

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİNAPRİL HCL VE HİDROKLOROTİYAZİDİ BİRLİKTE İÇEREN KOMBİNE
FARMASÖTİK PREPARATLARDAN BU MADDELERİN AYNI ANDA ANALİZİ İÇİN
YENİ KROMATOĞRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Serkan ALTUNSOY

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. Bengi USLU

2010 – ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	VIII
Çizelgeler	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri (ACEİ)	6
1.1.1. Cilazapril	9
1.1.2. Kaptopril	11
1.1.3. Enalapril	12
1.1.4. Fosinopril	14
1.1.5. Trandopril	15
1.1.6. Ramipril	16
1.1.7. Lisinopril	18
1.1.8. Spirapril	19
1.1.9. Perindopril	20
1.1.10. Benazepril	22
1.1.11. Zofenapril	23
1.1.12. Delapril	24
1.2. Kinaprilve Hidroklorotiyazid Genel Bilgiler	25
1.2.1 Kinapril ve Hidroklorotiyazid'in Kimyasal Yapısı	27
1.3. Çalışmanın Amacı	28
1.4. Kinapril ve Hidroklorotiyazid Literatürde Yer Alan Tayin Yöntemleri	29
1.4.1. Kromatografi Kullanılan Tayin Yöntemleri	29
1.4.2. Elektroforez Kullanılan Tayin Yöntemleri	34

1.4.3.	Elektrokimyasal Tayin Yöntemleri	35
1.4.4.	Spektrofotometri	36
1.5.	Kromatografi	37
1.5.1.	İyon Kromatografi	40
1.5.2.	Sıvı Kromatografi	44
1.5.3.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	49
1.6.	Analitik Yöntem Validasyonu	78
1.7.	Validasyon Genel İşlemleri	79
1.8.	Tipik Validasyon Karakteristikleri	79
1.8.1.	Doğruluk	80
1.8.2.	Kesinlik	82
1.8.3.	Seçicilik	84
1.8.4.	Teshiş Sınırı Gözlenebilirlik Sınırı	85
1.8.5.	Tayin Alt Sınırı	86
1.8.6.	Doğrusallık	88
1.8.7.	Duyarlılık	89
1.8.8.	Çalışma Aralığı	89
1.8.9.	Sağlamlık	90
1.8.10.	Tutarlılık	90
1.8.11.	Stabilite	91
1.9.	Yöntem Validasyonu İle İlgili Çalışmaların Sunumu	93

2. GEREÇ ve YÖNTEM	94
2.1. Kimyasal Maddeler	94
2.2. Cihazlar	94
2.3. Cam ve Diğer Malzemeler	95
2.4. Çözeltilerin Hazırlanması	96
2.5. YPSK Yöntemi	98
2.5.1. Deneyin Yapılışı	98
2.5.2. YPSK Yönteminin Optimizasyonu	98
3. BULGULAR	99
3.1. Standart Maddelerin Saflık Kontrolleri	99
3.1.1. IR Spektroskopisi	99
3.2. Kinapril ve Hidroklorotiyazid Dalgaboyu Taraması	101\102
3.3. Geliştirilen YPSK-UV/GB Dedektör Yöntemine Ait Analiz Bulguları	103
3.3.1. YPSK Sistemi Optimizasyonu	103
3.3.2. Kinapril ve Hidroklorotiyazid YPSK-UV/GB Dedektör ile Yönteminin Analiz Validasyonu	113
3.3.2.1. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık	114
3.3.2.2. Sentetik Karışım	118
3.3.2.3. Dozaj Formlarına Uygulama ve Geri Kazanım	120
3.3.2.4. Doğruluk ve Kesinlik	124
3.3.2.5. Cihaz Tekrarlanabilirliği	127
4. TARTIŞMA	129
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	135
ÖZET	137
SUMMARY	138
KAYNAKLAR	140
ÖZGEÇMİŞ	147

ÖN SÖZ

Kinapril non-sülfidril anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür ve Hidroklorotiyazid de tiyazid grubu diüretik ilaçlar grubunda yer alan antihipertansif etkili ilaçlardır. Bu iki ilacın birlikte kullanımı daha etkin bir tedaviyi sağlamaktadır. Tez kapsamında bu ikili ilaç karışımının aynı anda analizi için en uygun kolon ve hareketli faz kompozisyonu ve akış hızının etkisi incelenmiş ve yeni, basit, hızlı, duyarlı ve seçici bir analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemin bu maddelerin dozaj formlarından aynı anda analizine uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve yüksek lisans tezim boyunca başta saygı değer hocalarım olmak üzere Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D.'nin tüm personeline teşekkür ederim. Bundan dolayı bana yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam, Doç.Dr. Bengi Uslu'ya sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Çalışmalarım boyunca benden desteğini esirgemeyen ve bu çalışmanın yapılması için gerekli imkânı veren, başta Haşim Yücel, Nihat Toslu ve Dr.Şule Özen'e teşekkür ederim. Ayrıca bana deney aşamasında yardımcı olan Kim. Ruşen Özkarabulut'a ve Tuba Kutucu'ya teşekkür ederim.

Hayatımda büyük bir yeri olan Sevgili Babam ve tüm aileme, bana destek oldukları için teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Seçicilik
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
k'	Kapasite faktörü
T	Kinapril
H	Hidroklorotiyazid
I	İrbesartan
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
N	Eşdeğer teorik tabaka sayısı
N_{et}	Etkin eşdeğer teorik tabaka sayısı
PSO	Pik simetri oranı
R	Ayrıcılık
r	Korelasyon katsayısı
r^2	Tanımlayıcılık katsayısı
SS	Standart sapma
BSS	Bağıl Standart sapma
t	Alıkonma zamanı
UV/GB	Ultraviyole/Görünür bölge
IR	Kızıl Ötesi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
HILIC	Yüksek Etkileşim Kromatografisi (High interaction Chromatography)
(ESI-MS)	Elektron spray iyonlaşma-Kütle spektrometre

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1. Cilazaprilin Yapısı	9
Şekil 1.2. Kaptoprilin Yapısı	11
Şekil 1.3. Enalaprilin Yapısı	13
Şekil 1.4. Fosinoprilin Yapısı	14
Şekil 1.5. Trandoprilin Yapısı	15
Şekil 1.6. Ramiprilin Yapısı	16
Şekil 1.7. Lisinoprilin Yapısı	18
Şekil 1.8. Spiraprilin Yapısı	19
Şekil 1.9. Perindoprilin yapısı	20
Şekil 1.10. Benazaprilin Yapısı	22
Şekil 1.11. Zofenaprilin Yapısı	23
Şekil 1.12. Delaprilin Yapısı	24
Şekil 1.13. Kinaprilin Yapısı	27
Şekil 1.14. Hidroklorotiazitin Yapısı	28
Şekil 1.15. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	39
Şekil 1.16. Kromatografik Ayırma Tekniğinin Şematik Gösterimi	40
Şekil 1.17. İyon Kromatografisi Sisteminin Şematik Gösterimi	41
Şekil 1.18. YPSK Cihazının Temel Bileşenleri	51
Şekil 1.19. Çözücü proglama sistemi	54
Şekil 1.20. Kolon Verimliliği	57
Şekil 1.21. YPSK Yöntemiyle Elde Edilen Kromatogram	75
Şekil 1.22. Kromatografide Piklerin Ayırımının Gösterimi	77
Şekil 1.23. Teşhis Sınırını Hesaplanmasında	
Kullanılan Sinyal/gürültü Oranı Şekli	86
Şekil 1.24. Tayin Alt Sınırı Hesaplanmasında	
Kullanılan Sinyal/gürültü Oranı Şekli	87

Şekil 1.25. Kalibrasyon Doğrusu (grafiği) Ve Eşitliği	89
Şekil 3.1. Kinaprilin IR spektrumu	99
Şekil 3.2. Hidroklorotiyazid IR spektrumu.	100
Şekil 3.3. Kinapril 20 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV/GB spektrumu	101
Şekil 3.4. Hidroklorotiyazid 12,5 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV/GB Spektrumu	102
Şekil 3.5. Hichrom C18 10 micron 4.6x250 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 20 µg/ml derişiminde Kinapril ve 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (Alıkonma zamanı 3,237 olan pik Hidroklorotiyazid, 4,391 olan pik ise Kinapril pikidir).	104
Şekil 3.6. Thermo MOS-2 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 20 µg/ml derişiminde Kinapril ve 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (Alıkonma zamanı 2,182 olan pik Hidroklorotiyazid, 6,454 olan pik ise Kinapril pikidir).	105
Şekil 3.7. Asetonitril oranının % 50 (hacimce) olduğu kromatogram ; 20µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril	107
Şekil 3.8. Asetonitril oranının % 30 (hacimce) olduğu kromatogram; 20µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril	107
Şekil 3.9. Asetonitril oranının % 20 (hacimce) olduğu kromatogram; 20µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril	108
Şekil 3.10. Asetonitril oranının % 40 (hacimce) olduğu kromatogram; 20µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril	108

- Şekil 3.11. Hareketli faz akış hızının 0,9 ml/dk olduğu kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril 109
- Şekil 3.12. Hareketli faz akış hızının 1,1 ml/dk olduğu kromatogram ; 20µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril 110
- Şekil 3.13. İç standart olarak Enalaprilin kullanıldığı kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Enalapril 111
- Şekil 3.14. İç standart olarak Perindoprilin kullanıldığı kromatogram; 20 µg/ml derişiminde Kinapril , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril 111
- Şekil 3.15. Sistem uygunluk parametrelerinin hesaplandığı kromatogram; 20µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril 113
- Şekil 3.16. Hidroklorotiyazid analizi için kalibrasyon doğrusu 115
- Şekil 3.17. Kinapril analizi için doğrusal aralık 116
- Şekil 3.18. Kinapril ve Hidroklorotiyazid içeren Accuzide (20+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kromatogram; 20 µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril 122

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.Hipertansiyon Evreleri	1
Çizelge 1.2. Katyon ve Anyon Değiştiriciler	43
Çizelge 1.3. Kolon Çeşitleri	59
Çizelge 1.4. Ters ve Normal-faz Sıvı Kromatografilerin Karşılaştırılması	66
Çizelge 1.5. Ters ve Normal-faz Sıvı Kromatografide Kullanılan Sabit Ve Hareketli Fazlar	67
Çizelge 3.1. Sistem Uygunluk Parametreleri.	112
Çizelge 3.2. Kinaprilin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait eğrisi kalibrasyon özellikleri (n=10).	116
Çizelge 3.3. Hidroklorotiyazid YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisi özellikleri (n=10)	117
Çizelge 3.4. Kinapril ve Hidroklorotiyazid içeren sentetik karışımın dedektörü YPSK-UV/GB ile analizi yöntemine ait % geri kazanım sonuçları	119
Çizelge 3.5. Kinapril ve Hidroklorotiyazid içeren Accuzide (20+12,5 mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait bulgular (n=5)	121
Çizelge 3.6. Kinapril ve Hidroklorotiyazid içeren Accuzide (20+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait % geri kazanım sonuçları (n=5)	123
Çizelge 3.7. Kinapril YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları	125
Çizelge 3.8. Hidroklorotiyazid YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine ait günler arası gün içi ve kesinlik ve doğruluk analizi bulguları	126

Çizelge 3.9. Kinapril YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine	
cihaz tekrarlanabilirliği analiz bulguları	127
Çizelge 3.10. Hidroklorotiyazid YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yöntemine	
cihaz tekrarlanabilirliği analiz bulguları	128

1. GİRİŞ

Kan dolaşımının sağlanması için bir basınç gereklidir. Bu basıncın normalden fazla olmasına hipertansiyon denir. Hipertansiyon için kullanılan diğer bir isim ise, yüksek tansiyondur. Kan basıncı ölçülürken 2 kan basıncı değerine bakılır.

- Büyük tansiyon (sistolik kan basıncı)
- Küçük tansiyon (diastolik kan basıncı) Kalbin kasılması sırasında ölçülen kan basıncı, büyük tansiyon, kalbin gevşemesi esnasında ölçülen kan basıncı ise küçük tansiyondur. Hem büyük tansiyon hem de küçük tansiyonun normalden fazla olması hipertansiyon'dur. Hipertansiyon tanısı için büyük ve küçük tansiyondan birisinin normalden yüksek olması yeterlidir. Gerek büyük tansiyon gerekse de küçük tansiyonun normalden yüksek olması önemlidir. Genel olarak, sistolik kan basıncının (büyük tansiyon) 14 cm Hg (140 mm Hg) ve diastolik kan basıncının (küçük tansiyon) 9 cm Hg'dan (90 mm Hg) yüksek olması hipertansiyon olarak kabul edilir.(O'Neil 2001; Sweetman 2007 ; Duplay 2007) Çizelge.1.1

Kategori	Sistolik kan basıncı (mm Hg)		Diastolik kan basıncı (mm Hg)
Optimal	< 120	ve	< 80
Normal	< 130	ve	< 85
Yüksek normal	130 - 139	veya	85 - 89
Hipertansiyon			
Evre 1	140 - 159	veya	90 - 99
Evre 2	160 - 179	veya	100 - 109
Evre 3	> 179	veya	> 109

Kan basıncı aynı birey içinde ve bireyler arasında farklılık gösterir. Bu nedenle bireyin kan basıncı (kan basıncının sfigmomanometre ile ayrı ayrı zamanlarda en az 3 kez ölçülmesi) yapıp ortalaması alınarak belirlenmelidir.

Hipertansiyon kalp hastalıkları için ana bir risk faktörüdür. Eğer tedavi edilmezse beyin dolaşımı, kalp, damar ve böbrek hastalıkları için ciddi hastalık ve ölüm oranlarında artışa sebep olur. Bir kez teşhis yapıp tedavi başlanırsa artan kan basıncı düşürülebilir, kalp ve kalp dolaşım sistemindeki hastalık riski azaltılabilir.

Sanayileşmiş ülkelerdeki yetişkin nüfusun %10-20 kadarında hipertansiyon bulunduğu hesaplanmaktadır. Sınırdaki hipertansiyon vakaları da katılırsa bu oran kuşkusuz daha yüksektir. Kişinin yaşı, cinsiyeti ve ırkı hipertansiyon sıklığı konusunda belirleyici faktörlerdir. Hipertansiyon siyah ırkta ve kadınlarda daha çok görülmektedir.

Kişi yaşının hipertansiyona olan katkısı öncelikle damarlarda yaşlanmaya eşlik eden anormalliklerdir. Bu durum özellikle de kanı kalpten damarlara taşıyan damarlardaki esneklik kaybı ile açıklanabilir. Ancak yaşla hipertansiyon arasındaki bu bağlantıya bazı ilkel toplumlarda hiç rastlanmamaktadır. Bu durumda etkili faktörün "uygarlaşma" ve bununla bağlantılı yaşam biçimi olduğu söylenebilir: örn. tuz kullanımı, aşırı beslenme, sedanter yaşam stresi, vs

Hipertansiyonun Sınıflandırılması

Hipertansiyon sıklıkla nedenine göre sınıflandırılır. Buna göre iki tip vardır.

esansiyel (primer) hipertansiyon
sekonder hipertansiyon

Hipertansiyon vakalarının yaklaşık %90'ı, neden (etiyoloji) bilinmediğinden primer ya da daha doğru bir deyimle "esansiyel" hipertansiyon olarak adlandırılır.

Hipertansiyon vakalarının geriye kalan bölümüne, yani yaklaşık %10'una bu durumun nedeni bilindiğinden "sekonder " hipertansiyon denir. Böbrek kökenli olan (renal) hipertansiyon bunların en yaygın olanıdır. (O'Neil 2001; Sweetman 2007; Duplay 2007; Rx Mediafarma 2008)

Sekonder Hipertansiyon

Bu tipte yüksek kan basıncı, bilinen bir etiyolojiden (hastalıktan) kaynaklanmaktadır. Neden olan hastalık tedavi edildiğinde hipertansiyon düzelir.

Böbrek hastalığı: Renal hipertansiyon olarak adlandırılır. Varolan bir böbrek hastalığı kan basıncının yükselmesine neden olur.

Endokrin hastalıkları: Endokrin sistemi etkileyen hastalıklar kan basıncını da etkiler, çünkü adrenal bezler çeşitli kan basıncını kontrol eden mekanizmaları düzenler.

İlaçlar: Bazı ilaçlar, örneğin kortikosteroidler, oral kontraseptifler (aldosteron sekresyonu ve plazma reninini arttırarak), nazal dekonjestanlar, amfetamin, tiroid hormonları, NSAID, soğuk algınlığı ilaçları, siklosporin, eritropoetin, iştah kesiciler, trisiklik antidepresanlar, MAO inhibitörleri, alkol (günde 70-100 mL civarında alkollü içki alınması hipokalemik alkalozla birlikte hipertansiyona neden olur) kan basıncının yükselmesine neden olurlar. Bu ilaçların bırakılması ile kan basıncı normale döner.

Diğer Sebepler

1. Aort koarktasyonu: aortun doğuştan dar olması
2. Gebelik toksemisi: hipertansiyon, albuminüri, ödem ile karakterize, gebeliğin ikinci yarısında oluşan bir hastalık.
3. Beyin tümörü ya da lezyonu: intrakraniyel basınca yol açarak kan basıncının hızla yükselmesine neden olur.

Esansiyel (Primer) Hipertansiyon

Hipertansiyonun bu en yaygın şekli, bilinen nedenlere bağlı değildir. Bu hipertansiyonun ortaya çıkış faktörleri hakkında kesin bilgimiz mevcut değildir. Ayrıca hipertansiyonun başlangıcında rolü olan patogenetik faktörlerin sayısı da çoktur. Hipertansiyon, kalp dolaşım sistemi, noröendokrin, renal sistemi içeren multisistem bir bozukluktur ve güçlü genetik faktörleri içerir.

Bu faktörlerden birine ya da bir başkasına farklı derecelerde önem veren çok sayıda ve farklı patogenetik teoriler öne sürülmüştür.

Esansiyel hipertansiyon ayrıca bazı risk faktörleri ile de ilgidir. Bu faktörler hipertansiyonu daha yaygın ve/ya da daha şiddetli yapmaktadır.

1. sıvı ve hacim kontrolünde değişikliklerle sonuçlanan renal işlev değişikliği
2. renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde anormallik
3. arteriol duvarlarında artmış sodyum ve tuz
4. baroreseptörlerin yeniden düzenlenmesi
5. diyetteki tuz miktarının yüksek olması
6. anormal psikolojik uyarı
7. ırk
8. cinsiyet
9. yaş

10. diabetes mellitus
11. aile hikayesinde hipertansiyon
12. hiperlipidemi(hiperkolesterolemi)
13. sigara içimi
14. obezite (şışmanlık)

Antihipertansif ilaçların sınıflaması:

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

- İdrar söktürücüler
- β adrenerjik reseptör blokerleri
- α adrenerjik reseptör blokerleri
- Kalsiyum kanal blokerleri
- Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEİ)
- Angiotensin II (AT-II) reseptör blokerleri
- Direkt etkili damar genişleticiler
- Santral etkili sempatolitik ilaçlar
- Adrenerjik nöron blokerleri
- Sadece hipertansif kriz tedavisinde kullanılan ilaçlar

1.1.Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEİ)

Renin –angiotensin-aldosteron sisteminin (RAAS) sistemik hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği ve diabetik nefropatinin patofizyolojisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. (Csikos ve ark. 1998) RAAS'ın aşırı aktivasyonu, kardiyovaskular morbidite ve mortalite riskini artırır (Alderman ve ark. (1991).Bu sistemin bloke edilmesi kan basıncını düşürür, kalp yetmezliği belirti ve bulgularını iyileştirir, diabetik nefropatide renal fonksiyonun bozulmasını önler. RAAS renin inhibitörleri (beta-bloker), ACE inhibitörleri, Angiotensin II reseptör blokerleri ve Aldosteron inhibitörleri tarafından bloke edilebilir. RAAS bloke edildiği zaman sağlanan yararların çoğu ACE inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda saptanmıştır. ACE inhibitörleri ile RAAS bloke edildiği zaman,

- a) Damar koryuyucu antiproliferatif ve antimigratuar etkiler ortaya çıkar.
- b) Endotelyal fonksiyon, arteriel komplians ve tonus iyileşir ve\ veya restore edilir, plak rüptüründen korunulur, endojen fibrinolizis artar ve antitrombosit ve direkt antiaterojenik etkiler oluşur,
- c) İnsulişn duyarlılığı iyileşir, lipid profili üzerinde olumsuz etki yoktur,
- d) Sol ventriküler preload ve afterload azalarak sol ventriküler hipertrofi azalır ve myokard oksijenasyonu iyileşir.

ACE inhibitörleri hipertansif hastalarda kan basıncının tedaviyle düşürülmesinin amacı kardiyovaskular morbitide ve mortaliteyi azaltmaktır. ACE inhibitörlerinin kan basıncını düşürmede uygun ve etkili olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir.

Ayrıca bu grup ilaçların hipertansiyonlu hastalarda morbitideve mortaliteyi konvansiyonel tedaviye benzer olarak azatlığı iki prospektif çalışmada

(Captopril prevention Project CAPPP, Swedish Trial in Old Patients-2 with Hypertension-STOP-Hypertension II) kanıtlanmıştır.(J Hypertens 1990)-(Hansson L ve ark 1999)

ACE İnhibitörleri Antihipertansif Mekanizmaları (Opie LH 1992)

1. Dolaşımdaki renin-angiotensin II sisteminin inhibisyonu,
2. Doku ve vasküler renin-angiotensin sisteminin inhibisyonu
3. Terminal nöronlardan norepinefrin salınımının azalması,
4. Bradikinin ve vasodilator prostaglandinlerin oluşumunda artış,

5. Aldosteron salımında azalma ve\veya renal kan akımının artışından dolayı sodyum retansiyonun azalmasıdır.

Angiotensin I angiotensin converting enzyme (ACE) vasıtasıyla angiotensin II'ye dönüşür. ACE'ye alternatif enzimatik yollar trypsin, cathepsin veya kalp chymase'da angiotensin I'i angiotensin II'ye dönüştürür. Bu nedenle ACE inhibitörleri angiotensin II oluşumunu %100 bloke etmez. Son yıllarda geliştirilen angiotensin II reseptör blokerleri bradikinin ve prostaglandinlerin seviyelerini değiştirmeksizin reseptör seviyesinde (AT1) AII' ye pressör ve fonksiyonel cevapları bloke ederler.

ACE İnhibitörlerinin Etkileri

Plazma renin aktivitesi	artırır.
Angiotensin I'in seviyelerini	artırır.
Angiotensin II seviyelerini	düşürür.
Alternatif yolla oluşan angiotensin II	değiştirmez
Angiotensin II subtipleri aktivasyonu	
AT1	azalır
AT2	azalır

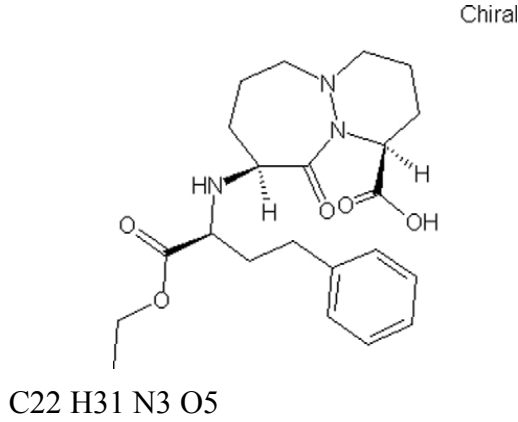
AT3	azalır
AT4	azalır
Bradikinin seviyeleri	artar
Prostaglandin seviyeleri	artar
Doku plasminojen activator seviyeleri	azalır.

Kullanımda olan ACE inhibitörleri şunlardır.(Opie LH.1992), (Burnier M.ve ark 2000)

1.Captopril	7.Perindopril	13.Spirapril
2.Enalapril	8.Quinapril	14.Zofenopril
3.Benazapril	9.Ramipril	
4.Cilazapril	10.Trandolapril	
5.Fosinopril	11.Alacepril	
6.Lisinopril	12.Delapril	

1.1.1.Cilazapril

Cilazapril bir anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE olduğunu; kininase II) inhibitörüdür. Bir ön ilaç olan (prodrug) Cilazaprilin aktif iki asitli metaboliti ilaç sınıfının başka bir üyesi olan enalapril den daha etkindir. Hipertansiyon ciddi değilse cilazaprilin yarı ömrü (30-50 saat) bir günlük dozaja izin verir. Cilazapril hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, miyokardiyal infarktüsü tedavisinde kullanılır. (Hutchison ve ark 2003a). Şekil1.1



Şekil1.1 Cilazapril Yapısı

Cilazapril etkin metaboliti olan cilazaprilat için hızla hidroliz olur. Cilazaprilatin pik plazma konsantrasyonu cilazaprilin alınmasından sonra 2 saatte oluşabilir. Tek bir doz sonrasında, kullanıcın kan basıncı 3-5 saat içinde azalmaya başlar ve 8-12 saat devam eder. % 90 oranında enzim dönüştürme inhibisyonu için yaklaşık 3 ng/ml aktif metabolitin plazma konsantrasyonu gereklidir.

Çünkü cilazaprilat idrarda elenir bu nedenle böbrek yetmezliği olan insanlarda dozun ayarlanması gerekir. Cilazapril karaciğerde aktifleştğinde dozun karaciğer yetmezliği için de ayarlanması gerekir. Aktif cilazapril metabolitinin yarı ömrü 30-50 saattir. (Hutchison ve ark 2003a)

Cilazapril angiotensin II için angiotensin I'in dönüşümünü önleyen enzim dönüştürücü inhibitöre nispeten uzun-etkili bir nonsulphydryl angiotensindir. Çünkü angiotensin II angiotensine dönüşen bir enzimin inhibitörleri vasodilasyona neden olan ve doğrudan etkili damardaraltan bir ilaçtır.

Aldosteronun serbest bırakılmasını azaltır ve böylece sodyum ve su reabsorpsiyonun azalmasını sağlar. Bu sonuçlar kan hacminde ve kalpte toplam periferik direnci düşürür (Jackson ve ark. 2001).

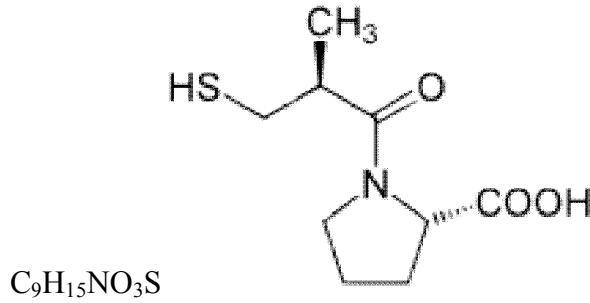
Angiotensin dönüştürme enzim inhibitörleri nabızda refleks artışına neden olmadan sistemik damar direnci azaltırlar. (Brown ve ark 1998), (Van Veldhuisen et al 1998).

Angiotensin enzim inhibitörleri dönüşümü için ana göstergeler esas hipertansiyon ve konjestif ısı yokluğu tedavisi içindir. Akut miyokardiyal kalp tıkanıklığı ile bu ilaçların enzim dönüşüm anjiyotensin dolaşan seviyelerini azaltır, sol ventrikül salgı fraksiyonunu geliştirir ve bir doza bağlı şekilde kan basıncı ve egzersiz kapasitesi iyileştirir. (Hutchison ve ark 2003a).

Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin olumsuz etkileri verimsiz öksürük, döküntü, eozinofili, anemi ve trombositte azalış bulunmaktadır. Ayrıca, bu ajanlar hipotansiyon, taşikardi, anjina, perikardit veya anephric hastalarda hipertansiyona neden olabilir. Diğer ortak yan etkileri hiperkalemi, hipertermi, hipoglisemi, hiponatremi, insülin duyarlılığı ve çinko eksikliği bulunmaktadır. (Hutchison ve ark 2003a)

1.1.2.Kaptopril

Güçlü bir ACE (Angiotensin-converting enzim) inhibitörüdür. Etki mekanizması kesinlik kazanmamakla beraber, tesirini renin-angiotensin-aldosteron sistemini inhibe ederek gösterdiği sanılmaktadır. Kaptopril, ACE'yi inhibe ederek Angiotensin I'in Angiotensin II'ye dönüşmesini engeller. Kaptopril renin miktarının düşük olduğu hipertansiyon vakalarında da etkilidir ancak bu tesirini ne yolla gösterdiği bilinmemektedir. Kaptopril, oral yoldan verildiğinde süratle emilir. Alındıktan 1 saat sonra doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır. Biyolojik yarılanma zamanı 2-5 saat civarındadır.



Şekil 1.2 Kaptoprilin Yapısı

Kaptopril ana kullanım alanı vazodilatasyon ve bazı böbrek fonksiyonu faaliyetleri inhibe etmeye dayanmaktadır. Bu avantajlar en açık biçimde aşağıdaki koşullarda görülür.

- 1) Hipertansiyon
- 2) Miyokard infarktüsü ve konjestif kalp yetmezliği
- 3) Diyabetik nefropati içinde böbrek fonksiyonlarını korur.

Ayrıca bazı hastaların özellikle duygu durumunda yükselmesine yardımcı olmaktadır. (Novel Pharmacological Approaches to the Treatment of Depression)

Ayrıca kanser tedavisinde kullanılmak için üzerinde çalışmalar yapılmıştır.(Attoub S.ve ark 2008).

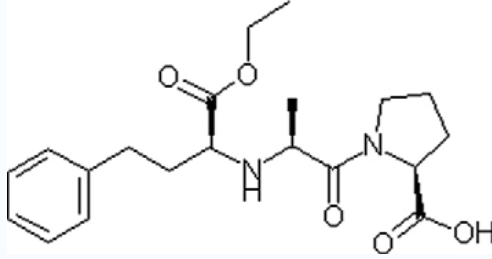
Kaptopril diğer ACE inhibitörleri gibi öksürük, döküntü ve tat bozukluklarına neden olur.(Atkinson AB ve ark 1979) Kaptopril nispeten zayıf farmakokinetik profiline sahiptir. Kısa olan bu yarı ömür süresi hasta ile olan uyumu azaltır. Bu durum hastanın günde 2-3 doz almasını gerektirir.

Kaptoprilin olumsuz etkileri öksürük, anjiyoödem, agranulocystosis, proteinüri, hiperkalemi, tat değişikliği, spermde bozukluk, postural hipotansiyon, akut böbrek yetmezliği ve lökopeni diye sayılabilir. (Smith CG ve ark 2003).

1.1.3.Enalapril

Enalapril anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. Enapril hipertansiyon tedavisi, konjestif kalp yetmezliği, post-miyokard infarktüsü, konjestif kalp yetmezliği, post-miyokard infarktüsü gibi endikasyonlar için kullanılır. (Hutchison ve ark 2003a) Enalaprilin kendisi zayıf bir ACE inhibitörüdür ama karaciğerde aktif metaboliti olana enalaprilata dönüşür. Enalaprilat ACE inhibitörü olan enalaprilden 10-20 kat daha etkindir. Enalapril genellikle tek doz uygulamadan sonra daha 24 saat etkilidir. Enalapril diğer ACE inhibitörleri gibi hipertansif hastaların tedavisinde kalsiyum kanal veya beta-adrenoseptör antagonistlerine göre inme, pnömoni riskini ve zatürre riskini azaltan ACE inhibitörüdür. (Hutchison ve ark 2003)

Chiral

C₂₀ H₂₈ N₂ O₅

Şekil 1.3 Enalaprilin Yapısı

Enalaprilin oral formu plazma düzeyinde 30-90 dakika içinde emilimi gerçekleşir. Aktif metabolitin plazma düzeyinde 3-4 saat içinde emilimi gerçekleşmektedir.

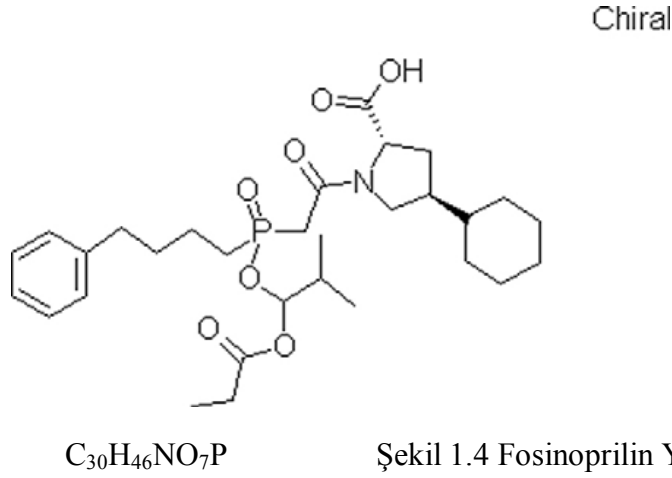
Enalaprilin tek doz alımında kan basıncında azalma 0,5-4 saat içinde gerçekleşir. 12-24 saat arası sürer. Aktif metabolitin yarılanma süresi 30-50 saattir. (Hutchison ve ark 2003).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri esansiyel hipertansiyon ve konjestif ısı yetmezliği tedavisi için kullanılır. (Hutchison ve ark 2003).

Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin olumsuz etkileri verimsiz öksürük, döküntü, eozinofili, anemi ve trombositte azalmadır. Ayrıca, bu ajanlar hipotansiyon, taşikardi, anjina, perikardit veya anephric hastalarda hipertansiyon neden olabilir. Diğer ortak yan etkiler hiperkalemi, hipertermi, hipoglisemi, hiponatremi, insülin duyarlılığı ve çinko eksikliği bulunmaktadır. (Hutchison ve ark 2003).

1.1.4.Fosinopril

Fosinopril bir phosphinic anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE olduğunu; kininase II) inhibitörüdür. Fosinopril hipertansiyon tedavisi, konjestif kalp yetmezliği, post-miyokard infarktüsü ve diğer endikasyonlar için kullanılır. (Hutchison ve ark 2003a). Fosinopril bir ön ilçatır, aktif metaboliti olan fosinoprilat bağırsak ve karaciğer içinde esterleşir. Fosinoprilin metaboliti safra ve böbrek tarafından atılımda elenir.



Fosinopril hızlı bir şekilde karaciğerde aktif metaboliti olan fosinoprilat ise bağırsak duvarında hidrolize olur. Fosinopril oral veya iv uygulamadan sonra, karaciğer yetmezliği mümkün değildir.

Fosinoprilin alınımında 3 saat sonra fosinoprilat doruk plazma seviyesine ulaşmaktadır. İlaçın alınımından sonra 1 saat içinde kan basıncında düşüş başlamaktadır. Tek dozun etkisi 24 saat sürmektedir. Hipotansif etki fosinoprilin alınımından sonra 2-7 arasında görülmektedir. Fosinopril idrar ve safrada elenirse böbrek yetmezliği için doz ayarlaması yapmak gerekmektedir. Aktif metabolit olan fosinoprilatın yarı yaşam süresi 12 saattir. (Hutchison ve ark 2003a).

Fosinopril, anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörü, anjiyotensin I den anjiyotensin II'ye dönüşümünü engelleyen, doğrudan etkili vasoconstrictor ajanıdır.

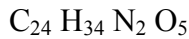
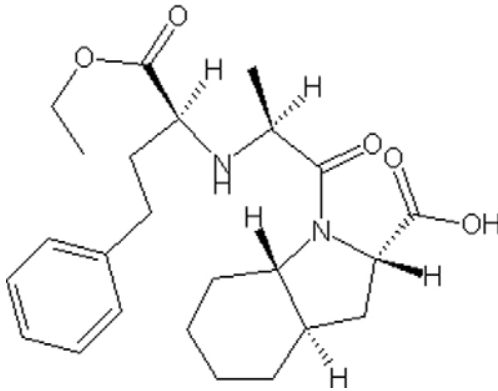
Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kalp hızında bir refleks artışına neden olmadan sistemik vasküler direnci azaltmaktadır. (Brown ve ark 1998), Van Veldhuisen et al 1998).

Fosinopril ve diğer anjiyotensin enzim inhibitörlerinin kullanımı, anjiyoödem, anuric böbrek yetmezliği, kalıtsal ya da idiyopatik anjiyoödem dönüştürme ve hamilelik gibi durumlarda uygun değildir. (Hutchison ve ark 2003a). Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin olumsuz etkileri verimsiz öksürük, döküntü, eozinofili, anemi ve trombosit toplamada azalıştır. Ayrıca, bu ajanlar hipotansiyon, taşikardi, anjina, perikardit veya anephric hastalarda hipertansiyona neden olabilir. Diğer ortak yan etkileri ise hiperkalemi, hipertermi, hipoglisemi, hiponatremi, insülin duyarlılığı ve çinko eksikliğidir. (Hutchison ve ark 2003a).

1.1.5.Trandopril

Trandolapril bir anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü klinik hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisi için kullanılır. Trandopril etil ester yapıdadır. ACE inhibitörlerinden Trandopril kendisinde 8 kat daha aktif olan ve iki asitli aktif metabolitine Trandolaprilat dönüştürülmesi gereken bir ön ilaçtır. (Physician's Desk Reference 2004).

Chiral



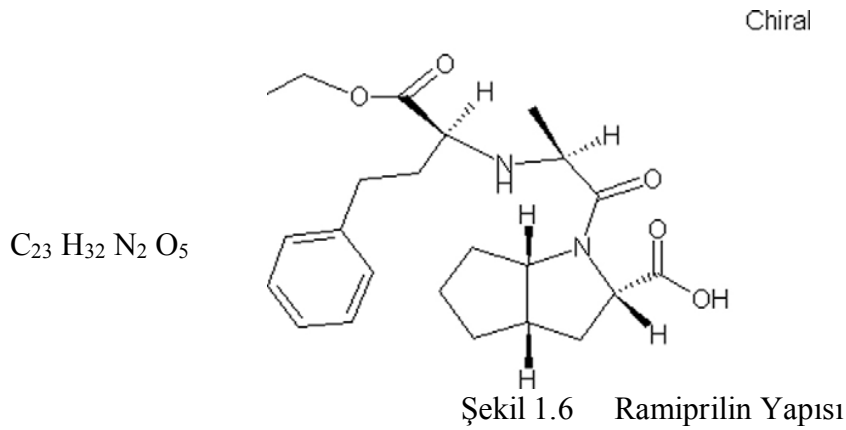
Şekil 1.5 Trandoprilin Yapısı

Trandolapril hipertansiyon, kalp yetmezliği ve sol ventrikül disfonksiyonu tedavisi için kullanılır. (Physician's Desk Reference 2004). Antihipertansif tedavi için, tek başına veya hidroklorotiyazid veya verapamil ile birlikte kullanılabilir.

Trandoprilin tek dozu (2mg) 4 saat sonunda ACE plazmasında %75-80 inhibisyon üretir. Bu oran 8 saat sonunda %10 8 gün sonunda ise yarıya düşmektedir. Maksimum ACE inhibisyonu trandoprilat konsantrasyonun 2 ng/ml de meydana gelir. Trandopril aşıırı duyarlı olmak ve daha önce ACE inhibitörleriyle anjiyoödem tedavisi görmek bu ilacın kullanılmasını sakıncalı hale getirmektedir. (Physician's Desk Reference 2004). Trandolapril kullanımının yan etkileri kalıcı olmayan üretken öksürük, anjiyoödem, hiperkalemi, bradikardi, hipotansiyon, kas ağrısı ve gastrittir. (Physician's Desk Reference 2004).

1.1.6.Ramipril

Ramipril bir anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE olduğunu; kininase II) inhibitörüdür. Bir ön ilaç olan, ramipril hızla gastrointestinal sistemden emilir ve aktif metaboliti olan ramiprilat için kapsamlı hepatik metabolizmasına uğrar. Ramiprilat Ramiprilde 6 kat daha etkili anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür.

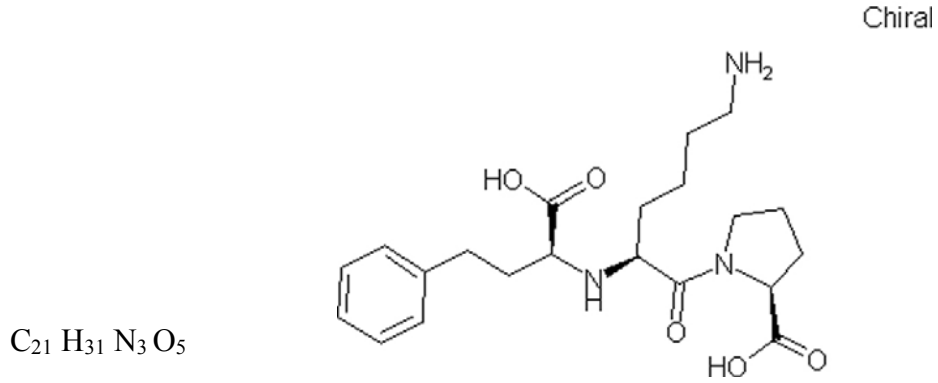


Ramiprilin doruk plazma konsantrasyonu alımından 1 saat içinde gerçekleşir. Kan basıncındaki azalma ilacın alımında sonra 2 saat içinde, zirve değerine ise 6-8 saatte ulaşır. İlaç alındıktan sonra 24 saat etkisi sürer. Ramipril idrar elenirse, doz böbrek yetmezliği ile ayarlanmalıdır. Ramiprilatın yarılanma süresi 24-50 saattir. (Hutchison ve ark 2003). Ramipril, anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörü, anjiyotensin I den anjiyotensin II'ye dönüşümünü engelleyen, doğrudan etkili vasoconstrictor ajanıdır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kalp hızında bir refleks artışına neden olmadan sistemik vasküler direnci azaltmaktadır. (Brown ve ark 1998), (Van Veldhuisen et al 1998).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri için başlıca kullanımları esansiyel hipertansiyon ve konjestif ısı yetmezliği tedavisi içindir. (Hutchison ve ark 2003). Ramipril ve diğer anjiyotensin enzim inhibitörlerinin kullanımı, anjiyoödem, anuric böbrek yetmezliği, kalıtsal ya da idiyopatik anjiyoödem dönüştürme ve hamilelik gibi durumlarda uygun değildir. (Hutchison ve ark 2003a). Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin olumsuz etkileri verimsiz öksürük, döküntü, eozinofili, anemi ve trombosit toplamada azalıştır. Ayrıca, bu ajanlar hipotansiyon, taşikardi, anjina, perikardit veya anephric hastalarda hipertansiyona neden olabilir. Diğer ortak yan etkileri ise hiperkalemi, hipertermi, hipoglisemi, hiponatremi, insülin duyarlılığı ve çinko eksikliğidir (Hutchison ve ark 2003a). Diğer daha az yaygın yan etkileri tat bozuklukları, cinsel işlev bozukluğu, döküntü ve alopesidir. Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kullanımı ile ilgili daha ciddi yan etkileri pankreatit, böbrek yetmezliği, nötropeni, hepatotoksisite, anjiyoödem, spermde ve fetal ölümdür. (Hutchison ve ark 2003).

1.1.7.Lisinopril

Lisinopril non-sülfidril ve uzun etkili anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE; kininase II) inhibitörüdür. Lisonopril hipertansiyonun tedavisi için, konjestif kalp yetmezliği, postmyocardial infarktüsü için kullanılır. (Hutchison ve ark. 2003).



Şekil 1.7 Lisinoprilin Yapısı

Lisinopril yavaş ve değişken şekilde gastrointestinal sistemden emilir, emme oranı sabit hızdadır.(0.2/sa).Lisonoprilin alımından 6-8 saat sonra doruk plazma seviyesine ulaşır, ilk saat içinde kan basıncında azalma meydana gelmektedir.

Tez doz kullanımında (20 mg) 24 saat etkisi sürmektedir. Lisinopril 10 mg doz için ortalama plazma konsantrasyonu 40 ng/ml ve 20 mg doz için ise 80-140 ng/ml dir. Çünkü lisinopril idrarda değişmeden süzülürse, böbrek yetmezliği ile dozun ayarlanması gerekir. (Hutchison ve ark 2003). Lisinopril diğerlerine göre daha uzun etkili non-sülfidril anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür. Bu durum anjiyotensin I'nin anjiyotensin II'ye dönüşmesini engeller. Çünkü anjiyotensin II doğrudan etkili vazokonstrüktördür.

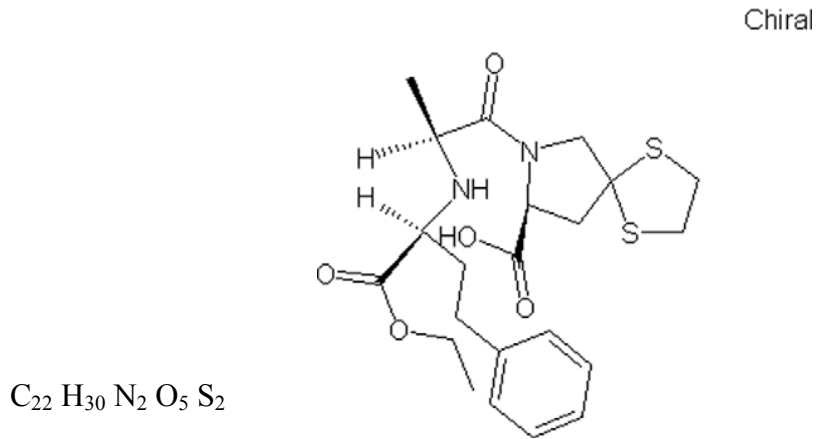
Vazodilatasyonun nedeni anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleridir. Ayrıca azalan aldosteron salgısı nedeniyle sodyum ve su reabsorbsiyonunda düşüş meydana gelmektedir. Bunun sonucunda kan hacmi toplam periferik direncinde bir azalma ile sonuçlanır. (Jackson ve ark. 2001).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kalp hızında bir refleks artışa neden olmadan sistemik vasküler direnci düşürür. (Brown ve ark. 1998), (Van Veldhuisen ve ark. 1998). Lisinopril ve diğer anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin kullanımı anjiyoödem, anurik böbrek yetmezliği, kalıtsal ya da idiyopatik anjiyoödem, hamilelik gibi durumlarda uygulanması uygun değildir. (Hutchison ve ark. 2003). Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin olumsuz etkileri verimsiz öksürük, döküntü, eozinofili, anemi ve trombosit toplamada azalıştır.

Ayrıca, bu ajanlar hipotansiyon, taşikardi, anjina, perikardit veya anephrik hastalarda hipertansiyona neden olabilir. Diğer ortak yan etkileri ise hiperkalemi, hipertermi, hipoglisemi, hiponatremi, insülin duyarlılığı ve çinko eksikliğidir. (Hutchison ve ark. 2003a).

1.1.8.Spirapril

Spirapril anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü Avrupa'da hipertansiyon tedavisi için kullanılır. Uygulamayı takiben, Spirapril aktif metaboliti spiraprilat dönüştürülür



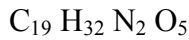
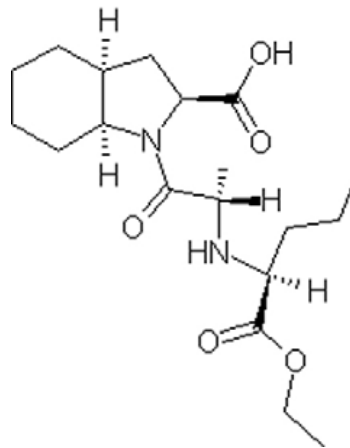
Şekil 1.8 Spiraprilin Yapısı

Sağlıklı erkek deneklerde, hidroklorotiyazid ile spirapril sabit kombinasyonları ilacın farmakokinetiğini etkilemiştir. (Schurer et al 2003). Spiraprilin aktif metaboliti spiraprilat anjiyotensin II seviyesindeki dolaşımı azaltarak hipertansif hastalarda kan basıncını azaltır. Tek başına veya HCTZ ile birlikte kullanılabilir. (Schurer et al. 2003). Sol ventrikül hipertrofisi olan hipertansif hastalarda spirapril ile, günlük tedavide sol ventrikül kitle indeksi 3 ay sonra % 14.7 6 ay sonra ise % 27.3 olmuştur. (Arend et al. 2002). Spiraprilin kullanımı ile ilgili en sık yan etki öksürüktür. (Schmidt ve ark. 1999).

1.1.9.Perindopril

Perindopril anjiyotensin II oluşumunu engelleyerek kan basıncının düşmesini sağlayan anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür. Perindopril laboratuvar hayvanlarında ve insanlarda ACE'yi inhibe için kullanılan perindoprilatı elde etmek için kullanılan bir ön ilaçtır. Perindoprilin farmakolojik aktif metaboliti perindoprilattır. Perindopril tek başına veya tiyazid diüretikler gibi diğer antihipertansif ajanlar ile birlikte, esansiyel hipertansiyon tedavisinde kullanılır.

Chiral



Şekil 1.9 Perindoprilin Yapısı

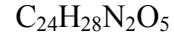
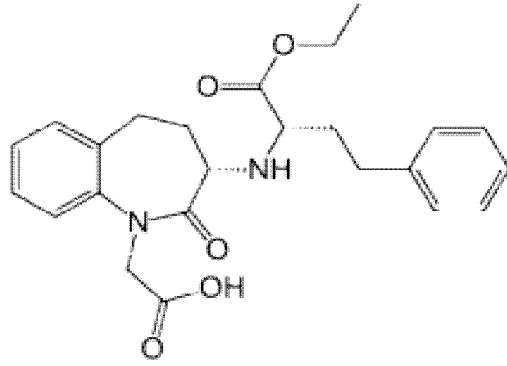
Perindoprile aşırı duyarlı olmak ya da ACE inhibitörleriyle anjiyoödem hastalığının daha önce tedavi edilmemesi Perindoprilin olumsuz etkilerindendir. Yaşlı insanların plazma konsantrasyonları genç insanlarınkinden 2 kat fazladır.

Perindoprilin bir dozu yaşlı hastalarda, özellikle CHF, böbrek ve karaciğer yetmezliği olan hastalarda azaltılmalıdır. Gebelikte fetus üzerindeki olası etkileri hakkında, özellikle ikinci ve üçüncü üç aylık dönem için uyarılar olmalıdır. Perindoprilin yan etkileri anafilaktoid reaksiyonlar, anjiyoödem semptomatik hipotansiyondur. Ayrıca eicosanoids ve polipeptid metabolizmasını etkiler. Diğer yan etkileri hiperkalemi, öksürük, nötropeni, keyifsizlik, kabızlık, ağız kuruluğu, hapşırma dahil, nazal damla, burun kanaması, ses kısıklığı, idrar tutma veya frekans, arthralgia, kas ağrısı, migren baş ağrısı, konjunktivit, kulak ağrısı, terleme ve kaşıntıdır.

1.1.10.Benazepril

Benazepril yüksek tansiyon , konjestif kalp yetmezliği tedavisinde ve kronik böbrek yetmezliğinde kullanılır.

Karaciğer tarafından kendi ester grubunun bölünmesi üzerine benazepril non-sulfidril anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü benazeprili aktif metaboliti benazeprilata dönüştürür.



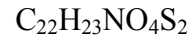
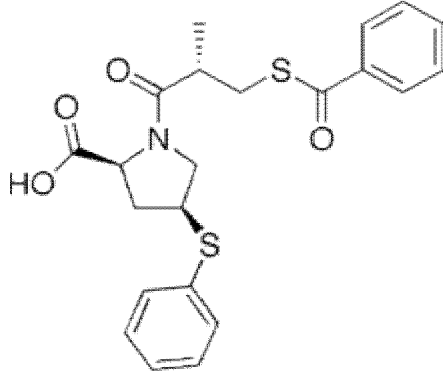
Şekil 1.10 Benazeprilin Yapısı

En sık karşılaşılan yan etkileri baş ağrısı ve öksürüktür. Anafilaksi, anjioödem, hiperkalemi veya potasyum düzeylerinde bir yükselik de oluşabilir. Benazepril gebelik sırasında fetusun zarar görmesine neden olabilir.

Bu nedenle hamilelik döneminde kullanılmamalıdır. Böbrek hastalarının üzerinde yapılan uzun süreli çalışmalarda benazepril alan hastalarda böbrek fonksiyonlarında düzelme ve böbrek rahatsızlıklarında daha yavaş ilerleme tespit edilmiştir. (Hou F ve ark. 2006) (Hitti ve ark. 2006).

1.1.11.Zofenapril

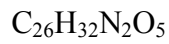
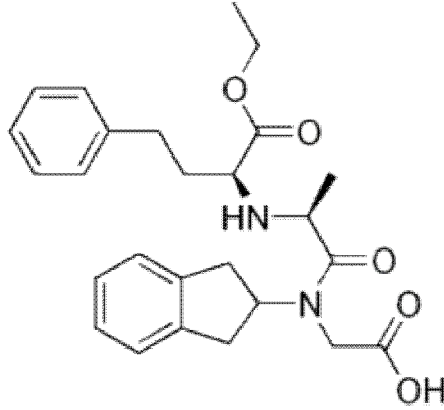
Zofenapril anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. Kalp koruma özelliği hipertansiyon tedavisinde endikedir. (Ambrosioni E 2007). Yapılan küçük çalışmalarda zefonopril diğer hipertansiflerden atenolol ve enaprilden daha etkin ve daha az yan etkisi vardır. (Nilsson P 2007) , (Mallion JM 2007).



Şekil 1.11 Zofenaprilin Yapısı

1.1.12.Delapril

Delapril anjiyotensin döüştürücü enzim inhibitörüdür. Delapril hipertansiyon tedavisinde kullanılır. Orta hipertansiyonda günlük doz 30 mg dır. Delapril kombinasyon şeklinde kullanılır. Genelde manidipin ile birleştirilerek kullanılır. Kombinasyon şeklinde kullanılması yan etkisini azaltmaktadır. En sık görülen yan etkileri baş ağrısı, ağrı, ödem ve inatçı öksürüktür. Yaşlılarda hipertansiyon komplikasyonlarında yarım doz kullanılmalıdır. Delapril çocuklarda endike değildir. Hamilelikte kullanılmamalıdır. Hipertansiyon hastası aynı zamanda karaciğer tedavisin de görüyorsa alınan doz miktarında ayarlama yapılmalıdır.



Şekil 1.12 Delaprilin Yapısı

1.2. Kinapril ve Hidroklorotiyazid Genel Bilgiler

Kinapril

Kinapril non-sülfidril anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür. Diğer grup üyelerine göre daha uzun bir etkinlik süresi vardır. Bu ön ilaç iki asitli aktif metaboliti karaciğerde desterifikasyon yapılmış şeklidir. Kinapril hipertansiyon tedavisi, konjestif kalp yetmezliği, post-miyokard infarktüsü ve diğer endikasyon için kullanılır. (Hutchison ve ark. 2003).

Kinapril karaciğerde kinaprilat için hızla hidrolize olur. İlaç alındıktan sonra ana bileşik 1 saat içinde doruk plazma seviyesine ulaşır, aktif metabolit ise 2 saatte ulaşmaktadır. (Hutchison ve ark. 2003).

Tek doz alındıktan sonra kan basıncı 1 saat içinde azalmaya başlamaktadır ve etkisi 12-24 saat arasında sürmektedir. Kinaprilin bir dozunun % 60 kadar kinaprilat olarak idrarda süzülürse, kinapril dozu böbrek veya karaciğer yetmezliği ile ayarlanmalıdır. Kinaprilin yarılanma süresi 30 dakikadır. Kinaprilatta ise bu süre 2-25 saat arasındadır. (Hutchison ve ark. 2003). Kinapril anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörü, anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü engelleyen, doğrudan etkili vazokonstüktör ajanıdır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kalp hızında bir refleks artışına neden olmadan sistemik vasküler direnci azaltmaktadır. (Brown ve ark. 1998), (Van Veldhuisen et al. 1998). Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin başlıca kullanımları esansiyel hipertansiyon ve konjestif ısı yetmezliği tedavisi içindir (Hutchison ve ark 2003). Diğer anjiyotensin enzim inhibitörlerinin kullanımı, anjiyoödem, anurik böbrek yetmezliği, kalıtsal ya da idiyopatik anjiyoödem dönüştürme ve hamilelik gibi durumlarda uygun değildir. (Hutchison ve ark. 2003). Angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin olumsuz etkileri verimsiz öksürük, döküntü, eozinofili, anemi ve trombosit toplamada azalıştır. Ayrıca, bu ajanlar hipotansiyon, taşikardi, anjina, perikardit veya anephrik hastalarda hipertansiyona neden olabilir. Diğer ortak yan etkileri ise hiperkalemi, hipertermi, hipoglisemi, hiponatremi, insülin duyarlılığı ve çinko eksikliğidir.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin kullanımı ile ilgili daha ciddi yan etkileri pankreatit, böbrek yetmezliği, nötropeni, hepatotoksisite, anjiyoödem, spermde ve fetal ölümdür. (Hutchison ve ark. 2003).

Hidroklorotiyazid ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazit yapılı bir diüretiktir. Tiazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine kullanılırlar.

Kıvrım diüretiklerden farklı olarak, böbrek yetmezliği olan hastalarda etkinlikleri zayıflar. Hidroklorotiyazid diabetes insipidus ve hiperkalsüri tedavisi içinde kullanılır. Hidroklorotiyazid, FDA gebelikte ilaç kullanımı risk sınıflandırmasında B kategorisine dahildir (hayvan deneyleri ve gebelerde yapılan kontrollü çapraz çalışmalarda risk olasılığı doğrulanmamış ilaçlar).

Tiazit grubu diüretikler böbrek tubulus epitelyumundan sodyum iyon transportunu inhibe ederek sodyum, klor ve suyun atılımını artırır.

Tiyazidlerin bu etkiyi göstermelerinde farklı mekanizmalar rol oynayabilirse de, yaptıkları diürezden sorumlu esas mekanizma Henle kıvrımının çıkan kolunun kortikal bölümü (kortikal dilüe edici segment) ile distal tubulusun proksimal bölümünde aktif klorür reabsorbsiyonunu inhibe etmeleridir. İkincil olarak sodyum reabsorbsiyonunu da azaltırlar. Klorür transportunu nasıl azalttıkları tam olarak bilinmemektedir. Tiyazidler ayrıca potasyum ve bikarbonat atılımını artırır, kalsiyum ve ürik asit eliminasyonunu azaltırlar. Hidroklorotiyazidlerin potasyum atılımını artırmaları renal tübülüslerin distal bölümünde sodyum yükünü arttırmalarına (Na^+ iyonundan zengin filtrat) bağlıdır; böylece sodyum-potasyum değiş-tokuş mekanizmasını harekete geçirerek potasyum salgılanmasını indirekt olarak artırmış olurlar. Neden oldukları hipokloremi ve hipokalemi hafif metabolik alkalozu yol açabilir.

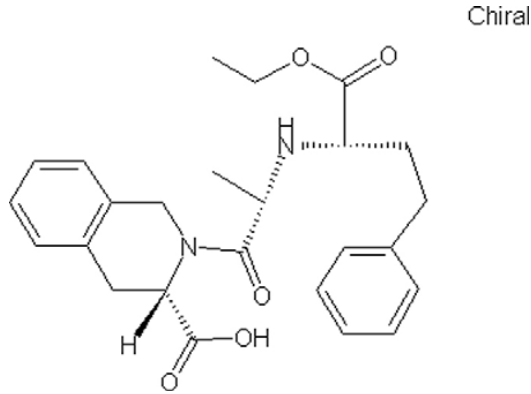
Hidroklorotiyazidlerin diüretik etkileri hastanın asit-baz dengesinden etkilenmez. Hidroklorotiyazidler aldosteron antagonisti etki göstermezler ve esas etkileri karbonik anhidraz enzim inhibisyonundan bağımsızdır (RxMediapharma, 2008; Sweetman, 2007).

1.2.1. Kinapril ve Hidroklorotiyazid'in Kimyasal Yapısı

Kinaprilin açık formülü 2[2 [[1 (etoksikarbonil) 3 fenilpropil] amino] 1 oksopropil] 1,2,3,4 tetrahidro; 2 [2 [(1 etoksikarbonil 3 fenilpropil) amino] propionil] 1,2,3,4 tetrahidro 3 isokinolinkarboksilik

Kinapril beyaz kristal yapıdadır. Erime noktası 120-130 C dir. Molekül ağırlığı 438.521 g'dır.

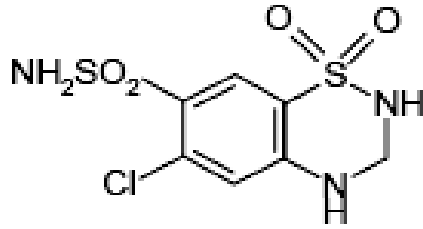
Kinaprilin Yapısı



Şekil 1.13 Kapalı formülü: $C_{25}H_{30}N_2O$

Hidroklorotiyazid beyaz renkte, kokusuz, kristal yapıda bir maddedir ve molekül ağırlığı 297,74'dür. Suda çözünürlüğü az, fakat sodyum hidroksitte çözünürlüğü yüksektir.

Açık formülünün okunuşu; 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamit 1,1-dioksit şeklindedir (Şekil 1.2). Kapalı formülü $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ 'dir.



Şekil 1.14

Hidroklorotiyazid Yapısı

1.3. Çalışmanın Amacı:

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

Bu nedenle kinapril ve hidroklorotiyazidin biyolojik sıvılar içerisinde tayini için geliştirilecek yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla yöntem validasyonu uygulanacak, yapılan analizlerin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

Geliştirilen yöntemin duyarlılık, doğruluk, kesinlik, çalışma aralığı ve doğrusallık, cihaz tekrarlanabilirliği, tekrarlanabilirlik, sağlamlık, özgünlük, tutarlılık, mutlak ve bağıl geri kazanım, gerçek numunelerin analizine uygulanabilirlik gibi parametreleri değerlendirilecek, sistem uygunluğu testleri gerçekleştirilecektir.

1.4. Kinapril ve Hidroklorotiyazid'in Literatürde Yer Alan Tayin Yöntemleri

1.4.1. Kromatografi

Sagar A. Parekh ve ark. (2008) İnsan plazmasındaki Hidroklorotiyazid, Kinapril ve kinaprilin aktif metaboliti kinaprilatın aynı anda tayinleri için hassas ve hızlı olan sıvı kromatografisi-kütle spektrometre (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmişlerdir. Katı faz ekstrasyonundan sonra hypurity C8 (100mmx2.1mm ; 5 μ m) kolonu kullanılarak 2.8 dakika boyunca 2 μ l hacminde enjeksiyon yapılarak kromatogram alınmıştır.

İsokratik hareketli fazda %0.5 (h\h) fosforik asit asetonitril (25:75) bulunmaktadır. İlaçların ürün iyonları üçlü quadrupole kütle spektrometresi üzerinde takip edilebilmiştir. Doğrusallık aralığı Hidroklorotiyazid için 5-500 ng\mL Kinapril ve kinaprilat için ise 5-1500 ng\mL olarak bulunmuştur. Çözeltiler oda sıcaklığında hazırlanmıştır.

Ch. Abbara ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada insan plazma örneklerinde Kinapril ve eş zamanlı olarak aktif metaboliti olan kinaprilatın analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada iki tür hareketli faz kullanılmıştır. Bu iki hareketli faz asetonitril ve tetrabutil amonyum hidrojen sülfat çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çözeltideki 10 mM tetrabutil amonyum pH 7 de dietilamin ile ayarlanmış ve 0,22 mm filtre süzgecinden süzölmüştür. Hareketli faz oranları Kinapril için asetonitril ve tetrabutil amonyum (62:38) (h\h) Kinaprilat için ise (25:75) (h\h) dir.

Ayrıca bu çalışmada C 18 kolonu kullanılmış ve ölçümler 215 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri kinaprilat için 20-1000 ng/ml Kinapril için ise 10-500 ng/ml değerleri arasında doğrusal bulunmuştur. Kinapril ve Kinaprilat'ın sırasıyla belirme sınırları 10 ng/ml ve 20 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Geri kazanım oranı Kinapril için %90 Kinaprilat için ise %80 den fazladır. Bu yöntem sağlıklı insanlarda Kinapril'in biyoeşdeğerlik çalışmalarında başarıyla uygulanmıştır.

Anna Gumieniczek ve ark. (1999) tablet numunelerinin analizi için Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini geliştirmişlerdir. Bu çalışmada UV dedektör (211nm) ve iç standart olarak da perindopril kullanılmıştır. LiChrosorb RP-18 kolonu ve hareketli faz olarak da fosfat tamponu (pH 2,5) ve asetonitrilin (6:4,h/h) kullanıldığı yöntemde, hareketli fazın akış hızı 1ml/dk olarak seçilmiştir. Belirleme sınırı 50 mg/ml olarak bulunmuştur.

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

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

D.Bonezzi ve ark. (1997), Kinapriline tablet formu içindeki miktarını belirlemek için Yüksek performans sıvı kromatografisi-UV spektroskop metodunu geliştirmişlerdir. Bu çalışma için kinapriline toz formu oda koşullarında 15 dakika magnetik karıştırıcı yardımıyla çözülür. YPSK sisteminde su pompası 100 voltluk Jasco Uvidec dedektörü ve HP seri 3396 entegratörü kullanılmıştır. Rheodine enjektör (20 ml) ve UV (215 nm) kullanılmıştır. Kromatografik ayırma için 5 µm Hypersil ODS kolonu (250 mmx4.5mm) ve hareketli faz olarak A-B karışımı kullanılmıştır. A: 20 mM sodyum heptasülfonat (pH:2.5) B: Asetonitril-THF (95\5) dir. Bu çalışmada akış hızı 1ml\dak ve hareketli faz oranı ise (63:37) (h\h) dir. Asetonitril- 20 mM sodyum heptasülfonat (pH:2.5 1:1 h\h) içinde sabit konsantrasyonlu iç standart hazırlanır. Hazırlanan solusyonlardan 20 µl enjekte edilip iç standart ve standart solusyon piklerinin oranları karşılaştırılarak tayin gerçekleştirilir.

Alan R. Kugle ve ark (1994) yaptıkları çalışmada hassas ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi, radyokimyasal algılama metodu ve perfusat ultrafiltre kullanılarak idrar numuneleri içindeki Kinapriline ve Kinaprilate miktarı tayin etmişlerdir. İdrar ve perfusat içindeki Kinapriline ve Kinaprilate tesbitinden önce asetonitril ile santrifüj ön işlemi uygulanır. Perfusat ultrafiltre kullanarak toplanır. İki Kinapriline diketopiperazin metaboliti, PD 109.488 ve PD 113.413 kullanarak Kinapriline ve Kinaprilate birbirinden ayrılır.

Kinapriline ve Kinaprilate performansının hassasiyeti ve doğruluğu 4 gün boyunca takip edilip değerlendirilmiştir. 100 µl örnek numune kullanılarak hem 3H-Kinapriline hem de 3H-Kinaprilate için tayin sınırı ($\approx 2,0 \mu\text{Ci} / \text{mg}$) 1 ng / ml olarak belirlenmiştir.

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

Nobuharu Goto ve ark (1992), gaz kromatografi ve kütle spektrometre kullanılarak biyolojik sıvı içerisinde kinaprilin dioksopiperazin metabolitini belirlemişlerdir. Plazma ve idrar içindeki kinaprilin dioksopiperazin metaboliti asidik ortamda hekzan-dikloroetan (1:1) ile elde edilir. Metabolit için tayin limitleri plazma için 0.2 ng/mL, idrar içinse 1 ng/ml olarak bulunmuştur. Belirme sınırı ise plazma için 0.1 ng/mL idrar içinse 0.5 ng/ml olarak bulunmuştur. Bu yöntem farmokokinetik çalışmalar için geçerlidir.

Nobuharu Goto ve ark. (1992), insan plazmasında ve idrarındaki kinapril ve aktif metabolit olan kinaprilatın hassas tayini için gaz kromatografi-negatif-iyon kimyasal iyonlaşma ve kütle spektrometre kullanmışlardır.

Kinapril ve kinaprilat insan plazmasından ve idrardan Bond-Elut C18 kartuşu kullanarak ayrılmıştır. Plazma ya da idrardaki kinapril veya kinaprilatın tayini için pentafloro benzil bromür, trifloroasetik anhidrat, pentaflorobenzil ve trifluoroasetil türevleri kullanılmıştır.

Kinapril ve kinaprilat için tayin sınırı plazma için 0.05 ng/mL, idrar içinse 0.5 ng/ml'dir. Bu yöntemin farmokokinetik ve klinik farmakolojik çalışmalar için güvenilirliği çok iyi bulunmuştur

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

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

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

Stewart ve ark (1986), guanetidin ve hidroklorotiyazid karışımlarında bu iki etken maddeyi tayin etmek için 0,02 M sodyum pentan sülfonat içeren asetonitril ve 0,05 M NaH_2PO_4 (30:70) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır. Analizi oktadesilan kolonu ve elektrokimyasal dedektör kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

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

Weinberger ve ark (1983), yaptıkları çalışmada kan serumunda hidroklorotiyaziti tayin etmişlerdir. Bu amaçla pH: 5 olan 0,05 M tetrabütil amonyum hidroksit ile hacimce %20 asetonitril içeren 0,01M fosfat tamponundan oluşan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmışlardır. 0,05-1 $\mu\text{g/ml}$ derişim aralığında hazırlanan kalibrasyon grafiğı ile bu etken maddenin miktar tayinini başarıyla gerçekleştirmişlerdir.

1.4.2. Elektroforez

S. Hillaert ve ark (2001) Kapiler elektroforez metodu ile ACE inhibitörlerini tayin etmişlerdir. Bu çalışmada en önemli parametre çalışılan tamponun pH'ıdır. Ayrılma erimiş-silis kapiler (52 cm toplam uzunluk x 375 μ m) ve sodyum sulfat tamponu kullanılmıştır (pH :7.25 ; 100 mM). Bu yöntem ilaç formülasyonundaki bileşiklerin kantitatif tayininde kullanılır. Bu deneyde Waters Quanta 4.000 HPLC modeli kullanılmıştır. Kullanılan kapiler dedektör uzunluğu 52 cm, iç çapı 75 mm dir. Tayin için çinko deşarj lambası ve 214-nm dalga boylu UV filtreli dedektör kullanılmıştır. Deneyler oda sıcaklığında (20 ± 2 °C) 20 kV'da yapılmıştır.. Deneyde kullanılan kinaprilin teorik miktarı 10 mg\tdır. Deney sonunda miktar 10.12 ± 0.42 ya da % 101.2 olarak belirlenmiştir.

S. Hillaert ve ark (2000), kapiler elektroforezi birkaç anjiyotensin dönüştürücü enzimin belirlenmesi için kullanmışlardır. Ayırma bileşiği olarak fosfat tamponu kullanılmıştır. Kullanılan tamponun yüksek seçiciliği nedeniyle aynı sistem kinaprilin ilaç formülündeki miktar tayinini belirlemek için de uygulanmıştır. Yapılan analiz sonucunda yardımcı maddelerin sonucu olumsuz etkilemediği gözlenmiştir. Bu çalışmada voltaj 25 kV olarak uygulanmış, çinko deşarj lambası ve UV filtre kullanılmıştır.

R. Gotti ve ark. (1999), kapiler elektroforez yöntemi tablet içindeki anjiyotensin dönüştürücü enzimlerin belirlenmesinde kullanmışlardır. Kapiler elektroforez birbirine yapı olarak yakın olan bileşikler tam olarak ayıramayabilmektedir. Bu nedenle alkilsulfonik katkı maddeleri (sodyum heptasulfonat,(+)-10- komforsulfonik asit) çalışan tampon çözeltisine eklenerek ayırma daha iyi hale getirilmiştir. Optimum koşullar sağlandıktan sonra uygulamadan elde edilen sonuçlar YPSK yöntemi ile karşılaştırılmış ve yöntem doğrulanmıştır.

1.4.3. Elektrokimyasal Tayin Yöntemleri

Jose' Angel Prieto ve ark (2003), kinapril'in elektrokimyasal davranışını kare dalga voltametrisi yöntemi ile incelemek ve farmasötik dozaj şekillerinden tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Tüm çözeltilerden elektrokimyasal analiz öncesi 4 dakika boyunca azot gazı geçirilmiştir. Çalışmada yardımcı elektrot platin tel, referans elektrot doymuş kalomel elektrot ve çalışma elektrotu ise HMDE (yüzey alanı 0.5 mm^2) dir. Kinaprilin nicel analizi için 0.2M borat tamponu (pH 9.5) destek elektroliti olarak kullanılmıştır.

1.4.4. Spektrofotometri

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

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

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

Magri ve ark. (1995), hidroklorotiazit ve fosinoprilin aynı anda miktar tayini analizini çoklu dalgaboylu UV spektrofotometri yöntemini kullanarak yapmışlardır. Bu yöntemde optimum dalga boyu aralığını 210-240 nm olarak kullanmışlardır.

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

Salem (1991), hidroklorotiyazid-spironolakton, hidroklorotiyazit-kaptopril, hidroklorotiyazit-furosemid karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin aynı anda miktar tayinlerini türev spektrofotometrisini kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Bu tayinde 1. ve 2. türev yöntemleri kullanılmıştır.

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

1.5.Kromatografi

Genel bir tanım olarak kromatografi, akış halindeki gaz veya sıvı bir fazla birlikte (hareketli faz) karışımdaki bileşenlerin, durgun faz (sabit faz) üzerinden geçirilip, bileşenlerin alıkonma sürelerine bağlı olarak ayırımların gerçekleştirildiği güçlü bir analitik yöntemdir.

Kromatografi 1903 yılında Rus bilim adamı Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett bitki pigmentlerini ayırmak için kromatografiyi kullanmıştır. Yaptığı çalışmada toz kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolon kullanmıştır. Bu cam kolondan bitki pigmentlerini içeren çözeltiyi geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmayı başarmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar halinde gözüktüğü için yöntem kromatografi adını vermiştir. Yunanca’ da chroma “renk” ve graphein “yazmak” anlamına gelmektedir (Skoog, D.A ve ark 1998)

1938 yılında, Izmailov ve Schraiber ince tabaka kromatografisinin (TLC) temellerini atmış, daha sonra bu yöntem 1958 de Stahl tarafından geliştirilmiştir.

1941’deki çalışmalarında Martin ve Synge teorik tabaka sayısı kavramını kromatografik yöntemin veriminin bir ölçümü olarak uygulamışlardır. Bu kavram sadece sıvı kromatografisi tekniklerinde devrim yaratmamış, gaz ve kağıt kromatografisinin gelişimi için de aşama kaydetmiştir.

Martin ve James’in 1952 de yayımlanan ilk gaz kromatografik çalışması bu tekniğin hızlı gelişiminin bir başlangıcı olmuştur.

Klasik kolon kromatografisinden türetilen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YPSK), günümüzde kullanılan modern enstrümental analitik teknikleri arasında yer almaktadır. (Weiss, J.1989).

Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

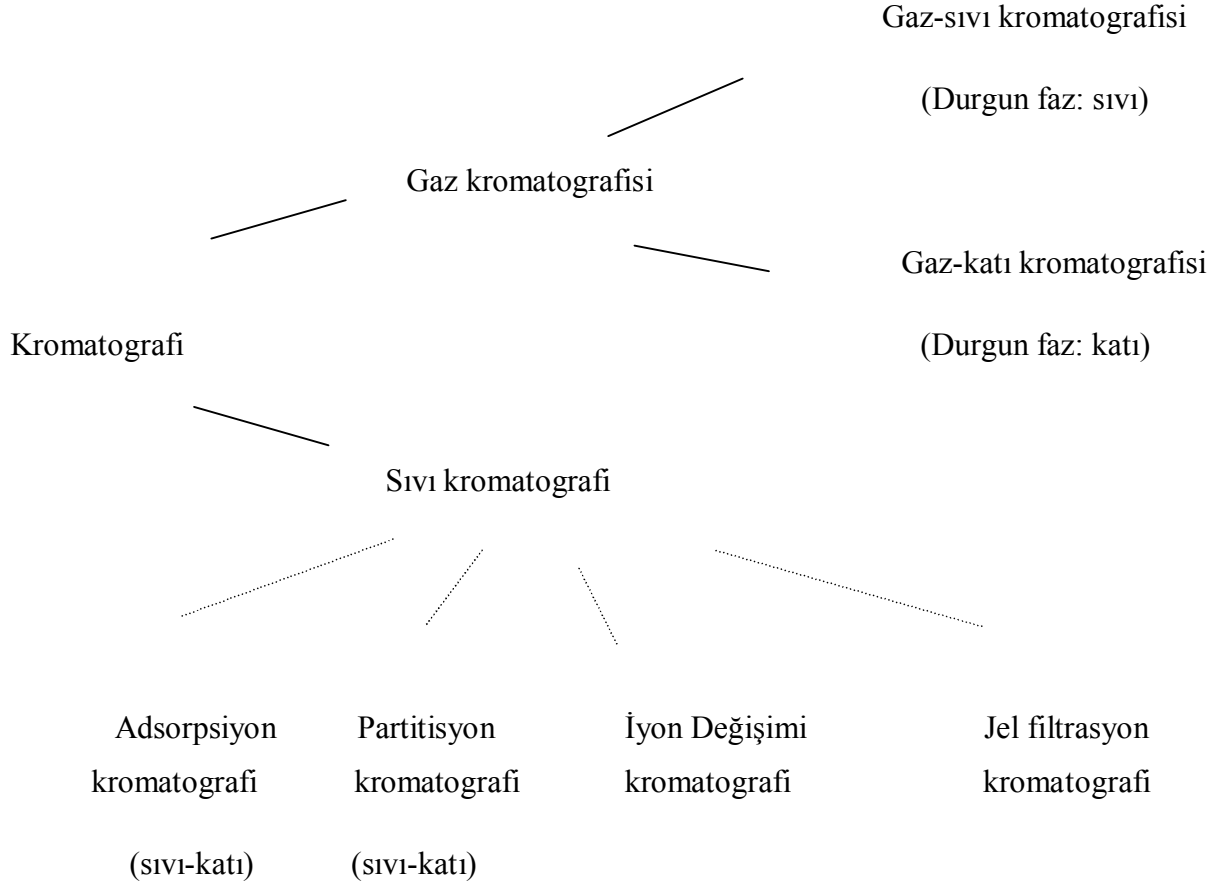
Kromatografi uygulama ortamı açısından iki sınıfa ayrılır;

- Kolon Kromatografisi
- Düzlem Kromatografisi

Kolon kromatografisinde, sabit faz yüksek basınca dayanıklı bir kolona tutturulur ve hareketli faz basınç altında, bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır.

Düzlem kromatografisinde, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Şekil 1'de kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması verilmiştir. (Skoog, D.A ve ark. 1998).

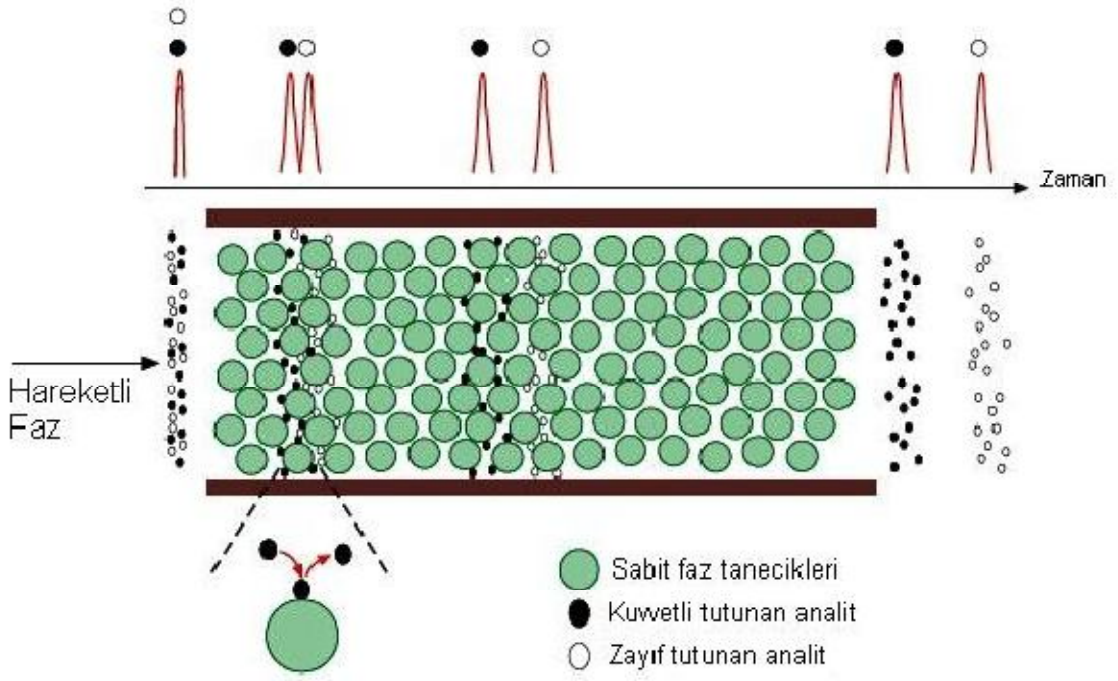
Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması (Şekil.1.15)



Kromatografik Ayırma Tekniği

Hareketli fazın ilerlemesiyle çözünen maddelerin sabit faz üzerinden sürüklenmelerine elüsyon, kullanılan çözücüye elüent adı verilir. Şekil 2.2’de kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi görülmektedir (Lewis, A. C. 2005). Kolona çözücünün sürekli verilmesi, hareketli ve durgun faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde taneciklerini kolondan sürükler.

Numune enjeksiyon sonrasında kolona gelir ve numunenin bileşenleri kolonun iki fazı arasında dağılır. Kolona katılan hareketli faz numune taneciklerini içeren çözücüyü kolonda ilerlemeye zorlar.



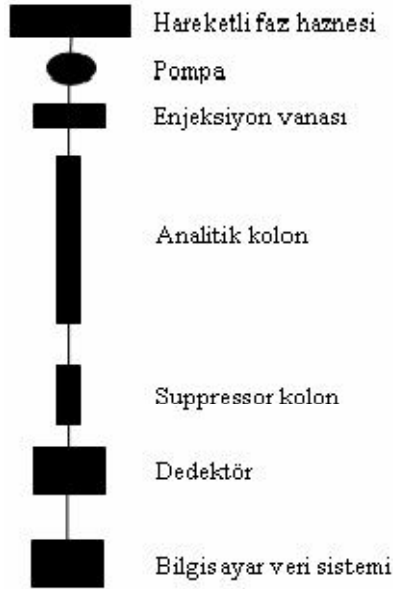
Şekil.1.16 Kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi

1.5.1.İyon Kromatografi

Yeni bir yöntem olan İyon Kromatografi 1975’de Small, Stevens ve Baumann tarafından tanıtılmıştır. Baskılayıcı kolon esaslı kromatografi olarak da bilinen iyon kromatografi, çözünen iyonik türlerin ayırımı ve tayini için kullanılan analitik bir tekniktir.

Baskılayıcı kolon esaslı (suppressed) ve baskılayıcı kolon bulunmayan veya tek kolonlu (non-suppressed) modlarında gelişme gösteren iyon kromatografisi genel sınıflandırma içerisinde sıvı-sıvı kromatografik teknikler içerisine girmektedir. Birçok basit inorganik anyon ve katyonun eşzamanlı tayini için ilk kez güvenilir ve kesin bir yöntem sağladığı için, iyon kromatografisi çok hızlı gelişim göstermiştir. İyon kromatografisi, çevresel ve endüstriyel uygulamalar, gıda ve klinik ve farmakolojik uygulamalar için oldukça yararlı bir tekniktir (Karim, K. Ve ark 2003). Bunun yanı sıra bitki analizleri, metal ve metalurjik çözeltilerin analizleri, işlem görmüş suların analizleri gibi birçok alanda yaygın olarak uygulanma imkânına sahip bir yöntemdir.

Dionex tarafından geliştirilen modern bir iyon kromatografisi sisteminin ana bileşenleri aşağıda gösterilmektedir.



Şekil. 1.17 İyon kromatografisi sisteminin şematik gösterimi

Hareketli faz çift pistonlu bir pompa ile kromatografik sistem boyunca pompalanır. Pulssuz bir akış, pompanın elektronik kontrolü ile sağlanır. Bu amperometrik ve UV/GB dedektörlerinin her ikisi için de geçerlidir.

Kromatografinin en önemli kısmı analitik kolondur. Uygun sabit faz seçimine ek olarak uygun kromatografik parametrelerin seçimi analizlerin kalitesini belirler. Kolon gövdeleri inert materyallerden yapılır ve genellikle oda sıcaklığında çalıştırılırlar. Karbonhidrat ve aminoasitlerin analizi gibi bazı durumlarda yüksek sıcaklıklarda kolonun sıcaklığının termostat ile kontrol edilmesi gerekir.

Analiz edilen türlerin miktarını ve türünü belirlemeye yarayan dedektörün performansını artırmak amacıyla aşağıdaki kıstaslar göz önünde bulundurulmalıdır:

- Doğrusallık
- Ayrım
- Gürültü

İyon kromatografide en geniş uygulaması bulunan dedektör iletkenlik dedektörüdür. Bu tayin sistemi genellikle baskılayıcı kolon içermektedir. Baskılayıcı kolon analit iyonlarını etkilemez. Sadece hareketli fazdan gelen iletkenliği kapatarak dedektör duyarlılığını artırır. İletkenlik dedektörüne ek olarak, UV/GB, amperometrik ve floresans dedektörler de kullanılmaktadır.

Çözünen maddenin derişimine cevap veren bir dedektör, kolon çıkışına yerleştirilirse elde edilen sinyaller zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Elde edilen bu veriler ile çözünen türlerin kalitatif (nitel) ya da kantitatif (nicel) analizleri yapılabilir. Kantitatif sonuçlar; analit pikinin yüksekliğinin veya pik alanının, standardın pik yüksekliği veya pik alanı ile kıyaslanması sonucu elde edilir. Çünkü pik alanları ve pik yükseklikleri tayini yapılacak türlerin derişimi ile doğru orantılıdır. Elde edilen verilerin sadeleştirilmesi dijital integratörler ya da bilgisayar sistemleri ile yapılmaktadır (Weiss, J. 1989). Sıklıkla kullanılan katyon ve anyon değıştiriciler Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2 Katyon ve Anyon Değiştiriciler

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

1.5.2.Sıvı Kromatografi

Sıvı kromatografi bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözünmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tesbit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir.

Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) denir.

Gaz ve sıvı kromatografinin uygulama alanları farklıdır; ancak birçok bileşen her iki kromatografiyle de ayrılabilir. Amaca uygun seçim yapılır: Kromatografiyle ayrılan maddelerle daha başka işlemler yapılacaksa maddelerin toplanması istenir. Toplama işleminde, gaz kromatografisinde taşıyıcı faz gaz olduğundan gaz ortamdan hemen uzaklaşır ve saf madde uygun bir soğutma sistemiyle kolayca sıvı veya katı halde elde edilebilir. Sıvı kromatografisinde, taşıyıcı faz sıvı olduğundan, saf madde ile birlikte gelen taşıyıcı sıvının uzaklaştırılması için ek işlemler yapılmalıdır. Bu koşulda gaz kromatografisi tercih edilir. Sıvı kromatografi, ayrılacak bileşik ısıya karşı duyarlıysa veya büyük moleküllüyse kullanılır.

Sıvı Kromatografi Birimleri ve Özellikleri

SK aşağıdaki temel birimlerden oluşur.

- a) Hareketli/ Taşıyıcı Faz Deposu
- b) Taşıyıcı Faz Hareket Birimi; Pompa(lar)
- c) Enjeksiyon (Örnek Yükleme) Birimi
- d) Ayırma Birimi; Kolon(lar)
- e) Ölçüm Birimi; Dedektör(ler)
- f) Yazım Birimi; Kaydedici, İntegratör
- g) Atık Deposu

Sıvı kromatografisinde ayırmaya etki eden değişkenlerden biri hareketli fazdır. İyi bir hareketli faz; sabit fazın özelliklerini değiştirmemeli, örnekteki bileşenlerin hepsini çözmeli, düşük viskozitede olmalı, (gerektiğinde) ayrılan bileşenlerden kolayca ayrılabilmesi (kolayca buharlaşabilmesi), kullanılan dedektöre uygun olmalı, ekonomik ve istenen saflıkta kolayca bulunabilir olmalıdır. Yüksek basınçta yapılan kromatografide, sisteme verilmeden önce, hareketli fazın içerisindeki çözünmüş gazlar uzaklaştırılmalıdır; aksi halde sistemin düşük basınçlı kısmı olan dedektörde, çözünmüş gazlar (özellikle hava) kabarcık oluşturur. Bu durum, dedektörden çok hatalı değerler alınmasına neden olur. Hareketli fazdan gaz uzaklaştırma işlemi ısıtma veya vakum uygulayarak olur. 10-60 ml/h akış hızını elde etmek için hareketli faza uygulanan basınç, 30-400 atm arasında değişir.

Hareketli fazı kolona gönderen pompadır. Hareketli faz pompalama sistemi, vuruntusuz akış oluşturmak üzere çift pistonlu bir pompa içerir. Pistonların biri emerken diğeri bastığından SK için çok önemli olan düzgün akış elde edilir. Pompa debisi 0.1 ml/dk hassasiyetle ayarlanabilir. Pompa, hareketli faz deposundan aldığı çözücüü önce enjeksiyon sistemine gönderir.

Örneğin rahat yüklenmesi ve hareketli faz akışının enjeksiyondan etkilenmemesi için örnek çok uçlu bir vananın içerdği kanala verilir. Vananın pozisyonu değiştirilerek hareketli fazın kanaldan geçmesi, dolayısıyla enjeksiyon sağlanır.

Çözücü enjeksiyon sisteminden geçtikten sonra, SK sisteminin ayırma birimi olan kolona gelir. SK kolonları paslanmaz çelik veya kartuş şeklindedir. Analitik ya da preparatif amaçlı olabilirler. Analitik kolonlar, yani kantitatif analiz amaçlı olanlar 2-8 mm iç çaplıdır ve uzunlukları içerdikleri dolgu tipine göre 10-100 cm arasında değişir. Bir karışım içinde istenen bileşenleri ayırarak elde etmeye yönelik olan preparatif kolonlar genellikle 6 mm çaplı 25-100 cm uzunluğunda kolonlardır.

SK türleri kullanılan kolona göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır.

- a) Adsorpsiyon (Sıvı-Katı) Kromatografi
- b) Partitasyon (Sıvı-Sıvı) Kromatografi
- c) İyon Değişimi Kromatografi
- d) Jel Filtrasyon Kromatografi

SK koşulları iyi ayarlandığında, kolonda birbirinden ayrılan maddeler taşıyıcı faz ile birlikte ölçüm birimi olan dedektöre gelirler. Dedektör maddenin derişimi ile doğru orantılı bir özelliğini ölçmelidir. Bu amaçla; Absorbans Dedektörü, Floresans Dedektörü, Kırılma İndisi Dedektörü, Elektrokimyasal Dedektör ve İletkenlik Dedektörü kullanılabilir.

Absorbans dedektörleri, akış hücrelerinden geçen sıvının -sabit ya da istenilen değere ayarlanabilir dalga boyundaki- ışık absorpsiyonunu ölçerler. Floresans dedektörler, belli bir dalga boyunda ışığı absorpladıktan sonra başka bir dalga boyunda ışın yayan yani floresans özellik gösteren maddelerin yaydığı ışık şiddetini ölçerler. Kırılma indisi dedektörleri ise akış hücrelerinden geçen akımın kırılma indisini ölçerler. Absorbans dedektörü kullanılırken seçilen dalga boyunun, ışığın % 90'ının absorplandığı dalga boyu olarak tanımlanan, çözücü uv-cut off değerinden yüksek olmamasına dikkat edilmelidir. Bu durum, özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için önemlidir. Akış hücresine gelen madde derişimi ve/veya cinsi değiştiğinde dedektör sinyalinde değişiklik olur. Kaydedici, zamana göre dedektörden gelen sinyali (voltaj değişimini) kaydeder.

Adsorpsiyon (Sıvı - Katı) Kromatografi

Ayrılacak bileşenlerin sabit katı faz üzerinde tersinir olarak adsorplanmaları esasına dayanır. Burada hareketli faz, adsorban üzerinde sıvı olarak hareket eder. Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan farklı derecede ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti büyük olan bileşen yüzeyde daha uzun kalırken, küçük olan daha kısa sürede kalmakta, hiç adsorplanmayan bileşen ise kolonda hiç geciktirilmeden hareketli faz ile taşınarak dışarı çıkmaktadır.

Yüzeye adsorplanan bileşenler ise yüzeye etkileşmelerine bağlı olarak farklı kalma sürelerinde kolonu terketmektedir.

Adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz olarak adsorplama yapabilecek bir katı kullanılır. En çok kullanılan yüzeyleri polar sabit fazlar alümina ve silikajeldir. Sabit faz olarak genellikle polar katılar kullanıldığından, hareketli faz olarak apolar veya çok az polar sıvılar kullanılır; benzen, oktan, kloroform gibi. Ayrılacak bileşenin sabit fazla etkileşmesi dipol-dipol çekmeleri, Van Der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları sonucunda gerçekleşir.

Adsorpsiyon kromatografisi, polarlıkları farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında iyi sonuç verir. Durgun fazın polaritesi, sabit fazın polaritesinden daha büyük olduğunda buna ‘Normal Faz Kromatografisi’, hareketli fazın polaritesi daha büyük olduğunda buna, ‘Ters Faz Kromatografisi’ denir. Bu tip kromatografide, nicel analizlerde adsorpsiyon izoterminin derişime göre doğrusal olduğu bölgelerde hatasız çalışılabilir. Doğrusal kısım zayıf adsorplanan bileşik için geniştir; bu nedenle nicel çalışmada zayıf adsorplama istenir.

Partisyon (Sıvı – sıvı) Kromatografisi

Bu kromatografisi türünde ayrılacak bileşenin, durgun sıvı ile çözücü arasındaki dağılma oranı ayrılmanın ne kadar başarılı olacağını belirler. Bu nedenle dağılma kromatografisi olarak da adlandırılır.

Destek katısı üzerine kaplanan bir sıvı sabit fazı oluşturur, diğer sıvı da hareketli fazı oluşturur: Bu kromatografisi, bu iki sıvı fazda çözünürlüğü farklı olan her bileşeni ayırmada kullanılabilir. Ayırma, bileşenin iki fazdaki dağılma oranına göre gerçekleşir. Burada sabit faz ve hareketli faz karışmamalı ve birbirlerini çözmemelidir. Durgun fazda çözünürlüğü yüksek olan bileşenler kolonda uzun süre kalırken, çözünürlüğü düşük olanlar daha kısa süre kalır. Sabit faz ayrılacak bileşen için iyi bir çözücü, fakat hareketli faz için kötü bir çözücüdür; yani iki fazın polarlıkları farklı olmalıdır.

Hareketli fazın durgun fazdan daha az polar olduğu sistemlere normal faz kromatografisi; tersi duruma ters faz kromatografisi denir.

Fiziksel olarak destek katısı üzerine tutturulmuş durgun sıvı, taşıyıcı sıvı tarafından kolayca sürüklenip götürülebilir (kolon kanaması) ve destek katısı üzerindeki durgun fazın miktarı zamanla değişir. Böylece kolonlarla yapılan ayırmaların, tekrarlanabilirliği az olmakta, kolon kısa zamanda işe yaramaz duruma gelmektedir. Bunu önlemek için sabit faz katı destek üzerine kimyasal olarak bağlanmaktadır. Böylece kolonların ömrü uzun olmakta ve tekrarlanabilir ayırmalar gerçekleşmektedir.

Jel-Filtrasyon Kromatografisi

Kimyasal olarak inert olması gereken katı faz, bir jel ya da gözenekli bir organik bileşiktir. Hareketli faz katı gözeneklerini doldurmuştur. Ayırma, örnek bileşenlerinin molekül büyüklüklerine göre olur. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleküllü bileşenler, kolonda uzun süre kalırken, büyük moleküllüler daha kısa süre kalırlar.

1.5.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

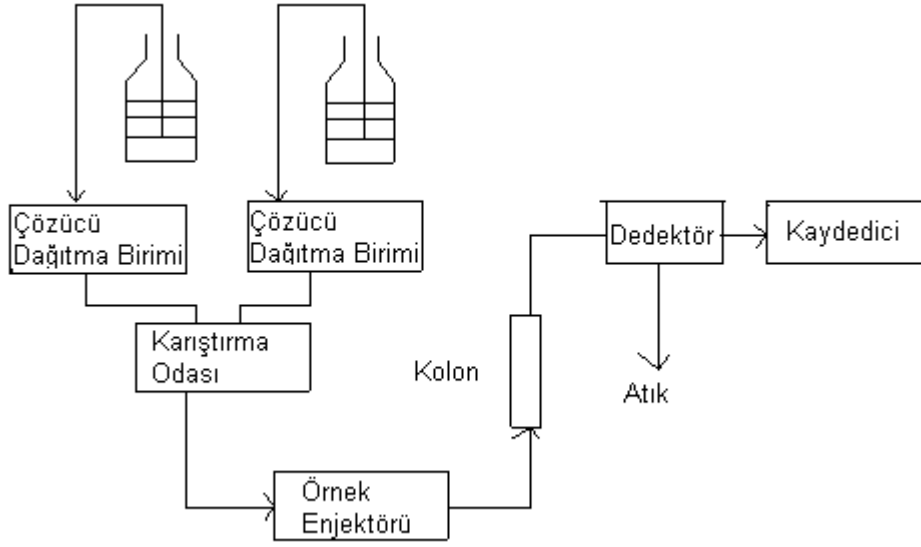
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK); en çok kullanılan analitik yöntemlerden biri olup, kromatografinin bir türüdür. Kromatografik prosesler, sabit faz ve sürekli faz arasındaki kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir.

YPSK, bir karışımdaki bileşenleri ayırmak için hareketli sıvı fazdan yararlanır. Bu bileşenler (veya analitler) ilk önce bir çözücü içerisinde çözülür ve yüksek basınç altında kromatografik kolona doğru akışı sağlanır. Kolon içerisinde karışım bileşenlerine ayrılır. Kolon içerisindeki çözünme miktarı önemlidir ve çözünen madde ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır. Sabit faz kolon içerisindeki dolgu maddesi olarak tanımlanabilir. Çözünen madde ile sabit ve sürekli faz arasındaki etkileşim farklı sabit faz ve çözelti kullanılarak ayarlanabilir.

YPSK birçok kimyasal karışımın kolay bir şekilde ayrılmasını sağlar. Sıvı bir mobil fazın kullanıldığı kromatografik yöntemlerin (Sıvı kromatografisi) tarihçesi Rus botanikçi M. S. Twsett'in 1906 yılında yaptığı ve yayımladığı çalışmalarına kadar uzanır. Önceleri düz yüzlemsel yapıda sabit fazlar kullanılmış ve bu teknikler daha sonra kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi olarak isimlendirilmiştir. Modern sıvı kolon kromatografisi ise 1969 yılında YPSK'nin kullanıma girmeye başlamasıyla gelişme göstermiştir.

YPSK sistemleri

Standart YPSK donanımı temel olarak; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimleri bileşenlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözünmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Örnek hareketli faz ile kolona pompalanır ve kolon içerisinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Ayrılan bileşenlerin sinyallerini dedektör kaydeder. Kromatografik analiz sonucunda elde edilen ve bilgisayara aktarılan sinyallere kromatogram adı verilir.



Şekil 1.18

Sürekli (Hareketli) faz

Örnek bileşenlerini, kolon boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlardır. YPSK sisteminde kullanılacak sürekli fazın seçiminde,

- Yüksek derecede saflık
- Dedektör ile uyumluluk
- Düşük viskozite
- Örneği çözebilme
- Kimyasal açıdan inert olması
- Uygun fiyat

gibi özelliklere dikkat edilmelidir.

Sabit faz

YPSK uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern YPSK adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip, küçük, rijit yapıdaki partiküllerdir. Temel adsorbent özellikleri şunlardır. (Chromatography, 1995; SGE Chromatography Products, 2001):

- 3-10 µm partikül boyutu
- Olabildiğince es boyutlu, ortalamanın $\pm$ % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımı
- 70-300 Å gözenek boyutu
- 50-250 m²/g yüzey alanı
- Yüzeye tutturulan ligand türüne bağlı olarak, adsorbent normal faz (-OH, -NH₂) veya ters faz (C8, C18, fenil) hatta anyon (NH₄) ya da kation (-COO-) değiştirici ve zwitter iyonik yapıda olabilir.

Pompa

Kolon dolgu materyali olarak üretilen partiküllerin kolona doldurulması işlemi ve uygun çözücüde çözünen örneğin bu sabit faz ve sürekli faz yatağıyla etkileşmesi için yüksek basınçlı pompalara ihtiyaç vardır. Kullanılan partikülün boyutu küçüldükçe yüksek basınçlı pompalar gerekse de; küçük partiküller yüksek örnek yükleme kapasitesi, hızlı analiz ve yüksek çözünürlüğe sahiptirler. Pompa seçiminde akış hızında kararlılık önemlidir. Ticari olarak mevcut pompalama sistemlerinin farklı tipleri şunlardır:

- Doğrudan gaz basınç pompaları
- Pnömatik hızlandırıcı pompa
- Pistonlu pompalar
- Şırınga tipi pompalar

Doğrudan gaz basınç pompalarında, yüksek basınçta sıvı akışının sağlanması, genellikle azot veya helyum gazının kullanılmasıyla olur. Gaz basıncı, hareketli fazın yüzeyine doğrudan veya bir diyafram yoluyla uygulanır.

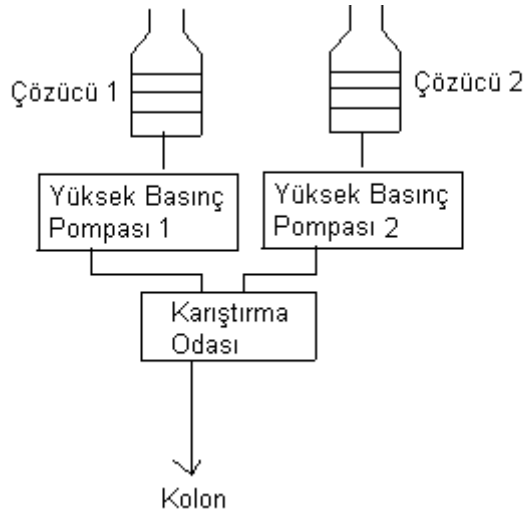
Bu sistem sınırlı bir hacme sahiptir, bu yüzden durdurularak tekrar çözücü ile doldurulmalıdır. Avantajı, ucuz ve tek hareketli faz kullanıldığında güvenilir olmasıdır.

Pnömatik (havalı) pompalar da gaz basıncıyla çalışır. Gaz basıncı, küçük alanlı bir pistonu iten büyük alanlı bir pistonu etki eder. Gaz basıncı böylece pistonların yüzey alanları oranında kuvvetlenir. Sabit basınçtaki sıvı sisteme dağıtılır. Sıvının pompayı terketme hızı, çözücünün vizkozitesine, pompa çıkışındaki akışın direncine ve kolon dolgu maddesiyle olan etkileşimine bağlıdır.

Pistonlu (sabit akış) pompaları iki modeldir. Birinde piston, pompalanan hareketli sıvı faz ile doğrudan temas halindedir. Diyafram pompaları olarak adlandırılan diğerinde ise, piston hareketi hidrolik sistem yoluyla esnek paslanmaz çelik membrana iletilir. Bu pompaların piston hareketi nedeniyle çözücü, sabit akış hızında, havalı pompalardan daha seri pulslerle dağıtılır. Çözücünün pulslu akışı ile dakikada 25 -100 piston hareketi (strok) üretilir. Pompalardaki sıvı akışı genellikle 10mL.dak⁻¹kadardır.

Şırınga tipinde pompalarda, elektriksel olarak hareket eden kurşun vida, verilen çözücü hacmini yeterli basınçta tutan bir pistonu hareket ettirir. Bu pompaların başlıca avantajı, yüksek basınçta (7500 psi'a kadar) serbest pulslu akış sağlama yetenekleridir ve akış hızı, çalışılan basınçtan bağımsızdır. Pompaların aynı zamanda çözücü oranlarını da değiştirebilecek şekilde programlanabilmesi, çözücü programlaması adı verilen ve çok daha etkin bir ayırmayı sağlayan tekniğin uygulanmasına olanak verir. Çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Bu sistem gerekli ayırmayı sağlamakta kullanılan iki hareketli faz için, iki yüksek basınç pompasına sahiptir.

Bu amaçla kullanılacak iki hareketli fazın tamamen karışabilir olması gerekir. Pompalar yoluyla çözücüler, ya difüzyon ya da mekanik olarak çalışan küçük hacimdeki karıştırma odalarında karıştırılırlar.



Şekil 1.19

Sıvı kromatografisinde, iki farklı örnek enjeksiyon sistemi kullanılır.

- A. Hareketli faz akışı olurken; Septum yoluyla kolon başına mikrosiringa ile enjeksiyon, Hareketli faz akışının durdurulmasıyla septum yoluyla enjeksiyon, Kolonun hemen başında hareket eden faza septum yoluyla enjeksiyon.
- B. Dış ilmek subabı (valfi) yoluyla enjeksiyon. Şırınga enjeksiyonları, iç hacmi mümkün olduğunca küçük olması gereken bir septum enjektörü vasıtasıyla yapılabilir. Bu basit alet, dolgu maddesine yapılan (kolon üzeri enjeksiyon) ve akışı durdurarak yapılan enjeksiyonlar (stop-flow) için iyi sonuçlar verir.
- C. Kolon üstü septum enjeksiyonu yapılırken alınması gereken önlem, iğnenin kolon dolgu maddesine temas etmemesidir. Örnek hareketli faz kolona girmeden önce de enjekte edilir. Bu yöntem kolon dolgu maddesinin herhangi bir zarar görmesinin

önüne geçer. Fakat bu yöntemde, pompa, basıncın atmosferik basınca düşmesi için kapatılır, sonra örnek enjekte edilir ve pompa tekrar çalıştırılır. Bu yüzden alıkonma zamanında belirsizlik yaratabilir. Septum enjeksiyon teknikleri, küçük hacimli örnekler kullanıldığında uygulanır.

Valf enjeksiyonları, bölme kullanılmaksızın, 5000 psi dan yüksek basınçta çalışacak şekilde dizayn edilmiş, ince borulu ilmek (loop)lerdir. Bunlar, hareketli faz, by-pass yoluyla kolona pompalanırken, örnek ilmeğinin doldurulması yoluyla çalışırlar.

Örnek ilmeği, 10-500 ml'lik bir hacim aralığında, ya dıştan ve değiştirilebilir, ya da içten ve sabit hacim ilmeği olabilir.

Nicel analiz için valf enjeksiyon aletleri, septum enjektörlere göre bazı avantajlara sahiptir:

- Yüksek tekrarlanabilirlikle, geniş bir aralıktaki örnek hacimlerini enjekte etme yeteneği
- Çözücü akışını durdurmaksızın yüksek basınçta (5000 psi) enjeksiyon olanağı,
- Kolon tıkanmasına neden olan septumun bulunmaması,
- Örneklem sistemi için otomasyon

Kolon



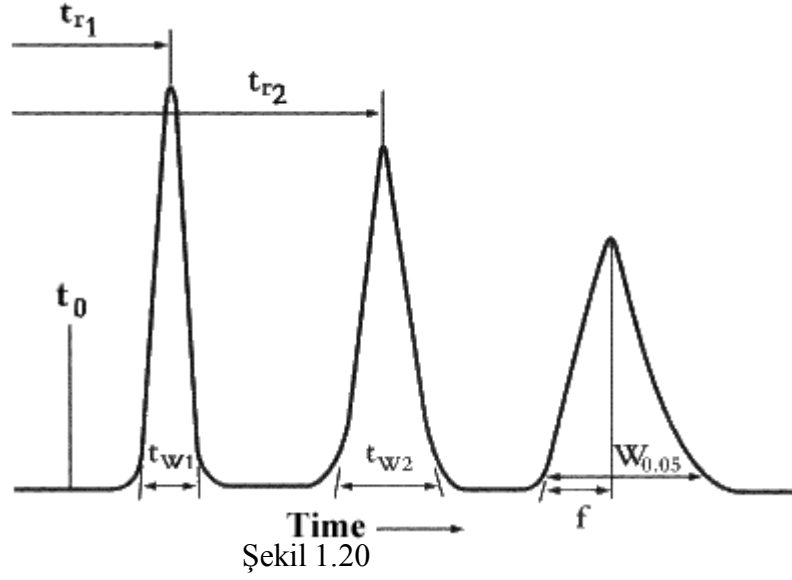
C18,	4,6 x 250 mm,	5µm,	300Å
Kolon dolgu	kolon uzunluğu	dolgu maddesi	gözenek büyüklüğü
malzemesi	çapı	partikül büyüklüğü	

Modern YPSK donanımının temel yapı taşlarından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu parçadır. Seçilecek kolonun YPSK uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir.

Tipik YPSK kolonları; mikron boyutlu partikül içerirler (1-10 µm) ve yüksek basınca (400 atm) dayanıklı çelik kolonlardır. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-10 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır.

Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 2-30 cm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır.

Kolon verimliliği: Kromatografik analizlerde seçilen kolonun özelliklerine bağlı olarak elde edilen piklerin simetrileri, pik genişlemesi ve piklerin ayırma kapasitesi



Teorik Plaka Sayısı (N): Kolon verimliliği ile ilgili bir kavramdır. Bant genişlemesi teorik plaka sayısı ile bağlantılıdır. Bu değerin mümkün olduğu kadar büyük olması istenir.

$$N = 16 (t_r/w)^2$$

Eğer pik asimetrisi ve baseline ile ilgili bir problem var ise plaka sayısı bu sefer

$N = 5.54 (t_r/w_{1/2})^2$ şeklinde hesaplanır. Plaka sayısı ne kadar yüksek ise kolon verimi o kadar iyidir.

HETP (yükseklik eşdeğer teorik plaka sayısı): Farklı uzunluktaki kolonların karşılaştırılması amacı ile hesaplanır. Bu değerin küçük olması kolon verimliliğinin bir göstergesidir. Genellikle bu değer 0.01- 0.03 mm arasındadır (5m).

$$HETP (H) = L/N$$

Eşitlik (1)

L: kolon uzunluğu, mm

N: Teorik plaka sayısı

Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü) (k): Kolona tutunan bileşiğin kolona tutunmadan çıkan bileşiğe oranıdır. Direkt kolonun verimliliği ile ilgili bir kavramdır. k değerinin 1.5-5 arasında olması istenir.

$$k = (t_r - t_0) / t_0$$

Eşitlik (2) yazılır.

Kolon Türleri: (Ticari Kolon Markaları)

Çizelge 1.3

Sektör	Bileşen	Kullanılacak sabit faz
İlaç Sektörü	Bazık bileşikler (aminler)	Purospher® RP-18
	Bazık, asidik ve nötral bileşikler	Chromolith® RP-18 endcapped; Chromolith® RP-8 endcapped; Purospher® STAR RP-18 endcapped
	Amino asitler	Superspher® RP-8
	Antibiyotikler	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® STAR RP-18 endcapped
	Antiepileptik ilaçlar	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® STAR RP-18 endcapped
	Beta inhibitör	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® STAR RP-18 endcapped
	Karbohidratlar	Purospher® STAR NH2
	Karboksilik asitler	Chromolith® RP-8 endcapped; LiChrospher® RP-select B
	Nucleosidler ve Nucleotidler	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® RP-18 endcapped
	Steroide	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® STAR RP-18 endcapped
Gıda	Karbohidratlar (şeker)	Purospher® STAR NH2
	Karboksilik asitler	Chromolith® RP-8 endcapped; LiChrospher® RP-select B
	Koruyucular	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® STAR RP-18 endcapped
	Tatlandırıcılar	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® STAR RP-18 endcapped
	Vitaminler	Chromolith® RP-18/RP-8 endcapped; Purospher® STAR RP-18/RP-8 endcapped
Çevre	Pestisitler	Chromolith® RP-18 endcapped; Purospher® RP-18 endcapped
	Patlayıcılar	Purospher® RP-18 HC
	PAH	LiChrospher® PAH

Kolon Dolgu Maddeleri

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

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

Sıvı kromatografisinde kullanılan gözenekli taneciklerin çapları 3-50 µm arasında değişebilmektedir. Tanecikleri oluşturan reçinelerden biri olan silika, en yaygın olarak kullanılanlardan biridir. Bu tanecikler yarı geçirgendir, çapları 10-50 µm ve yüzey alanları 1-25 m²/g arasında değişmektedir. Bu analitik uygulamalarda bir dezavantajdır. Mikro gözenekli taneciklerin yüzey alanları ise 200-300 m²/g'a kadar çıkabilmektedir ve çapları da 3-10 µm arasındadır. Yüzey alanı arttıkça ayırma kapasitesi artmaktadır. Tanecik boyutu küçüldükçe kolon geri basıncı da artmaktadır. İlişki Eşitlik (3)'de gösterilmiştir.

$$\text{Basınç} \propto \left(\frac{1}{d_p} \right)^{1.8} \quad d_p: \text{Tanecikçapı} \quad \text{Eşitlik (3)}$$

Silika bazı kimyasal işlemlerle türevlendirilerek bağlı sabit fazlar elde edilmektedir;

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



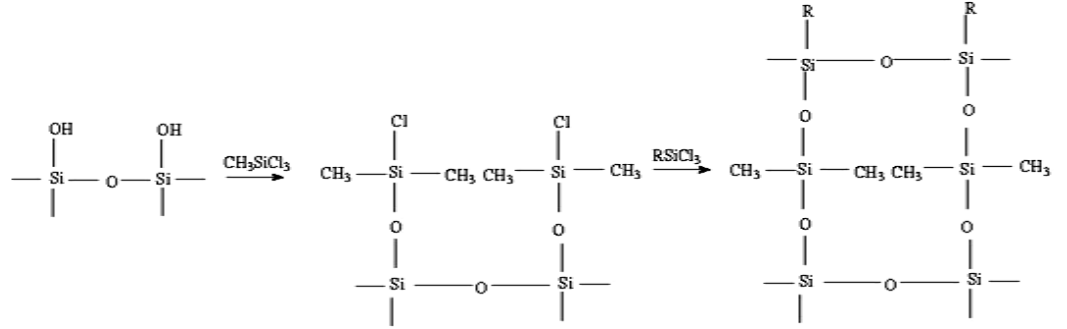
2.Silikon bağları oluşumu (Si-O-Si-R₃):Yüzey silanol grupları organoklorosilan ile tepkimeye girmektedir.



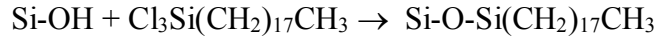
3.Silikon-karbon bağları oluşumu: Yüzey silanol grupları tionil klorür ile tepkimeye sokularak organolityum bileşikleri oluşturulmaktadır. Oluşturulan organik gruplar doğrudan silika yüzeyine bağlanır.



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

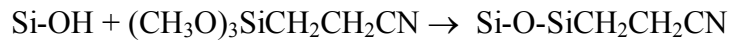


Doygun hidrokarbon polimer tabakaları, siyanoetilsilikon polimer tabakaları ve naylon kaplı silika da kullanılmaktadır. Örneğin, 18 karbon zincirli sabit faz elde edilmesinde aşağıdaki tepkimeler kullanılmaktadır.



(ODS geçirgen faz)

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



(Nitril geçirgen faz)

Bu polimerler hareketli faz akışı ile silika yüzeyinden çıkartılamazlar ve kalıcıdır.

Silika gruplarına (C_8 , C_2) diğer fonksiyonel grupların, örneğin fenil ($SiPh_2$), alkil fenil ($SiC_6H_4CH=CH_2$), ve floro-eter eklenmesi ile farklı fonksiyonel grupları içeren sabit fazlar elde edilebilir (Hamilton. 1982).

Dedektör

Günümüzde kromatografik yöntemlerde optik dedektörler sıklıkla kullanılmaktadır. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken, UV absorbans, floresans emisyon ya da kırılma indisindeki değişimden dolayı ışık şiddetindeki değişim belirlenir ve kaydedilir. Belirlenen bu değişimler (kromatogramlar) üzerinden alıkonma süreleri, pik alanları gibi değerler tayin edilerek, kolon performans parametreleri hesaplanır. Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorbans dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190-600 nm aralığında analiz mümkün olmaktadır. Kullanılan diğer dedektör türleri içinde kırılma indisi (refractive index, RI), floresans (FL), elektrokimyasal (EC) ve kütle spektrometresi (mass spectrometric, MS) dedektörleri bulunmaktadır.

RI dedektörleri yaygın olarak kullanılan ancak az hassasiyete sahip dedektörlerdir. FL ve EC, RI'ya göre daha hassas ancak daha seçici dedektörlerdir. MS dedektörleri ise çok duyarlı, ancak pahalı sistemlerdir.

İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Yüksek duyarlılık
- Hızlı tepki
- Düşük sinyal gürültüsü
- Minimum pik yayılması
- Ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı
- Çalışma kolaylığı ve genişliği

YPSK kullanım alanları

Günümüzde YPSK, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları bileşen ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

- Bileşen Ayırma: YPSK’de bileşen ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır.

Yapılan ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine bağlıdır.

- Saflaştırma: Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre koşullar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir. Bu ise ancak doğru bir mobil faz seçimiyle mümkündür. İstenilen maddenin kolondan çıkış süresinin herhangi bir safsızlık veya istenmeyen bir maddenin karışmasını engelleyecek kadar kısa olması gereklidir.

- Tanımlama: Bir maddenin YPSK ile tanımlanması YPSK analizlerinin önemli bir parçasını oluşturur. YPSK’de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir. Herhangi bir maddenin YPSK ile tanımlanabilmesi için öncelikle dedektörün doğru seçilmesi gerekir. Dedektör seçildikten ve optimum koşullarda ayarlandıktan sonra bir ayırma analizi yapılmalıdır. Tanımlanmaya çalışılan maddenin seçilen dedektör ve analiz koşullarında kabul edilebilir bir çıkış süresi ve belirgin bir piki olmalıdır. Çıkış süresini kısaltmak için bazı ayarlamalar yapılabilir. Bunlardan ilki kolon seçimi, diğeri mobil faz seçimi ve son olarak da akış hızı seçimidir.

Kesin bir tanımlama için bilinen bir örneğin kullanılması gerekir. Güvenilir bir tanımlama için birden çok metod kullanılmalıdır.

- **Derişim Tayini:** YPSK’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derisini tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda YPSK’ye enjekte edilmesi işlemini içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derisine karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir.

Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur. YPSK’de kullanılan sürekli fazın polaritesi ayırma işleminde önemli rol oynar. İki farklı elüsyon tipi vardır:

- **İzokratik Elüsyon:** Kolona sabit bileşimdeki sürekli faz pompalanır. Sürekli fazın polaritesi sabit olduğu için kolona çok fazla ilgi duyan bileşenleri kolondan atmak zorlaşır ve elüsyon süresi uzar. Maddelerin molekül büyüklüğüne göre tayini de bu elüsyon türü ile gerçekleşir.
- **Gradient Elüsyonu:** Sürekli faz bileşimi analiz boyunca doğrusal olarak değişir. Analiz örneğinin kolon dolgu materyali yüzeyine afinitesi önemlidir. Ortamdaki elüentin polaritesi zamanla değiştirilerek örneklerin partikül yüzeyine afinitesi değiştirilir ve ayırma sağlanır.

YPSK türleri

Sıvı kromatografisini sınıflandırmanın birçok yolu vardır. Eğer bu sınıflandırma sabit fazın yapısına ve ayırma prosesine göre yapılırsa, YPSK’yı 5 farklı türde inceleyebiliriz.

1.Normal Faz Kromatografisi (Normal Phase Chromatography, NPC):

Bu türde sabit faz oldukça polar yapıda (örneğin silika jel), sürekli faz ise n-hekzan ya da tetrahidrofuran gibi apolar yapıdadır. Burada polar olan kolon dolgu materyali ile etkileşen polar örneklerin alıkonma süreleri daha az polar olan örneklerle oranla daha fazladır. Bu nedenle örnek bileşenlerinden daha polar olanlar, kolondan daha geç çıkarlar ve ayırma gerçekleşir.

2.Ters Faz Kromatografisi (Reversed Phase Chromatography, RPC):

Normal faz kromatografisinin tam tersidir. Sabit faz apolar (hidrofobik), sürekli faz ise su ve asetronitril karışımı gibi polar yapıdadır. Burada apolar yapıdaki örnek bileşenleri kolonda daha uzun kalırlar.

Ters ve Normal-faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması

Çizelge 1.4

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

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

Çizelge 1.4

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

3.Büyükölükçe Ayırma Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC):

Kolon, gözenek boyutu ve hacmi kontrol edilebilen partiküller ile doldurulur. Kolona enjekte edilen örnek içerisindeki bileşenler moleköl büyüklüklerine göre kolondan filtre edilirler. Büyük moleküller hızlı bir şekilde kolondan ayrılırken, daha küçük moleküller partiküllerin gözeneklerine doğru difüzlenererek kolondan daha geç çıkarlar. Bu yöntemde jel geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography, GPC) de denir.

4.İyon Değişim Kromatografisi (Ion Exchange Chromatography, IEC):

Sabit faz, örnek bileşenleri üzerinde yer alan iyonik yapının tersi şekilde yüklenmiştir. Bu sayede iyonik yapıda olan veya iyonlaşabilen örneklerin analizi ve ayrılması yapılmaktadır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşime giren bileşen kolondan daha geç çıkar. Etkileşim düştükçe alıkonma süresi azalır. Mobil faz sulu tampon çözeltileridir. pH ve iyonik şiddet alıkonma sürelerinin kontrolünde kullanılır.

Kasyon ve Anyon Değiştiriciler (Aşağıdaki çizelge Çizelge 1.2 ile aynıdır.)

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

5. Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC):

Sabit faz polar, sürekli faz da sabit faza göre daha az polaritede fakat polar yapıdadır. Burada polar yapıdaki örnekler kolonda daha uzun süre kalırlar.

Hidrofilik etkileşim kromatografisi polar analitlerin tayinine yönelik olarak özellikle son on yılda geliştirilmiş yeni bir, yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemidir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemlerinden biri olan ters faz sıvı kromatografisi peptidlerin ayrılmasında kullanılan vazgeçilmez bir yöntemdir.

Ters faz sıvı kromatografisinin bir avantajı, güçlü çözünürlük kapasitesinin yanında uçucu mobil faz kullanılabilmesidir. Bu uçucu mobil faz ile saf peptid kolayca vakum altında kurutma ile elde edilebilir.

Fakat ters faz sıvı kromatografisinde ayırma yeteneği çok güçlü olsa da, polar moleküller için yeterli alıkonma sağlanamaz. Bu durumda silika, alumina gibi sabit faz ve hekzan, kloroform gibi susuz mobil faz içeren normal faz sıvı kromatografisi, polar analitlerin ayırımı için kullanılabilir.

Normal faz sıvı kromatografisinde, peptid gibi hidrofilik bileşiklerin apolar çözeltiler içerisinde çözülmesi zordur ve bu yüzden normal faz sıvı kromatografisi biyolojik örneklerin uygulamasında az kullanılır. (Yoshida et al. 2004). 1975 yılından beri polar sabit faz olarak, modifiye edilmemiş silika ve sulu mobil faz, normal faz sıvı kromatografisinde karbonhidratlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu koşullarda mobil faz çok az oranda su bileşeni içermekte ve bu da biyolojik örneklerin çözünürlüğü için avantaj sağlamaktadır. Bu kullanılan yöntem hidrofilik etkileşim kromatografisi denir.

HILIC yöntemi, ilk kez Dr. Andrew Alpert tarafından 1990 yılında (J. Chromatogr. 499 1990) yayınında önerilmiş olup, hidrofilik maddelerin ayırımında kullanılan, normal faz sıvı kromatografisinin bir çeşididir (Y. Guo et al. 2005, Knut ve ark. 2006).

Hidrofilik etkileşim kromatografisinde, sabit faz, silika, siyano, amino, diol gibi polar bir maddedir. Mobil faz ise az miktarda su veya polar çözelti içeren yüksek organiklikte ve sabit faza göre daha az polaritededir (T. Ikegami ve ark. 2008).

Az miktarda su veya polar çözelti içeren Asetonitril, HILIC kromatografisi için kullanılan klasik bir mobil (hareketli) fazdır.

Aynı zamanda THF ve dioksan gibi su ile karışan çözeltiler de kullanılabilir. HILIC'te düşük su/yüksek organik mobil faz oranı kullanmak, elektron iyonlaşma kütle spektrometrenin (ESI-MS) hassasiyetini bileşikler için arttırır. Bu özelliği ile HILIC safsızlık tespitinde kullanılabilir.

Bunlardan baska yüksek organiklikte mobil faz kullanıldığı için kolon geri basıncı düşüktür ve bu da kolonun yüksek akış hızlarında çalışmasını kolaylaştırarak analiz süresini kısaltır. HILIC'te sabit fazın ve analitlerin polaritesinin artması, mobil fazın polaritesinin azalması, analitlerin alıkonmasını arttırmaktadır. HILIC'te önemli bazı parametreler vardır. Bunlar, mobil faz kuvveti, mobil faz pH'ı, sabit faz türü, akış hızı gibi parametrelerdir. HILIC için mobil faz içerisindeki su oranı hacimce %5-40 arasında olmalıdır, yani sıklıkla kullanılan Asetonitril oranı hacimce %95-60'dır.

Yöntemde, mobil fazda bulunan polar analitlerin yine polar bir katı destek yüzeyi ile farklı derecede etkileşimi, analitlerin kolonu farklı sürelerde terk etmesine neden olmakta ve bu davranış kromatografik ayırımı sağlamaktadır. Mobil faz, polar sabit faz yüzeyi üzerinde suca zengin tabaka oluşturmaz. Analitler mobil faz ile bu ıslak sabit faz yüzeyi arasında ayrılırlar. Daha polar bileşikler sabit sulu tabaka ile daha güçlü etkileşim gösterir. HILIC ayırımlarında mekanizma karışıktır. Mekanizmanın karışık olmasının yanında yöntem pratikte basittir.

HILIC için bazı avantajlar:

1. Kütle spektrometre hassaslığı, hareketli faz içerisindeki yüksek organik bileşen ile geliştirilir.
2. Ters faz kromatografi ile yeterince alıkonamayan yüksek polaritedeki analitleri alıkoyar.
3. Çözücülerin elüsyon sırası ters faz ayırmada olduğunun tam tersidir ve bu alternatif seçicilik kazandırır.
4. Yüksek organik bileşenli hareketli fazlardan dolayı yüksek akış hızları mümkündür.

Yani HILIC, ters faz sıvı kromatografisine göre daha iyi alıkonmaya ve seçiciliğe sahiptir. Aynı zamanda normal faz sıvı kromatografisinde çözünemeyen polar analitlerin ayırımı için de kullanılmaktadır. (V. Mccalley ve ark 2007).

HILIC uygulama alanları:

HILIC yüksek polaritedeki maddelerin yani;

- Biyolojik aktif bileşikler
- Nükleotidler
- Suda çözünen vitaminler
- İlaç metabolitleri
- Nörotransmitterler
- Aminoasitler
- Peptidler
- Oligosakkaritler'in tayininde kullanılır.

HILIC, Ters faz sıvı kromatografisinde istenilen alıkonma sağlanamayan veya alıkonamayan bileşikler gibi bileşiklerin ayrılmasında kullanılır. Literatürde bugüne değin yapılan çalışmalarda özellikle silika bazlı kolon materyalleri tercih edilmiştir. Bu silika; amino, diol, sülfobetain türü gruplarla modifiye edilip polar gruplu sabit faz olarak kullanılabilir. Son yıllarda bu tür sabit fazların ayırma verimleri ayrıntılı olarak incelenmektedir. Yapılan bir çalışmada HILIC modunda, fosforilkolin tipi monomerin silika yüzeye kovalent bağlanmasıyla elde edilen zwitter iyonik yapıdaki sabit faz, HILIC modunda peptid ayırımı için kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada peptidlerin alıkonmalarının pH 3-6 arasında arttığı gözlenmiştir..

Ayrıca bu tip kolonun sadece silika kolonuna göre daha iyi alıkonmaya sahip olduğu görülmüştür (W. Jiang ve ark. 2006). Yapılan diğer bir çalışmada ise silika kolonu, amide ile modifiye edilmiş silika kolonu, siyano ve diol grubu ile modifiye edilmiş silika kolonu ve sülfalkil ile modifiye edilmiş silika kolonu'nun farklı analitler kullanılarak ayırma verimleri incelenmiştir.

Asit, baz, nükleosit ve karbonhidrat analit olarak kullanılmıştır ve analitlerin ayırımında her bir kolonun farklı kromatografik performansına sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlar bir tabloda özetlenmiştir. Tabloya Sülfalkilbetain ile modifiye edilmiş kolon için baktığımızda nükleosit ayırımında, mobil fazda hacimce %85 ACN kullanıldığı ve 6 bileşiğin ayırımının yapıldığı gözlenmektedir (T. Ikegami ve ark. 2008). Literatürde HILIC modunda kolon performanslarını araştıran daha birçok çalışma bulunmaktadır.

Kromatografi Terimleri

I.Kromatogram

Çözünen maddenin derişimlerine cevap veren bir dedektör, kolon çıkışına yerleştirilirse ve dedektör sinyali zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilirse bir seri pik elde edilir. Kromatogram olarak adlandırılan bu grafikler, hem kalitatif hem de kantitatif analiz için kullanılır. Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerini tanımada kullanılabilir. Pik alanları her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür (Asan, A. 1999)

II. Dağılma Sabitleri

Çoğu zaman, kromatografide dağılma dengeleri analitin hareketli ve durgun fazlar arasında aktarımı ile ilgili eşitliklerle tanımlanır. Bu nedenle bir A çözüneni için

$$A_{\text{hareketli}} \leftrightarrow A_{\text{durgun}}$$

yazılabilir.

Reaksiyonun denge sabiti K dağılma sabiti, bölüşüm oranı veya bölüşüm katsayısı olarak adlandırılır ve

$$K = C_S / C_M \quad \text{Eşitlik (4)}$$

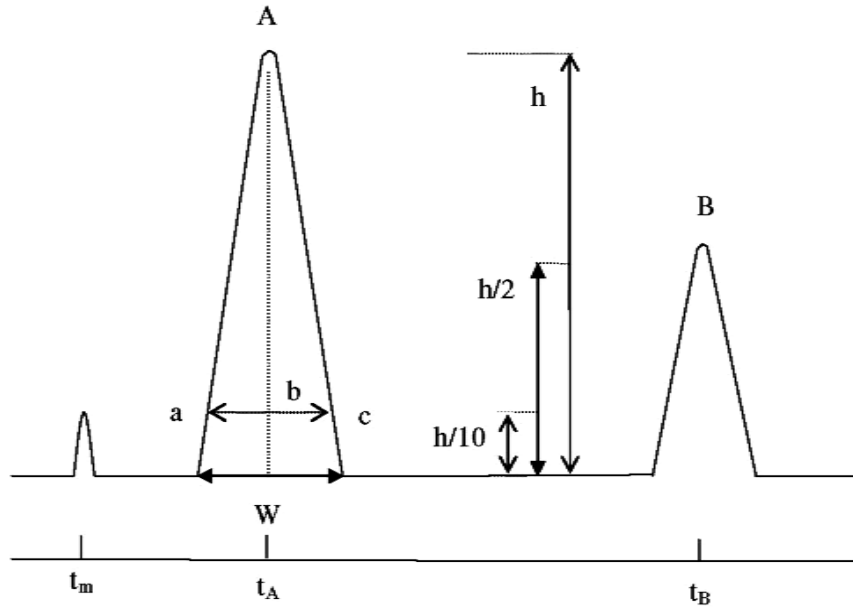
olarak gösterilir. Bu eşitlikte C_S çözünenin durgun fazdaki molar derişimi, C_M ise hareketli fazdaki molar derişimidir.

İdeal durumda, K geniş bir çözünen derişim aralığında sabittir; bu nedenle C_s , C_M ile doğru orantılıdır. Yukarıdaki eşitliğin geçerli olduğu kromatografiye doğrusal kromatografi denir ve simetrik Gauss tipi pikler vermesi ve alıkonma zamanlarının enjekte edilen analit miktarından bağımsız olması gibi özellikleri vardır.

K değerin büyük oluşu, maddenin sabit fazda iyi tutulduğunu ve bu yüzden kolon boyunca yavaş ilerlediğini gösterir. Ters durumda yani K değerin küçük oluşunda ise maddenin sabit fazda az tutulduğunu ve böylece kolon içinde hızlı ilerlediği anlamına gelir. Bir karışımında bulunan bileşenlere ait K değerlerinin farklı oluşu, bunların kolon boyunca birbirlerine göre farklı hızlarda ilerlemelerine yol açar. Bu yüzden bileşenler, kolonun sonlarına doğru birbirlerinden ayrılmış olurlar ve kolonu farklı zamanlarda terk ederler (Asan, A. 1999)

III. Alıkonma Zamanı (Retention Time)

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



Şekil 1 .21 YPSK yöntemiyle elde edilen kromatogram

Şekil 1.21’de t_m ; sabit faz ile etkileşmeyen maddelerin veya hareketli fazın alıkonma zamanını, t_A ; A maddesinin alıkonma zamanını, t_B ; B maddesinin alıkonma zamanını göstermektedir. Alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi de denilmektedir. Ayrılamayan piklerin veya hareketli fazın alıkonma hacmi, ölü hacim (V_0) olarak da adlandırılır. Bir maddenin alıkonma hacmi ayırımı yapılacak olan maddenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmidir. Alıkonma hacmi; alıkonma zamanı ile hareketli faz akış hızının (F) çarpılması ile hesaplanabilir.

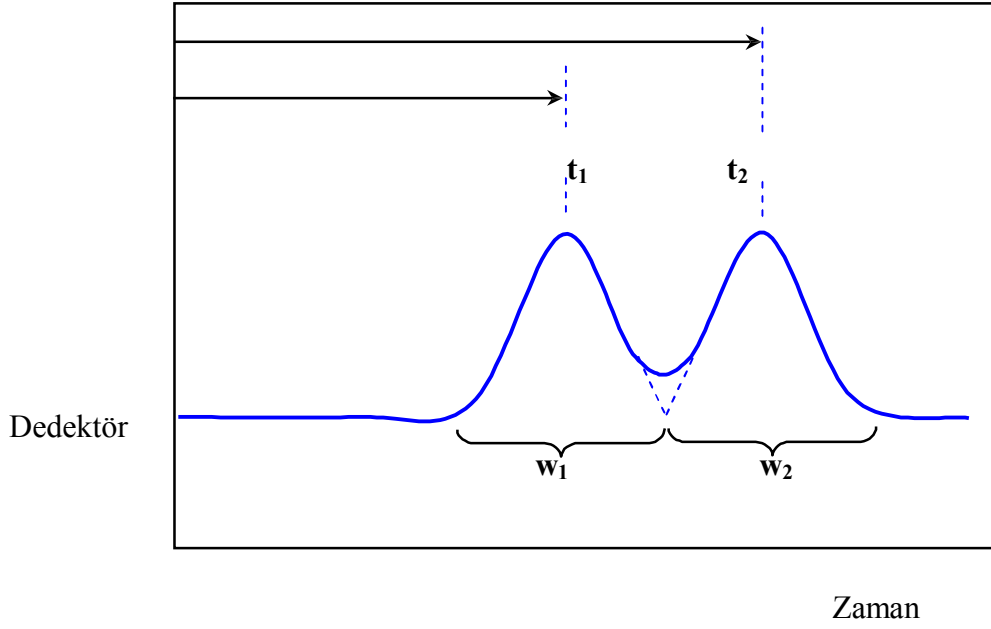
$$V_0 = t_m \times F \quad \text{Eşitlik (5)}$$

IV. Kolonun Ayırım Gücü (Resolution)

Kromatografik yöntemin uygulanmasıyla, karışımdaki maddelerin birbirinden ayrılmasının amaçlandığı daha önceden açıklanmıştı. Maddelerin birlerinden ne derece ayrılabilirdikleri, bir yazıcı üzerinde her madde için elde edilen pikler ile izlenir. Piklerin genişliği veya darlığı tek başına bir anlam ifade etmez. Pikler geniş görülmesine rağmen maddeler birbirlerinden ayrılmış, keskin dik pikler görülmesine rağmen de maddeler birbirlerinden ayrılmamış olabilir. Bu durumda hangi kromatogramdaki maddelerin tam olarak ayrıldığını belirleyebilmek için ayırım gücü terimi “ R_s ” yi dikkate almak gerekir.

R_s aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenebilir;

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad \text{Eşitlik (6)}$$



Şekil 1.22. Kromatografide piklerin ayırımının gösterimi

R_s : Ayırım gücü

t_{R1}, t_{R2} : İki farklı maddenin alıkonma zamanları

w_1, w_2 : Bu iki madde pikinin taban genişliklerini göstermektedir.

İki madde pikinden faydalanılarak bulunan değerler yerine konursa ayırım gücü hesaplanabilir. Ayırım gücünün hesaplanabilmesi için Şekil 1.22’de gösterildiği gibi Gaussian piklerin elde edilmesi gereklidir. Genellikle bir kromatogramda elde edilen ardışık iki pik arası için;

$R_s > 1,5-2$ ise pikler % 100 ayrılmıştır.

$R_s = 1$ ise % 97,5 yeterli ayırım vardır.

$R_s < 1$ ise yeterli ayırım sağlanamamış demektir.

Bu durumda şartlar yeniden gözden geçirilmelidir (Asan, A. 1999)

1.6. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlik Testleri)

Analitik yöntemler, ilaç analizlerinde, biyolojik numune analizlerinde, biyoeşdeğerlik çalışmalarında, farmakokinetik bilgilerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, ilaç etken maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde, ilaç etken maddelerinin metabolitlerinin tayininde kullanılan yöntemlerdir. Bu işlemlerin yapılabilmesi için iyi karakterize edilmiş, güvenilir sonuçların elde edilebileceği tamamen geçerli analitik yöntemlerin kullanılması veya geliştirilmesi gereklidir. Her yeni geliştirilen yöntemin validasyon sonuçları birbirinden bağımsızdır (Riley ve ark 1996; Swartz ve ark 1997; ICH 1994; Ahuya ve ark 2001; Lunte ve ark 1996). Yöntem validasyonu analitik işlemlerin istenilen kullanım için uygunluğunu gösteren parametrelerdir. Uygulanacak analitik işlemler için hangi tip validasyon karakteristiklerinin kullanılacağı belirlenmelidir. Geliştirilen bir yöntemin veya parametrelerinde ufak değişiklikler yapılmış bir yöntemin geçerli olabilmesi için mutlaka gerekli validasyon testlerinin ve ilgili hesapların yapılmış olması gereklidir (Riley ve ark 1996; Swartz ve ark 1997; ICH 1994; Snyder ve ark 1997; Ahuya ve ark 2001; Lunte ve ark 1996; Adamovics 1997; Braggio ve ark 1996; Shabir 2003; Papadoyannis ve ark 2004; Ermer 2001; Mc Dowell 1999). Amerikan Farmakopesine (USP 24) göre validasyon, analizi yapılacak madde için geliştirilen analiz yönteminin seçilen aralıkta uygunluğunu, doğruluğunu, duyarlılığını, tekrar edilebilirliğini, sağlamlığını belirtmektedir.

1.7. Validasyonun Genel İşlemleri

1. Cihazın kontrolü ve validasyonu, (tüm donanım ve yazılımlar için geçerlidir)
2. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametrelerde yapılan değişikliklerden sonra yapılan validasyon,
3. Cihaz ve ilgili yöntem seçildikten sonra ve validasyonları yapıldıktan sonra ayırma yöntemleri için gerçekleştirilen Sistem Uygunluk Testleri (SUT). Bu testler FDA ve USP tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir. Bir analitik yöntemin validasyonu; laboratuvar çalışmaları ile belirlenen ve istenen analitik uygulamalar için gerekli yöntem performans karakteristiklerinin bulunmasıdır. Performans karakteristikleri analitik parametreler cinsinden ifade edilir.

Bu parametreler hem *in-vivo* hem de *in-vitro* çalışmalarda kullanılan yöntemler için geçerlidir. Biyoanalitik yöntemler; kan serum, plazma veya idrar gibi biyolojik sıvılarda etkin maddelerin veya metabolitlerinin; gaz kromatografi (GK), sıvı kromatografisi (SK) veya bunların SK-KS, GK-KS, SK-KS-KS, GK-KS-KS gibi kütle spektrometrisi (KS) ile kombinasyonları, Elektrokimyasal ve Radyokimyasal yöntemler gibi yöntemlerle miktar tayinlerini içerir.

1.8. Tipik Validasyon Karakteristikleri

- 1.8.1. Doğruluk (Accuracy; Geri Kazanım(Recovery))
- 1.8.2. Kesinlik (Precision)
- 1.8.3. Seçicilik (Selectivity, specificity)
- 1.8.4. Teşhis Sınırı (LOD)
- 1.8.5. Tayin Sınırı (LOQ) veya tayin alt sınırı (LLOQ)
- 1.8.6. Doğrusallık (Linearity)
- 1.8.7. Duyarlılık (sensitivity)
- 1.8.8. Çalışma Aralığı (Range)
- 1.8.9. Sağlamlık (Robustness)

1.8.10. Tutarlılık (Ruggedness)

1.8.11. Stabilité

1.8.1. Doğruluk (Geri Kazanım):

Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Bu aynı zamanda biyolojik sıvılardan tüketmenin etkinliğini de gösterir. Kullanılan cihazlardan yapılan ölçümlere dayalı olarak hesaplanır. Biyolojik sıvılarda çalışılırken geri kazanımın % 100 olması gerekmez. Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişim için yapılır; alçak (tayin alt sınırında veya yakın konsantrasyonunda), orta (çalışma konsantrasyon aralığının ortasında yer alan bir konsantrasyonda) ve yüksek (çalışma konsantrasyon aralığının üst sınırlarında veya yakınında yer alan bir konsantrasyonda) derişim değerleri seçilerek kullanılır.

Seçilen her bir konsantrasyon için minimum 5 tayin yapılmalıdır. Bu tayinlerden minimum 3 tanesi ortalama değerin % 15 inden daha fazla sapma göstermemelidir.

Tayin alt sınırındaki konsantrasyon için bu sapma % 20 yi geçmemelidir. (Riley ve ark 1996).

Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir.

1.8.1.1. Referans standart ile karşılaştırmak:

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

Hesapla bulunan değerlerin çizelgede yer alan değerlerden küçük oluşu geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğunu gösterir.

Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (%BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir.

$$\% BSS = \frac{SS}{X} \times 100 \quad \text{Eşitlik (7)}$$

SS: Standart Sapma

—

X: Ortalama Değer

1.8.1.2. Kör matris ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:

Farmasötik dozaj formları gibi matris etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrise değişik derişimlerde eklenir. Bu matris ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur. Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% BH) ile beraber verilir.

1.8.1.3 Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi:

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları matris içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır.

Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

1.8.2. Kesinlik:

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

1.8.2.1 Tekrarlanabilirlik:

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

1.8.2.2 Orta-Kesinlik:

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

1.8.2.3 Tekrar Elde Edilebilirlik:

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

1.8.3. Seçicilik:

Analizi yapılacak maddenin numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Bu kompleks numune karışımlarını analizinde girişim derecesinin de bir ölçüsüdür.

Etken madde yanında safsızlıkların, parçalanma ürünlerinin, benzer kimyasal maddelerin veya plasebo bileşenlerin bulunduğu numune ile bulunmadıkları numunede yapılan miktar tayini analizlerde etkin maddenin bulunan konsantrasyonları arasındaki fark olarak ifade edilir. Özellikle stabilite tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır.

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

Seçicilik 2 yolla saptanır:

- 1- Tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin girişim yapma oranına veya ayırma yöntemlerinde, “Ayrım gücü” (R_s) değerlerine bakılır. Bu değer ayırma yöntemleri için $R_s \geq 2,0$ olmalıdır.
- 2- Ayırma yöntemlerinde duyarlı bir dedektör seçilebilir. İncelencek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan dedektörler Elektrokimyasal veya Radyoaktivite Dedektörleridir. Bu dedektörler belli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin girişim yapma ihtimalini yok ederler.

1. Basamaktaki işlem için:

A- Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphelenilen maddeler aynı anda geliştirilen yöntemle analiz edilir ve cevaptaki değişim incelenir. Ayırma yöntemlerinde bilinen veya girişim yapmasından şüphelenilen maddeler aynı anda kolona etken madde ile birlikte enjekte edilir ve ayırma gücü değerlerine bakılır ($R \geq 2,0$ olmalıdır).

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

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

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

E- Ayırma yöntemlerinde kütle spektrometrisi dedektörleri gibi duyarlı ve hassas tekniklerle veya DAD (Foto diyot dizisi) dedektörü ile değişik dalga boyunda deney anında taramalar yaparak herhangi ilave bir pik olup olmadığını kontrol edilir.

1.8.4. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (TS):

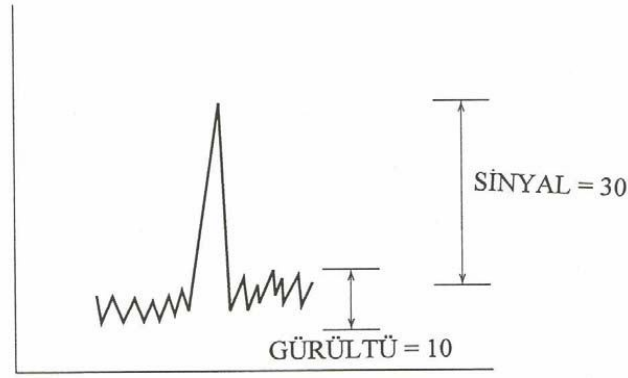
Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt konsantrasyondur. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile Teşhis Sınırı saptanmasında;

$$TS = 3.3 \times SS / m$$

Eşitlik (9)

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



Şekil 1.23 . Teşhis sınırını hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli

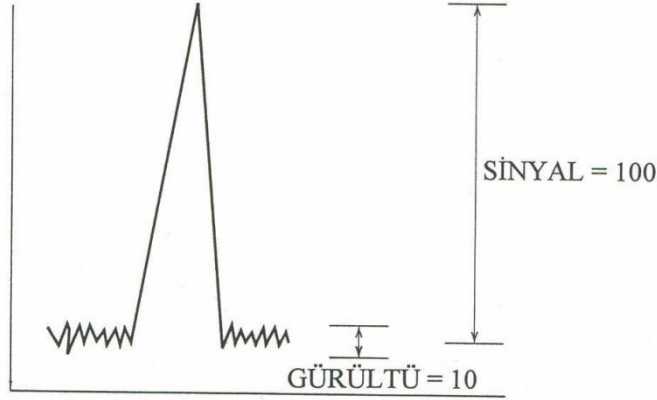
1.8.5. Tayin Alt Sınırı (TAS):

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan konsantrasyon düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek TAS tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır.

Hesaplama yolu ile Tayin Alt Sınırı saptanmasında;

$$TAS = 10 \times SS / m \quad \text{Eşitlik (10)}$$

eşitliği kullanılır. SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. SS ve m değerleri TS eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.



Şekil 1.24

Tayin alt sınırı hesaplanmasında kullanılan sinyal/gürültü oranı şekli

Biyolojik sıvılarla çalışılırken TAS'nı belirlemek için aşağıdaki şartların yerine gelmesi gerekir:

a- Analitin TAS'daki derişimi için cihazdan ölçülen cevap kör için ölçülen cevabın en az 5 katı olmalıdır.

b- Analit için gözlenen pikin veya alınan cevabın tanımlanabilir ve diğer girişim yapma ihtimali bulunan maddelerden ayrı olması gerekir ayrıca % 20 kesinlik ve % 80–120 doğrulukta tekrar edilebilir olmalıdır.

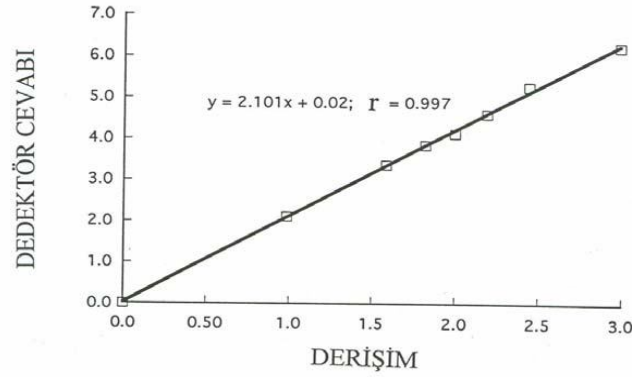
1.8.6. Doğrusallık:

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Eğim (m), kesişim(n) ve korelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametrelerdir. Bunlar analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı $r = 0,999$ ve üzerinde ise ve cevap değerleri çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa sağlanmış demektir.

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

1.8.6.1 Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği):

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



Şekil 1.25 Kalibrasyon doğrusu (grafığı) ve eşitliği

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

a- Tayin alt sınırı derişiminden elde edilen cevaplar arasındaki sapma %20 den fazla olmamalıdır

b- Tayin alt sınırı derişiminin dışında seçilen standart derişimlerden elde edilen cevaplardaki sapmalar % 15 den fazla olmamalıdır.

1.8.7. Duyarlılık:

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

1.8.8. Çalışma Aralığı:

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

Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduğundan sonra belirlenir.

Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın ölçölür. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50'nden düşük ve %150'nden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Hedef miktarın %50, 75, 100, 125 ve 150 olacak şekilde aralık düzenlenebilir.

1.8.9. Sağlamlık:

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

Örneğin pH 3 de $\pm 0,1$ kadar bir değışim gösteren bir madde pH 4,5 da değışmeden aynı sonucu veriyorsa pH 4,5 ortam olarak seçilmelidir.

1.8.10. Tutarlılık:

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın: aynı laboratuarda farklı analizciler tarafından; aynı laboratuarda farklı cihazlar tarafından; farklı laboratuarda gerçekleştirilmesi; reaktif ve çözücülerin markalarının değıştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değıştirilmesi; ayırma yöntemlerinde aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir. Orta kesinlikle de benzeşmektedir. % BSS ile ifade edilir. Uluslararası Uyum Konferansı (ICH= International Conference on Harmonization) bunu yapılması kesin olarak zorunlu işlemler grubuna dahil etmemiştir.

1.8.11. Stabilite:

Zorunlu bir validasyon parametresi olmamakla beraber yapılması tavsiye edilir. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre (örneğin 1 gün, 1 hafta, 1 ay veya ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa o kadar süre) stabilitesini koruması gereklidir. Etken maddenin stabilitesi oda sıcaklığında ve en az 6 saat olarak değerlendirilmelidir. Saklama süresinin tamamlanmasından sonra stabilite taze hazırlanmış stok çözelti ile karşılaştırma yaparak tayin edilir. Biyolojik numunelerde ilacın stabilitesi, onun saklama şartları, kimyasal yapısı, matris ve saklama kabının bir fonksiyonudur.

Stabilite olarak; numune toplama ve işleme sırasında, uzun süreli (belirlenen saklama sıcaklığında), kısa süreli saklamalarda (oda sıcaklığında) ve dondurma - çözme işleminden sonra geliştirilen analitik yöntem uygulanarak tayin edilir.

Tüm stabilite çalışmalarında analitin, içinde analit ve girişim olmayan biyolojik sıvı içerisinde taze hazırlanmış stok çözeltilerinden hareketle hazırlanan numune setleri kullanılır.

1.8.11.1. Dondurma çözme stabilitesi: (Freeze and Thaw Stability):

Bu yolla yapılan stabilite çalışmalarında 3 dondurma ve çözme siklusu kullanılır. Düşük ve yüksek derişimlerde en az 3 çözelti istenen sıcaklıkta 24 saat süreyle dondurulur, sonra oda sıcaklığında kendiliğinden çözülmesi beklenir. Tamamen çözüldükten sonra numuneler aynı şartlarda 12–24 saat süreyle yeniden dondurulur. Donma-çözme işlemi 2 kez daha tekrarlanır ve 3. siklustan sonra tayin işlemi yapılır. Eğer analit istenen saklama şartlarında dayanıklı değilse; stabilite için numunenin 3 donma-çözme işlemi için – 70 °C kullanılır.

1.8.11.2. Kısa süreli stabilite (Short-term temperature stability):

Düşük ve yüksek derişimlerdeki numuneler oda sıcaklığında çözölür ve bu sıcaklıkta 4–24 saat aralığında tutulur (bu süre numunenin oda sıcaklığına gelmesi süresine bağılı olarak değışir). Bu sürenin tamamlanmasından sonra stabilite taze hazırlanmış stok çözelti ile karşılaştırma yaparak tayin edilir.

1.8.11.3. Uzun süreli stabilite (Long-term stability):

Bu stabilite, numunenin ilk toplandığı tarihten başlayarak son numune analizine kadar geçen süreyi kapsar. Bu işlemde düşük ve yüksek derişimde en az üç çözeltinin aynı koşullar altında saklanmasıdan sonra tayinleri yapılır. Numunelerin hacmi üç ayrı işlemde kullanıma yetecek kadar olmalıdır. Stabilite hesabında ilk toplandığı andaki derişim ile son derişim arasında kıyaslama yapılarak tayin edilir.

1.9. Yöntem Validasyonu İle İlgili Çalışmaların Sunumu:

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

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

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kimyasal Maddeler

Kinapril	(Pfizer)
Hidroklorotiyazid	(Unichem)
Enalapril	(Msn Lab)
Perindopril	(Msn Lab)
Asetonitril	(CH ₃ CN, JT. Baker)
Metanol	(CH ₃ OH, JT. Baker)
Potasyum dihidrojen fosfat	(KH ₂ PO ₄ , JT. Baker)
Orto fosforik asit	(H ₃ PO ₄ , JT. Baker)
Milli-Q saf su	

2.2. Cihazlar

YPSK pompası	(Shimadzu 2550)
UV/GB	(Shimadzu 2487)
YPSK Kolonu	(Hichrom C 18 10 micron 250x4.6 mm)
Spektrofotometre	(Shimadzu UV-2550)
pH metre	(WTW pH 526)
Ultrasonik banyo	(Bandalin Sonorex)
Hassas terazi	(Mettler)
YPSK saflıkta su cihazı	(Sartorius)
Derin dondurucu	(Vestel)

2.3. Cam ve Diğer Malzemeler

Balon joje (20 ml, 50 ml, 100 ml)	(İsolab)
Mezur (1000 ml, 2000 ml)	(İsolab)
Beher	(İsolab)
Enjektör (5 ml, 10 ml)	(Ayset)
Cam pipet (1ml, 2 ml, 5 ml)	(Schott)
0.2 µ RC filtre	(Wattman)

2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1. Kinaprıl Stok Çözeltisi: Analiz işlemlerinde kullanılacak Kinaprılın stok çözeltisi derişimi 0,2 mg/ml olacak şekilde hareketli faz içerisinde hazırlanmıştır.

2.4.2. Hidroklorotiyazid Stok Çözeltisi: Analiz işlemlerinde kullanılacak hidroklorotiyazid stok çözeltisi derişimi 0,125 mg/ml olacak şekilde hareketli faz içerisinde hazırlanmıştır..

2.4.3. Perindopril Stok Çözeltisi: Analiz işlemlerinde kullanılacak Perindopril stok çözeltisi derişimi 0,2 mg/ml olacak şekilde hareketli faz içerisinde hazırlanmıştır.

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

2.4.5. Test Çözeltisi: Miktar tayini yapabilmek amacıyla 10 tablet duyarlı olarak tartılmış, havanda ezilmiş ve 1 tablete eşdeğer tablet tozu hassas olarak tartılıp 100 ml'lik balonjojeye alınmıştır. Üzerine hareketli faz eklenerek ultrasonik banyoda 10 d çözünmesi için bekletilmiştir. Hacmine hareketli faz ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0.2 µ RC filtreden süzölmüş ve bu süzöntüden 1ml alınarak 10 ml'lik balonjojeye konulmuş, hacmine hareketli faz ile tamamlanmıştır.

2.4.6. KH_2PO_4 Çözeltisi: 0,067 mol/L derişiminde KH_2PO_4 deiyonize su ile 1000 ml'lik balonjojede hazırlanmıştır. pH'sı derişik ortofosforik asitle 2,5'e pH metre kullanılarak ayarlanmıştır.

2.4.7. Hareketli Faz Çözeltisi: Günlük hazırlanmış 0,067 mol/L derişiminde KH_2PO_4 (pH 2,5)'den hacimce % 60 ile asetonitrilden hacimce % 40 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin pH değeri derişik ortofosforik asitle ayarlandıktan sonra asetonitril ilave edilmiştir. Hareketli faz 0.45 μm filtreden süzöldükten sonra 5 dk ultrasonik banyoda tutulup gazı giderilmiştir.

2.5.YPSK Yöntemi

2.5.1.Deneyin Yapılışı

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

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

2.5.2. YPSK Yönteminin Optimizasyonu

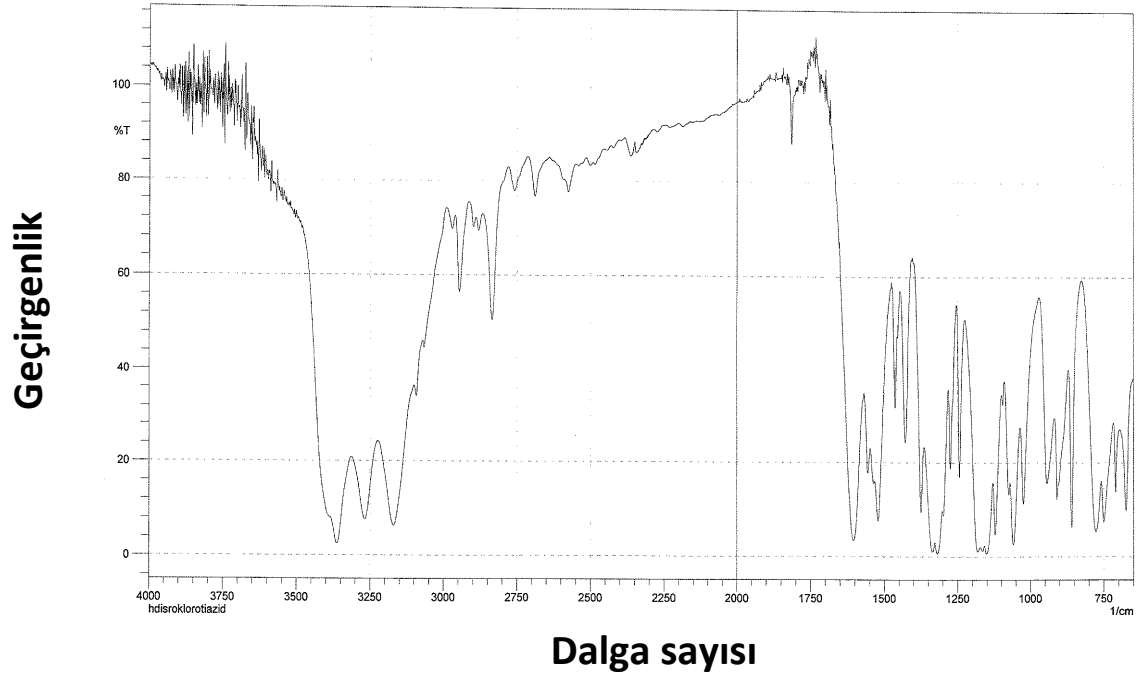
Geliştirilecek yöntem için en iyi ayırımın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar saptanmıştır. Bu amaçla, kinapril ve hidroklorotiyazidin ters-faz sıvı kromatografisiyle ayırımında; sabit faz seçimi, hareketli faz organik düzenleyici seçimi (metanol veya asetonitril), hareketli faz organik düzenleyici oranı (asetonitril oranı; % 20, 30, 50 (h/h)), iç standart seçimi ve hareketli faz akış hızı (0,9; 1,0; 1,1 ml/d) etkileri incelenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Saflık Kontrolü

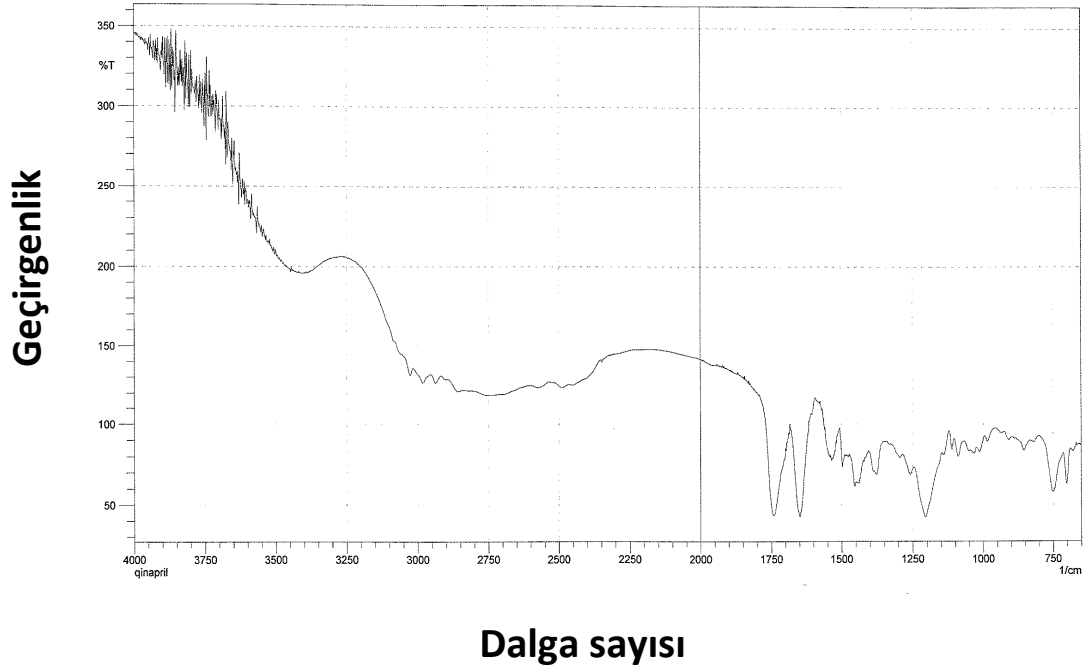
3.1.1. IR Spektroskopisi

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



Şekil 3.1. Hidroklorotiyazidin IR spektrumu

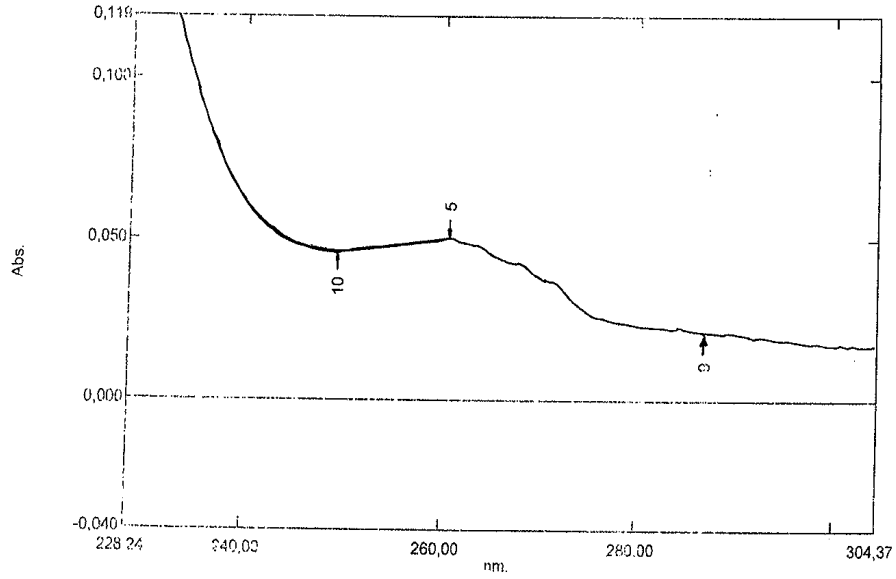
Kinapril IR spektrumu



Şekil 3.2.Kinaprilin IR spektrumu

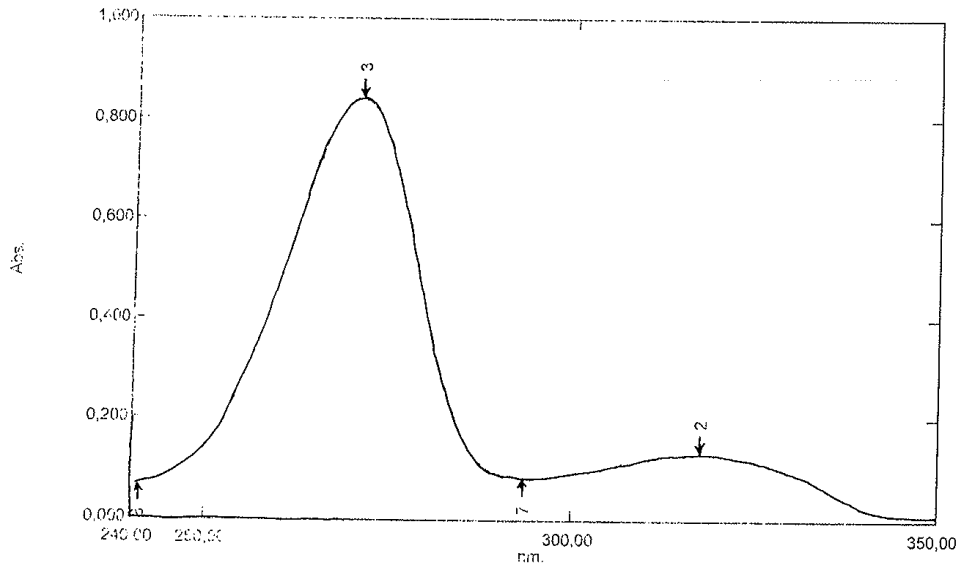
3.2. Kinapril ve Hidroklorotiazitin Dalga Boyu Taraması

Kinapril hareketli faz ile çözöldükdten ($20 \mu\text{g/ml}$) sonra spektrofotometre ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 196 nm olarak saptanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kinaprilin $20 \mu\text{g/ml}$ derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV/GB spektrumu

Hidroklorotiyazid hareketli faz ile çözüldükten (12,5 µg/ml) sonra spektrofotometre ile dalga boyu taraması yapılmış ve maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu 270 nm olarak saptanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hidroklorotiyazid 12,5 µg/ml derişiminde hazırlanan çözeltisinin UV/GB spektrumu

Kinapril ve hidroklorotiyazid YPSK yönteminde kullanılacak dalga boyunu seçmek için öncelikle her iki maddenin de dalga boyu taraması yapılmıştır ve dalga boyu 211 nm seçilmiştir.

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

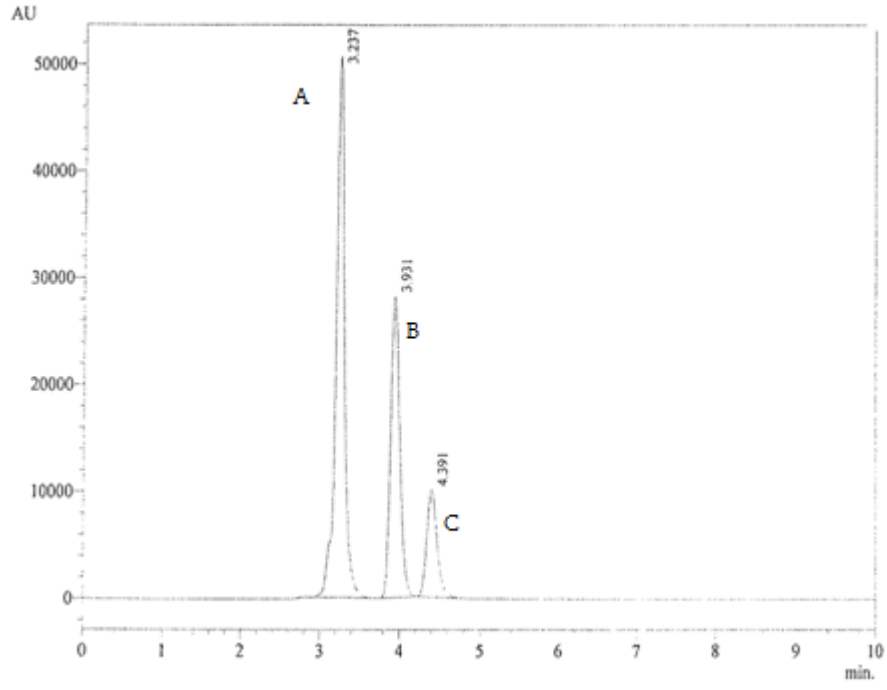
3.3.1. YPSK Sistemi Optimizasyonu

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

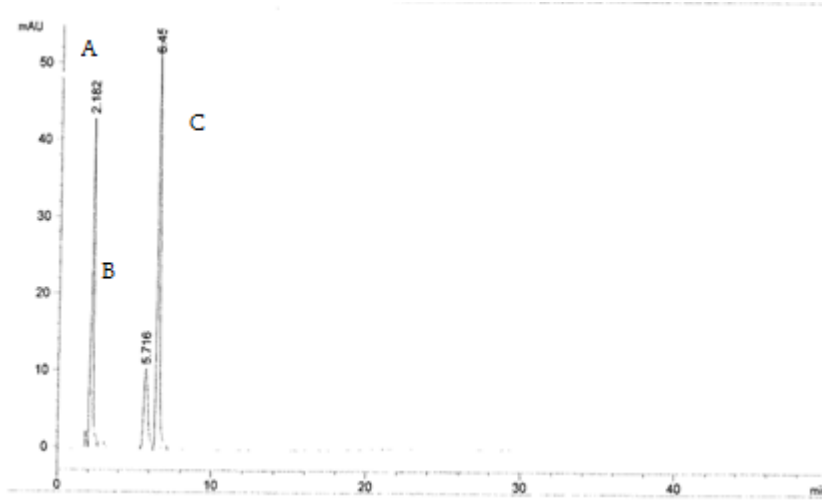
A. Sabit Faz Seçimi

Geliştirilen yöntemde YPSK ile analiz için iki farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Kolon seçimi sırasında hareketli faz tampon çözeltisi olarak potasyum dihidrojen fosfat (pH 2,5), hareketli faz organik düzenleyici olarak da asetonitril sırasıyla 60:40 (h/h) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, hareketli faz akış hızı 1,0 ml/d ve dalga boyu 211 nm şeklinde belirlenmiştir.

Kinapril ve hidroklorotiyazidin yukarıda verilen şartlarla Hichrom C18 10 mikron 250x4,6 mm kolonu kullanılarak elde edilen kromatogramı Şekil 3.5’de verilmiştir. Aynı şartlar kullanılarak Thermo MOS-2 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanılmıştır ve kromatogramlar kaydedilmiştir (Şekil 3.6)



Şekil 3.5. Hichrom C18 10 micron 250x4,6 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 20 µg/ml derişiminde Kinapril (C) ve 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A), 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)



Şekil 3.6. Thermo MOS-2 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanılarak yapılan analizin kromatogramı; 20 µg/ml derişiminde Kinaprıl (C) ve 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A), 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)

Her iki kromatogramda pik simetri oranları değerdendirilmiş, Hichrom C18 10 mikron 250x4,6 mm kolonu kullanıldığında kinaprılın pik simetri oranı 1,35 ; Thermo MOS-2 5 µm 4.6x250 mm kolonu kullanıldığında ise 2,95 bulunmuştur. Bu yüzden Hichrom C18 10 mikron 250x4,6 mm kolonu ayırma işleminde kullanılacak kolon olarak seçilmiştir.

B. Hareketli Fazın Belirlenmesi

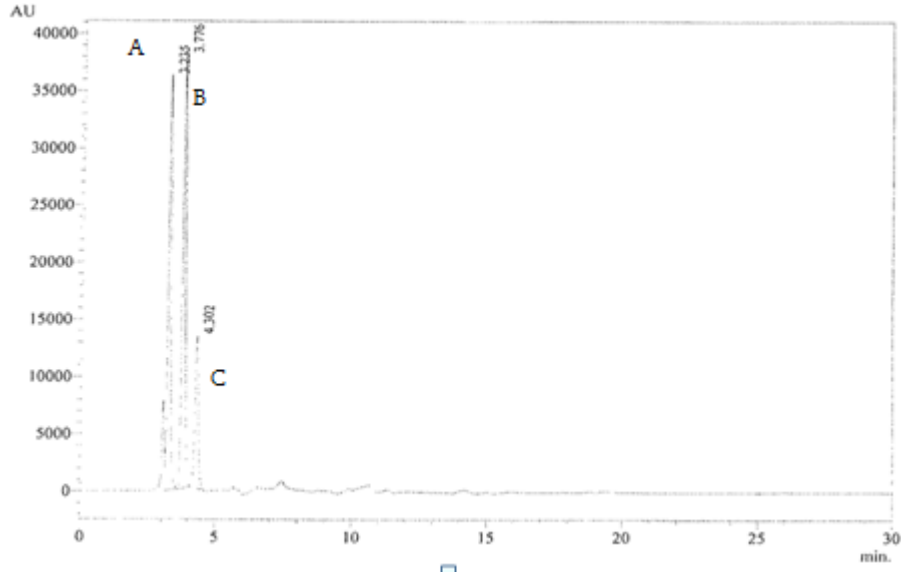
Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir

1. Organik Düzenleyici Türü ve Miktarının Belirlenmesi

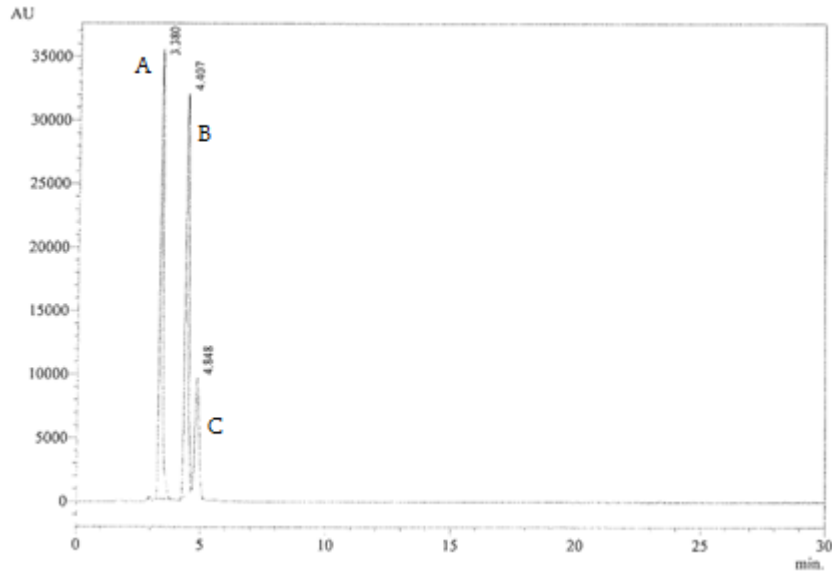
Organik düzenleyici seçimi için hareketli faz organik düzenleyicisi olarak asetonitrilin kinapril ve hidroklorotiazit analizine etkisi incelenmiştir.

Hareketli faza %20, % 30 ve %50 (hacimce) oranında asetonitril eklenmiş, % 20 asetonitril içeren hareketli faz ile alıkonma zamanı olarak 3,479'dakikada hidroklorotiyazid piki elde edilirken, aynı kromatografik koşullarda, %30 içeren hareketli faz ile 3,380 dak. da aynı şekilde %50 asetonitril içeren hareketli faz ile 3,235 dak. Da pik elde edilmiştir. Fakat kinapril piki bu oranları içeren hareketli fazlarda geç alıkonma zamanında gelmiştir. Akış hızı 1,1 ml/d'ya çıkarılıp hareketli faz oranı değiştirildiğinde ise hidroklorotiyazid 3,010 'dak.da gelmiştir. Çözücü pikleri, hidroklorotiyazid alıkonma zamanında gelebileceği için organik düzenleyici olarak asetonitril seçilmiştir. İyi bir ayırım için en uygun asetonitril oranının saptanması amacıyla hareketli faz çözücü içeriği hacimce % 20, %30, %40 ve %50 olacak şekilde değiştirilmiştir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, 0,067 mol/l, KH_2PO_4 (pH 2,5) içeren hareketli faz 1,0 ml/d akış hızında ve 25°C kolon sıcaklığında kullanılmıştır.

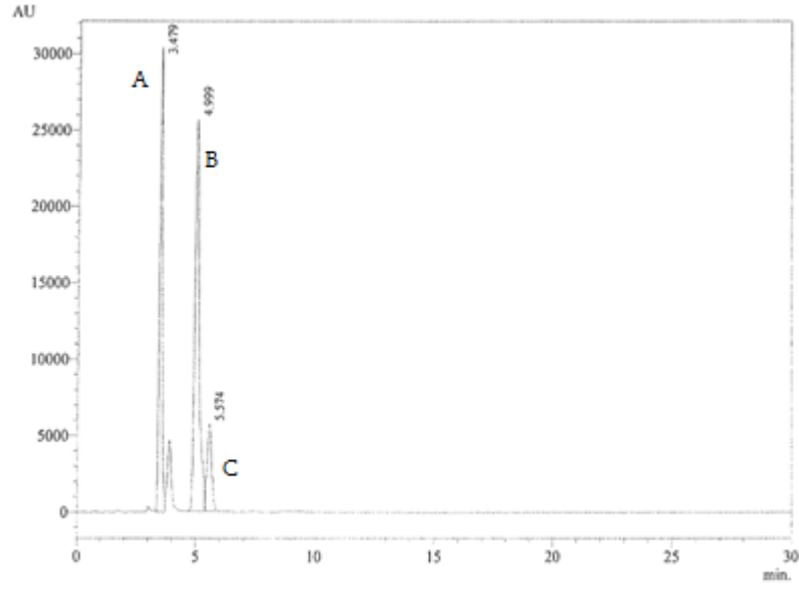
Hareketli fazın asetonitril miktarındaki değişimleri Şekil 3.7, Şekil 3.8 ,Şekil 3.9 ve şekil 3,10 daki kromatogramlarda gösterilmiştir. Analizin iyi bir ayırım ile daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi için, iç standart olarak seçilen perindopril pikinin de daha kısa alıkonma zamanında gelmesinden dolayı Şekil 3.10'daki asetonitril oranının % 40 (h/h) olduğu kromatogram seçilmiştir.



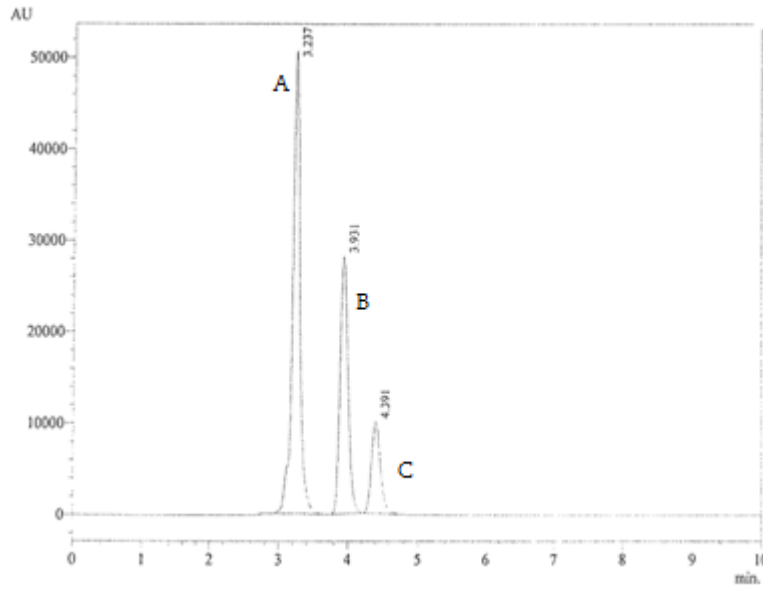
Şekil 3.7. Asetonitril oranının % 50 (h/h) olduğu kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinaprıl (C) , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)



Şekil 3.8. Asetonitril oranının % 30 (h/h) olduğu kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinaprıl (C) 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)



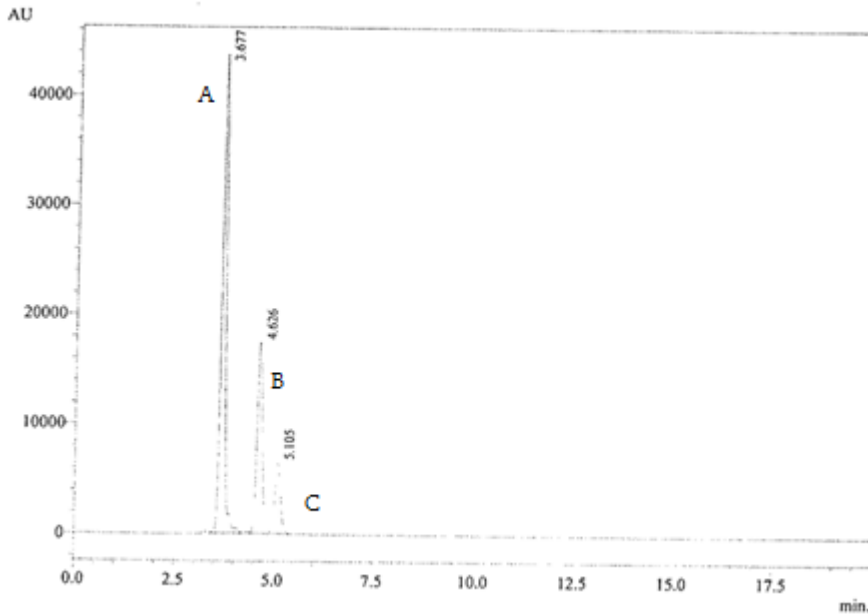
Şekil 3.9. Asetonitril oranının % 20 (h/h) olduğu kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinaprıl (C) , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)



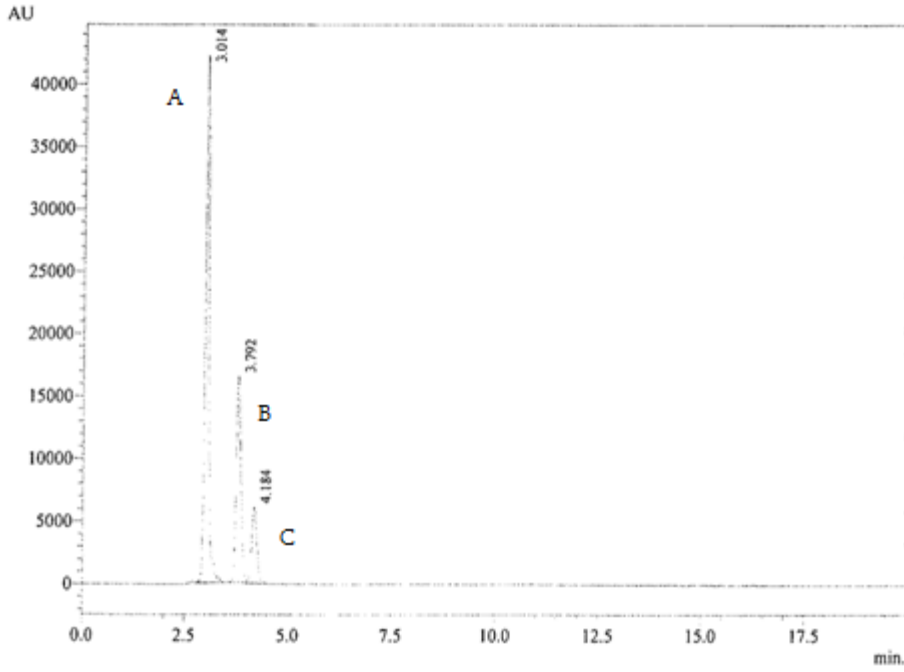
Şekil 3.10. Asetonitril oranının % 40 (hacimce) olduğu kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinaprıl (C) , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)

2. Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi

Kinapril ve hidroklorotiyazidin analizinde kullanılan hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, asetonitril ve KH_2PO_4 (pH 2,5) (40 :60 h/h) içeren hareketli faz, 25°C kolon sıcaklığında farklı akış hızlarında YPSK sistemine verilmiştir. Akış hızı 0,9 ; 1,0 ve 1,1 ml/d olarak değiştirilmiştir ve kromatogramlar Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de verilmiştir. Hareketli faz YPSK sistemine 1,0 ml/d akış hızı ile verildiğinde alıkonma sürelerinin uzun olduğu, 1,1 ml/d akış hızında verildiğinde ise hidroklorotiyazidin istenenden daha kısa sürede geldiği saptanmıştır. Bu şartlar dikkate alınarak optimum akış hızı 1,0 ml/d olarak seçilmiş ve asetonitril oranının değiştirilmesiyle uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir.



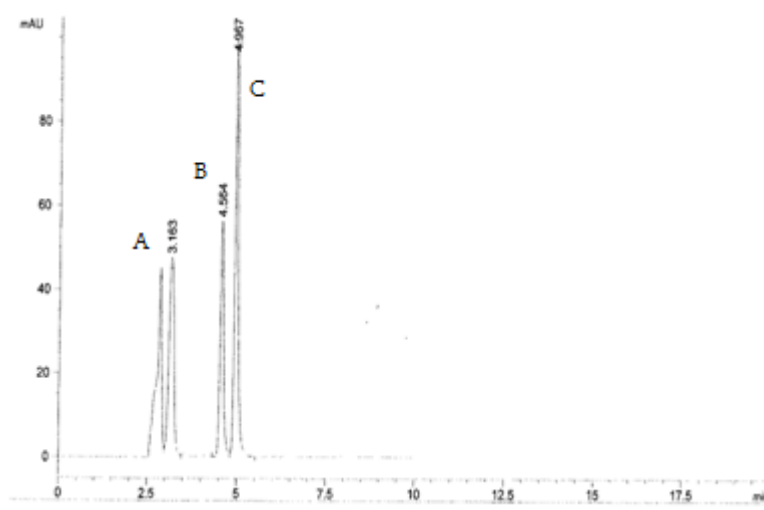
Şekil 3.11. Hareketli faz akış hızının 0.9 ml/d olduğu kromatogram ; 20µg/ml derişiminde Kinapril (C), 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)



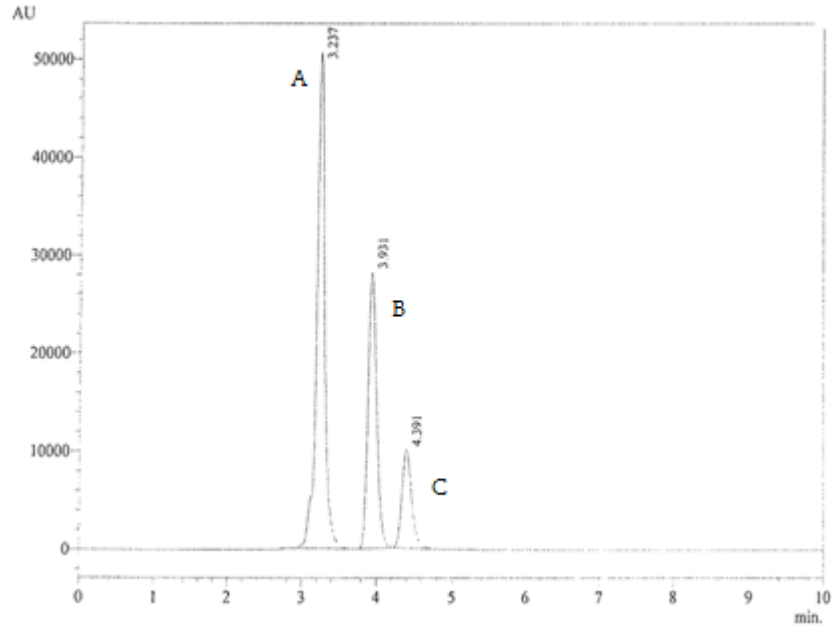
Şekil 3.12. Hareketli faz akış hızının 1,1 ml/d olduğu kromatogram ; 20µg/ml derişiminde Kinapril (C), 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)

C. İç Standartın Belirlenmesi

Kinapril ve hidroklorotiyazidin tayini sırasında kullanılacak iç standart seçimi için Enalapril, ramipril, ve perindopril denenmiştir. Enalapril ve perindoprilin; kinapril ve hidroklorotiyazidten ayırımı sağlanmıştır (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Pik simetri oranı, seçicilik ve analiz süresi göz önüne alınarak iç standart olarak perindopril seçilmiştir. Perindoprilin seçimi sırasında, asetonitril ve 0,067 mol/l KH_2PO_4 (40 :60 h/h ; pH 2,5 akış hızı 1,0 ml/d) içeren hareketli faz, 211 nm dalga boyu ve 25°C kolon sıcaklığı kullanılmıştır.



Şekil 3.13. İç standart olarak Enalapril kullanıldığı kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinapril (C), 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Enalapril (B)



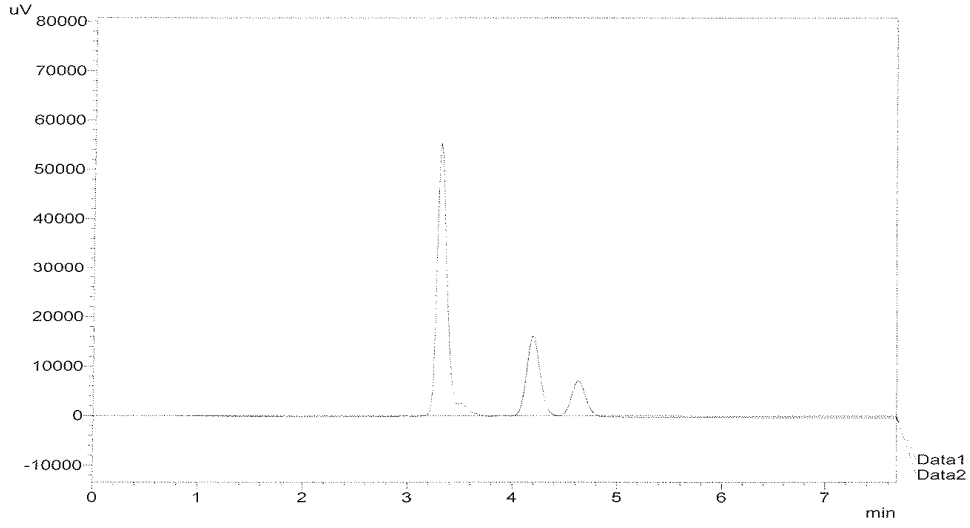
Şekil 3.14. İç standart olarak Perindoprilin kullanıldığı kromatogram ; 20 µg/ml derişiminde Kinapril (C) , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid (A) ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (B)

D. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları

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

Çizelge 3.1. Sistem Uygunluk Parametreleri

	Kinapril	Hidroklorotiazit
Kapasite Faktörü (k')	0,275	
Seçicilik (α)	0,250	0,195
Kolon Etkinliği (N)	5087	3942
Ayırıcılık (R)	4,14	
Pik Simetri Oranı (PSO)	1,10	1,12



Şekil 3.15. Sistem uygunluk parametrelerinin hesaplandığı kromatogram ; 20µg/ml derişiminde Kinapril, 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril (Data 1 :Mobil faz)

3.3.2. Kinapril ve Hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB Dedektör ile Analizi Yönteminin Validasyonu

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

Kinapril ve hidroklorotiyazidin YPSK ile analiz yönteminde Hichrom C18 (tanecik çapı ; 10 µm, 4.6x250 mm) kolon, 25°C kolon sıcaklığı ile asetonitril ve KH₂PO₄ (pH 2,5 ; 0,067 M), (40 :60, h/h) içeren hareketli faz (1,0 ml/d) kullanılmıştır.

UV/GB dedektörü ile kinapril ve hidroklorotiazit için ortak dalga boyu 211 nm olarak seçilmiştir. Bu koşullarda; kinapril, hidroklorotiyazid ve iç standart olarak seçilen perindopril alıkonma zamanları sırasıyla 3,338 ; 4,256 ve 4,696 dak.dır.

3.3.2.1. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) ve Duyarlılık

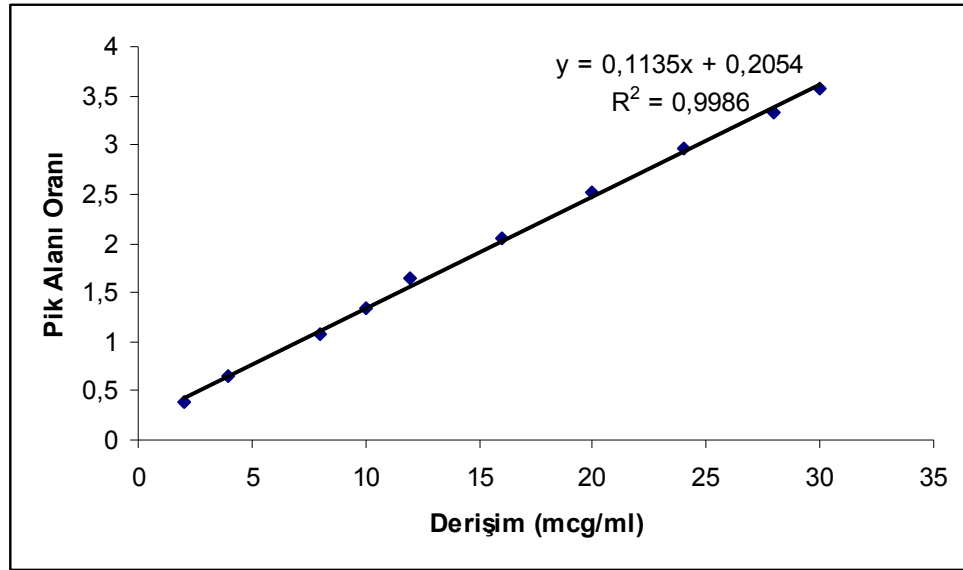
Kinapril ve hidroklorotiyazid'in YPSK ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve kalibrasyon eğrisinin saptanmasında kinapril için 2 µg/ml ile 30 µg/ml (Şekil 3.15), hidroklorotiyazid için ise 1,25 µg/ml ile 18,75 µg/ml (Şekil 3.16) aralığında farklı derişimlerde, çözölüp hareketli faz ile seyreltilerek çözeltileri hazırlanmış ve YPSK'ne enjekte edilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi, her bir derişim değeri için elde edilen kinapril ve hidroklorotiyazidin pik alanının (A_T , A_H) perindopril (iç standart) pik alanına (A_I) bölünerek elde edilen oranının, Kinapril ve Hidroklorotiyazidin derişimi değeri karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur.

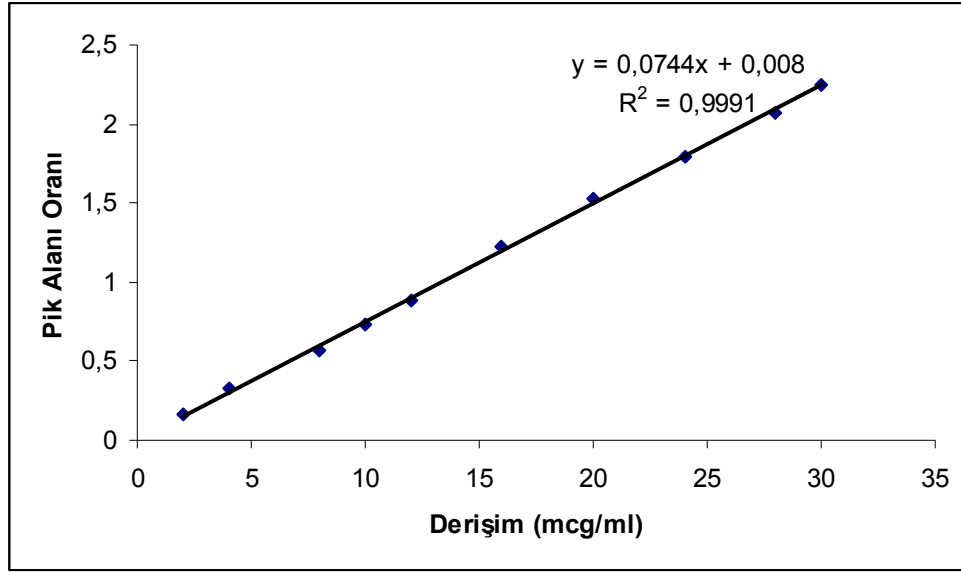
Geliştirilen YPSK yöntemi kinapril için 2 µg/ml ile 30 µg/ml hidroklorotiyazid için ise 1,25 µg/ml ile 18,75 µg/ml derişimleri arasında doğrusaldır.

Hidroklorotiyazid analizi için tanımlanan YPSK-UV/GB dedektör yönteminde doğrusal aralık eğri denklemi $y = 0,1135x + 0,2054$; $r^2 = 0,9986$ ve kinapril için ise $y = 0,0744x + 0,008$; $r^2 = 0,9991$ olarak saptanmıştır.

Kinapril ve hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yönteminde teşhis sınırı (LOD) kinapril için; 0,0195 µg/ml (S/N=2,6), hidroklorotiyazid için ise 0,003 µg/ml (S/N=3,2) ve tayin alt sınırı (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde (< %2) kinapril için; 0,078 µg/ml (Çizelge 3.2), hidroklorotiyazid için ise 0,012 µg/ml olarak saptanmıştır (Çizelge 3.3).



Şekil 3.16. Hidroklorotiyazidin analizi için kalibrasyon doğrusu



Şekil 3.17. Kinapril analizi için kalibrasyon doğrusu

Çizelge 3.2. Kinapril YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisi özellikleri (n=10)

Regresyon Denklemi*	$y = 0,0744x + 0,008$
Eğimin Standart Hatası	0,0005
Kesişimin Standart Hatası	0,0113
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9995
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9991
Kalibrasyon Aralığı ($\mu\text{g/ml}$)	2-30
Teşhis Sınırı ($\mu\text{g/ml}$)	0,0195
Tayin Alt Sınırı ($\mu\text{g/ml}$)	0,078

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

Çizelge 3.3. Hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisi özellikleri (n=10)

Regresyon Denklemi*	$y = 0,1135x + 0,2054$
Eğimin Standart Hatası	0,0001
Kesişimin Standart Hatası	0,0044
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9993
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9986
Kalibrasyon Aralığı ($\mu\text{g/ml}$)	1,25-18,75
Teşhis Sınırı ($\mu\text{g/ml}$)	0,003
Tayin Alt Sınırı ($\mu\text{g/ml}$)	0,012

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

3.3.2.2. Sentetik Karışım

Kinapril ve hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yönteminde iki etken maddenin birbirlerine olan etkilerini incelemek amacıyla birinin derişimi sabit tutulup, diğer etken maddenin derişimi değıştirilerek sentetik karışım yapılmıştır. Kinapril derişimi 20 µg/ml oranında sabit tutulmuş, hidroklorotiyazidin derişimi 1,25; 5,0; 6,25; 12,5 ve 18,75 µg/ml oranlarında değıştirilerek % geri kazanım çalışması yapılmıştır. Aynı işlem hidroklorotiyazidin derişimi 12,5 µg/ml oranında sabit tutularak, kinapril 2; 8; 16; 20 ve 30 µg/ml oranlarında değıştirilip uygulanmıştır (Çizelge 3.4).

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

	İlave Edilen Madde Miktarı (µg/ml)	Bulunan Madde Miktarı (µg/ml)	% Geri Kazanım
Kinapril	2,0	2,05	102,5
	8,0	8,10	101,25
	16,0	16,10	100,63
	20,0	20,29	101,46
	30,0	30,10	100,33
			X _{ort} : 100,23
			SS:1,22
			%BSS:1,21
			%BH:-0,23
Hidroklorotiazit	1,25	1,23	98,40
	5,0	5,05	101,0
	6,25	6,18	98,88
	12,5	12,45	99,60
	18,75	18,65	99,46
			X _{ort} : 99,47
			SS:0,88
			%BSS:0,88
			%BH:-0,53

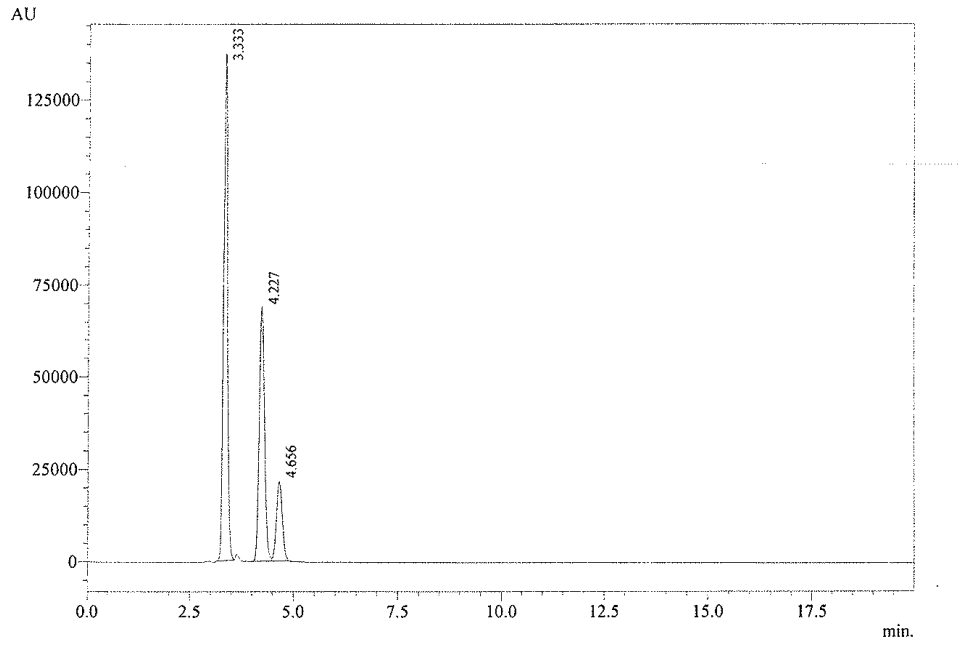
3.3.2.3. Dozaj Formlarına Uygulama ve Geri Kazanım

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

Kinapril ve hidroklorotiyazid içeren tabletlerden miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 2.4.5. anlatıldığı şekilde tablet çözletileri hazırlanmış ve saf kinapril ve hidroklorotiyazid içeren çözeltiler ile aynı anda analiz yapılmıştır. Bu eğrilerden okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde yerine konularak tabletlerin içerdiği kinapril ve hidroklorotiyazid miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan analiz sonuçları Çizelge 3.5'te, kromatogramı ise Şekil 3.18'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Kinapril ve hidroklorotiyazid içeren Accuzide (20+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait bulgular (n=5)

Numune No.	Tablette Bulunan Etken Madde Miktarı (mg)	
	Kinapril	Hidroklorotiyazid
1	20,10	12,40
2	20,05	12,35
3	19,80	12,50
4	19,90	12,40
5	20,25	12,66
X_{ort}	20,02	12,46
SS	0,16	0,15
%BSS	0,79	1,20
%BH	-0,1	-0,32



Şekil 3.18. Kinapril ve hidroklorotiyazid içeren Accuzide (20+12,5mg) tabletlerin YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait kromatogram; 20µg/ml derişiminde Kinapril , 12,5 µg/ml derişiminde Hidroklorotiyazid ve 20 µg/ml derişiminde Perindopril

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

Çizelge 3.6. Kinapril ve hidroklorotiyazid içeren Accuzide (20+12,5mg) tabletlerin

YPSK-UV/GB dedektörü ile analizi yöntemine ait % geri kazanım sonuçları (n=5)

	İlave Edilen Madde Miktarı (mg)	Bulunan Madde Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
Kinapril	20,00	20,10	100.50
	20,00	20,05	100,25
	20,00	19,80	99.00
	20,00	19,90	99.50
	20,00	20,25	101.25
			X _{ort} : 100.1
			SS:0,60
			%BSS:0,59
			%BH:-0,1
Hidroklorotiazit	12,50	12,40	99.20
	12,50	12,35	98.80
	12,50	12,50	100.00
	12,50	12,40	99.20
	12,50	12,66	101.3
			X _{ort} : 99,70
			SS:0,89
			%BSS:0,89
			%BH:-0,30

3.3.2.4. Doğruluk ve Kesinlik

Kinapril ve hidroklorotiyazidin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları; kinaprilin 2 µg/ml ve 30 µg/ml derişimlerinde, hidroklorotiyazidin ise 1,25 µg/ml ve 18,75 µg/ml derişimlerinde gerçekleştirilmiş, gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8’de verilmiştir.

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

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

Eklenen Kinapril miktarı (µg/ml)	Gün İçi	Günler Arası
	Kinapril alanı/iç standart alanı oranı	Kinapril alanı/iç standart alanı oranı
2	3,3152	3,3156
	3,3206	3,3200
	3,2001	3,2010
	3,1501	3,1515
	3,4054	3,4040
	3,1735	3,1740
X_{ort}	3,2608	3,2610
SS	0,092	0,091
%BSS	2,8213	2,7905
30	0,890	0,880
	0,880	0,885
	0,893	0,897
	0,891	0,890
	0,888	0,887
	0,893	0,895
X_{ort}	0,889	0,889
SS	0,0045	0,0058
%BSS	0,506	0,652

Çizelge 3.8. Hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB yöntemi ile analizi yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları

Eklenen Hidroklorotiazit miktarı (µg/ml)	Gün İçi	Günler Arası
	Hidroklorotiyazid alanı/iç standart alanı oranı	Hidroklorotiyazid alanı/iç standart alanı oranı
1,25	2,1829	2,1831
	2,0497	2,0496
	2,0259	2,0264
	2,1446	2,1440
	2,1588	2,1579
	2,1566	2,1576
$\bar{X}_{ort}$	2,1197	2,1198
SS	0,0059	0,0058
%BSS	0,278	0,273
18,75	0,400	0,395
	0,398	0,388
	0,388	0,397
	0,391	0,39
	0,393	0,395
	0,381	0,382
$\bar{X}_{ort}$	0,391	0,391
SS	0,0063	0,0051
%BSS	1,611	1,304

3.3.2.5. Cihaz Tekrarlanabilirliği

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

Çizelge 3.9. Kinaprilin YPSK-UV/GB yöntemi ile analizinde yöntemine cihaz tekrarlanabilirlik bulguları

Madde Miktarı (µg/ml)	Kinapril alanı/iç standart alanı oranı
20	2,9590
	2,8914
	2,9056
	2,9321
	2,9214
	2,9113
	X _{ort.} : 2,9203
	SS: 0,0022
	BSS: 0,075

Çizelge 3.10. Hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB yöntemi ile analizinde yönteminde cihaz tekrarlanabilirliği bulguları

Madde Miktarı (µg/ml)	Hidroklorotiyazid alanı/iç standart alanı oranı
12,5	2,0420
	2,0703
	2,0605
	2,0301
	2,0604
	2,0432
	X _{ort} : 2,0510
	SS: 0,0137
	BSS: 0,067

4. TARTIŞMA

Kinapril, non-sülfidril anjiyotensin dönüştürücü bir enzim inhibitörüdür. Diğer grup üyelerine göre daha uzun bir etkinlik süresi vardır. Bu ön ilaç, iki asitli aktif metabolitin karaciğerde desterifikasyon yapılmış şeklidir. Kinapril hipertansiyon tedavisi, konjestif kalp yetmezliği, post-miyokard infarktüsü ve diğer endikasyonlar için kullanılır. Hidroklorotiyazid ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazit grubu bir diüretiktir. Tiazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine kullanılırlar. Tiazit grubu diüretikler böbrek tubulus epitelyumundan sodyum iyon transportunu inhibe ederek sodyum, klor ve suyun atılımını artırır. Tez kapsamında Kinapril ve Hidroklorotiyazid'in YPSK yöntemi ile aynı anda analizleri için hızlı, duyarlı ve ekonomik bir analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmış ve gerekli optimizasyonlar ve yöntem geçerlik testleri yapılmaya çalışılmıştır.

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

Kinapril ve hidroklorotiyazidin YPSK yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, kinapril ve hidroklorotiyazidin kromatografik davranışları öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Analiz sırasında oluşabilecek hataları önlemek için iç standart seçimi yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemde YPSK ile analiz için iki farklı sabit faz (kolon) denenmiştir.

Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir. Organik düzenleyici seçimi için hareketli faz organik düzenleyicisi olarak asetonitrilin kinapril ve hidroklorotiyazid analizine etkisi incelenmiştir. % 40 (h/h) oranında asetonitril içeren hareketli faz ile 3.237 d. da hidroklorotiyazid piki elde edilmiştir.

Akış hızı 1.1 ml/dk'ya çıkarılıp hareketli faz oranı değiştirildiğinde ise hidroklorotiyazid 3.014 dakikada gelmiştir. Çözücü pikleri, hidroklorotiyazidin alıkonma zamanında gelebileceği ve pikin içerisine karışabileceği için organik düzenleyici olarak asetonitril seçilmiştir. Elde edilen sonuçlardan organik düzenleyici olarak asetonitrilin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

İyi bir ayırım için en uygun asetonitril oranının saptanması amacıyla hareketli faz çözücü içeriği % 40' a (h/h) ilave olarak % 20, %30 ve %50 (h/h) olacak şekilde değiştirilmiştir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, 0.067 mol/L, KH_2PO_4 (pH 2,5) içeren hareketli faz (1,0 ml/d) 25°C kolon sıcaklığında kullanılmıştır. Hareketli fazın asetonitril miktarındaki değişimler, Şekil 3.7, Şekil 3.8 Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'de verilmiştir. Analizin iyi bir ayırım gerçekleştirilebilmesi için, iç standart olarak seçilen perindopril pikinin de daha kısa alıkonma zamanında gelmesinden dolayı Şekil 3.10'daki asetonitril oranının % 40 (h/h) olduğu hareketli faz çalışma ortamı olarak seçilmiştir.

Kolon seçimi sırasında hareketli faz tampon çözeltisi olarak potasyum dihidrojen fosfat (pH 2,5) ve hareketli faz organik düzenleyici olarak da asetonitril, 60:40 (h/h) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, hareketli faz akış hızı 1,0 ml/d ve her iki maddenin analizi için dalga boyu 211 nm şeklinde belirlenmiştir.

Kinapril ve hidroklorotiyazidin tayini için yukarıda verilen şartlarla Hichrom C18 10 μm 4.6x250 mm kolonu ve Thermo MOS-2 5 μm 4.6x250 mm kolonu kullanılmıştır.

Her iki kromatogramda pik simetri oranları değerlendirilmiş, Hichrom C18 10 μ m 4.6x250 kolonu kullanıldığında kinaprilin pik simetri oranı 1,35; Thermo MOS-2 5 μ m 4.6x250 kolonu kullanıldığında ise 2,95 olarak saptanmıştır.

Bu yüzden Hichrom C18 10 μ m 4.6x250 mm kolonu, ayırma işleminde kullanılacak kolon olarak seçilmiştir.

Kinapril ve hidroklorotiyazidin analizinde kullanılan hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, asetonitril ve 0,067 mol/L KH_2PO_4 (40 :60 h/h ; pH 2,5) içeren hareketli faz, 25°C kolon sıcaklığında farklı akış hızlarında YPSK sistemine verilmiştir. Akış hızı 0,9; 1,0 ve 1,1 ml/d olarak değiştirilmiştir ve kromatogramlar Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de verilmiştir. Hareketli faz YPSK sistemine 0,9 ml/d akış hızı ile verildiğinde alıkonma sürelerinin uzun olduğu; 1,1 ml/d akış hızında verildiğinde ise hidroklorotiyazidin istenenden daha kısa sürede geldiği saptanmıştır. Bu şartlar dikkate alınarak optimum akış hızı 1,0 ml/d olarak seçilmiş ve asetonitril oranının değiştirilmesiyle uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir.

Kinapril ve hidroklorotiyazidin analizi sırasında kullanılacak iç standart seçimi için enalapril, ramipril ve perindopril denenmiştir. Perindopril ve enalaprilin, kinapril ve hidroklorotiyazid den ayırımı sağlanmıştır (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Pik simetri oranı, seçicilik ve analiz süresi göz önüne alınarak iç standart olarak perindopril seçilmiştir. Perindopril seçimi sırasında, asetonitril ve 0,067 mol/L KH_2PO_4 (40 :60 h/h ; pH 2,5 akış hızı 1,0 ml/d) içeren hareketli faz, 211 nm dalga boyu ve 25°C kolon sıcaklığı kullanılmıştır.

Sonuç olarak Kinapril ve Hidroklorotiyazid’in YPSK ile analiz yönteminde Hichrom C18 (tanecik çapı ; 10 μ m, 4.6x250 mm) kolon, 25°C kolon sıcaklığı ile asetonitril ve KH_2PO_4 (pH 2,5; 0,067 mol/l), (40:60 h/h) içeren hareketli faz; 1,0 ml/d akış hızında kullanılmıştır. UV/GB dedektörü ile Kinapril ve Hidroklorotiyazid için ortak dalga boyu 211 nm olarak seçilmiştir.

Bu koşullarda; kinapril, hidroklorotiyazid ve iç standart olarak seçilen perindopril alikonma zamanları sırasıyla 4,391; 3,237 ve 3,931 d. olarak saptanmış ve analizlere bu şartlarda devam edilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonuna geçmeden önce sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında (izelge 3.1) yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur.

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

Bu parametrelerden doğrusallık için kinapril ve hidroklorotiyazidin YPSK ile analizi yönteminde kinapril için 2-30 µg/mL (şekil 3.16), hidroklorotiyazid için ise 1,25-18,75 µg/ml (şekil 3.17) aralığında doğrusallık elde edilmiştir.

Kalibrasyon doğrusu, her bir derişim değeri için elde edilen kinapril ve hidroklorotiyazidin pik alanının (A_T , A_H) perindopril (iç standart) pik alanına (A_I) oranının, kinapril veya hidroklorotiyazid derişimi değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Kinapril analizi için tanımlanan YPSK-UV/GB yönteminde doğrusal aralık doğru denklemi $y=0,0744x+0,008$; $r^2=0,9991$ ve hidroklorotiyazid için ise $y=0,1135x+0,2054$; $r^2=0,9986$ olarak saptanmıştır.

Kinapril ve hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB analizinde teşhis sınırı (LOD) kinapril için; 0,00195 µg/ml (S/N=10,8), hidroklorotiyazid için ise 0,003 µg/ml (S/N=3,2) ve tayin alt sınırı (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde (< %2) kinapril için; 0,078 µg/ml (izelge 3.1), hidroklorotiyazid için ise 0,012 µg/ml olarak saptanmıştır (izelge 3.2).

Kinapril ve hidroklorotiyazidin YPSK-UV/GB dedektör ile analizi yönteminde iki etken maddenin birbirlerine olan etkilerini incelemek amacıyla birinin derişimi sabit tutulup, diğerk etken maddenin derişimi değıştirilerek sentetik karışım yapılmıştır. Kinapril 20 µg/ml derişiminde sabit tutulmuş, hidroklorotiyazidin 1,25, 5,0, 6,25 12,5, 18,75 µg/ml derişimlerinde % geri kazanım çalışması yapılmıştır. Aynı işlem hidroklorotiyazidin derişimi 12,5 µg/ml de sabit tutularak, kinapril 2; 8; 16; 20 ve 30 µg/ml derişimlerinde uygulanmıştır (Çizelge 3.4).

Kinapril ve hidroklorotiyazid tayini için geliştirilen YPSK-UV/GB yönteminin piyasa preparatlarına uygunlanabilirliğı ve tablet katkı maddelerinin yöntemle bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır. Bunun için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

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

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

Kinapril ve hidroklorotiyazidin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları; kinaprilin 2 µg/ml ve 30 µg/ml derişimlerinde, hidroklorotiyazidin ise 1,25 µg/ml ve 18,75 µg/ml derişimlerinde gerçekleştirilmiş, gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8’de verilmiştir. Gün içi çalışmaları iki farklı derişim düzeyinde ve altı bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise iki farklı derişim düzeyinde altı bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır. Kullanılan YPSK-UV/GB dedektör sisteminin de tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için doğrusal aralık içerisindeki bir analiz derişiminde hazırlanan standart kinapril ve hidroklorotiyazid çözeltisinin aynı gün içerisinde 6 tekrarlı analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10’da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlardan da yöntemimizin yeterli kesinlik ve doğruluk parametrelerini sağladığı görülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada non-sülfidril anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü olan Kinapril ve tiazit grubu diüretik ilaçlardan olan Hidroklorotiazit için en uygun sabit (kolon) ve hareketli faz kompozisyonu (hareketli faz organik düzenleyicisi maddesinin seçimi) ve akış hızının etkisini saptayabilmek için; pH'ın, organik çözücü cinsinin ve oranının, sabit fazın cinsinin (fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü) etkileri detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Analiz sırasında oluşabilecek hataları önlemek için uygun bir iç standart seçimi yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemde YPSK yöntemi ile analiz için iki farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan organik düzenleyici olarak asetonitrilin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Analizin iyi bir ayırım ile daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi için, iç standart olarak seçilen perindopril pikinin de daha kısa alıkonma zamanında gelmesinden dolayı asetonitril oranının % 40 (h/h) olduğu hareketli faz çalışma ortamı olarak seçilmiştir.

Sonuç olarak Kinapril ve Hidroklorotiazitin YPSK ile analiz yönteminde Hichrom C18 (tanecik çapı ; 10 μ m, 4.6x250 mm) kolonu, 25°C kolon sıcaklığı ile asetonitril ve KH₂PO₄ (pH 2,5; 0,067 mol/l), (40 :60, h/h) içeren hareketli faz; 1,0 ml/dk akış hızı ve UV/GB dedektörü ile kinapril ve hidroklorotiazit için ortak dalga boyu 211 nm olarak seçilmiştir. Bu koşullarda ; kinapril, hidroklorotiazit ve iç standart olarak seçilen perindopril alıkonma zamanları sırasıyla 4,391 d; 3,237 d. ve 3.931 d. olarak saptanmıştır.

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur.

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

Bu parametrelerden doğrusallık için kinapril ve hidroklorotiazitin YPSK ile analiz yönteminde telmisartan için 2-30 µg/mL, hidroklorotiazit için ise 1,25-18,75 µg/ml aralığında doğrusallık saptanmıştır. Kinapril analizi için tanımlanan YPSK-UV/GB yönteminde doğrusal aralık doğru denklemi $y=0,0744x+0,008$; $r^2=0,9991$ ve hidroklorotiazit için ise $y= 0,1135x+0,2054$; $r^2=0,9986$ olarak saptanmıştır. Geliştirilen ve yöntem geçerlilik hesaplamaları yapılmış olan yöntem kinapril ve hidroklorotiazit etken maddelerini aynı anda içeren farmasötik dozaj formuna uygulanmış ve her iki maddenin de aynı anda analizinde kullanılabileceği görülmüştür. Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tablet katkı maddelerinin analizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

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

ÖZET**Kinapril HCl Ve Hidroklorotiazidi Birlikte İçeren Kombine Farmasötik Preparatlardan Bu Maddelerin Aynı Anda Analizi İçin Yeni Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi**

Kinapril ve Hidroklorotiazit'in aynı anda analizi için bir YPSK-UV yöntemi sunulmuştur. Bu yöntemde; bir ters-faz kolonu (Hichrom C18; 10 µm, 4.6x250 mm iç çap) 1,0 ml/d akış hızındaki asetronitril: KH₂PO₄ tampon (pH 2,5; 0,067 mol/l) (40 : 60 ; h/h) karışımından oluşan bir hareketli faz, 211 nm dalga boyunda iki bileşiğin ayrılması için kullanılmıştır. Kromatografik ayırım 25°C'de yapılmıştır. İç standart olarak perindopril seçilmiştir. Geliştirilen yöntem kısa bir süre içerisinde kinapril, hidroklorotiazit ve iç standardın iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Bu şartlar kullanılarak, kinapril için 4,391 d; Hidroklorotiazit için 3,237 d ve perindopril için 3,931 d alıkonma zamanı elde edilmiştir. Taze hazırlanmış standart çözelti kromatogramında validasyon prosedürünün bir parçası olan ayırma, seçicilik, asimetri ve kapasite faktörü gibi çeşitli parametreleri kontrol etmek için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Geliştirilen yöntem tamamen valide edilmiştir. Kinapril için 2-30 µg/ml ve hidroklorotiazit için 1,25-18,75 µg/ml derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini ve uygulanabilirliğini göstermek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Yüksek orandaki geri kazanım; yöntemin, ilaçların formülasyonunda kullanılan katkı maddelerinden ve yardımcı maddelerden etkilenmediğini göstermektedir.

Hammaddede ve farmasötik formülasyonlarda kinapril ve hidroklorotiazitin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan yöntem hızlı, basit, yüksek kesinlik ve doğruluktadır. Geliştirilen bu yöntem, ekonomiktir ve zaman kazandırdığı için, kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Kinapril, Hidroklorotiazit, Analiz, YPSK, Dozaj Form, Validasyon

SUMMARY

Development of a New Chromatographic Method For Simultaneous Determination of Quinapril HCl And Hydrochlorothiazide In Combination Pharmaceutical Forms

An HPLC-UV method is presented for the simultaneous determination of Quinapril and Hydrochlorothiazide. In this method; a reversed-phase column (Hichrom ; 10 μm , 4.6x250 mm I.D.) with a mobile phase of acetonitril: KH_2PO_4 buffer (pH 2,5 ; 0,067 mol/l) (40 : 60 ; v/v) at 1,0 ml/min flow rate was used to separate both compounds with a detection of 211 nm. The chromatographic separation was performed at 25 °C. Perindopril was chosen as internal standard because it showed a shorter retention time with better peak shapes and better resolution, compared to other potential internal standards. The proposed HPLC method gives a good resolution between Quinapril, Hydrochlorothiazide and internal standard within a short analysis time. Using these conditions, the retention times were obtained as 4,391 min for Quinapril, 3,237 min for Hydrochlorothiazide and 3,931 min for Perindopril (IS).

System suitability tests were carried out on the chromatogram of freshly prepared standard solutions to check various parameters such as resolution, selectivity, asymmetry and capacity factors as a part of validation procedure. The proposed methods have been extensively validated. Linearity was obtained in the concentration range of 2-30 $\mu\text{g/mL}$ for Quinapril and 1,25-18,75 $\mu\text{g/ml}$ for Hydrochlorothiazide. In order to demonstrate the validity and applicability of the proposed HPLC method, recovery tests were carried. High percentage recovery shows that the method is free from the interferences of the commonly used excipients and additives in the formulations of drugs.

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

Key Words: Quinapril, Hydrochlorothiazide, Determination, HPLC, Dosage Form, Validation.

KAYNAKLAR

ADAMOVICS, J.A.(1997). *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*, Marcel Dekker, New York,

AHUYA, S. SCYPINSKI, S. (2001). *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, New York.

ALAN R. KUGLER, STEPHEN C. OLSON, DAVID E. SMITH (1995).Determination of quinapril and quinaprilat by high-performance liquid chromatography with radiochemical detection, coupled to liquid scintillation counting spectrometry *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 666, Issue 2, Pages 360-367

ALDERMAN MH, MADHAVAN S, OOI WL, COHEN H, SEALEYJE, LARAGH JH.(1991). Association of the renin-sodium profilewith the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1991, **324**:1098-1104.

AMBROSIONI.E (2007). Defining the role of zofenopril in the management of hypertension and ischemic heart disorders". *Am J Cardiovasc Drugs* **7 (1)**: 17–24.

ANNA G., HANNA H. (1999). High-performance liquid chromatographic assay of quinapril in tablets *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, Volume 73, Issue 4, Pages 183-185

AREND, U., ALBRECHT, S., MEISEL, E., SCHMIDT, J.(2002). Influence of ACE inhibitor spirapril on left ventricular hypertrophy. *Forstch Med. Orig.***120(4)**, 147–150.

ASAN, A.(1999). Alifatik diaminlerin ve suda çözünen yaygın fenollerin yüksek basınç sıvı kromatografisi ile ayırımı ve UV-Görünür spektrofotometrik tayinleri, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

ATKINSON AB, ROBERTSON JIS. (1979). Captopril in the treatment of hypertension and cardiac failure. *Lancet*; **2(8147)**:836–9.

ATTOUB S, GABEN AM, AL-SALAM S. (2008). "Captopril as a potential inhibitor of lung tumor growth and metastasis". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1138**: 65–72.

AZUYAMA C.T. (1990). Sensitive liquid chromatographic method for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Chromatogr.* **532**: 168-174

BEBAWY, L.I., EL KOUSY, N. (1997). Stability-indicating method for the determination of hydrochlorothiazide, benzydamine hydrochloride and clonazepam in the presence of their degradation products. *Anal. Lett.* **30(7)**: 1379-1397

BELAL, F., RIZK, M., IBRAHIEM, F., EL-DIN, M.S. (1986). Spectrophotometric determination of benzothiadiazines in dosage forms. *Talanta*. **33(2)**: 170-172.

BRAGGIO,S. BARNABY,R.J. GROSSI,P., CUGOLA,M. (1996). A strategy for validation of bioanalytical methods. *J.Pharm. Biomed. Anal.***14**.375-388.

BROWN, N., VAUGHAN, D. (1998). Cardiovascular drugs: angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*, **97**, 1411–142

BURNIER M, BRUNNER HR. (2000). Angiotensin II receptor antagonists. *The Lancet* 2000, **355**:637- 643.

CARLUCCI, G, DI GIUSEPPE, E., MAZZEO, P. (1993). Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* **93**: 245-248.

CH. ABBARA, G. AYMARD, S. HINH, B. DIQUET (2002). Simultaneous determination of quinapril and its active metabolite quinaprilat in human plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Volume 766, Issue 2, 25 Pages 199-207

CSIKOS T, CHUNG O, UNGER T. (1998)Receptors and their classification: Focus on angiotensin II and the AT2 receptor. *JHum Hypertens* 1998, **12**:311-318.

DAVID V. McCALLEY (2007). A study of retention and overloading of basic compounds with mixed-mode reversed-phase/cation-exchange columns in high performance liquid chromatography *Journal of Chromatography A*, Volume 1138, Issues 1-2, 5 , Pages 65-72

DE CROO, F. VAN DEN BOSSCHE, W., DE MOERLOOSE, P. (1985). Simultaneous quantitative determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*. **20(8)**: 477-481

DOMINGO, E.B., HERNANDEZ, M.J.M., RAMOS, G.R., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C. (1992). High-performance liquid chromatographic determination of diuretics in urine by micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **582**: 189-194

DUPLAY, D.(2007). *Physicians Desk Reference* (PDR), 61st Ed., Published by Thomson Medical Economics Company Inc., Electronic Verison, Montvale, N.

D.BONEZZI, R.GOTTI, V.ANDRISANO, V.CAVRINI (1997). Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage form by derivate UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC)

ERMER, J. (2001). Validation in pharmaceutical analysis. Part 1: An intergrated approach. *J.Pharm. Biomed. Anal.***24**,755-767

E.PANDER(1999). Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by second-order derivative spectrophotometry *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 21, Issue 2, 1 Pages 257-265

FETT, J.J., HISCHAK, F., CLINE LOVE, L.J. (1991). Mobile phase versu stationary phase approaches to the direct injection of biological fluids in liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **5**: 14-18.

HANSSON L, LINDHOLM LH, EKBOM T (1999). Randomisedtrial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: cardiovascular mortality and morbidity the SwedishTrial in Old Patients with Hypertension-2 Study. *Lancet* 1999, **354**:1751-1756.

HITSCHERICH, M.E. RYDBERG, E.M., TSILIFONIS, D.C., DALY, R.E. (1987). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **10(5)**: 1011-1021.

HITTI, MIRANDA; CHANG, LOUISE (2006). "Drug May Treat Advanced Kidney Disease

HOU F, ZHANG X, ZHANG G, XIE D, CHEN P, ZHANG W, JIANG J, LIANG M, WANG G, LIU Z, GENG R (2006). "Efficacy and safety of benazepril for advanced chronic renal insufficiency". *N Engl J Med* **354 (2)**: 131–40

HUTCHISON, T.A., SHAHAN, D.R., (2003). Hutchison, T.A., Shahan, D.R. (Ed.), *DRUGDEXW System*, Edition Electronic Version. , MICROMEDEX, Greenwood Village, CO.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (1994). *Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures for Pharmaceuticals*; Availability, Fed.Reg. **59**, 9750

JACKSON, E. GARRISON, J.C.(2002).Renin and Angiotensin. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Gilman, A.G.(Ed.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Edition 10*, pp. **31.755–785**,McGraw-Hill, New York, NY.

JOSE ANGEL PRIETO, ROSA M. JIMENEZ ROSA M. ALONSO (2003). Square wave voltammetric determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations *Il Farmaco*, Volume 58, Issue 5, Pages 343-350

KARIM, K. J, JIN, JI-YE, TAKEUCHI, T. (2003). Simultaneous separation of inorganic anions and cations by using anion-exchange and cation-exchange columns connected in tandem in ion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 995,

KNUT I., WEN J. , GERD F., YOHENNES G., (2006) Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode *Journal of Chromatography A, Volume 1127, Issues 1-2, 15, Pages 82-91*

LEWIS, A. C. (2005). Chromatographic Techniques, *Encyclopedia of Life Science*, 1-7.

LUNTE, S.M. RADZIK, D.M.(1996). Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis, *Elsevier Science Ltd*, New York.

MAGRI, A.L. BALESTRIERI, F, MAGRI, A.D. MARINI, D. (1995). Determination of fosinopril in pharmaceutical formulations containing hydrochlorothiazide by multiwavelength UV spectrophotometry. *Talanta*. **42**: 1719-1723.

MALLION JM (2007). "An evaluation of the initial and long-term antihypertensive efficacy of zofenopril compared with enalapril in mild to moderate hypertension". *Blood Press Suppl 2*: 13–8

McDOWALL, R.D. (1999). The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. *Anal. Chim. Acta*, **391**:149-158.

NILSSON P (2007). "Antihypertensive efficacy of zofenopril compared with atenolol in patients with mild to moderate hypertension". *Blood Press Suppl 2*: 25–30.

NOBUHARU G., TAEKO K., KIYOTERU I. (1992). Trace analysis of quinapril and its active metabolite, quinaprilat, in human plasma and urine by gas chromatography—negative-ion chemical ionization mass spectrometry *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 578, Issue 2, Pages 195-201

NOBUHARU G., TAKESHI S. , MINORU S. , KIYOTERU I. (1992). Determination of dioxopiperazine metabolites of quinapril in biological fluids by gas chromatography—massspectrometry *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 578, Issue 2, Pages 203-206

O'NEIL, M.J. (Senior Ed.) (2001). *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 13th Ed., Merck&Co., Inc., New Jersey.

OPIE LH.(1992). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors: *ScientificBasis for Clinical Use. Authors' Publishing House*, New York, USA, pp: 149-193.

PAPADOYANNIS, I.N., SAMANIDOU, V.F. (2004). Validation of instrumentation. *J.Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* **27**.753-783

PAPADOYANNIS, I.N., SAMANIDOU, V.F, GEORGA, K.A., GEORGARAKIS, E. (1998). High pressure liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide (HCT) in pharmaceutical preparations and human serum after solid phase extraction. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **21(11)**: 1671-1683

RILEY, C.M., ROSANSKE, T.W., (1996). Development and Validation of Methods. *Elsevier Science Ltd.*, New York.

R. GOTTIA, V. ANDRISANO a, V. CAVRINI a, C. BERTUCCI b, S. FURLANETTO (1999). Analysis of ACE – inhibitors by CE using alkylsulfonic additives

RXMEDIAPHARMA (2008). *İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Prof.Dr. Levent Üstünes, (Ed.), 2008, Gemaş Yayıncılık.*

SAGAR. A. PAREKH, ASHUTOSH PUDAGE, SANTOSH S. JOSHI, VIKAS V. VAIDYA, NOEL A. GOMES, SUDHIR S. KAMAT (2008). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide quinapril and quinaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SALEM, H., EL-MAAMLI, M., EL-SADEK, M., KHEIR, A.A. (1991). U.V. and U.V. derivative spectrophotometric determination of two-component mixtures. *Spectr. Letters.* **24(3)**: 451-470.

SATANA, E., ALTINAY, S., GÖGER, N.G, OZKAN, S.A., SENTURK, Z. (2001). Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25(5–6)**: 1009–1013.

- SHABIR, G.A. (2003) Validation high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J.Chromatogr.A.*, **987**:57-66.
- SHAIKH, B. RUMMEL, N. (1998). Liquid chromatographic determination of chlorothiazide and hydrochlorothiazide diuretic drugs in bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 1039-1043.
- SCHMIDT, J. , KRAUL, H. (1999). Clinical experience with spirapril in human hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34**(suppl 1), 25–30.
- SCHURER, M., ERB, K., JUNGE, K., SCHAFER, H., SCHULZ H., AMSCHLER, S., KRUUP, S., HERMAN, R., (2003). Druginteraction of spirapril hydrochloride monohdrate and hydrochlorothiazide. *Arzneimittelforschung*, **53**(6):414–419.
- SKOOG, D.A., NIEMAN, T. A., Holler, F. J. (1998). Harcourt Brace and Company, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, 674-677 s
- S. HILLAERT, K. DE GRAUWE, W. VAN DEN BOSSCHE (2001). Simultaneous determination and several inhibitors of angiotensin converting enzyme by capillary electrophoresis
- S. HILLAERT, W. VAN DEN BOSSCHE (2000). The quantitative determination of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme by CE
- SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L.(1999). *Practical HPLC Method Development, 2nd Ed.*, John Wiley and Sons Inc., New York,
- SMITH CG, VANE JR (2003). "The discovery of captopril". *FASEB J.* **17** (8): 788–9.
- STEWART, J.T., CLARK, S.S. (1986). Liquid chromatographic determination of guanethidine salts and hydrochlorothiazide using electrochemical detection and ion-pair techniques. *J. Pharm. Sci.* **75**(4): 413-415.
- SWARTZ, M.E., KRULL, I.S., (1997). Analytical method development and validation, Marcel Dekker, New York
- SWEETMAN S.C. (2007). Martindale, *The Complete Drug Reference*, 35th Ed. Pharmaceutical Press, London
- TATSUNARI YOSHIDA (2004). Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Volume 60, Issue 3, **30**: Pages 265-28

THE CAPPP (1990) Group. The Captopril Prevention Project: aprospective intervention trial of angiotensin enzyme inhibition the treatment of hypertension. *J Hypertens* 1990,**8**:985-990

TOHRU IKEGAMI, KOUKI TOMOMATSU, HIROTAKA TAKUBO, KANTA HORIE, NOBUO TANAKA (2008). Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography *Journal of Chromatography A, Volume 1184, Issues 1-2, 14 Pages 474-503*

YONG GUO (2005). Sheetal Gaiki Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography *Journal of Chromatography A, Volume 1074, Issues 1-2, 13, Pages 71-80*

VAUGHAN ED (1972) Jr. Renin, angiotensin and aldosterone systemin pathogenesis and management of hypertensivevascular disease. *Am J Med* **52**: 633-652

VAN VELDHUISEN, D.J., GENTH-ZOTZ, S., BROUWER, J., BOOMSMA, F., NETZER, T.,MAN IN 'T VELD, A.J., PINTO, Y.M.,LIE, K.I., CRIJNS, H.J, (1998). High-versus low-dose ACE Inhibition in chronic heart failure: a double-blind,placebo-controlled study of imidapril. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **32**: 1811–1818

WEISS, J. (1989). *Handbook of Ion Chromatography*, Dionex Corporation Sunnyvale, California, **3**: 30-31 p.

WEINBERGER, R., PIETRANTONIO, T. (1983). Fully automated liquid chromatographic system for the determination of hydrochlorothiazide in blood plasma and sera. *Anal. Chim. Acta.* **146**: 219-226.

WEN J., GERD F., YOHANNES G., KNUT I. (2006) Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode *Journal Chromatography A, Volume 1127, Issues 1-2, 15:Pages 82-91*

ÖZGEÇMİŞ

I.Bireysel Bilgiler

SOYADI, ADI : ALTUNSOY Serkan

DOĞUM YERİ, TARİHİ: Erzurum, 1980

UYRUĞU : TC

MEDENİ DURUMU : Bekar

YAZIŞMA ADRESİ : Mithat Paşa mah. Zubeyde Hanım cad. No:15
DA:15\SAKARYA

TELEFON : 05387266501

E-MAIL : Serkan.altunsoy135@hotmail.com

II.Eğitim

İlkokul: Mehmet Akif ilköğretim Okulu 1986-1991

Ortaokul: Mehmet Akif ilköğretim Okulu 1991-1994

Lise: Fatih Lisesi 1994 -1997

Üniversite: Abant İzzet Baysal Üninersitesi

Fen Fakültesi Kimya Bölümü[İngilizce] (Bolu) 2000-2005

III.Yabancı Dil

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

IV. Mesleki Deneyim

Nobel İlaçta (2006-2007) Üretim mühendisi olarak çalıştım.

Neutec İlaçta (2007-Hala Çalışıyorum) Üretim şefi olarak çalışmaktayım.

