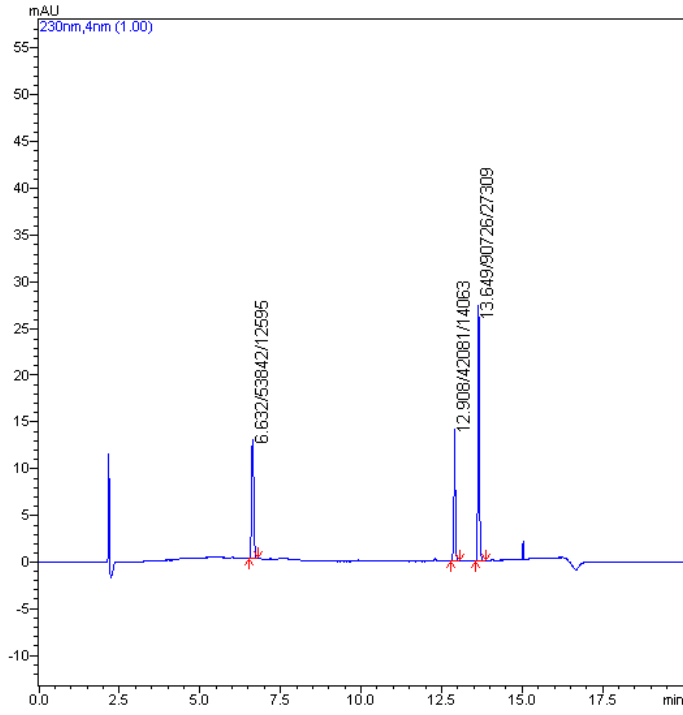
**b) pH 2.0 fosfat tamponu**

**Şekil 25. Değişken hareketli faz sistemi VI'nin farklı tamponlar ile piklerin alıkonma zamanı üzerine etkisi**

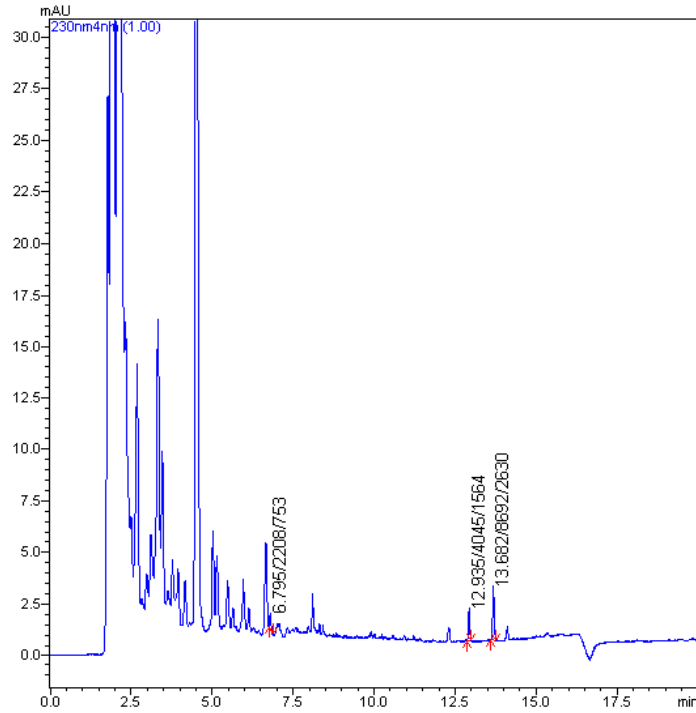
pH=2 tamponunun kullanılması maddelerin alıkonma zamanlarını pH=6.3'e göre bir miktar ötelemiştir. Fakat, bu bir üstünlük olarak görülse de, değişken hareketli fazın kullanıldığı çalışmalarda IRB ve AGO piklerinin birbirine çok yakın gelmesinden dolayı pH=6.3'te çalışmaya karar verilmiştir.

Buraya kadar yapılan çalışmalarda birinci nesil monolitik kolon (Chromolith® RP-18e (100×4.6 mm)) kullanılmıştır. Maddelerin idrardan analizleri düşünüldüğünde ve kolonun özelliklerinden dolayı ayırımın daha iyi olacağı öngörüldüğü için bu kolonların yeni nesli olan Chromolith® HR, RP-18e (100×4.6 mm) kolona geçilmiştir. Yukarıda değişken hareketli faz sistemi VI ile yapılan analiz pH=6.3 tamponu varlığında yeni kolonda da tekrarlanmıştır. Yeni kolon ile **Şekil 26**'da verilen kromatogram elde edilmiştir.

Aynı yöntem 1/10 oranında seyreltilmiş idrar numunesine eklenen IRB, HCT ve AGO standart maddelerinin analizinde de kullanılmış ve **Şekil 27**'deki kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 26. Chromolith® HR kolon ile elde edilen kromatogram



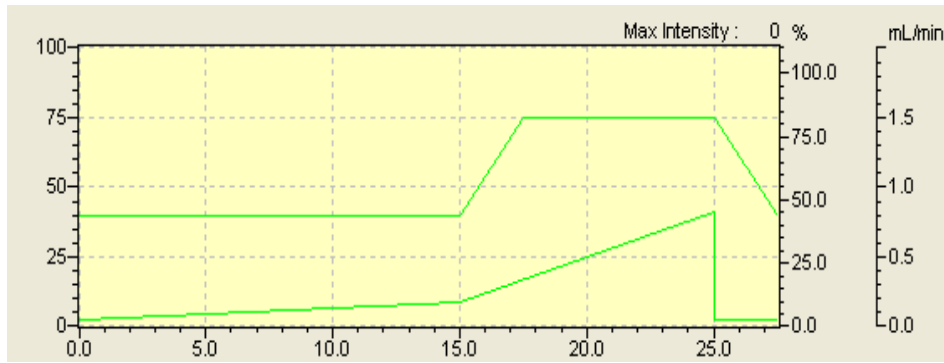
Şekil 27. Değişken hareketli faz sistemi VI'nın maddelerin idrardan analizi sırasında piklerin alıkonma zamanı üzerine etkisi

İdrar kromatogramında IRB ve AGO, idrardan kaynaklanan herhangi bir pik ile girişim yapmamaktadır. Fakat alıkonma zamanından dolayı HCT, idrara özgü maddelerin pikleriyle girişim yapmakta ve iyi bir ayırım gerçekleşmemektedir. Bu durumda analiz süresi uzatılarak hareketli faz içeriğinin ve akış hızının

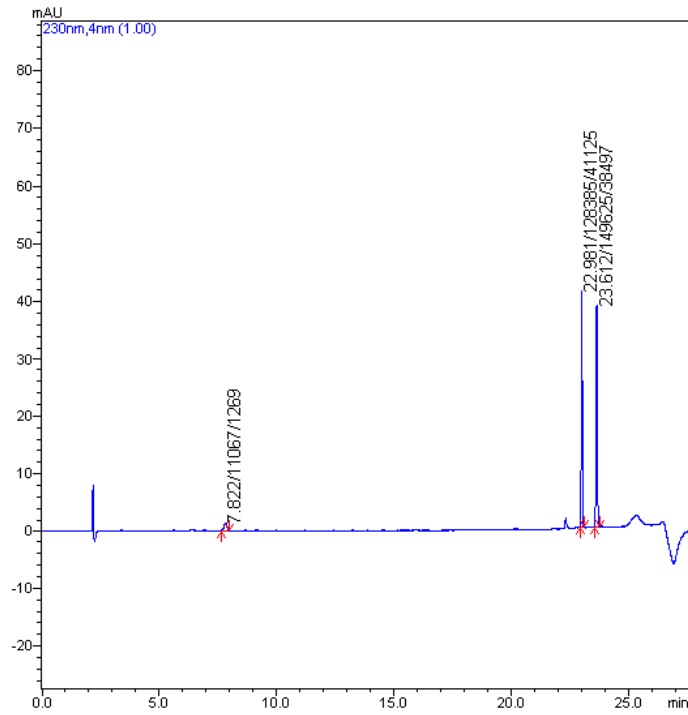
değişim zamanları yeniden düzenlenmiş ve aşağıdaki analiz sistemi elde edilmiştir.

Çizelge 13. Değişken hareketli faz sistemi VII

Zaman (dk)	ACN (%)	0.025 M pH=6.3 Fosfat tamponu (%)	Zaman (dk)	Akış hızı (mL/dk)
0	3	10	0-15	0.8
0-15	3→10	10	15-17.5	0.8→1.5
15-25	10→45	10	17.5-25	1.5
25-27.5	45→3	10	25-27.5	1.5→0.8



Şekil 28. Değişken hareketli faz sistemi VII

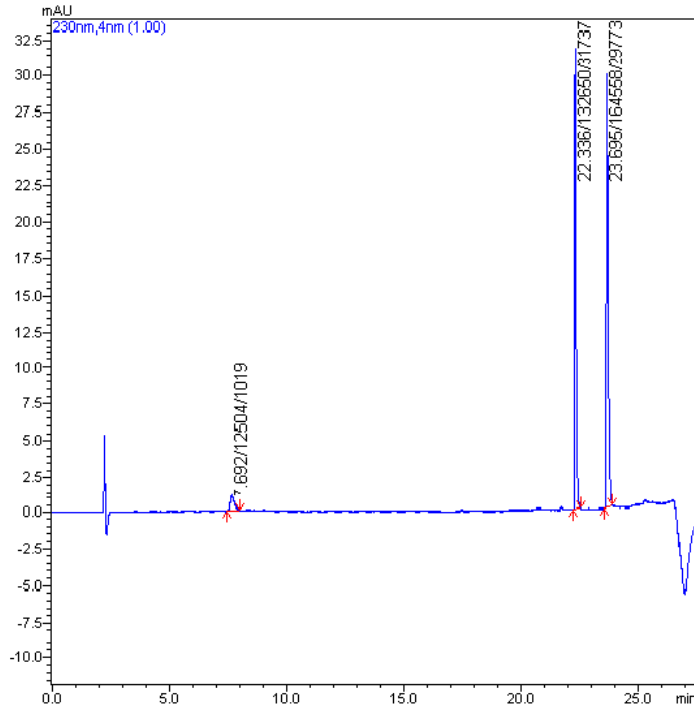


Şekil 29. HCT ( $2.015 \times 10^{-6}$  M, 7.822 dk), IRB ( $3.360 \times 10^{-5}$  M, 22.981dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 23.612 dk) içeren standart çözeltinin kromatogramı (Chromolith® HR kolon ile)

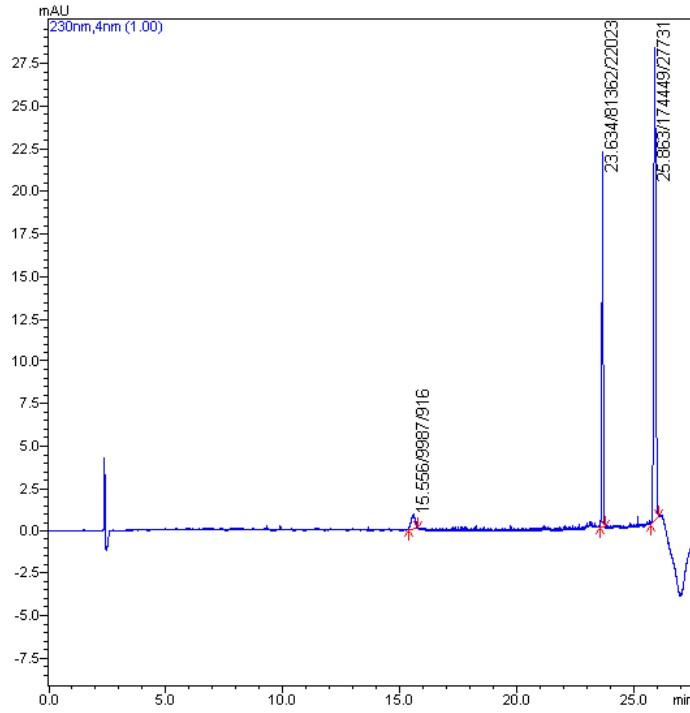
Şekilden de görüldüğü gibi analiz 27.5 dakikada tamamlanmıştır. Bu yöntem ile, maddelerin, analizin ilk dakikalarında kolonda tutulmaları sağlanmış ve örnekten (tabler ve idrar) ileri gelebilecek analiz dışı bileşenler ile girişimleri engellenmiş ve böylelikle yöntemin seçiciliği arttırılmıştır.

Aynı yöntem yeni nesil monolitik kolon ile karşılaştırılmak üzere birinci nesil monolitik ve Fortis C<sub>18</sub> kolona da uygulanmıştır. Aynı çözeltiler bu kolonlarla yeniden analizlenmiş ve elde edilen kromatogramlar Chromolith® RP-18e kolon için Şekil 30'da, Fortis C<sub>18</sub> kolon için Şekil 31'de verilerek kolon farkının alıkonma zamanlarına etkisi gözlenmiştir.

Şekil 29, 30 ve 31'deki farklı kolonlara ait kromatogramlar karşılaştırıldığında yeni nesil ve birinci nesil monolitik kolonlar arasında piklerin alıkonma zamanları yönünden belirgin bir fark olmamış fakat birinci nesil kolon ile daha yayvan pikler elde edilmiştir. Fortis kolondan elde edilen kromatogramda alıkonma zamanları, özellikle HCT için, artmıştır. Ayrıca yöntemde değişken akış hızının kullanılması Fortis kolonda bir süre sonra temel çizginin bozulmasına yol açmış ve gürültü yükselmiştir. Bu iki kolonun yukarıda bahsedilen dezavantajları ve her bir kolon için yapılan sistem uygunluk testlerinin sonuçları göz önüne alınarak monolitik kolonların yeni nesli olan Chromolith® HR kolon ile analizlere devam edilmiş ve yöntemin validasyonu bu kolon ile yapılmıştır.



Şekil 30. HCT ( $2.015 \times 10^{-6}$  M, 7.692 dk), IRB ( $3.360 \times 10^{-5}$  M, 22.336 dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 23.695 dk) içeren standart çözeltinin kromatogramı (Chromolith® RP-18e kolon ile)



Şekil 31. HCT ( $2.015 \times 10^{-6}$  M, 15.556 dk), IRB ( $3.360 \times 10^{-5}$  M, 23.634 dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 25.863 dk) içeren standart çözeltinin kromatogramı (Fortis C<sub>18</sub> kolon ile)

Analizler sırasında elde edilen kromatogramlar analiz cihazının bağlı olduğu veri analiz programı ile değerlendirilmiştir. IRB, HCT ve AGO'nun dedektör yanıtları pik normalizasyon (PN) yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu yöntemde, pik alanları alıkonma zamanına bölünmüştür. Validasyon çalışmalarında IRB ve HCT'nin değişen derişimlerine karşı AGO'nun sabit derişimli bir çözeltisi kullanılmış, yani analitlerin PN değerleri IS'nin PN değerlerine oranlanmıştır. Bu şekilde alet, ortam ve analizciden kaynaklanan hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır.

HCT ve IRB'nin AGO'ya göre bağıl alıkonma zamanları değerlendirildiğinde (Çizelge 14) monolitik yapıli kolonların birbirlerine uyumlu alıkoyma özellikleri sergilerken partikül yapıli Fortis C<sub>18</sub> kolonun ise farklı özellikler sergilediğı tespit edilmiştir. Bu tespit kolonların birbiri yerine kullanılabilme imkanının değerlendirilebilmesi açısından anlamlıdır.

Çizelge 14'te sunulan karşılaştırmaya ek olarak, tez kapsamında test edilen analitik kolonların analit piklerinin alıkonma zamanları ve pik normalizasyon değerlerine ilişkin performans istatistikleri ise Çizelge 15'te verilmiştir.

Çizelge 14. Analitler ve IS'nin farklı kolonlardaki bağıl alınma değerleri

		Standart Çözeltilisi	Tablet Çözeltilisi	İdrar Çözeltilisi
<b>Chromolith® High Resolution RP-18e</b>	HCT/AGO	0.3	0.3	0.3
	IRB/AGO	1.0	1.0	1.0
	HCT/IRB	0.3	0.4	0.3
<b>Chromolith® Performance RP-18e</b>	HCT/AGO	0.3	0.3	0.3
	IRB/AGO	0.9	0.9	0.9
	HCT/IRB	0.3	0.3	0.3
<b>Fortis C<sub>18</sub></b>	HCT/AGO	0.6	0.6	0.6
	IRB/AGO	0.9	0.9	0.9
	HCT/IRB	0.7	0.7	0.7

Çizelge 15. HCT, IRB ve AGO'nun farklı kolonlar ile farklı örneklerde yapılan analizlerinde elde edilen sinyallerinin alınma zamanı ve pik normalizasyonu kesinliklerinin karşılaştırması (n=3)

		Chromolith® High Resolution RP-18e			Chromolith® Performance RP-18e			Fortis C <sub>18</sub>		
		HCT	IRB	AGO	HCT	IRB	AGO	HCT	IRB	AGO
Standart Çözeltileri	RT Ort.	7.890	22.946	23.616	7.664	22.350	23.705	15.486	23.665	25.867
	RT SS	0.008	0.004	0.003	0.050	0.015	0.011	0.062	0.032	0.014
	RT %BSS	0.103	0.015	0.011	0.656	0.068	0.047	0.399	0.136	0.056
	PN Ort.	0.209	0.810		0.209	0.853		0.099	0.506	
	PN SS	0.009	0.003		0.024	0.002		0.003	0.009	
	PN %BSS	4.104	0.391		11.349	0.190		3.022	1.710	
Tablet Çözeltileri	RT Ort.	7.954	22.976	23.630	7.590	22.356	23.715	15.464	23.643	25.863
	RT SS	0.021	0.008	0.005	0.012	0.015	0.014	0.110	0.005	0.013
	RT %BSS	0.266	0.033	0.022	0.159	0.067	0.059	0.712	0.019	0.049
	PN Ort.	0.475	0.292		0.474	0.335		0.201	0.255	
	PN SS	0.008	0.001		0.026	0.001		0.008	0.003	
	PN %BSS	1.647	0.382		5.461	0.255		3.894	1.241	
İdrar Çözeltileri	RT Ort.	7.866	22.932	23.614	7.594	22.338	23.719	15.588	23.646	25.852
	RT SS	0.006	0.008	0.006	0.031	0.012	0.009	0.026	0.006	0.009
	RT %BSS	0.070	0.033	0.024	0.404	0.053	0.039	0.169	0.026	0.034
	PN Ort.	0.144	0.494		0.143	0.755		0.087	0.321	
	PN SS	0.007	0.004		0.023	0.005		0.005	0.001	
	PN %BSS	5.092	0.730		16.195	0.695		5.606	0.179	

Çizelge 16. Sistem uygunluk testlerinin sonuçları

Parametre	Chromolith® HR RP-18e			Chromolith® RP-18e			Fortis C <sub>18</sub>			Tavsiye edilen değer
	HCT	IRB	IS	HCT	IRB	IS	HCT	IRB	IS	
<b>Aıkonma zamanı (dk)</b>	7.89	22.946	23.616	7.664	22.35	23.705	15.486	23.665	25.867	
<b>Teorik tabaka sayısı (N)</b>	17097	1419296	741667	10279	730584	479106	33559	910171	385036	>2000
<b>Kuyruklanma faktörü (T)</b>	1.08	1.44	1.49	1.35	1.88	1.65	1.23	1.11	1.07	<2
<b>Asimetri faktörü (A<sub>s</sub>)</b>	1.06	1.36	1.36	1.33	1.72	1.56	1.44	1.09	1.06	0.95<A <sub>s</sub> <1.2
<b>Kapasite faktörü (k)</b>	3.14	11.05	11.4	2.94	10.5	11.2	8.34	13.3	14.6	2<k<10
<b>Ayırım gücü (R<sub>s</sub>)</b>	94.6	7.17		72.0	11.2		37.3	16.6		>2
<b>Seçicilik faktörü (α)</b>	3.52	1.03		3.57	1.07		1.59	1.10		>1
<b>Aıkonma zamanının %BSS</b>	0.103	0.015	0.011	0.65	0.068	0.047	0.399	0.14	0.056	<1

### ***YPSK yönteminin validasyonu***

IRB ve HCT'nin eş zamanlı olarak analizi için geliştirilen YPSK yönteminin doğru, güvenilir ve tekrar edilebilir sonuçlar vermesi gerekmektedir. Bu amaçla ICH ve Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP)'nin önerdiği ölçütlere göre bazı değerlendirmeler yapılmıştır.

Validasyon işlemlerinden önce YPSK cihazının ve yöntemin performansını gösteren sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Bu testlerde teorik tabaka sayısı ( $N$ ), ayırım gücü ( $R_s$ ), kuyruklanma ( $T$ ) ve asimetri faktörü ( $A_s$ ), seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) ve kapasite faktörü ( $k$ ) gibi parametreler hesaplanmıştır. Hesaplamalar YPSK cihazının bağlı olduğu bilgisayara yüklü olan Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak elde edilmiştir. Sonuçlar **Çizelge 16**'da verilmiştir.

IRB ve HCT analizi için geliştirilen yöntemin validasyonu, analitik yöntemlerin validasyonu üzerine ICH tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen tavsiyelere göre yapılmıştır. Bu kılavuz doğrultusunda doğruluk, kesinlik, doğrusallık, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve spesifiklik testleri yöntemine uygulanmıştır.

Yöntemin doğruluğunu belirleyebilmek amacıyla standart katma yöntemine dayalı geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. IRB ve HCT dışındaki bileşenlerin yöntem ile yaptığı etkileşimi incelemek için bilinen derişimde IRB, HCT ve IS karışımı, boş idrar ve önceden analiz edilmiş tablet çözeltilerine eklenmiş ve analiz edilmiştir. Geri kazanım verileri her bir örnek tipi için 3 farklı örnek çözeltilisine katılan 3 farklı derişimde analit içeren çözeltilerin 3'er kez analiz edilmesi ile elde edilmiştir. Eklenen çözeltilerdeki analit derişimleri düşük, orta ve yüksek standart katma uygulamalarında sırasıyla HCT için  $1.008 \times 10^{-6}$ ,  $4.030 \times 10^{-6}$ ,  $8.061 \times 10^{-6}$  M ve IRB için  $1.680 \times 10^{-5}$ ,  $6.721 \times 10^{-5}$ ,  $1.344 \times 10^{-4}$  M derişimlerde eklenmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler doğrusallık çalışmaları sonucu elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, numune bileşenlerinin analitlerin tayinine beklenenden olumsuz etki yapmadığını göstermektedir. Yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler **Çizelge 17**'de verilmektedir.

Yöntemin kesinliği, tekrar edilebilirlik çalışmaları ile saptanmıştır. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan  $3.360 \times 10^{-5}$  M IRB ve  $2.015 \times 10^{-6}$  M HCT içeren çözelti aynı gün içerisinde ve ardışık 3 gün süre ile belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların standart sapması, bağıl standart sapması ve güven aralığı parametrelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle geliştirilen yöntemin kesinlik yönünden analitik açıdan yeterli düzeyde olduğu görülmüştür. Kesinlik sonuçları standart çözeltiler için **Çizelge 18 ve 19**'da, idrar içerisindeki IRB ve HCT için **Çizelge 20 ve 21**'de verilmiştir.



**Çizelge 17 . Doğruluk çalışmalarının sonuçları**

	Eklenen (M)	Bulunan (M)	Bulunan SS	% Geri Kazanım	% Geri Kazanım SS	Ortalama Geri Kazanım	%BSS	GA <sub>%95</sub>
HCT Tablet	$1.008 \times 10^{-6}$	$1.003 \times 10^{-6}$	$4.499 \times 10^{-8}$	99.50	4.44	104.90	5.88%	4.75
	$4.030 \times 10^{-6}$	$4.241 \times 10^{-6}$	$2.679 \times 10^{-7}$	105.20	6.65			
	$8.061 \times 10^{-6}$	$8.858 \times 10^{-6}$	$2.131 \times 10^{-7}$	109.90	2.64			
HCT İdrar	$1.008 \times 10^{-6}$	$1.068 \times 10^{-6}$	$3.573 \times 10^{-8}$	106.00	3.54	101.50	5.02%	8.77
	$4.030 \times 10^{-6}$	$3.973 \times 10^{-6}$	$1.476 \times 10^{-7}$	98.58	3.67			
	$8.061 \times 10^{-6}$	$8.057 \times 10^{-6}$	$4.530 \times 10^{-7}$	99.95	5.62			
IRB Tablet	$1.680 \times 10^{-5}$	$1.717 \times 10^{-6}$	$4.325 \times 10^{-7}$	102.20	2.55	99.68	2.86%	2.20
	$6.721 \times 10^{-5}$	$6.728 \times 10^{-5}$	$3.742 \times 10^{-7}$	100.10	0.56			
	$1.344 \times 10^{-4}$	$1.301 \times 10^{-4}$	$2.411 \times 10^{-6}$	96.77	1.80			
IRB İdrar	$1.680 \times 10^{-5}$	$1.694 \times 10^{-5}$	$1.967 \times 10^{-7}$	100.80	1.18	98.86	2.03%	1.55
	$6.721 \times 10^{-5}$	$6.657 \times 10^{-5}$	$7.211 \times 10^{-8}$	99.05	0.11			
	$1.344 \times 10^{-4}$	$1.299 \times 10^{-4}$	$1.752 \times 10^{-6}$	96.68	1.30			

Çizelge 18. IRB standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi

	1. Gün (n=8)	2. Gün (n=8)	3. Gün (n=8)	Günler arası (n=24)
<b>Ortalama</b>	0.8052	0.8047	0.8043	0.8048
<b>En düşük ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.8029	0.8022	0.8019	0.8036
<b>En yüksek ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.8076	0.8073	0.8068	0.8060
<b>Standart Sapma</b>	0.002811	0.003023	0.002952	0.002824
<b>Ortalamanın standart hatası</b>	0.0009938	0.001069	0.001044	0.0005765
<b>%BSS</b>	0.35%	0.38%	0.37%	0.35%
<b>ANOVA</b>	F (2.21) = 0.1863 P > 0.05			

Çizelge 19. HCT standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi

	1. Gün (n=8)	2. Gün (n=8)	3. Gün (n=8)	Günler arası (n=24)
<b>Ortalama</b>	0.2080	0.2052	0.2042	0.2058
<b>En düşük ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.2020	0.1987	0.1991	0.2029
<b>En yüksek ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.2139	0.2117	0.2093	0.2087
<b>Standart Sapma</b>	0.007123	0.007751	0.006044	0.006893
<b>Ortalamanın standart hatası</b>	0.002518	0.002741	0.002137	0.001407
<b>%BSS</b>	3.43%	3.78%	2.96%	3.35%
<b>ANOVA</b>	F (2.21) = 0.6260 P > 0.05			

Çizelge 20. İdrar içerisinde IRB için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirilmesi

	1. Gün (n=8)	2. Gün (n=8)	3. Gün (n=8)	Günler arası (n=24)
<b>Ortalama</b>	0.4916	0.4895	0.4902	0.4905
<b>En düşük ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.4892	0.4875	0.4884	0.4894
<b>En yüksek ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.4941	0.4915	0.4921	0.4915
<b>Standart Sapma</b>	0.002903	0.002439	0.002206	0.002582
<b>Ortalamanın standart hatası</b>	0.001026	0.0008622	0.0007800	0.0005271
<b>%BSS</b>	0.59%	0.50%	0.45%	0.53%
<b>ANOVA</b>	F (2.21) = 1.452 P > 0.05			

Çizelge 21. İdrar içerisinde HCT için kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirilmesi

	1. Gün (n=8)	2. Gün (n=8)	3. Gün (n=8)	Günler arası (n=24)
<b>Ortalama</b>	0.1462	0.1475	0.1479	0.1472
<b>En düşük ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.1412	0.1414	0.1445	0.1448
<b>En yüksek ortalama GA %<sub>95</sub></b>	0.1511	0.1537	0.1513	0.1496
<b>Standart Sapma</b>	0.005926	0.007335	0.004046	0.005714
<b>Ortalamanın standart hatası</b>	0.002095	0.002593	0.001431	0.001166
<b>%BSS</b>	4.05%	4.97%	2.74%	3.88%
<b>ANOVA</b>	F (2.21) = 0.1968 P > 0.05			

Yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla  $1.008 \times 10^{-6}$ ,  $2.015 \times 10^{-6}$ ,  $4.030 \times 10^{-6}$ ,  $6.046 \times 10^{-6}$ ,  $8.061 \times 10^{-6}$ ,  $1.008 \times 10^{-5}$  M HCT,  $1.680 \times 10^{-5}$ ,  $3.360 \times 10^{-5}$ ,  $6.721 \times 10^{-5}$ ,  $1.008 \times 10^{-4}$ ,  $1.344 \times 10^{-4}$ ,  $1.680 \times 10^{-4}$  M IRB ve  $1.645 \times 10^{-5}$  M sabit derişimde AGO içeren çözeltiler hazırlanmış ve belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında da analizler gün içi ve günler arası olarak 3 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler en küçük kareler metoduyla değerlendirilmiş, buna göre eğim, kesim ve bu değerlerin standart sapmaları ile korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Hem IRB hem de HCT için bu yöntemin belirtilen derişim aralığında doğrusal sonuçlar verdiği ve Lambert-Beer Yasası'na uyduğu görülmüştür. Yöntemin gün içi ve günler arası doğrusallığına ilişkin istatistiksel

veriler standart çözeltiler için **Çizelge 22 ve 23**'te, idrar içerisindeki IRB ve HCT için **Çizelge 24 ve 25**'te verilmiştir.

**Çizelge 22 . IRB standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi**

	IRB			
	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
<b>Aralık (M)</b>	1.680×10 <sup>-5</sup> - 1.680×10 <sup>-4</sup>			
<b>Eğim</b>	24956 ± 172.9	25165 ± 217.9	25332 ± 352.6	25151 ± 136.2
<b>Kesim</b>	0.01819 ± 0.01763	0.008479 ± 0.02222	-0.01001 ± 0.03595	0.005553 ± 0.01389
<b>r</b>	0.9999	0.9999	0.9996	0.9998
<b>Eğim GA %<sub>95</sub></b>	24476 - 25436	24560 - 25770	24354 - 26311	24862 - 25440
<b>Kesim GA %<sub>95</sub></b>	-0.03075 - 0.06713	-0.05319 - 0.07015	-0.1098 - 0.08979	-0.02389 - 0.03500
<b>LOQ (M)</b>	7.17×10 <sup>-6</sup>	8.83×10 <sup>-6</sup>	1.42×10 <sup>-5</sup>	5.52×10 <sup>-6</sup>
<b>LOD (M)</b>	2.37×10 <sup>-6</sup>	2.91×10 <sup>-6</sup>	4.68×10 <sup>-6</sup>	1.82×10 <sup>-6</sup>
<b>ANOVA</b>	F (2.10) = 0.326 P > 0.05			

**Çizelge 23 . HCT standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi**

	HCT			
	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
<b>Aralık (M)</b>	1.008×10 <sup>-6</sup> - 1.008×10 <sup>-5</sup>			
<b>Eğim</b>	109215 ± 1151	109631 ± 649.7	109993 ± 1204	109613 ± 609.4
<b>Kesim</b>	-0.004941 ± 0.007042	0.002133 ± 0.003974	-0.001344 ± 0.007363	-0.001384 ± 0.003728
<b>r</b>	0.9998	0.9999	0.9998	0.9999
<b>Eğim GA %<sub>95</sub></b>	106019 - 112411	107827 - 111434	106651 - 113334	108321 - 110905
<b>Kesim GA %<sub>95</sub></b>	-0.02449 - 0.01461	-0.008898 - 0.01316	-0.02178 - 0.01910	-0.009286 - 0.006519
<b>LOQ (M)</b>	6.448×10 <sup>-7</sup>	3.625×10 <sup>-7</sup>	6.694×10 <sup>-7</sup>	3.401×10 <sup>-7</sup>
<b>LOD (M)</b>	2.128×10 <sup>-7</sup>	1.196×10 <sup>-7</sup>	2.209×10 <sup>-7</sup>	1.122×10 <sup>-7</sup>
<b>ANOVA</b>	F (2.10) = 2.614 P > 0.05			

**Çizelge 24 . İdrar içerisindeki IRB için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi**

	IRB			
	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
<b>Aralık (M)</b>	1.680×10 <sup>-5</sup> - 1.680×10 <sup>-4</sup>			
<b>Eğim</b>	14340 ± 203.9	14533 ± 203.6	15066 ± 193.4	14646 ± 137.8
<b>Kesim</b>	0.008778 ± 0.02079	-0.003282 ± 0.02076	-0.02701 ± 0.01972	-0.007173 ± 0.01405
<b>r</b>	0.9996	0.9996	0.9997	0.9999
<b>Eğim GA %<sub>95</sub></b>	13774 - 14906	13968 - 15098	14529 - 15603	14354 - 14939
<b>Kesim GA %<sub>95</sub></b>	-0.04893 - 0.06649	-0.06092 - 0.05436	-0.08175 - 0.02772	-0.03697 - 0.02262
<b>LOQ (M)</b>	6.121×10 <sup>-6</sup>	2.258×10 <sup>-6</sup>	1.793×10 <sup>-5</sup>	4.898×10 <sup>-6</sup>
<b>LOD (M)</b>	2.020×10 <sup>-6</sup>	7.452×10 <sup>-7</sup>	5.916×10 <sup>-6</sup>	1.616×10 <sup>-6</sup>
<b>ANOVA</b>	F (2.10) = 1.134 P > 0.05			

**Çizelge 25 . İdrar içerisindeki HCT için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin istatistiksel değerlendirmesi**

	HCT			
	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=18)
<b>Aralık (M)</b>	1.008×10 <sup>-6</sup> - 1.008×10 <sup>-5</sup>			
<b>Eğim</b>	71671 ± 1222	74199 ± 1085	77965 ± 947.1	74612 ± 1067
<b>Kesim</b>	-0.002711 ± 0.007472	-0.002805 ± 0.006636	-0.01533 ± 0.005793	-0.006950 ± 0.006524
<b>r</b>	0.9994	0.9996	0.9997	0.9999
<b>Eğim GA %<sub>95</sub></b>	68280 - 75062	71187 - 77211	75336 - 80594	72350 - 76873
<b>Kesim GA %<sub>95</sub></b>	-0.02345 - 0.01803	-0.02123 - 0.01562	-0.03141 - 0.0007470	-0.02078 - 0.006881
<b>LOQ (M)</b>	1.043×10 <sup>-6</sup>	8.944×10 <sup>-7</sup>	7.430×10 <sup>-7</sup>	8.744×10 <sup>-7</sup>
<b>LOD (M)</b>	3.440×10 <sup>-7</sup>	2.951×10 <sup>-7</sup>	2.452×10 <sup>-7</sup>	2.885×10 <sup>-7</sup>
<b>ANOVA</b>	F (2.10) = 3.314 P > 0.05			

Yöntemin saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ), kalibrasyon denkleminin eğimi ve kesim değerinin standart sapması kullanılarak hesaplanmıştır. Kesimin standart sapmasının eğime oranının kullanıldığı hesaplamalarda elde edilen oran değeri LOD için 3.3 ile, LOQ için 10 ile

çarpılmıştır. Hesaplamalarda kullanılan istatistiksel veriler doğrusallık için yapılan günler arası çalışmalardan elde edilmiştir. Bu şekilde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri hem standart IRB ve HCT çözeltileri için hem de idrar içerisindeki standart çözeltiler için yukarıdaki doğrusallık tablolarında verilmiştir.

Analizi yapılacak numunede var olan ve bu maddeyle girişim yapabilecek safsızlıkların yanında analiz edilmek istenen maddenin ölçülebilir yeteneği olarak bilinen spesifikliğin belirlenmesi için numune analizleri farklı üç kolonla yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlardan hiçbirinde analit piklerine olumsuz etki yapan herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Ayrıca kromatogramlardaki IRB ve HCT piklerinin saflıkları PDA dedektör ile kontrol edilmiş ve etkileşim yapan bir madde gözlenmemiştir. Bu sonuçlar değerlendirilerek yöntemin yeterli spesifikliğe sahip olduğu kabul edilmiştir.

Literatürlerde IRB ve HCT'nin stabiliteleri ile bazı çalışmalar yer almaktadır. Plazma içerisindeki celiprolol, bisoprolol ve IRB stabilitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda  $-22^{\circ}\text{C}$  civarında bozunmadığı,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 ay stabil kalmasına rağmen kromatogramlarda fazladan pik görülebildiği, oda koşullarında ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ise 24 saat stabil kalabildiği gösterilmiştir (Caudron ve ark., 2004). Başka bir çalışmada IRB standart çözeltisinin  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 ay saklandığı fakat tekrar edilebilir sonuçların 15 günlük sürede alınabildiği ve bu durumda da stabilitesinin 15 gün olduğu yer almaktadır (Gupta ve ark.,2011). Diğer bir çalışmada ise IRB'nin plazma ya da idrar içerisinde  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 7 ay saklanmasıyla dahi stabil kalabildiği gözlenmiştir (Chang ve ark., 1997). HCT için ise plazma ve idrar içerisinde oda koşullarında en az 5 saat stabil kaldığı söylenmektedir (Fang ve ark. 2005). Bu veriler dikkate alınarak IRB ve HCT'nin stabiliteleri,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan standart stok çözeltilerinin bir ay arayla yapılan analizlerinden elde edilen kromatogramlara bakılarak değerlendirilmiştir. **Şekil 32**'den de görüldüğü gibi bir ay sonunda her iki maddenin pik alanlarında ciddi oranda azalma gözlenmiş ve maddelerin bozunduğu kanaatine varılmıştır. Bu durumdan dolayı standart stok çözeltiler en fazla 15 gün kullanılacak şekilde hazırlanmış, kalan çözeltiler atılmıştır.

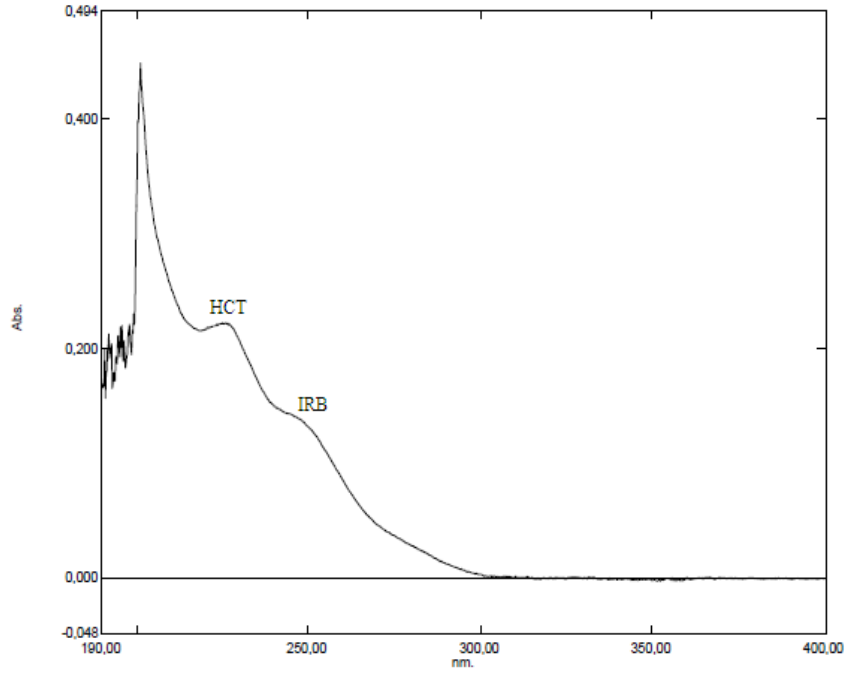
### **Geliştirilen Yöntemlerin Numunelere Uygulanması**

#### ***UV-spektrofotometrik yöntemin tabletlere uygulanması***

IRB ve HCT'nin eş zamanlı analizi için geliştirilen UV yöntemi Co-İrda<sup>®</sup> ilaç tableti (300 mg IRB/12.5 mg HCT) çözeltisine uygulanmıştır. Tablet çözeltisi deneysel kısımda anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve 190-400 nm aralığında spektrumu alınmıştır. Co-İrda<sup>®</sup> ilaç tabletinin spektrumu **Şekil 33**'te verilmektedir.

Elde edilen spektrumdan IRB ve HCT'nin maksimum dalga boylarındaki absorbanları her biri için kalibrasyon denklemlerinde yerlerine konularak tabletteki IRB ve HCT miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 26**'da verilmiştir.





Şekil 33. Co-İrda® ilaç tableti (300 mg IRB/12.5 mg HCT) spektrumu

Çizelge 26 . Co-İrda® ilaç tableti analiz sonuçları (n=10)

	mg IRB/Tablet	mg HCT/Tablet
<b>Ortalama</b>	299.89	12.499
<b>Standart Sapma</b>	0.4847	0.02166
<b>%BSS</b>	0.1616	0.1733
<b>%İçerik</b>	99.96	99.99

Tablet analiz sonuçlarından da görüldüğü gibi, IRB ve HCT'nin eş zamanlı analizi için geliştirilen UV metodu ile maddeler tabletlerden yüksek verimle analizlenmiştir.

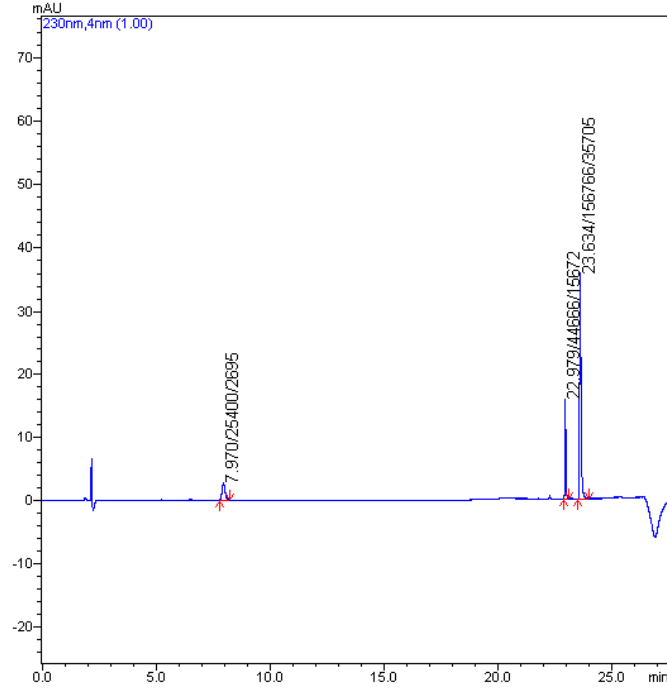
#### ***YPSK yönteminin tablet ve idrar numunelerine uygulanması***

Bu çalışmada geliştirilen YPSK yöntemi ile IRB ve HCT'nin hem ilaç tabletlerinden hem de idrar numunesinden analizleri yapılmıştır. Yöntemin numuneye uygulanması kısmında yine karşılaştırmalı sonuçlar elde etmek ve yöntemin numuneler üzerine spesifikliğini göstermek amacıyla yeni nesil monolitik kolon yanında birinci nesil monolitik kolon ve Fortis C<sub>18</sub> kolon da kullanılmıştır.

İlk çalışmalar yeni nesil monolitik kolon üzerinden yürütülmüştür. Co-İrda® ilaç tableti (300 mg IRB/12.5 mg HCT), daha önce deneysel kısımda anlatıldığı şekilde çözeltisi hazırlanmıştır. 1 mL'lik vialde, 50 µL 1:5 oranında %25 ACN ile seyreltilen tablet çözeltiden ve 50 µL AGO'dan alınıp %25 ACN ile



tamamlanmıştır. Bu çözelti iyice karıştırılıp analize verilmiştir. Tablet çözeltisinden elde edilen kromatogram Şekil 34’te verilmiştir.



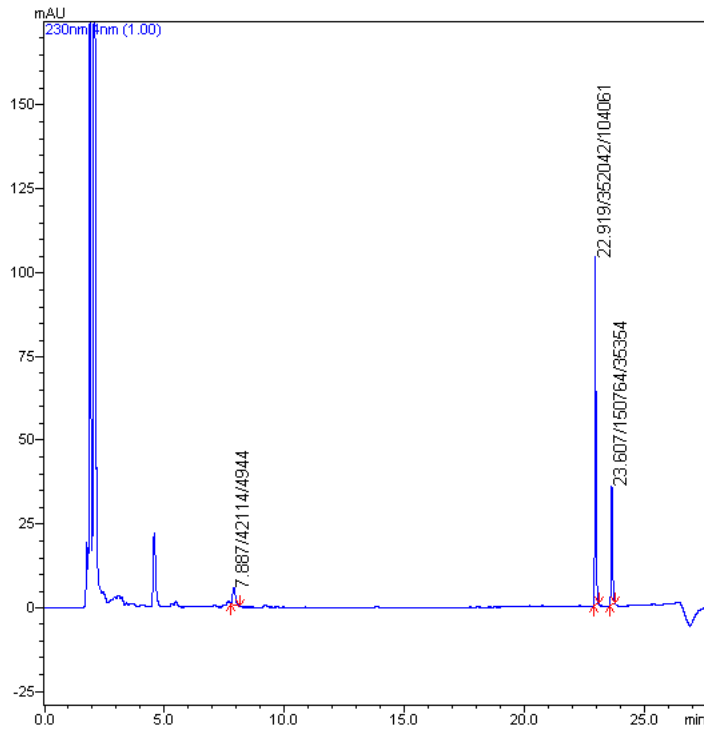
Şekil 34. Co-İrda® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram HCT ( $4.2 \times 10^{-6}$  M, 7.970 dk), IRB ( $7.0 \times 10^{-5}$  M, 22.979 dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 23.634 dk)

Tablet çözeltisinden analiz işlemi 10 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen kromatogramlardan IRB ve HCT’nin IS’ye göre PN değerleri hesaplanmış ve bu PN değerleri yardımıyla IRB ve HCT’nin doğruluk çalışmalarıyla elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak tabletteki IRB ve HCT miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 27’de verilmiştir.

IRB ve HCT maddeleri idrar örneklerinden de eş zamanlı olarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında kullanılan kolon mezopor gözenek yapısının sağladığı geniş yüzey alanından dolayı yüksek ayırma gücüne sahiptir. Ayrıca monolitik kolonlarla yapılan önceki çalışmalarda kolonun özelliğinden dolayı biyolojik numuneler herhangi bir ön hazırlık işlemine gerek duyulmadan sisteme verilip analiz edilmiştir (Bellomario ve ark., 2009; Penner ve ark., 2010). Bu avantajlar dikkate alınarak çalışmada idrara herhangi bir ön hazırlık işlemi (ekstraksiyon vb.) uygulanmamıştır. İdrar örnekleri oda sıcaklığına geldikten sonra, deneysel kısımda anlatıldığı şekilde, sadece santrifüjleme, süzme ve seyretme işlemlerine maruz bırakılmıştır. Vial içerisine 500 µL IRB-HCT karışımı, 50 µL AGO ve 650 µL 1/10 oranında seyreltilmiş idrar koyularak analize verilmiştir. IRB-HCT standartlarını içeren idrarın analizi sonucu elde edilen kromatogram Şekil 35’te verilmiştir.

Çizelge 27 . Belirlenen koşullar altında gerçekleştirilen tablet analizlerinin sonuçları (n=10)

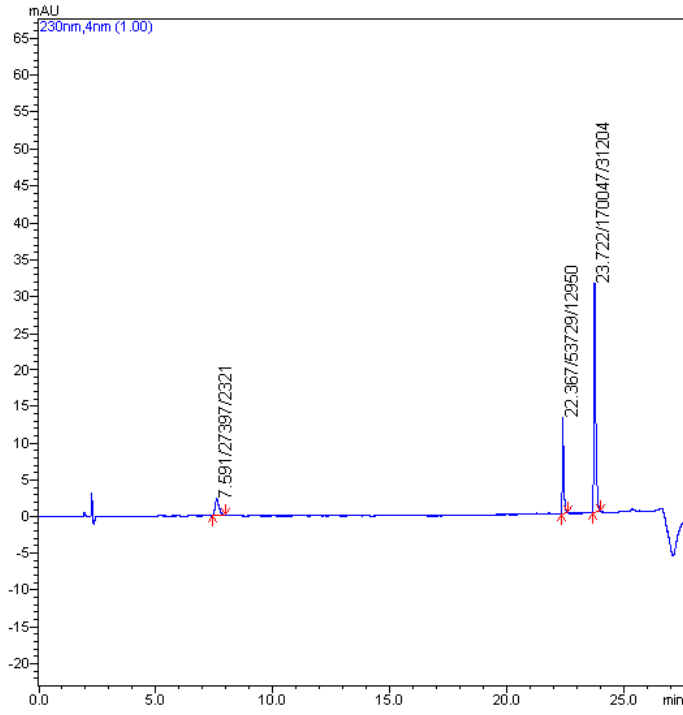
	IRB	HCT
<b>Ortalama</b>	299.9	12.50
<b>Minimum</b>	298.9	12.47
<b>Maksimum</b>	300.5	12.55
<b>Standart sapma</b>	0.5109	0.02283
<b>Ortalamanın standart hatası</b>	0.1616	0.007219
<b>En düşük ortalama GA %95</b>	299.5	12.48
<b>En yüksek ortalama GA %95</b>	300.3	12.52
<b>Varyasyon katsayısı</b>	0.17%	0.18%



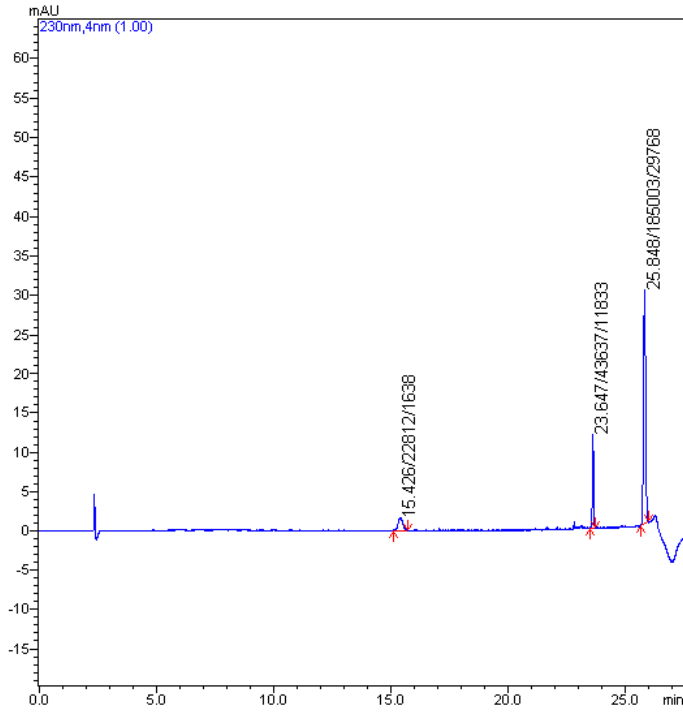
Şekil 35.  $1.008 \times 10^{-5}$  M HCT,  $1.680 \times 10^{-4}$  M IRB ve  $1.645 \times 10^{-5}$  M AGO içeren idrar analiziyle elde edilen kromatogram

Kromatogramlardan da görüldüğü gibi hiçbir ön işlem yapılmadan analizlenen idrarda dahi IRB, HCT ve AGO sinyalleri oldukça verimli elde edilmiştir.

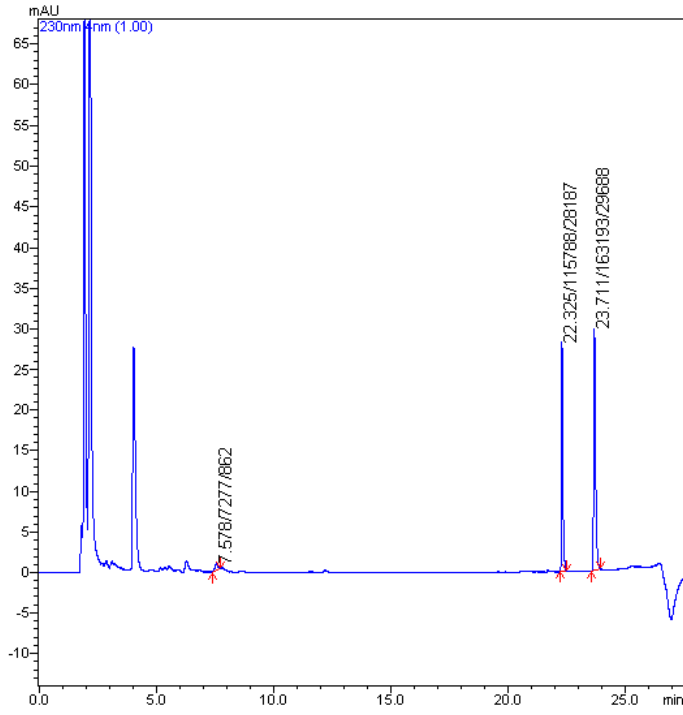
Aynı tablet ve idrar çözeltileri önce birinci nesil monolitik kolon, sonra Fortis C<sub>18</sub> kolon ile yeniden analizlenmiş ve aşağıdaki kromatogramlar elde edilmiştir.



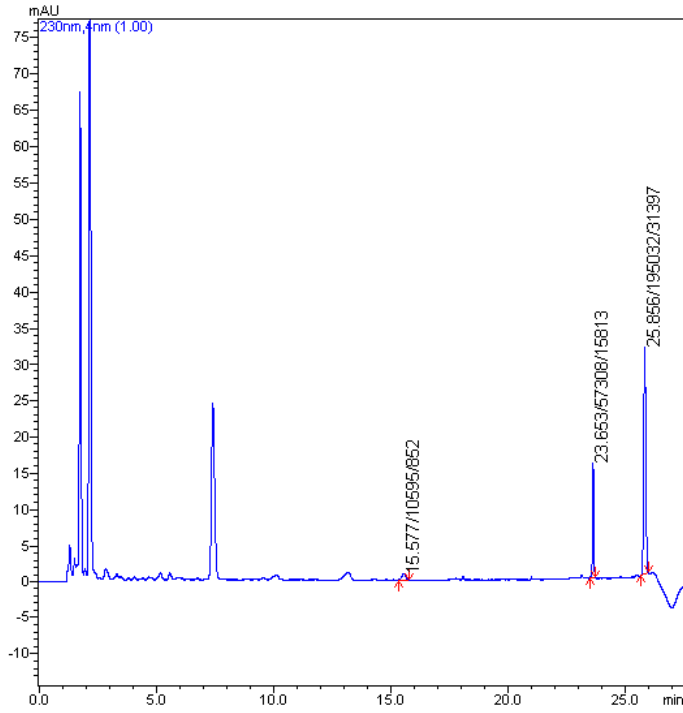
Şekil 36. Co-İrda® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram HCT ( $4.2 \times 10^{-6}$  M, 7.591 dk), IRB ( $7.0 \times 10^{-5}$  M, 22.367 dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 23.722 dk) (Chromolith® RP-18e kolon ile)



Şekil 37. Co-İrda® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram HCT ( $4.2 \times 10^{-6}$  M, 15.426 dk), IRB ( $7.0 \times 10^{-5}$  M, 23.647 dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 25.848 dk) (Fortis C<sub>18</sub> kolon ile)



Şekil 38. HCT ( $2.015 \times 10^{-6}$  M, 7.578 dk), IRB ( $3.360 \times 10^{-5}$  M, 22.325 dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 23.711 dk) içeren idrar çözeltisinin kromatogramı (Chromolith® RP-18e kolon ile)



Şekil 39. HCT ( $2.015 \times 10^{-6}$  M, 15.577 dk), IRB ( $3.360 \times 10^{-5}$  M, 23.653 dk) ve AGO ( $1.645 \times 10^{-5}$  M, 25.856 dk) içeren idrar çözeltisinin kromatogramı (Fortis C<sub>18</sub> kolon ile)

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, IRB ve HCT'nin farmasötik preparatlardan ve idrardan eş zamanlı analizi için örnek hazırlama basamakları basit ve analiz sonuçlarının güvenilir olmasının yanında kullanılan kimyasalların ucuzluğu, kolay bulunabilir iç standarda sahip olmasından dolayı bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemdeki tablet sonuçları, evrensel bir yöntem olan UV ile yapılan analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Önceki çalışmalara bakıldığında IRB ve HCT'nin insan plazması içerisinde eş zamanlı analizinde sabit akış hızı ve izokratik sisteme dayalı bir hareketli faz kullanılmıştır (Erk, 2003). Bu çalışmada ise YPSK yönteminin analiz süresinin uzun olması, değişken hareketli faz ve akış hızı sistemi kullanılması analizi daha karmaşık hale getirmektedir. Fakat analiz sırasında kolon özelliğinden dolayı daha yüksek akış hızında dahi düşük basınçlarda çalışılabilmesinden dolayı yöntemi üstün kılmaktadır.

Daha önceden yapılan çalışmalarda genellikle 3 µm ve 5 µm partikül boyutuna sahip C<sub>18</sub> yapısındaki kolonlarla ayırımlar yapılmıştır (Erk, 2003; Rane ve ark., 2010 ve Tutunji ve ark., 2010). Fakat ilk defa bu çalışmada IRB ve HCT ayırımlarının monolitik kolonlarla daha iyi yapıldığı gösterilmiştir. Bu kolonlar C<sub>18</sub> kolonlara göre daha düşük basınçlarda çalışma imkanı sunmaktadır. Ayrıca dolgu maddesinin özelliğinden ve mezopor/makropor büyüklüklerinden dolayı biyolojik sıvılar herhangi bir ön hazırlık işlemine ihtiyaç duyulmadan basit bir seyreltme işlemi ile sisteme verilebilmektedir (Bellomario ve ark., 2009; Penner ve ark., 2010). Çalışmada biyolojik numuneye yapılan bir ön hazırlık işleminin olmamasından dolayı toplam maliyet azaltılıp zamandan tasarruf sağlanmıştır.

Diğer yandan bu çalışmada iki monolitik kolon ve bir C<sub>18</sub> kolon olmak üzere üç farklı kolonun performansları da karşılaştırılmıştır. Sistem uygunluk testlerine göre en yüksek teorik tabaka sayısı ve ayırım gücü yeni nesil monolitik kolonlarda elde edilmiştir. Bu parametreler yönünden yeni nesil monolitik kolonu birinci nesil monolitik kolon ve ardından C<sub>18</sub> kolon takip etmektedir. Ayrıca yeni nesil monolitik kolonda IRB'nin HCT'ye göre bağıl alıkonma zamanı 2.91 iken, birinci nesil monolitik kolonda 2.92 olarak elde edilmektedir. Bu değerler hemen hemen aynı olmasına rağmen birbirinin alternatifini olarak kullanıldıklarında farklı alıkonma zamanlarına sahip IRB ve HCT pikleri verecekleri için birbirlerine karşı alternatif olarak kullanılmamalıdır.

Önceki çalışmalarda da (Erk, 2003 ve Rane, 2010) olduğu gibi analizler PDA dedektör kullanılarak yapılmış ve geliştirilen yöntemin spesifikliğini arttırılmıştır. Bu dedektör yardımıyla IRB ve HCT piklerinin saflıkları da kolaylıkla incelenmiştir. Fakat, KS'nin dedektör olarak kullanıldığı çalışmalarda daha düşük derişimlere inilmiştir (Tutunji ve ark., 2010). Bununla birlikte KS bağıli sistemlerin kurulum maliyetlerinin çok daha yüksek olması, rutin uygulamalarda örneklerin yoğun temizleme basamaklarına tabi tutulması ve standart YPSK çözücülerine göre daha yüksek kalitede çözücü kullanılması gerekliliği PDA dedektörlü uygulamaları KS dedektörlü uygulamalara üstün kılmaktadır.

Ayrıca bu çalışmada IRB standart çözeltileri için LOD  $1.82 \times 10^{-6}$  M (0.78 µg/mL) ve LOQ  $5.52 \times 10^{-6}$  M (2.37 µg/mL) iken, HCT standart çözeltileri için LOD  $1.122 \times 10^{-7}$  M (0.033 µg/mL) ve LOQ  $3.401 \times 10^{-7}$  M (0.101 µg/mL) değerlerine

ulaşmıştır. İdrar içerisinde ise IRB için LOD  $1.616 \times 10^{-6}$  M (0.69 µg/mL) ve LOQ  $1.616 \times 10^{-6}$  M (0.69 µg/mL) iken, HCT için LOD  $2.885 \times 10^{-7}$  M (0.086 µg/mL) ve LOQ  $8.744 \times 10^{-7}$  M (0.26 µg/mL) olarak elde edilmiştir. Diğer çalışmalarda Erk (2003) PDA dedektör kullanarak IRB için ve 0.98 µg/mL LOD ve 2.98 µg/mL LOQ'ya, HCT için ise 0.43 µg/mL LOD ve 1.86 µg/mL LOQ değerlerine inebilmiştir. Tutunji ve arkadaşları (2010) ise KS dedektörle IRB için 0.01 µg/mL LOD ve 0.06 µg/mL LOQ, HCT için 0.51 ng/mL LOD ve 1.0 ng/mL LOQ değerlerini elde etmişlerdir. Buradan da görüldüğü gibi KS kadar hassas olmasa da PDA dedektörle oldukça düşük derişimlere inilebilmiştir.

Analizler sonucunda elde edilen kromatogramlar değerlendirilirken IS'nin pik normalizasyonu ile birlikte kullanılması yöntemi dış faktörlerden kaynaklanan etkilere karşı daha dayanıklı hale getirmiştir. Bu şekilde yöntemden, cihazdan ve analizciden meydana gelen hatalar en aza indirilmiştir.

Deneysel ve istatistiksel veriler değerlendirildiğinde, geliştirilen yöntemin tablet ve idrar dışında diğer biyolojik sıvılara da uygulanabilmesi mümkündür. Daha hassas sonuçların elde edilebilmesi için analizler ultra hızlı sıvı kromatografi ve SK/KS kullanılarak gerçekleştirilebilir.

## KAYNAKLAR

Albero, I.; Ródenas, V.; García, S.; Sánchez-Pedreño, C. J. Pharm. Biomed. Anal., 29, 299-305, 2002

Bae, S.K.; Kim, M.J.; Shim, E.J.; Cho, D.Y.; Shon, J.H; Liu, K.H.; Kim, E.Y.; Shin J.G. Biomed. Chromatogr., 23, 568–572, 2009

Bellomarino, S.A.; Brown, A.J.; Conlan, X.A.; Barnett, N.W. Talanta, 77, 1873-1876, 2009

Bozal, B.; Doğan-Topal, B.; Uslu, B.; Özkan, S. A.; Aboul-Enein, H. Y. Anal. Lett., 42, 2322-2338, 2009

Can, N.O. J. Sep. Sci., 34, 2223–2231, 2011

Can, N.O.; Arlı G. J. AOAC Intern., 93, 4, 1077-1085, 2010

Carlucci, G.; Di Carlo, V.; Mazzeo, P. Anal. Lett., 33, 2491-2500, 2000

Caudron, E.; Laurent, S.; Billaud, E.M.; Prognon, P. J. Chromatogr. B, 801, 339-345, 2004

Chang, S.Y.; Whigan, D.B.; Vachharajani, N.N.; Patel, R. J. Chromatogr. B, 702, 149-155, 1997

Dökmeci, İ. , Farmakoloji Temel Kavramlar, 349, 2000

Dökmeci, İ. , Farmakoloji Temel Kavramlar, 668-672, 2000

Erk, N. J. Chromatogr. B, 784, 195-201, 2003a

Erk, N. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 26, 15, 2581-2591, 2003b

Fang, W.; Xie, W.; Hsieh, Y.-K.; Matuszewski, K. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 28, 2681-2703, 2005

González, L.; Lopéz, J.A.; Alonso, R.M.; Jiménez, R.M. J.C J. Chromatogr. A, 949, 49-60, 2002

Gupta, V.K.; Jain, R.; Agarwal, S.; Mishra, R.; Dwivedi, A. Anal. Biochem., 410, 266-271, 2011

Hillaert, S.; Van den Bossche, W. J. Pharm. Biomed. Anal., 31, 329-339, 2003

**http-1** Chromolith® Monolitik Formu

[www.merckmillipore.com.mx/chemicals/chromolith-monolithic-hplc - columns/turkey/c\\_MHab.s1LrkkAAAEWq.AfVhTI](http://www.merckmillipore.com.mx/chemicals/chromolith-monolithic-hplc-columns/turkey/c_MHab.s1LrkkAAAEWq.AfVhTI) (16.12.2012)

**http-2** A New Generation of Silica-Based Monoliths HPLC Columns with Improved Performance

[www.chromatographyonline.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=772076](http://www.chromatographyonline.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=772076) (28.05.2012)

International Conference on Harmonisation Expert Working Group: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). In: ICH Harmonised Tripartite Guideline, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 2005

- Joseph-Charles, J.; Brault, S.; Boyer, C.; Langlois, M.-H.; Cabrero, L.; Dubost, P. *Anal. Lett.*, 36: 11, 2485-2495, 2003
- Kayaalp, O. , Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 11. Baskı, 358-359, 2006
- Kayaalp, O. , Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 11. Baskı, 377-378, 2006
- Kayaalp, O. , Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 2. Cilt, 7. Baskı, 1995
- Khodke, A.S.; Potale, L.V.; Damle, M.C.; Bothara, K.G. *Pharm. Meth.*, 1, 39-43, 2010
- Liu, F.; Xu, Y.; Gao, S.; Zhang, J.; Guo, Q. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44, 1187-1191, 2007
- Moffat, A.C.; Osselton, M. D.; Widdop, B., *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, 4. Baskı, 1493-1494, 2011
- Moffat, A.C.; Osselton, M. D.; Widdop, B., *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, 4. Baskı, 1525-1526, 2011
- Nie, J.; Zhang, M.; Fan, Y.; Wen, Y.; Xiang, B.; Feng, Y.Q. *J. Chromatogr. B*, 828, 62-69, 2005
- Penner, N.; Ramanathan, R.; Zgoda-Pols, J.; Chowdhury, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 52, 534-543, 2010
- Rane, V.P.; Patil, K.R.; Sangshetti, J.N.; Yeole, R.D.; Shinde, D.B. *J. Chromatogr. Sci.*, 48, 595-600, 2010
- Razak, O. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, 433-440, 2004
- Sridharan, D.; Thenmozhi, A.; Rajamanickam, V.; Sundaranandavalli, S.; Palanikumar, B. *Intern. J. ChemTech Research*, 2, 876-879, 2010
- Şatana, E.; Altınay, Ş.; Göğer, N.G.; Özkan, S.A.; Şentürk Z. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25, 1009-1013, 2001
- Tutunji, L.F.; Tutunji, M.F.; Alzoubi, M.I.; Khabbas, M.H.; Arida, A.I. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51, 985-990, 2010
- USP - The United States Pharmacopeia 29 – National Formulary 25, System Suitability, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1177, 2006
- USP - The United States Pharmacopeia 30 – National Formulary 25, System Suitability, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2287-2288, 2006
- Vetuschi, C.; Giannandrea, A.; Carlucci, G.; Mazzeo, P. *Il Farmaco*, 60, 665-670, 2005



**EK 1 Chromolith® High Resolution RP-18e (100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası**

**C E R T I F I C A T E O F A N A L Y S I S**

**Chromolith® HighResolution**

**RP-18e 100-4.6**

Ord. No. 1.52022.0001

Sorbent Lot No. UM1420  
Column No. UM1420/012

Date 25.10.2011

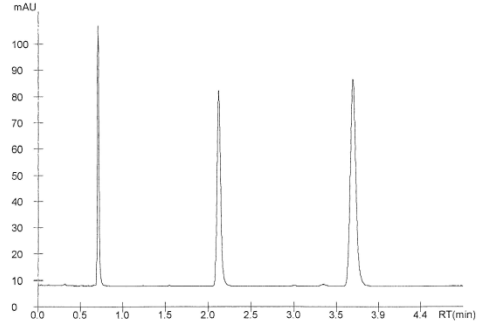
This batch of monolithic columns has successfully passed all production quality tests regarding our specifications for reproducibility.

- a. Capacity Factor  $k$
- b. Efficiency (Plate Number  $N/m$ )
- c. USP Tailing Factor ( $T_{USP}$ )
- d. Selectivity (Separation Factors  $\alpha$ )
- e. Chemical Stability

**Test result for Anthracene**

$k = 4.2$   
 $N/m = 152532$   
 $T_{USP} = 1.19$   
 $\Delta p = 59 \text{ bar}$   
 $\alpha \text{ (Anthracene/Progesterone)} = 2.11$

**COLUMN PERFORMANCE TEST CHROMATOGRAM**



**Sample Components**

- 1. Thiourea (10 µg/ml)
- 2. Progesterone (100 µg/ml)
- 3. Anthracene (10 µg/ml)

**Test Conditions**

Eluent: Acetonitrile/Water (60/40, v/v)  
Flow Rate: 2 ml/min  
Inj. Volume: 1 µl  
Detection: UV 254 nm  
Cell Volume: 13 µl  
Temperature: ambient

*Dr. Reiner Vogt*  
Quality Control

*This document has been produced electronically and bears no*

Made in Germany

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany  
Tel. +49 (0)6151-72 2440  
EMD Chemicals Inc., One International Plaza, Suite 300  
Philadelphia, PA 19113, USA, Tel. 1-800-645-5476

S.00000.2092-6001324947



## CERTIFICATE OF ANALYSIS

### Chromolith® Performance

RP-18e 100-4.6

Ord. No. 1.02129.0001

Batch No. UM6151  
Rod No. UM6151/067

Date 16.05.2007

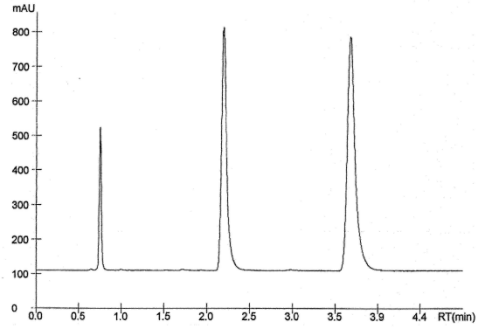
This batch of monolithic columns has successfully passed all production quality tests regarding our specifications for reproducibility

- Capacity Factor k
- Efficiency (Plate Number N/m)
- USP Tailing Factor ( $T_{USP}$ )
- Selectivity (Separation Factors  $\alpha$ )
- Chemical Stability

#### Test result for Anthracene

k = 4.1  
N/m = 84854  
 $T_{USP}$  = 1.57  
 $\Delta p$  = 21 bar  
 $\alpha$  (Anthracene/Progesterone) = 2.01

#### COLUMN PERFORMANCE TEST CHROMATOGRAM



#### Sample Components

- Thiourea (10 µg/ml)
- Progesterone (100 µg/ml)
- Anthracene (10 µg/ml)

Dr. Hans D.J. Müller  
Quality Assurance Production

#### Test Conditions

Eluent: Acetonitrile/Water (60/40, v/v)  
Flow Rate: 2 ml/min  
Inj. Volume: 1 µl  
Detection: UV 254 nm  
Cell Volume: 13 µl  
Temperature: ambient

This document has been produced electronically and bears no signature.

**DIVISION Performance & Life Science Chemicals (PLS)**  
**Certified Quality Management System**  
according to DIN ISO 9001



**Merck KGaA · 64271 Darmstadt · Germany**  
Fax +49 (0)61 51 72 60 80  
Website: [www.chromatography.merck.de](http://www.chromatography.merck.de)

## EK 3 Fortis C18 (5 µm, 100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası



45 Coalbrookdale Road  
Dunmurry, Glasgow, G7 7DU  
Tel: +44 (0)151 336 2266  
Fax: +44 (0)151 336 2265  
Email: sales@fortistechnologies.com  
Website: www.fortistechnologies.com

### QUALITY ASSURANCE

Phase: 5µm Fortis C18

Part Number: F18-050505

Column Dimension: 100x4.6mm

Batch Number: 185-184

Column Backpressure: 60 Bar

Mobile Phase: 60:40 ACN:Water

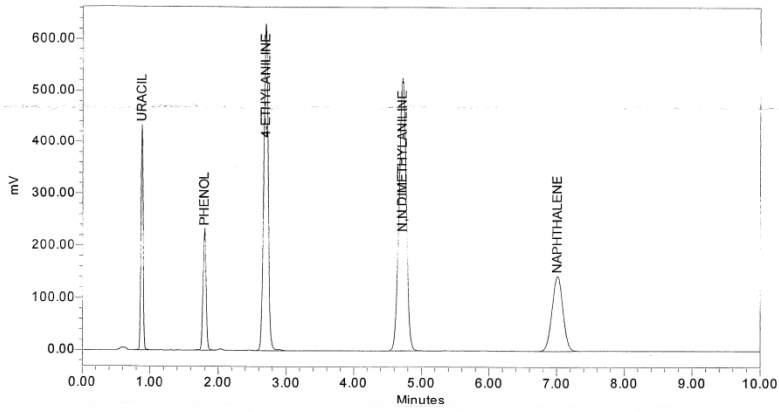
Flow: 1.0ml/min

Sample Volume: 10µl

Wavelength: 254nm

Temperature: 20°C

Serial Number: B10110305-1



Column Performance

Name	RT(min)	Capacity	Resolution	Symmetry	Plate Count
1 URACIL	0.880	-0.120		1.13	3557
2 PHENOL	1.800	0.800	12.815	1.08	7698
3 4-ETHYLANILINE	2.697	1.697	8.818	1.07	8326
4 N,N DIMETHYLANILINE	4.718	3.718	12.731	1.03	9477
5 NAPHTHALENE	7.012	6.012	9.194	1.02	8999

## EK 4 İrbesartan standart maddesinin analiz sertifikası



ULKAR KİMYA  
SANAYİ VE TİCARET A.Ş.

ULKAR KİMYA SANAYİ VE TİCARET A.Ş.  
59500 Organize Sanayi Bölgesi, Çerkezköy, Tekirdağ

### ANALİZ SERTİFİKASI

Malzeme Kodu/Tanımı	:11000012 İrbesartan E.U.		
Üretici/Satıcı Firma	: -		
Analiz Tarihi	:20.11.2008	Miktar	:28,890 KG
SAP Batch No	:8L0008	Kontrol Parti No	:040000021251
Satıcı Batch No	: -		
		Son Kullanma Tarihi	:16.11.2013
Saklama Şartı	:İYİ KAPATILMIŞ KAPLARDA. 30°C'NİN ALTINDA SAKLANIR.		

ANALİZLER	SPEŞİFİKASYONLAR	SONUÇLAR	METOD
GÖRÜNÜŞ	Beyaz veya beyazımsı, kristal toz.	0001 UYGUN Beyaz kristal toz.	USP Current Edition
POLİMORFİZM	Form A olmalı.	UYGUN Form A	Firma Spesifikasyonu
ÇÖZÜNÜRLÜK	Pratik olarak suda çözünmez. Etil alkolde ve metilen klorürde az çözünür.	0001 UYGUN Suda çözünmedi.Etanol ve metilen klorürde az çözündü.	USP Current Edition
TANIMA A-IR SPEKTRUM	IR spektrumu standarda uymalıdır.	0001 UYGUN Standart ile numune aynı pikleri verdi.	USP Current Edition
TANIMA B-HPLC	HPLC kromatogramı standarta uymalıdır.	UYGUN	USP Current Edition
SU	Max 0,50 %	0,34 %	USP Current Edition
AĞIR METAL	Max 0,002 %	0,002 %	USP Current Edition
KURUTMA KAYBI	Max 0,50 %	0,19 %	Firma Spesifikasyonu
BAĞIMLI MADDELER-İMPURITE A	Max 0,20 %	0,00 %	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
BAĞIMLI MADDELER-İMPURITE B (1-(2'-C	Max 0,10 %	0,00 %	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
BAĞIMLI MADDELER-TRIFENİL METANOL	Max 0,10 %	0,00 % Dedekte edilmedi.	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
SONUÇ	Kabul	ONAY TARİHİ	28.11.2008
AÇIKLAMA	ca 28.11.2008		
ANALİZİ YAPAN Eda BAŞARIK Okuyucu Analizci 27.11.08	KONTROL EDEN E.ŞEKER 28.11.2008	ONAY Dursun Gümüş 28.11.2008	

1 / 2



## ANALİZ SERTİFİKASI

Malzeme Kodu/Tanımı	:11000012 Irbesartan E.U.		
Üretici/Satıcı Firma	:-		
Analiz Tarihi	:20.11.2008	Miktar	:28,890 KG
SAP Batch No	:8L0008	Kontrol Parti No	:040000021251
Satıcı Batch No	:-		
		Son Kullanma Tarihi	:16.11.2013
Saklama Şartı	:İYİ KAPATILMIŞ KAPLARDA. 30°C'NİN ALTINDA SAKLANIR.		

ANALİZLER	SPESİFİKASYONLAR	SONUÇLAR	METOD
BAĞIMLI MADDELER- METOKSİTRİFENİL METAN	Max 0,10 %	0,00 % Dedekte edilmedi.	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
BAĞIMLI MADDELER-TEK BİLİNMEYEN İMPURİTE	Max 0,10 %	0,00 % Dedekte edilmedi.	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
BAĞIMLI MADDELER -TOPLAM İMP.	Max 0,50 %	0,03 %	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
MIKTAR TAYINI	(98,00)-(102,00) %	99,63 %	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
ARTIK SOLVENT - METANOL	Max 3000,0 ppm	0,0 ppm	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
AZİD LIMITİ	Max 10,00 ppm	0,00 ppm	USP Current Edition
PARTİKÜL BOYUTU-D90	Max 10,00 mikron	6,12 mikron	Firma Spesifikasyonu
ARTIK SOLVENT - ETİL ALKOL	Max 5000,0 ppm	84,4 ppm	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
ARTIK SOLVENT - ETİL ASETAT	Max 5000,0 ppm	384,4 ppm	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
ARTIK SOLVENT - ASETON	Max 5000,0 ppm	0,0 ppm	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.

SONUÇ	Kabul	ONAY TARİHİ	28.11.2008
AÇIKLAMA	KA 4 28.11.2008		
ANALİZİ YAPAN Etki BAŞTÜRK Ed. O. HANCI Fizik Bölümünden E. H. Y. 27.11.08	KONTROL EDEN F. KALEK 28.11.2008	ONAY Doruk Gümüş 28.11.2008	

## EK 5 Hidroklorotiazid standart maddesinin analiz sertifikası



Cambrex Profarmaco Milano S.r.l.  
Via Curiel 34, 20067 Paullo (MI)

### Certificate of Analysis

Product	HYDROCHLOROTHIAZIDE	C.A.S. n.	58-93-5
Batch	273738	Formula	C7H8ClN3O4S2
Production date	June 2008	M.W.	297.7
Expiration date	April 2013	T.S.	014.010
Analysis	June 26 2008		

DETERMINATION	SPECIFICATION	RESULT
DESCRIPTION	White or almost white crystalline powder	PASS
SOLUBILITY	NaOH sol.	Clear solution PASS
	n-Butylamine	Clear solution PASS
	Dimethylformamide	Clear solution PASS
COLOR	Abs. at 420 nm in NaOH sol.	NMT 0.100 0.015
IDENTIFICATIONS	IR spectrum	Conforms to standard PASS
	UV spectrum - USP	Conforms to standard PASS
	UV spectrum - EuPh	Abs ratio 273/323 between 5.4 - 5.7 PASS
RESIDUE ON IGNITION		NMT 0.1 % 0.0
HEAVY METALS		NMT 10 ppm PASS
LOSS ON DRYING		NMT 0.5 % 0.0
WATER		NMT 0.5 % 0.1
ASSAY	By titration (on dried basis)	98.0 / 102.0 % 101.5
	By HPLC (on dried basis)	98.0 / 102.0 % 101.4
RELATED SUBSTANCES BY HPLC	4-NH2-6-Cl-1,3-benzenedisulphonamide (DSA, USP-A/EP-B)	NMT 0.500 % 0.012
	Chlorothiazide (EP-A/USP)	NMT 0.500 % 0.017
	Dimer (EP-C/USP)	NMT 0.300 % 0.061
	Single largest unknown impurity	NMT 0.100 % NONE
	Total impurities (EP requirement)	NMT 1.00 % 0.09
	Total impurities excluding DSA (USP requirement)	NMT 0.900 % 0.078
CHLORIDES		NMT 100 ppm PASS
SELENIUM		NMT 30 ppm NOT USED
ACIDITY-ALKALINITY	0.01M HCl	NMT 0.4 ml PASS

This batch has been manufactured, packaged and tested in accordance with EU GMP Guideline, Volume 4 Part II (ICHQ7)

The product conforms to requirements of:  
USP31 - EuPh6

QUALITY ASSURANCE DIRECTOR  
Dr. Domenico Casucci



## EK 6 Agomelatin standart maddesinin analiz sertifikası

**SIGMA-ALDRICH®**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

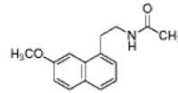
Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

### Certificate of Analysis

Product Name:  
Agomelatine - ≥98% (HPLC)

**Product Number:** A1362  
**Lot Number:** 011M4710V  
**Brand:** SIGMA  
**CAS Number:** 138112-76-2  
**Formula:** C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>  
**Formula Weight:** 243.30 g/mol  
**Storage Temperature:** Store at 2 - 8 °C  
**Quality Release Date:** 28 FEB 2011



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off-White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
> 20 mg/mL DMSO		
Elemental Composition	Pass	Pass
C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>		
Purity (HPLC)	≥ 97.5%	> 99.5%
HPLC Identity	Conforms	Conforms
co-elutes with the reference lot		

Brendan Nye, QC Team Leader  
Quality Control  
Natick, Massachusetts US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1