



**AMLODİPİN VE HİDROKLOROTİYAZİD ETKİN
MADDELERİNİN KARE DALGA VE DİFERANSİYEL
PULS VOLTAMETRİ YÖNTEMİ İLE FARMASÖTİK
PREPARATLARDA AYNI ANDA MİKTAR TAYİNİ**

Ümit KOÇAK

Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bilal YILMAZ**

Yüksek Lisans Tezi - 2018

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMLODİPİN VE HİDROKLOROTİYAZİD ETKİN
MADDELERİNİN KARE DALGA VE DİFERANSİYEL PULS
VOLTAMETRİ YÖNTEMİ İLE FARMASÖTİK
PREPARATLARDA AYNI ANDA MİKTAR TAYİNİ**

Ümit KOÇAK

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bilal YILMAZ

ERZURUM
2018

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**AMLODİPİN VE HİDROKLOROTİYAZİD ETKİN MADDELERİNİN
KARE DALGA VE DİFERANSİYEL PULS VOLTAMETRİ YÖNTEMİ İLE
FARMASÖTİK PREPARATLARDA AYNİ ANDA MİKTAR TAYİNİ**

Ümit KOÇAK

Tez Savunma Tarihi : 28.09.2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Bilal YILMAZ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Fatih POLAT (Erzincan Binali
Yıldırım Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM-2018**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Amlodipin.....	4
2.2.Hidroklorotiyazid.....	5
2.3. Cardofix Plus Tablet ile İlgili Genel Bilgiler	6
2.4. AML ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	7
2.5. HCT ile İlgili Yapılan Çalışmalar	17
2.6. Elektrokimyasal Yöntemler	23
2.6.1. Voltametri	24
2.6.1.1. Voltametrizde Uyarma Sinyalleri	26
2.6.1.2. Dönüşümlü Voltametri	26
2.6.1.3. Kare Dalga Voltametri.....	27
2.6.1.4. Diferansiyel Puls Voltametri.....	28
2.6.2. Elektroanalitik Yöntemlerin Kullanım Alanları.....	29
2.7. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	29
2.7.1. Doğruluk ve Kesinlik.....	30
2.7.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)	30

2.7.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	31
2.7.4. Duyarlılık.....	31
2.7.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)	31
2.7.6. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD)	31
2.7.7. Geri Kazanım.....	31
3. MATERYAL VE METOT.....	32
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	32
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	32
3.3. Voltametre Sistemi.....	32
3.3.1. Etik Kurul ve Voltametrik Yöntem ve Şartları.....	32
3.3.2. Amlodipin ve HCT için Kare Dalga Voltametri (SWV) Deneyinin Yapılışı.....	33
3.3.3.Amlodipin ve HCT için Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin Yapılışı.....	33
3.3.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Voltametri Yöntemi.....	34
4.1.1. Dönüşümlü Voltametri (CV) Deneyinin Yapılışı.....	34
4.1.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	36
4.1.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	37
4.1.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	37
4.1.2.2.2.Gözlenebilme Sınırı(LOD) ve Tayin Sınırı(LQD).....	38
4.1.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	39
4.1.2.2.4.Kararlılık(Stabilite)	39
4.1.2.2.5.Geri Kazanım	40
4.2.2.1.Standart Çözeltilerin Hazırlanması	40
4.4.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi(Validasyonu).....	41

4.2.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	41
4.2.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	42
4.2.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	43
4.2.2.2.4. Kararlılık (Stabilite)	43
4.2.2.2.5. Geri Kazanım	44
4.2.2.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	44
4.4. Amlodipin İçin Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin Yapılışı	45
4.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	45
4.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)	46
4.4.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi	46
4.4.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	47
4.4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	48
4.4.2.4. Kararlılık (Stabilite)	48
4.4.2.5. Geri Kazanım	49
4.5. Hidroklorotiyazid İçin Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin Yapılışı	49
4.5.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	50
4.5.2. Diferansiyel Puls Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	51
4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi	51
4.5.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	52
4.5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	52
4.5.2.4. Kararlılık (Stabilite)	53
4.5.2.5 Geri Kazanım	53
4.5.2.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	54
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61

KAYNAKLAR.....	62
EKLER.....	71
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	71
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	72



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve hazırlanmasında ilgisini, fikirlerini, yardımlarını esirgemeyen ve bu yolda her türlü fedakârlığı yapmaktan kaçınmayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bilal YILMAZ’a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı kimyasal madde ve malzeme yönünden 2018/6434 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bana her zaman güvenen, inanan ve hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Yaşar KOÇAK ve annem Rahime KOÇAK’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ümit KOÇAK

ÖZET

Amlodipin ve Hidroklorotiyazid Etkin Maddelerinin Kare Dalga ve Diferansiyel Puls Voltametri Yöntemi ile Farmasötik Preparatlarda Aynı Anda Miktar Tayini

Amaç: Bu çalışmada amlodipin ve hidroklorotiyazid etkin maddelerinin elektrokimyasal davranışları, camı karbon elektrotta 0.04 M Britton-Robinson tampon çözeltisinde (pH 5.0) Kare Dalga ve Diferansiyel Puls Voltametri yöntemi ile incelendi.

Materyal ve Metot: Amlodipin ve hidroklorotiyazid dönüşümlü voltamogramları yaklaşık olarak camı karbon elektrotta +0.50 ve +1.50 V da yükseltgenme piki gözlenmiştir. Doğrusallık, kesinlik, doğruluk, stabilite, tayin edilebilme sınırı ve miktar tayin sınırı gibi parametreler ICH Guidelines'e göre çalışıldı.

Bulgular: Kare Dalga ve Diferansiyel Puls Voltametri yönteminin kalibrasyon eğrisi 2.5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında doğrusaldır. Amlodipin ve hidroklorotiyazid için günüçi ve günler arası kesinlik değerleri % 5.34'ten ve doğruluk (bağıl hata) % 6.29'dan küçüktür.

Sonuç: Geliştirilen bu yöntemler ile amlodipin ve hidroklorotiyazid etkin maddelerini içeren Cardofix Plus preparatında miktar tayini yapıldı. Elde edilen analiz sonuçları değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Amlodipin, diferansiyel puls voltametri, dönüşümlü voltametri, hidroklorotiyazid, kare dalga voltametri, tablet

ABSTRACT

Simultaneous Quantitation of Amlodipin and Hydrochlorothiazide Effective Substances in the Pharmaceutical Preparations with Square Wave and Differential Pulse Voltammetry Method

Aim: In this study, electrochemical behaviors of amlodipin and hydrochlorothiazide effective substances were investigated on glassy carbon electrode in 0.04 M Britton-Robinson buffer solution (pH 5.0) by Square Wave and Differential Pulse Voltammetry method.

Material and Method: Cyclic voltammograms of amlodipin and hydrochlorothiazide were observed oxidation peak at about +0.50 V and +1.50 V on glassy carbon electrode. Parameters such as linearity, precision, accuracy, stability, limit of detection and limit of quantification were studied according to the ICH Guidelines.

Results: Calibration curve of Square Wave Voltammetry and Differential Pulse method was linear between the concentration range of 2.5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Within- and between-day precision values for amlodipin and hydrochlorothiazide were less than 5.34% and accuracy (relative error) was better than 6.29%.

Conclusion: Quantitation of amlodipin and hydrochlorothiazide was performed with this method which is developed in Cardofix Plus pharmaceutical preparation containing the amlodipin and hydrochlorothiazide effective substances. Obtained analysis results were evaluated.

Key Words: Amlodipin, cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, hydrochlorothiazide, square wave voltammetry, tablet

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AML	: Amlodipin
BSS	: Bağlı standart sapma
CV	: Dönüşümlü voltametri
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
HCT	: Hidroklorotiyazid
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICH	: International conference on harmonization
LC-MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometri
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
SWV	: Kare dalga voltametri
UV-Vis	: Ultraviyole-görünür bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. AML'nin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2. HCT'nin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. Voltamogram	25
Şekil 2.4. Voltametri de en çok kullanılan uyarma sinyalleri	26
Şekil 2.5. Dönüşümlü voltametri potansiyel-zaman grafiği	27
Şekil 2.6. Kare Dalga Voltametri potansiyel-zaman grafiği	27
Şekil 2.7. Kare dalga voltamogramı	28
Şekil 4.1. AML ve HCT etkin maddesinin 0.04 M BR içindeki dönüşümlü voltamogramları (AML ve HCT, 50 µg ml ⁻¹)	34
Şekil 4.2. AML ve HCT etkin maddesinin 0.04 M BR içindeki kare dalga voltamogramları (20 µg ml ⁻¹)	35
Şekil 4.3. AML ve HCT etkin maddesinin 0.04 M BR içindeki diferansiyel puls voltamogramları (20 µg ml ⁻¹)	36
Şekil 4.4. AML etkin maddesinin 0.04 M BR çözeltisindeki kare dalga voltamogramları (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg ml ⁻¹)	37
Şekil 4.5. Kare dalga voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 4.6. HCT etkin maddesinin 0.04 M BR çözeltisi içindeki kare dalga voltamogramları (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg ml ⁻¹)	41
Şekil 4.7. Kare dalga voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi	42
Şekil 4.8. Cardofix Plus farmasötik preparatının kare dalga voltametrik voltamogramı (25 µg ml ⁻¹)	45
Şekil 4.9. AML etkin maddesinin BR tamponu ortamında (pH 5) diferansiyel puls voltamogramları (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg ml ⁻¹ µg ml ⁻¹)	46
Şekil 4.10. Diferansiyel puls voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi	47
Şekil 4.11. AML etkin maddesinin BR tamponu ortamında (pH 5) diferansiyel puls voltamogramları (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µg ml ⁻¹)	50
Şekil 4.12. Diferansiyel puls voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi	51

Şekil 4.13. <i>Cardofix Plus</i> farmasötik preparatının diferansiyel puls voltametrik voltamogramı (25 µg ml ⁻¹)	55
---	----



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 4.1. Kare dalga voltametrik çalışmada AML'ye ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri.....	38
Tablo 4.2. Kare dalga voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	39
Tablo 4.3. AML'nin kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri.....	40
Tablo 4.4. Kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri.....	40
Tablo 4.5. Kare dalga voltametrik çalışmada HCT'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri.....	42
Tablo 4.6. Kare dalga voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	43
Tablo 4.7. HCT'nin kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri.....	44
Tablo 4.8. Kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri	44
Tablo 4.9. Diferansiyel puls voltametrik çalışmada AML'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri.....	47
Tablo 4.10. Diferansiyel puls voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	48
Tablo 4.11. AML'nin diferansiyel puls voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	49
Tablo 4.12. Diferansiyel puls voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri.....	49
Tablo 4.13. Diferansiyel puls voltametrik çalışmada HCT'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri.....	52
Tablo 4.14. Diferansiyel puls voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	53
Tablo 4.15. HCT'nin diferansiyel puls voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	53

Tablo 4.16. Diferansiyel puls voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın gūniçi ve günler arası geri kazanım değeri.....	54
--	----



1. GİRİŞ

Amlodipin (AML) bir kalsiyum kanal blokörüdür. Hipertansiyon tedavisinde kullanılır. AML kalsiyumun vücutta hücre membranındaki kalsiyum kanalları yoluyla hücre içine girişini inhibe eder. Bundan dolayı vücudun kan basıncını düşürür. Hidroklorotiyazid (HCT) ise başlangıçta kalp debisini düşürerek, plazma ve ekstraselüler sıvı hacmini azaltarak kan basıncını düşürür. Ancak tedaviye birkaç hafta devam edildiğinde, düşen plazma hacmi yavaş yavaş normale dönmesine rağmen yaptığı hipotansiyon devam eder. Bunun nedeni periferik vasküler rezistansta yaptığı azalmadır veya damar düz kas hücrelerinin noradrenalinine karşı duyarlılıklarının azaltılmasından kaynaklanır.^{1,2}

Literatür taramasında, farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda AML veya HCT etkin maddesinin miktar tayini için UV-Görünür Bölge Absorbsiyon Spektrofotometri,³⁻²³ Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC),²⁴⁻³³ FT-IR Spektrometri³⁰ ve Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri (LC-MS)³⁴⁻⁴² yöntemleri ile ilgili çalışmalara ulaşıldı.

Çalışmalarda genellikle tampon sistemi içeren mobil faz kompozisyonları kullanılmıştır. pH'sı bilinen tampon mobil faz sistemi günlük hazırlanması gerekmekte ve bu durum kolon ömrünü azaltmaktadır. HPLC çalışmasında analizin yapılması, kolonun şartlandırılması, analiz öncesi HPLC sisteminin çalışmaya optimize edilmesi için çok fazla zaman harcanmaktadır. HPLC yöntemi ile farklı etkin maddelerinin farmasötik preparatlarda ve biyolojik materyallerde yöntem geliştirme, yöntem validasyonu ve gerçek numunelerde uygulamasında HPLC sistemi ile çalışmanın zorlukları bilinmektedir. AML ve HCT'nin farmasötik preparatlarda tayinine yönelik Kare Dalga ve Diferansiyel Puls Voltametri yöntemi ile aynı anda tayinine yönelik bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bundan

dolayı AML ve HCT etkin maddelerinin farmasötik preparatlarda aynı anda tayinine ilişkin kolay, ekonomik ve hızlı yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir.

Farmasötik dozaj formlarında AML ve HCT ilaç etkin maddesinin yapısındaki değişiklikler, bu ilaç etkin maddelerinin elektrokimyasal özelliklerine bağlıdır. Tez kapsamında çalışılan ilaç etkin maddesinin oldukça yeni olması nedeniyle literatür araştırmasında voltametrik yöntemler ile analizi için bir çalışmaya ulaşılammıştır. Ayrıca bu etkin maddenin elektrokimyasal mekanizması hakkında da literatürde bir bilgiye rastlanmamıştır.

Bu nedenle tez kapsamında yer alan AML ve HCT maddelerinin yükseltgenme/indirgenme mekanizmaları üzerinde de çalışmalar yapılarak, analiz sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir. Bu tezde kullanılan elektrokimyasal yöntem olan voltametri 1970'li yıllardan itibaren günümüze kadar teknolojinin ve bilişim sektöründeki gelişmelerle özellikle ilaç analizlerinde giderek artan bir uygulama alanına sahip olmuştur.⁶⁷⁻⁶⁹

Voltametrik yöntemlerin günümüzde çok sayıda kullanım alanı vardır. Temel olarak en önemli kullanım alanı madde miktar tayinidir. Bu nedenle özellikle klinik amaçla kullanımları çok yaygındır. İlaçların içindeki etkin maddelerin tabletlerden, biyolojik sıvılardan izole edildikten sonra miktarlarının tayininde oldukça hassas tayinler yapılabildiğinden analizlerde tercih edilen yöntemler olmuşlardır.

Modern elektro analiz yöntemler (kare dalga ve diferansiyel puls voltametri) sayesinde biyolojik sıvılardan ilaç etkin maddeleri ve metabolitlerinin direkt olarak analizinin yapılabilmesi sağlanmaktadır.^{67,68} Bu yöntemler diğer pek çok yönteme (HPLC, LC-MS, GC-MS vb.) göre oldukça kolay ve hızlıdır.

Yapılan literatür araştırmalarında AML ve HCT etkin maddesinin bir arada tayinine ilişkin herhangi bir kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemine

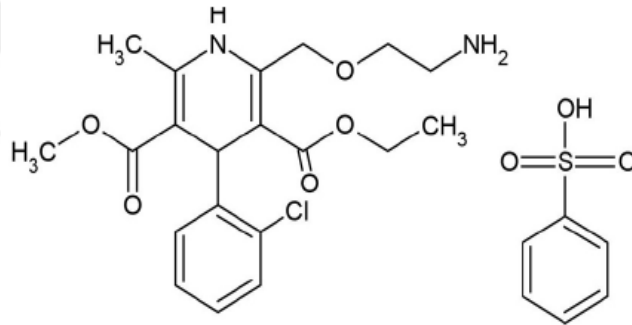
rastlanmadı. Bundan dolayı etkin maddelerin çözüleceği çözelti ortam pH'sının, çözücü ve destek elektrolit cinsinin etkisi araştırılarak kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemi optimize edildi. Uygun ortam şartları belirlendikten sonra, kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yönteminde belirleyicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gerikazanım, teşhis limiti, miktar tayin sınırı ve kararlılık parametreleri ile yöntem validasyonu (geçerlilik testi) yapıldı. Ayrıca AML ve HCT'nin kombine farmasötik preparatlarında miktar tayini de yapılarak yöntemlerin uygulanabilirliği gösterildi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amlodipin

AML (Şekil 2.1) kalsiyum kanal blokörü olup dihidropiridin ilaç sınıfındandır. AML hücre membranındaki kalsiyum kanalları yoluyla hücre içine kalsiyumun girişini engeller. Bu nedenle AML tarafından kalsiyum akımı engellenir. Bu etki yoluyla sistemik kan basıncı düşer. AML ağız yoluyla alınır. Bunun sonucu alındıktan sonra iyi absorbe olup, plazma doruk konsantrasyonuna 6-12 saat sonra ulaşılır. AML ilacının % 93'ü plazma proteinlerine bağlanır. AML itrah sonucu inaktif metabolitlere dönüşür ve AML ilacının % 10'u değişmeden % 60'ı ise metabolitleri şeklinde idrarla atılır. Plazmadan ilacın eliminasyon yarı ömrü 30-50 saat arasındır. AML ilacı her gün verilirse bir hafta sonra kararlı plazma ilaç konsantrasyonu düzeylerine ulaşılır.¹



Şekil 2.1. AML'nin kimyasal yapısı

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan AML yalnız başına kullanılabildiği gibi diğer antihipertansif ilaçlarla da kombine olarak günümüzde reçete edilmektedir. Hipertansif AML ilacı gerek teşhisi kesinleşmiş gerekse varlığından şüphe edilen vazospastik angina pectoris tedavisinde kullanılmaktadır. Bu amaçla gerek yalnız başına gerekse diğer antianjinal ilaçlarla birlikte beraber tıpta kullanılmaktadır. AML, dihidropiridinler ilaç sınıfına ait ilaçlara karşı aşırı duyarlılığı olan kişilerde kullanılmaması gerekmektedir.¹

AML'nin vücutta emilimi iyidir. Prospektüste yazılan yan etkilerin çoğu hafif ve orta derecededir. Tedavi sırasında en sık görülen yan etkileri baş ağrısı, baş dönmesi, yorgunluk, karın ağrısı çarpıntı, ödem, kızarma, bulantı ve uyuklamadır.¹

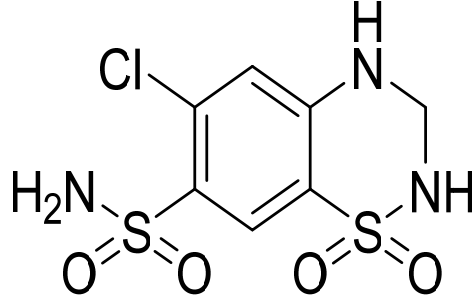
AML'nin kimyasal adı 3-O-Ethyl-5-O-methyl 2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate olup Şekil 2.1'de verilmiştir. AML'nin molekül formülü $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$ ve ağırlığı $408.85 \text{ g mol}^{-1}$ 'dür. AML beyaz kristal bir toz olan suda iyi çözünürken etil alkolde çözünürlüğü suya göre daha düşüktür. Erime noktası 134°C 'dir. AML'nin kaynama noktası 760 mmHg 'de 527.2°C olup etkin maddenin pKa değeri 8.6 'dır².

2.2. Hidroklorotiyazid

Hidroklorotiazidin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Genellikle normal kan basıncını etkilemez. Başlangıçta kalp debisini düşürerek, plazma ve ekstraselüler sıvı hacmini azaltarak (hipovolemi) kan basıncını düşürürler. Ancak tedaviye birkaç hafta devam edildiğinde, düşen plazma hacmi yavaş yavaş normale dönmesine rağmen yaptığı hipotansiyon devam eder. Bunun nedeni periferik vasküler rezistansta yaptığı azalmadır ve olasılıkla damar düz kas hücrelerinin noradreniline karşı duyarlılıklarının azaltılmasından kaynaklanır.

Hidroklorotiazidin astointestinal kanaldan absorpsiyonu verildiği farmasötik şekle ve verilen doza bağlı olarak değişkenlik gösterir. Sistemik biyoyaralanımı yaklaşık % 50-60'tır. Etkisi oral yolla verildikten 2 saatte sonra başlar ve doruk etki düzeyine 4 saatte ulaşır. Toplam etki süresi 6-12 saattir. Hidroklorotiazid plasentayı aşmasına rağmen kan-beyin engelini aşmaz. Anne sütüne geçebilir. Metabolize olmaz ve esas olarak idrarla değişmeden atılır; verilen dozun % 61'i 24 saatte elimine olur¹.

Hidroklorotiazidin (HCT)'nin kimyasal adı 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazidin-7-sülfonamid 1,1-dioksit olup Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. HCT'nin kimyasal yapısı

HCT'nin molekül formülü $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ ve molekül ağırlığı $297.70 \text{ g mol}^{-1}$ 'dir. HCT beyaz veya beyaza yakın, kokusuz kristal yapılı bir tozdur. Suda hafifçe çözünür, etil alkol ve metil alkol içindeki çözünürlüğü suya göre daha azdır².

2.3. Cardofix Plus Tablet ile İlgili Genel Bilgiler

Cardofix Plus, açık sarı renkli bir film kaplı tablettir. Her bir film kaplı tablet 10 mg amlodipine eşdeğer bazda 13.87 mg amlodipin besilat, 12.5 mg hidroklorotiyazid ve 160 mg valsartan içerir. Cardofix Plus, 28 adet film kaplı tablet içeren blister ambalajlarda satılmaktadır. Cardofix Plus film kaplı tablet, amlodipin, hidroklorotiyazid ve valsartan isimli etkin maddeler içermektedir. Her üç etkin madde de, yüksek kan basıncını kontrol etmeye yardımcı olur. Amlodipin, kalsiyumun damar duvarı içine girmesini engelleyerek damarların daralmasını önler. Amlodipin, “kalsiyum kanalı blokerleri” adı verilen bir madde grubuna aittir. Valsartan, “anjiyotensin-II reseptör antagonistleri” adı verilen bir madde grubuna aittir. Anjiyotensin-II vücutta üretilir ve damarların daralmasına neden olan kan basıncını yükseltir. Valsartan, anjiyotensin-II 'nin etkisini önleyerek etki eder. Hidroklorotiyazid, idrara çıkmayı artırarak kan basıncını düşürür¹. Hidroklorotiyazid, “tiyazid diüretikleri” adı verilen bir madde grubuna aittir.

2.4. AML ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Yucesoy ve ark.³ AML'nin miktar analizi için bir spektrofotometrik yöntem valide etmişlerdir. Yöntem AML'nin dinitrobenzensülfonik asit ile birlikte kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Reaksiyon bazik ortamda (pH=10) oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş olup kompleks ürün kloroform fazına sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile alınarak 337 nm'de absorbansı ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi 6.0-30.0 µg ml⁻¹ derişim aralığında geçerlidir. Sonuçların kesinliği % bağıl standart sapma (BSS) olarak verilmiş ve % BSS % 1.34'tür. AML için tablette geri kazanım % 99.7'dir. Yöntemin uygulanabilirliği AML içeren tabletlerde denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Jain ve ark.⁴ tarafından AML'nin tabletlerde tayini için bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. AML sodyum asetat içinde çözünmüş ve 240 nm'de absorbans ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi 50 ve 250 µg ml⁻¹ ($r^2= 0.9998$) derişim aralığında geçerlidir. AML için tablette geri kazanım çalışması sonucunda gerikazanım % 97.84 ve % 100.16 arasında hesaplanmıştır.

Abdel-Wadood ve ark.⁵ tabletlerde AML tayini için AML, ninhidrin ve fenilasetaldahit ile kompleks yapılarak iki farklı spektrofotometri yöntemi geliştirip valide etmişlerdir. Kalibrasyon eğrileri 0.35-1.80 µg ml⁻¹ ve 0.55-3 µg ml⁻¹ derişim aralığında doğrusaldır. Yöntemlerin miktar tayin sınırları 0.30 ve 0.54 µg ml⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Prasad ve ark.⁶ tabletlerde lisinopril-AML ve enalapril-AML miktar tayini için türev spektrofotometri yöntemlerini geliştirmişler. 215 ve 260 nm dalga boyundaki türev absorbansları ölçülerek AML'nin geri kazanım değerlerini % 100.15 ve % 99.71 arasında bulmuşlardır.

Prasad ve ark.⁷ AML ve atenolol etkin maddelerinin tabletlerde tayinini için türev spektroskopisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu analizlerde 250 ve 273.4 nm dalga boylarında

ölçümler alınarak AML ve atenelol için lineer derişim aralıklarını sırasıyla 2.5-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 15-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. Yöntemin miktar tayin sınırları 0.10 ve 0.40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirtilmiştir.

Juyal ve ark.⁸ AML ve atorvastatinin tabletlerde aynı anda analizi için hızlı, kesin ve basit bir yöntem olan çok bileşenli analiz modlu UV spektrofotometri yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Doğrusal derişim aralığını AML ve atorvastatin için sırasıyla 7.0-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 14-26 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulmuşlardır.

Ramesh ve ark.⁹ AML ve atorvastatin kalsiyumun tabletlerde aynı anda analizi için ekonomik iki spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntemde 361 ve 246 nm dalga boylarında, ikinci yöntemde 238.8 ve 246 nm dalga boylarında çalışılmıştır. Doğrusal derişim aralığını AML ve atorvastatin için 0.5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulmuşlar.

Rao ve ark.¹⁰ AML ve atorvastatinin tabletlerde aynı anda analizi için hızlı, kesin ve basit bir spektrofotometrik yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Bu yöntem için 242 nm ve 364 nm dalga boyları kullanılmış olup, yöntemin validasyon aşamasında AML ve atorvastatin için doğrusal derişim aralıkları sırasıyla 1-50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 1-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Abdallah ve ark.¹¹ AML ve atorvastatinin tabletlerde aynı anda miktar tayini için bir türev spektrofotometri yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Bu çalışmada 228 nm ve 245 nm dalga boylarında ölçümler yapılmış olup, AML ve atorvastatin için doğrusal derişim aralıkları 10-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 2.5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Basavaiah ve ark.¹² AML ve felodipinin tabletlerde aynı anda tayini için hızlı, basit ve ekonomik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem için 760 nm dalga boyunda çalışılmış olup AML ve felodipin için doğrusal derişim aralıkları 5-15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 1.5-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Rathee ve ark.¹³ AML ve lisinoprilin tabletlerde aynı anda tayinini türev spektrofotometrisi ile gerçekleştirmişler. Bu çalışmada AML ve lisinopril doğrusal derişim aralıkları 10-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 4-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Joshi ve ark.¹⁴ AML ve lisinoprilin tabletlerde aynı anda analizi için iki spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntem de 360 ve 248 nm dalga boylarında, ikinci yöntemde 300 ve 360 nm dalga boylarında her iki maddenin absorbansı ölçülmüş olup AML ve lisinopril için doğrusal derişim aralığı 5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Patil ve ark.¹⁵ AML ve losartan potasyumun tabletlerde aynı anda tayini için iki spektrofotometrik yöntem valide etmişlerdir. Birinci yöntemde 208 ve 237.5 nm dalga boylarında, ikinci yöntemde de 242.5 ve 237.5 nm dalga boylarında ölçümler alınmış olup AML ve losartan potasyumun doğrusal derişim aralıkları 2-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Kavari ve ark.¹⁶ AML ve losartan potasyumun tabletlerde aynı anda tayini için hızlı, basit ve ekonomik bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde 206 ve 360 nm gibi iki farklı dalga boyunda çalışılarak AML ve losartan için doğrusal derişim aralıkları 10-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 2.5-7.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Rahman ve ark.¹⁷ AML ve ninhidrinin tabletlerde aynı anda tayini için bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada 595 nm dalga boyunda ölçümler alınmış olup AML ve ninhidrin için doğrusal derişim aralıkları 10-60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Mehulkumar ve ark.¹⁸ AML ve olmesartanın tabletlerde aynı anda tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişler olup bu yöntemde AML için 259 nm dalga boyunda çalışılmıştır. AML ve olmesartanın doğrusal derişim aralıkları 5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ arasında doğrusal olup miktar tayin sınırı AML ve olmesartan için sırasıyla 0.18 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 0.43 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Kardile ve ark.¹⁹ olmesartan ile AML'nin tabletlerde aynı anda tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Absorbanslar 239 ve 256 nm dalga boyunda ölçülmüş olup AML ve olmesartan için doğrusal derişim aralıkları 5-35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Patil ve ark.²⁰ olmesartan medoksimil ile AML'nin tabletlerde aynı anda tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde 360 nm dalga boyunda çalışılmış olup AML ve olmesartan için doğrusal derişim aralığı 2-20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'dir. Yöntemde AML ve olmesartan için miktar tayin sınırı sırasıyla 0.092 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 0.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Muthu ve ark.²¹ tabletlerde UV- spektrofotometri yöntemiyle AML ve felodipinin aynı anda tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde 296 ve 363 nm gibi iki farklı dalga boyunda çalışılmış, AML ve felodipin için doğrusal derişim aralıkları 1-3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur. AML ve felodipin için miktar tayin sınırı sırasıyla 0.4125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 0.3786 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Gölcü ve ark.²² AML'nin bromfenol mavisi ile pH 3.2'de renkli bir iyon-çifti kompleksi oluşumuna dayanan bir reaksiyon geliştirerek AML'nin kolorimetrik tayinini yapmışlardır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi 6-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında Beer kanununa uymaktadır ve regresyon eşitliği $y=0.055x-0.018$ 'dir ($r=0.9997$). AML'nin farmasötik preparattan geri kazanımı değeri % 100.7 ve çalışmanın kesinliği için kullanılan % BSS değeri % 1.24'dür. Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Monkman ve ark.²³ AML'nin insan plazmasında ve diş eti oluğu sıvısı içerisinde var olup olmadığının görülmesi için bir gaz kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından AML etkin maddesi türevlendirme ile uçucu hale getirilerek

analiz gerçekleştirilmiştir. Kardiyovasküler rahatsızlıklardan dolayı AML tedavisi gören hasta plazmaları ve diş eti oluğu sıvılarında AML analizi yapılmıştır.

Bahrami ve ark.²⁴ AML analizi için insan serumunda bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. AML, serumdan etil asetat kullanılarak ekstrakte edilmiştir. HPLC sisteminde mobil faz olarak trietilamin ve metanol (50:50, h/h) kullanılmıştır. Çalışmada propranolol internal standart olarak kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi, insan serumunda 0.25-16 ng ml⁻¹'lik derişim aralığında lineer doğrusallık göstermiştir. Kesinlik çalışması gün içi ve günler arası %BSS ile değerlendirilmiş ve % 12'den düşük bir varyasyon göstermiştir.

Vora ve ark.²⁵ bisoprolol fumarat ve AML etkin maddelerinin tabletlerde aynı anda tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada mobil faz olarak 25 mM amonyum asetat (pH 5.0) ve methanol (65:35, h/h) karışımı, 0.8 ml dk⁻¹ akış hızı kullanılmıştır. Çalışmada C₁₈ ters faz kolonu (3 µm 50 × 4.6 mm i.d.) ve 230 nm'de ölçüm yapabilen UV dedektörü kullanılmıştır. Alıkonma süresi bisoprolol ve AML için sırasıyla 1.45 ve 3.91 dk'dır. Kalibrasyon eğrisi 8-33 µg ml⁻¹ derişim aralığında çizilmiştir. Çalışmanın geri kazanım değeri her iki madde için sırasıyla % 99.1 ve % 98.6 olarak bulunmuştur.

Shah ve ark.²⁶ atorvastatin ve AML miktarlarının tabletlerde aynı anda tespit edilebilmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kolon olarak C₁₈ (5 µm 250 × 4.6 mm i.d.) kullanılmıştır. HPLC yöntemi izokratik elüsyon modu ile, 0.02 M potasyum dihidrojen fosfat:asetonitril:metanol (30:10:60, h/h/h) içeren bir hareketli fazla birlikte kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 ml dk⁻¹'dir. Atorvastatin ve AML maddelerinin alıkonma süreleri sırasıyla 11.6 ve 4.5 dk'dır. Lineer aralık atorvastatin kalsiyum için 0.08-20 µg ml⁻¹ ve AML için 0.1-20 µg ml⁻¹ derişim aralığında sağlanmıştır. Atorvastatin ve AML

çözeltilerinin stabilite çalışması da yapılmıştır. Yöntem, atorvastatin ve AML maddelerini içeren kombine tabletlere uygulanmıştır.

Prajapati ve ark.²⁷ perindopril erbumin ve AML maddelerinin tabletlerde aynı anda miktar tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Her iki etkin maddenin kromatografik ayrımı Eclipse XDB C₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 5 mM fosfat tamponu (pH 2.6):asetonitril kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 ml dk⁻¹ olarak seçilmiştir. Analiz 8 dk içerisinde tamamlanmıştır. Lineer konsantrasyon aralığı perindopril erbumin için 8-60 µg ml⁻¹, AML için 10-75 µg ml⁻¹'dir. Yöntemin kesinliği %BSS ile değerlendirilmiş ve %BSS<%2.0' dir.

Rajitha ve ark.²⁸ telmisartan ve AML maddelerinin tabletlerde aynı anda ölçümü için basit, kesin, doğru ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kolon olarak Symmetry C₁₈ (4.6 x 250 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Yöntemde gradient elüsyon modlu mobil faz kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 ml dk⁻¹ ve dedektör dalga boyu 245 nm olarak seçilmiştir. AML ve telmisartan için alıkonma zamanı sırasıyla 2.32 ve 3.52 dk'dır. Lineer derişim aralığı telmisartan için 32-96 µg ml⁻¹ ve AML için 4-12 µg ml⁻¹ 'dir.

Chaudhari ve ark.²⁹ atorvastatin ve AML'nin aynı zamanda analizi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen HPLC yönteminde asetonitril ve 50 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (60:40, h/h) içeren hareketli faz ile Lichrospher® 100 C₁₈ (5 µm, 250 mm x 4.0 mm i.d.) kolonu kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 ml dk⁻¹ ve UV değeri 254 nm olarak seçilmiştir. Atorvastatin ve AML etkin maddeleri sıcaklık, asidik ve bazik baskı unsurlarına maruz bırakılarak stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri atorvastatin ve AML için sırasıyla 1-90 µg ml⁻¹ ve 1-80 µg ml⁻¹ derişim aralığında lineerdir. Tabletten geri kazanım sırasıyla % 99.76 ve % 98.12'dir. Yöntemin gözlenebilme sınırı atorvastatin ve AML için sırasıyla 0.4 ve 0.6 µg ml⁻¹, miktar tayin alt

sınırı ise her ikisi için de 1.0 µg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntem deneysel ortamda iki adet kombine kullanımlı olan ilaç formülasyonunda uygulanmıştır.

Üstün ve ark.³⁰ tarafından AML'nin IR Spektroskopisi ve HPLC yöntemleriyle kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. IR Spektroskopisi yönteminde KBr tablet tekniği kullanılmış, disulfiram ise internal standart olarak seçilmiştir. Çalışmalarda AML ve disulfiram için sırası ile 693 cm⁻¹ ve 913 cm⁻¹ spesifik absorpsiyon bantları seçilmiştir. AML için Beer yasasına göre uygun derişim aralığındaki regresyon denklemi $y=0.652x+0.024$ ($r^2=0.9968$)'dir. Çalışmanın geri kazanım değeri ve %BSS'sı IR spektroskopisi yöntemi için sırası ile % 98.2 ve % 1.63 olarak bulunmuştur. HPLC sisteminde Luna C₁₈ (5µm, 250 x 4.6 mm) kolon hareketli faz olarak su:metanol:fosfat tamponu (pH:3) (36:64:1, h/h/h) kullanılmıştır. Akış hızı 0.7 ml dk⁻¹'dir. Mefrusid etkin maddesi internal standart olarak çalışmada seçilmiştir. Analiz 275 nm'de yapılmış ve pikler AML ve mefrusid için sırası ile 11.5 ve 7.27 dakikadır. AML için lineer derişim aralığı 0.004-0.020 mg ml⁻¹'dir. Regresyon denklemi $y=0.846x-0.013$ ($r^2=0.9950$) olup ortalama geri kazanım değeri ve %BSS değeri sırası ile % 98.9 ve % 0.75 olarak bulunmuştur.

Chitlange ve ark.³¹ valsartan ve AML etkin maddelerinin HPLC yöntemindeki analizinde 1.0 ml dk⁻¹ akış hızında hareketli faz kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril:fosfat tamponu (0.02 M, pH:3.0) (56:44 h/h), 234 nm dalga boyu ve Kromasil C₁₈ (5µm, 250 x 4.6 mm) kolon kullanılmıştır. AML ve valsartan için alıkonma süreleri sırasıyla 3.07 ve 6.20 dk olarak bulunmuştur. BHPLC yöntemi ile bu etkin maddelerin stabilite çalışmaları da yapılmış ve her iki maddenin de bozulma ürünleri ile birlikte analizinin yapılabildiği sonucuna varılmıştır. Geliştirilen yöntem kesinlik, doğruluk ve sağlamlık açısından değerlendirilmiştir.

Klinkenberg ve ark.³² AML ve metabolitlerinin tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışma 25 °C'de ters faz C₁₈ kolonu, asetonitril:metanol:triethylamin (pH:3) (15:35:50, h/h/h) hareketli fazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma 237 nm dalga boyundaki UV dedektör ile gerçekleştirilmiştir. AML için lineer derişim aralığı 0.39-1.56 µg ml⁻¹'dir. HPLC çalışmasının miktar tayin alt sınırı ise 0.08 µg ml⁻¹ olarak bulunmuştur.

Sah ve ark.³³ AML'nin miktar tayini için WATERS C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5µm) kolonu kullanarak tabletlerdeki miktar tayinini yapmışlardır. Hareketli faz olarak asetonitril, 70 mM potasyum dihidrojen ortofosfat tamponu:metanol (15:30:55, h/h/h) kullanılmıştır. Karışımın pH değeri 3 olarak seçilmiştir. AML'nin alıkonma zamanı 2.60 dakika olarak belirlenmiştir. HPLC çalışmasında hareketli faz akış hızı 1.0 ml dk⁻¹ olarak seçilmiştir. AML için lineer derişim aralığı 0.5-8 µg ml⁻¹'dir. Yöntemin miktar tayin alt sınırı ise 0.20 µg ml⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Ma ve ark.³⁴ AML'nin insan plazmasında tayini için ultra performanslı sıvı kromatografi ardışık kütle spektrometri (UPLC-MS/MS) yöntemini geliştirmişlerdir. Bu analiz C₁₈ kolonu (50mm × 2.1 mm, 1.7 µm) ve 0.35 ml dk⁻¹'lık akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak % 0.3'lük formik asit içeren su ve asetonitril kullanılmıştır. İnternal standart olarak da nimodipin kullanılmıştır. İyonizasyon tekniği olarak elektrosprey iyonizasyon (ESI) modu kullanılmıştır. Lineer derişim aralığı 0.15-16.0 ng ml⁻¹'dir. Gün içi ve günler arası %BSS değerleri % 15'in altında, doğruluk değeri ise tüm üç kalite kontrol örneği için % bağıl hata ile verilmiş olup % -2.3 ile % 6.9 arasındadır. Yöntem, AML'nin, ağız yoluyla sağlıklı gönüllüler üzerinde kullanması sonrasındaki biyoyararlanım çalışmasında kullanılmıştır.

Dongre ve ark.³⁵ metoprolol süksinat ve AML etkin maddelerinin tabletlerde aynı anda tayini için basit ve kesin bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma

fotodiyot array dedektörü kullanılarak C₁₈ ters faz kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. 1.0 ml dk⁻¹ akış hızına sahip olan yöntem ICH talimatlarına göre spesifik, doğrusal, doğru ve sağlam olduğu gösterilmiştir.

Shentu ve ark.³⁶ AML'nin insan plazmasındaki tayini için katı faz ekstraksiyonu kullanarak bir LC-MS/MS yöntemi kullanmışlardır. Plazmadan (10 mm x 2 mm) HySphere C₈ kolonu ile katı-faz ekstraksiyon kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS yönteminin derişim aralığı 0.10 ile 10.22 ng ml⁻¹ arasında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası doğruluk değerleri % 8 civarındadır. Yöntemin kolay, az zaman alıcı ve diğer numune hazırlama yöntemlerine göre daha hızlı olduğu belirtilmektedir. Yöntem biyoeşdeğerlik analizlerinde kullanılmıştır.

Qi ve ark.³⁷ insan plazması ve idrarında olmesartan ve AML miktarının aynı anda tayini için hassas ve hızlı bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmiştir. Kromatografik ayırım C₁₈ ters faz kolonunda ESI modunda QTrap-5500 kütle spektrometresi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Yöntem seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, stabilite ve matriks etkisi parametreleri ile valide edilmiştir. Bu yöntemin lineer doğrusallığı olmesartan için insan plazması ve idrar için sırasıyla 0.2-500 ng ml⁻¹ ve 4-5000 ng ml⁻¹'dir. AML ise sırasıyla kan ve idrar için 0.1-50 ng ml⁻¹ ve 2-1000 ng ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Analiz süresi sadece iki dakikadır. Yöntem olmesartan ve AML maddelerinin farmakokinetiğini incelemek üzere sağlıklı gönüllülerde uygulanmıştır.

Bathula ve ark.³⁸ AML miktarının insan plazmasında tayini için, hızlı ve hassas bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım C₁₈ (100 x 2.1 mm, i.d, 1.7 µm) kolonunda yapılmıştır.. Hareketli faz 10 mM'lik amonyum asetat tamponu (pH:4.5) ve metanol (20:80 h/h) karışımından oluşmaktadır. Çalışmada 0.2 ml dk⁻¹ akış hızı kullanılmıştır. Çalışmada ondansetron hidroklorit dihidrat internal standart olarak kullanılmıştır. ESI kaynağı ile analiz gerçekleştirilmiştir. Lineer derişim aralığı 0.20-20 ng

ml⁻¹'dir. Kesinlik çalışmasının % BSS değerleri % 15'in altındadır. Yöntemin gözlenebilme sınırı 0.1 ng ml⁻¹ ve miktar tayin alt sınırı ise 0.20 ng ml⁻¹ değerlerinde bulunmuştur. Yöntem, sağlıklı erkek gönüllülerde AML tabletinin kullanımı sonrasında farmakokinetiksel çalışmaya da uyarlanmıştır.

Zhou ve ark.³⁹ AML, atorvastatin ve bunun metabolitleri ortohidrojen atorvastatin ve parahidrojen atorvastatin miktarlarının insan plazmasında pozitif iyon ESI ile birlikte aynı anda analizi için yeni, hassas, basit ve kısa sürede tamamlanan bir ESI-LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Etkin maddeler insan plazmasından sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile alınmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü için metil tertbütül eter ve etil asetat karışımı (50:50, h/h) kullanılmıştır. Kromatografik ayırım C₁₈ (150 mm × 2.0 mm, 5 µm) kolonu üzerinde 6.0 dakika içerisinde, % 0.3 oranında formik asit içeren asetronitril ve amonyumdan oluşan bir hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık AML için 35-10.000 pg ml⁻¹, atorvastatin için 35-25.000 pg ml⁻¹ derişim aralığında sağlanmıştır. Aynı zamanda yöntem 50 erkek gönüllü üzerinde biyoeşdeğerlik çalışması için uygulanmıştır.

Chang ve ark.⁴⁰ AML ve bisoprololün plazmada miktar tayini için yeni ve hassas bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada internal standart olarak klenbuterol kullanılmıştır. AML'nin plazmadan ekstraksiyonu sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS yönteminde Diamonsil C₁₈ kolonu (50 mm× 4.6 mm, 5 µm), metanol-su-formik asit birleşiminden oluşan (75:25:0.01, h/h/h) hareketli faz kullanılmıştır. Yöntemin analiz süresi 3 dk'dır. Yöntemin miktar tayyin sınırı AML ve bisoprolol için 0.2 ng ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi her iki etkin madde için de 0.2-50 ng ml⁻¹ derişim aralığında doğrusaldır. Geliştirilen yöntem Sprague Dawley sıçanlarında, farmakokinetiksel açıdan AML ve bisoprolol çalışmalarına başarıyla uygulanmıştır.

Karra ve ark.⁴¹ insan plazmasında losartan ve aktif metabolitleri ile AML'nin aynı anda tayini için basit, hızlı ve hassas bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada internal standart olarak irbesartan kullanılmıştır. Etkin maddeler insan plazması örneklerinden katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada C₁₈ ters faz kolonu, metanol ve % 0.1 h/h oranındaki formik asit karışımının (85:15, h/h) 1.0 ml dk⁻¹ akış hızıyla hareketli faz olarak kullanılmasıyla yöntem optimize edilmiştir. Lineer derişim aralığı losartan ve aktif metaboliti için 0.5-1000 ng ml⁻¹, AML için ise 0.05-10.1 ng ml⁻¹ derişimde doğrusaldır. Kesinlik ve doğruluk parametreleri hesaplanmış ve kabul edilebilir seviyede olduğu bulunmuştur.

Sirikatitham ve ark.⁴² insan plazmasındaki AML miktarını tayin etmek için, internal standartı tizanidin olan, pozitif iyonizasyon modunda çalışan hassas, spesifik, ESI ile kombine bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. AML plazmadan dietileter/diklorometan (70/30, h/h) karışımıyla sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Analiz C₁₈ ters faz analitik kolonunda, 10 mM'lik amonyum format/metanol/asetonitril (30/50/20, h/h/h) hareketli faz karışımının 1.0 ml dk⁻¹ hızında kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. AML için m/z 409.4, 238.1 ve internal standart için m/z 254.2, 44.1 değerlerine sahip iyonlar seçilmiştir. Plazmada AML'nin lineer derişim aralığı 0.3-15.0 ng ml⁻¹'dir. Çalışmada %BSS % 10'un altında olup plazmadan gerikazanım % 94.87 ile % 102.44 arasında bulunmuştur. LC-MS/MS yöntemi, tek bir dozda (10 mg'lık tablet) sağlıklı gönüllülere oral uygulandıktan sonra biyoeşdeğerlik çalışmasında başarıyla uygulanmıştır.

2.5. HCT ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Abdel-Hay ve ark.⁴³ amiloride (AMD), HCT ve timolol maleat (TIM)'ın aynı anda tayini için iki atane spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Birincisi birlikte türev spektrofotometrisi yöntemini içermektedir. Sıfırıncı ve birinci türev kullanılarak 365 ve

385 nm’de AMD, üçüncü derece türev kullanılarak 265 nm’de HCT ve birinci derece türev kullanılarak 315.4 nm’de TIM saptanmıştır. İkinci yöntem ise spektrum oranları, birinci ve ikinci türev eğrilerinin ölçüm tekniğini içermektedir. Bu yöntemde her bir etkin maddenin miktar tayini iki noktada yapılmaktadır. HCT bölücü olarak kullanıldığında AMD/HCT oranının birinci ve ikinci türevleri alınarak 299.4 ve 311 nm’de AMD saptanmıştır. Bölücü olarak TIM kullanılıp ikinci türev alındığında elde edilen değerler 264.2 ve 290 nm’de HCT derişimi ile orantılıdır. Bölücü spektrum olarak AMD’nin spektrumu kullanıldığında 289.8 nm de alınan birinci türev yardımıyla ve bölücü olarak HCT kullanıldığında 314.8 nm’de alınan birinci türev yardımı ile TIM tayin edilmiştir. Önerilen yöntem, laboratuvar ortamında hazırlanan tabletler ve farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımlar üzerinde uygulanmış, doğruluk ve tekrar edilebilirlik açısından iyi sonuçlar alınmıştır.

Kartal ve ark.⁴⁴ AMD ve HCT’nin eş zamanlı miktar tayini için hızlı, doğru ve kesin bir yöntem olan spektrum oranları türev spektrofotometrisi ve HPLC yöntemlerini tanımlamışlardır. Karışım için yapılan spektrum oranları türev spektrofotometrisinde 285.7 nm’de HCT için 302.5 nm’de de AMD için ölçüm yapılmıştır. İkinci yöntem ise LiChrosorb RP-C₁₈ kolonunun kullanıldığı (5 µm, 20 cm x 4.6 mm) HPLC yöntemidir. 0.025 M o-fosforik asit (pH 3.0’a trietilamin (TEA) ile ayarlanmış), asetonitril (84:16, h/h) hareketli faz olarak 1.2 ml dk⁻¹ akış hızında 278.0 nm’de UV detektör ile sağlanmıştır. Geliştirilen yöntemler farklı oranlarda bu bileşikleri içeren piyasa preparatlarından ve laboratuvar ortamında hazırlanmış karışımlardan elde edilen numunelere uygulanmıştır.

Ferraro ve ark.⁴⁵ AMD, HCT ve TIM’in aynı anda miktar tayininin yapılabilmesi için CLS, PCR ve değiştirilebilir PLS yöntemlerini bu maddelerin UV spektrumlarına (⁰D) ve bu spekturumun (¹D) birinci türevlerine uygulamışlardır. Bu yöntemlerin etkinliği ANOVA testi kullanılmak yoluyla birbirleriyle karşılaştırılmıştır. ⁰D-PCR, 0D-PLS-1, ¹D-PCR ve ¹D-PLS-1 yöntemleri ile tekrar edilebilir ve istatistiksel olarak benzer sonuçları

elde edilmiştir. Dört adet farklı istatistiksel eşdeğerlik basamağı analitlerin sentetik karışımlarına başarıyla uygulanmıştır. İşlem AMD ve HCT’i tek başına içeren tabletlere ve atenolol ve TIM ile karışım haldeki tabletlerine de başarıyla uygulanmıştır.

Ferraro ve ark.⁴⁶ çok değişkenli spektrofotometrik kalibrasyon yöntemini kullanarak AMD ve HCT içeren sentetik karışımların ve tablet numunelerinin miktar tayinini eş zamanlı olarak gerçekleştirmişlerdir. Analitin içerisinde 10:1 oranında bulunan bileşiklerin elektronik absorpsiyon verilerinin hızlı ve doğru ayırımı en küçük kareler (PLS-1) yöntemi ile sağlanmıştır. Bu ayırım sırasında herhangi bir ön işlem gerekmemiş ve herhangi bir maddenin girişimi oluşmamıştır. Yöntem, her iki bileşiğin sentetik karışımları yardımıyla, doğrusal çalışma aralığının doğruluğu ve gün-içi günler-arası kesinlik çalışmaları yapılarak valide edilmiştir. Doğrusal aralık HCT için 21.7-30.4 mg L⁻¹ ve AMD için 1.8-3.0 mg L⁻¹ olarak belirlenmiştir. Önerilen yöntem bu bileşikler içeren farklı farmasötik dozaj formlarından miktar tayininde kullanılmış ve HPLC yöntemi ile oldukça uyumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca ilaç çözünürlük çalışmalarında kullanılan metanol:su ortamında bu maddelerin stabilitesinin nasıl olduğunun anlaşılması için yapılan çalışmaya da başarıyla uygulanmıştır.

Dinc ve ark.⁴⁷ AMD ve HCT içeren farmasötik preparatların absorpsiyon ve türeve dayalı spektrofotometrik çalışmalarına dört farklı kemometrik yöntem olan CLS, ILS, PCR ve PLSR yöntemini uygulamışlardır. 205-395 nm aralığında AMD için 2-10 µg ml⁻¹, HCT için 4-28 µg ml⁻¹ aralığında ve 25 karışım dizaynı noktasından 0. derece ve 1. Derece türev spektrum değerleri yardımıyla kemometrik kalibrasyonlar oluşturulmuştur. Her iki maddenin absorpsiyon ve türev spektrumlarının ölçümüne dayalı önerilen yöntemin istatistiksel karşılaştırmaları yapılmıştır.

Elshanawane ve ark.⁴⁸ AMD ve HCT’nin aynı anda analizini gerçekleştirmek için klortalidonun iç standart olarak kullanıldığı UV dedektörlü bir HPLC yönetimi

geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem bir ters-faz kromatografidir. Hareketli faz 10 mM KH_2PO_4 çözeltisi (pH 4.5):methanol (70:30, h/h) karışımı ve akış hızı 1 mL dk^{-1} olarak optimize edilmiştir. Dedektör 215 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi 10 dakikadır. Yöntem kesinlik, doğruluk, tekrar edilebilirlik ve stabilite açısından valide edilmiştir. Yöntem herhangi bir ön işlem gerektirmeden idrar numunelerine de uygulanmıştır.

Song ve ark.⁴⁹ AMD ve HCT'nin aynı anda tayini için elektrosprey tandem kütle spektrometrik tayine dayanan bir LC yöntem geliştirip validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Numune hazırlanması sırasında proteinleri çöktürmek amacıyla asetonitril kullanmışlardır. Ayırma işlemi gradient elüsyon yöntemi ile Phenomenex Curosil-PFP (250 x 4.6 mm, 5 μm) kolonunda yapılmıştır. Hareketli faz % 0.23 amonyum asetat içeren % 0.15 formik asit çözeltisi ve metanol den oluşmuş ve akış hızı 1.0 mL dk^{-1} olarak belirlenmiştir. İç standart olarak rizatriptan kullanılmıştır. Pozitif m/z 230→171 AMD'i, m/z 270→158 rizatriptanı ve negatif m/z 296→205 HCT'i göstermektedir. AMD ve HCT için miktar tayin sınırı sırasıyla 0.1 ve 1.0 ng mL^{-1} olarak bulunmuştur. Bu değerler bu iki madde için daha önce yayınlanan UV, florometrik ve kütle spektrometrik yöntemlere göre daha düşük değerlerdir. Validasyon parametrelerinden doğruluk ve kesinlik çalışmaları farklı derişimlerde yapılmış ve % 15'in altında bulunmuştur. Bu basit ve duyarlı LC-MS/MS yöntemi AMD ve HCT tabletlerinin sağlıklı gönüllü erkeklerde farmokinetik çalışmasında başarıyla kullanılmıştır.

Lu ve ark.⁵⁰ içinde HCT etkin maddesi de olan on iki adet diüretik etkili ilaç için hızlı, yüksek çözünürlüklü ve etkili bir MS dedektörlü kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. İki adet nötral bileşik dışında on adet diüretik bileşik kapiler elektroforez yöntemiyle 20 kV voltaj uygulamak suretiyle 50 μm çapında ve uzunluğu 48.5 cm olan silika kapiler içinde 40 mM amonyum fosfat tamponu (pH 9.40) içerisinde 6 dakika içinde

ayrılmışlardır. Kapiler elektroforez bir ortogonal elektrosprey ara yüzeyi yardımıyla bir kütle spektrometresine bağlanmıştır. Optimize edilmiş koşullar altında oniki adet diüretik için LOD değeri 13-2.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri ise % 72.4 ile % 118 arasında değişmektedir. İdrar numuneleri 0.22 μm membran filtrelerden geçirildikten sonra doğrudan enjekte edilebilmektedir.

Goebel ve ark.⁵¹ atletlerden alınan idrar numunelerinde diüretiklerin rutin analizi için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde katı faz ekstraksiyon ile elde edilen ekstratlar elektrosprey iyonlaşmalı tandem kütle spektrometri dedektörlü LC cihazına enjekte edilmektedir. Yöntemde her bir örnek tek bir enjeksiyonla ayrılmakta ve yöntem 35 adet diüretik ve ilgili bileşikler saatte beş numune analiz edecek şekilde ayarlanmıştır. İdrar numunelerindeki 100 ng ml^{-1} derişimin altındaki bileşikler tayin edilebilmekte ve geri kazanımları % 80 ve üzerindedir.

Belal ve ark.⁵² klorotiazid, HCT, triklorometiazid, benztiazid, bendroflumetiazid, metilklotiazid etkin maddelerini 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 etkin maddelerin spektrofotometrik tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Bebawy ve ark.⁵³ farmasötik preparatlardaki telmisartan ve HCT'nin miktar tayinleri için dört analitik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemler türev spektrofotometri, spektrum oranları türev yöntemi, ince tabaka kromatografi (İTK) ve spektrofotometridir. Türev yöntemiyle karışımdaki telmisartan ve HCT analizi için sırasıyla 241.6 ve 227.6 nm dalga boylarındaki türev absorbans değerlerinin ölçümleri kullanılmıştır. Spektrum oranları türev yönteminde telmisartan için 242.7 nm'de ve HCT için 274.9 nm'deki sinyal genlikleri kullanılarak kalibrasyonlar elde edilmiştir. İki etkin maddenin İTK ile ayırımından sonra sırasıyla telmisartan ve HCT için 295 ve 225 nm'deki dansiyometrik

ölçümler ile miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Spektroflorimetrik olarak yalnızca karışımdaki telmisartanın analizi gerçekleştirilmiştir.

Prasad ve ark.⁵⁴ metoprolol HCT ve propranolol karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etkin maddelerin miktar tayinlerini 1. ve 2. türev spektrofotometrik yöntemlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada bileşenlerin türev spektrumlarında sıfır noktaları birbirine çok yakın olduğundan bu durumu ortadan kaldırmak için kompensasyon tekniği kullanmışlardır. Bu tayinlerde çalışma aralığı 1. seri HCT için 5 -10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, propranolol için 5-15 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 2. seride 6,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ HCT sabit olmak kaydıyla propranolol için 5-15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ aralığındadır. Bu iki serinin türev absorbans değerleri kullanılarak HCT ve propranololün miktarlarını tayin edilmişlerdir. HCT ve metoprolol karışımında ise HCT için 5-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve metoprolol için 40-60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında çalışmışlardır.

Banoğlu ve ark.⁵⁵ yaptıkları çalışmada tabletlerdeki benazepril hidroklorür ve HCT'nin spektrofotometrik olarak miktar tayinlerini yapmışlar ve sonuçları HPLC yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu çalışmada 239/249 nm'deki absorbans oranını benazepril için ve 269/249 nm'deki absorbans oranlarını HCT'nin regresyon denklemlerinin hesaplanması için kullanmışlardır.

Erk⁵⁶ iki bileşenli karışımlarda HCT, spironolakton, ramiprilin miktar tayinlerini spektrum oranları türev ve Vierordt yöntemleri ile yapmıştır. HCT-ramipril karışımını içeren tabletlerde HCT için 0.8 ve ramipril için 0.7 standart sapma ile Vierordt yöntemini, HCT için 0.3 ve ramipril için 0.9 standart sapma ile spektrum oranları türev yönteminin uygulanabildiği görülmektedir. HCT-spironolakton karışımını içeren tabletlerde Vierordt yöntemi ile HCT için 0.7, spironolakton için 1.1 standart sapma ve spektrum oranları türev spektrofotometrisi ile hidroklorotiazid için 0.5 ve spironolakton için 0.9 standart sapma ile tayinleri gerçekleştirmiştir.

Shaikh ve ark.⁵⁷ dana sütünde bulunan klorotiazid ve HCT'nin miktar tayini için 0.05 M ve pH 3 olan potasyum fosfat tamponu (1:1, h/h) ile asetonitril tetrahidrofurandan ibaret olan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmıştır. Bu etkin maddelerin miktar tayini 225 nm'de dalgaboyu değişebilen dedektör yardımı ile HCT ve klorotiazid için korelasyon katsayısının karesi 0.995 olan lineer regresyon denklemleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir.

Özkan⁵⁸ yaptığı bir kromatografik çalışmada tabletlerde ve insan serumunda bulunan losartan potasyum ve HCT'nin miktar tayinlerini HPLC yöntemi ile yapmıştır. Bu çalışmada ters faz C₁₈ kolonunu ve 0.01 M KH₂PO₄-asetonitril (65:35, h/h) karışımını pH'sını H₃PO₄ ile 3'e ayarlayarak hareketli faz olarak kullanmıştır. Uygulanan yöntemin gözlenebilme ve miktar tayin limitlerini sırasıyla losartan potasyum için 1.02 ng ml⁻¹ ve 3.39 ng ml⁻¹ ve HCT için 4.49 ng ml⁻¹ ve 14.96 ng ml⁻¹ olarak bulunmuştur.

2.6. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi sonucu oluşan kimyasal ve fiziksel değişimleri ve ayrıca kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüşümünü inceleyen bir bilim dalıdır. Elektroanalitik yöntemlerde elektrot-çözelti sistemine bir elektriksel etki uygulanır ve bu etki sonucu sistemin verdiği cevap incelenir.

Elektrokimyasal bir sistemde katot ve anot olmak üzere iki elektrot bulunur. Bir elektrokimyasal hücrede indirgenme reaksiyonunun olduğu elektrot katot, yükseltgenmenin olduğu elektrot ise anottur.

Elektroanalitik yöntemler içinde voltametrik, polarografik potansiyometrik, amperometrik ve konduktometrik yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerde akım, direnç, iletkenlik, potansiyel, elektrik miktarı ve sığa gibi değişkenler ile derişim arasındaki ilişkiler incelenir.³¹

2.6.1. Voltametri

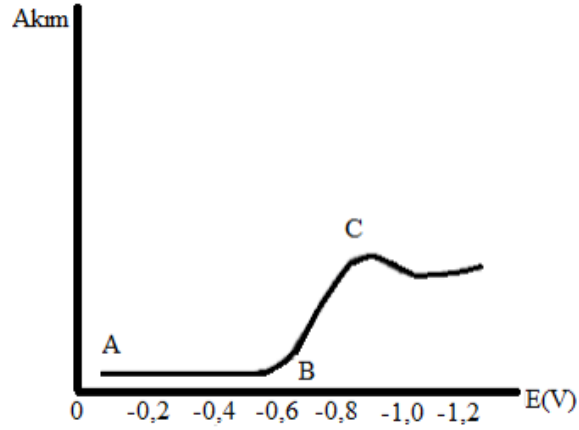
Voltametri yönteminde çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akım ölçülür. Bu bilgilerden yararlanarak analit hakkında bilgi edinilir.

Voltametrde numunenin koyulduğu elektrokimyasal hücreye değiştirilebilen potansiyel uyarma sinyalleri uygulanır ve bu uyarma sinyalleri, yönteme göre karakteristik akım oluşturur. Oluşan elektrokimyasal reaksiyon sonucu çalışma elektrotunda oluşan akıma karşı çalışma elektrotunun potansiyelinin grafiği çizilerek voltamogram alınır. Tipik bir voltamogram Şekil 2.3’de gösterilmiştir.

Şekil 2.3'teki voltamograma göre, başlangıçta (A noktasında) akım çok düşüktür. Safsızlık ve çift tabaka yükleme (elektrot yüzeyi kondansatör gibi davrandığından) sebebiyle A ve B noktaları arasında akım yavaşça yükselir. Bu genellikle zemin akım olarak adlandırılır. B noktasında potansiyel, yükseltgenmiş türlerin indirgenme potansiyeli değerine yaklaşır.

Potansiyel artışı elektronların, elektrottan yükseltgenmiş türe doğru artan bir hızla göç etmesine sebep olur. İndirgenmedeki hız artışı hücredeki akımı da artırır. Bu artış sürekli devam etmez. Şekil 2.3’te görüldüğü gibi C noktasında bir pik ile sonlanır.⁵⁹

Voltametri ve polarografi ilk kez 1954 Çekoslovak farmakopesinde ilaç analizlerinde kullanılmıştır. Polarografi ile saf etkin maddenin yanında çok kompleks bir karışım olsa bile aktif maddelerin analizi hassasiyetle yapılabilir. Analiz esnasında herhangi bir girişim olmadığından analiz başarı ile yapılabilir.⁶⁰



Şekil 2.3. Voltamogram

Pek çok ilaç etkin maddesi ve vücutta bulunan fizyolojik aktif maddeler polarografik veya voltametrik yöntemlere cevap vermektedir.

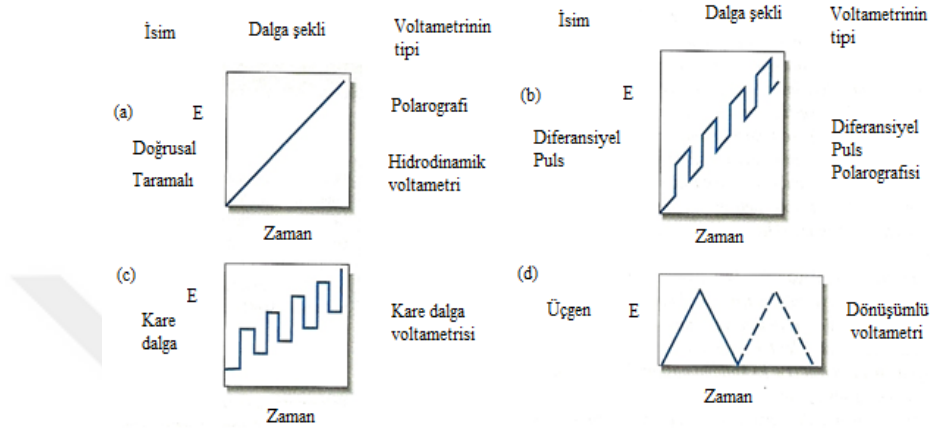
Bu yöntemin diğer analitik yöntemlere üstünlüğü ise; analitlerin ön saflaştırma işlemlerine fazla ihtiyaç olmaması, ucuz olmaları, az miktarda maddenin analiz için yeterli olması, kolay uygulanabilir olmaları, fazla çözücü gerektirmemeleri ve hassas birer yöntem olmalarıdır.^{61,62}

Voltametrik çalışmalarda tablet, şurup, süspansiyon, kapsül, vb. ilaç preparatlarında bulunan etkin maddenin haricindeki diğer katkı maddelerinin çözünmemesinden dolayı genelde elektroaktivite göstermez.

Bundan dolayı farmasötik preparatlarda analiz için herhangi bir ayırma işlemine gerek olmadan elektrokimyasal analizler yapılabilmektedir. Ayrıca bu yöntemlerin diğer bir üstünlüğü de çok pahalı ve az miktardaki ilaç etkin maddelerinin kimyasal analizinde de çok az miktarda numuneyle çalışma imkanı vermektedir.⁶²⁻⁶⁴

2.6.1.1. Voltametrde Uyarma Sinyalleri

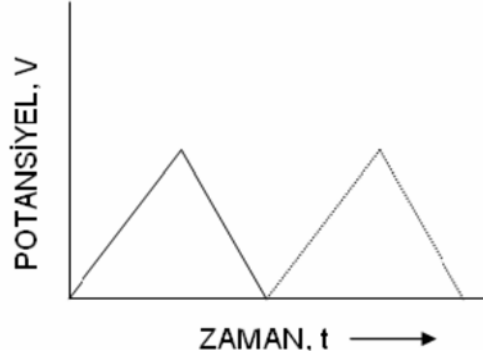
Voltametrde, çalışma elektrotuna elektrokimyasal hücre içinde kontrol edilebilir ve değiştirilebilir bir potansiyel uygulanır. Bunun karşılığında akım ölçülür. Voltametrde en çok kullanılan uyarma sinyallerinden dördü Şekil 2.4'te verilmiştir.⁶⁵



Şekil 2.4. Voltametrde en çok kullanılan uyarma sinyalleri

2.6.1.2. Dönüşümlü Voltametri

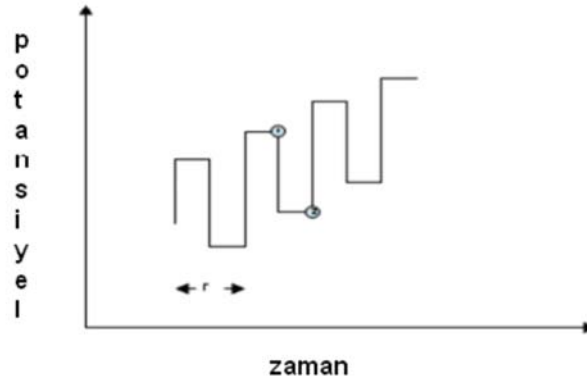
Dönüşümlü voltametri yöntemi nitel analiz ve mekanizma aydınlatmada kullanılan en yaygın elektrokimyasal yöntemdir.⁶⁶ Dönüşümlü voltametri yönteminde çözelti içinde bulunan çalışma elektroduna uygulanan potansiyel polarizasyon dalgasının düzgün bir şekilde değiştirilmesi sonucu oluşan akım-potansiyel davranışını incelenir. Yöntem bu esasa göre çalışır. Dönüşümlü voltametri yönteminde, uygulanan potansiyel önce bir yönde sonra ters yönde taranırken akım ölçülür. Bir dönüşümlü voltametri deneyinde tek bir tam döngü, bir yarım döngü veya birçok döngüler kullanılabilir



Şekil 2.5. Dönüşümlü voltametri potansiyel-zaman grafiği

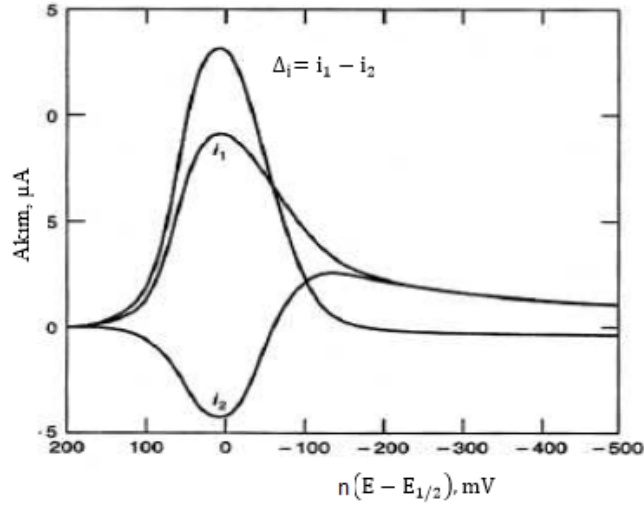
2.6.1.3. Kare Dalga Voltametrisi

Kare dalga voltametri son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls voltametri tekniğidir. Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha az sürede elde edilir.



Şekil 2.6. Kare dalga voltametri potansiyel-zaman grafiği

Şekil 2.6'da kare dalga voltametrisinde elde edilen basamaklı sinyal görülmektedir. Basamaklı sinyalde her basamağın boy ve puls periyodu eşit olup bu yaklaşık 5 ms civarındadır.



Şekil 2.7. Kare dalga voltamogramı

Şekil 2.7’de bir tepkime için alınan kare dalga voltamogramı gösterilmektedir. Kare dalga voltametri yöntemi ile nicel analiz yapılırken 10^{-7} ile 10^{-8} M tayin sınırlarına ulaşılabilirdiğinden çok hassas analizler gerçekleştirilebilir. Bu nedenle farmasötik preparat ve biyolojik örneklerdeki analizlerde çok rahat tercih edilebilmektedir.

2.6.1.4. Diferansiyel Puls Voltametri

Bu yöntem, kapasitif akımın faradayik akımdan ayrılması esnasında kullanılır. Bu yöntemde faradayik akımın ve kapasitif akımın oranları alınır ve faradayik akımın kapasitif akıma oran yüksektir.

Her bir pulsta iki ölçüm alınır. Birinci ölçüm puls uygulamadan hemen önce alınırken ikinci ölçüm ise puls bitmeden alınmalıdır. Net akım, son akım ile ilk akımın farkı alınarak bulunmakta ve yapılan fark alma işlemi kapasitif akımın yok edilmesi olarak bilinmektedir.⁶⁷

2.6.2. Elektroanalitik Yöntemlerin Kullanım Alanları

- Çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilen kantitatif tayinler
- Kalitatif tayinler
- Elektrot reaksiyon mekanizmalarının belirlenmesi
- Oksidasyon basamağı, sitokiyometri, reaksiyon hızı ve yük transferinin belirlenmesi
- Kütle aktarımı ve adsorbsiyon olaylarının incelenmesi
- Standart elektrot potansiyellerinin belirlenmesi
- Kimyasal ve elektrokimyasal reaksiyon denge sabitlerinin belirlenmesi
- Difüzyon katsayılarının belirlenmesi
- Elektrot yüzey alanlarının tespiti
- Korozyon çalışmaları
- Organik veya inorganik materyallerinin ince filmlerinin oluşturulması
- Elektrokimyasal polimerizasyon
- Enerji üretimi
- Elementlerin geri kazanımı

2.7. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Geçerlilik Testi (Validasyon), kalitatif veya kantitatif analizler yapılırken analizin doğru olduğunun anlaşılabilmesi için yapılan testlerin tümüdür.^{68,69}

Yöntemin geçerlilik testi için kullanılan parametreler:

1. Doğruluk
2. Kesinlik
3. Saklanan Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)
4. Doğrusallık
5. Seçicilik

6. Duyarlılık

7. Geri Kazanım

Biyolojik ortamlarda ve farmasötik preparatlarda etkin maddelerin miktarlarının belirlenmesinde geliştirilen yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Bunların nasıl yapılacağı aşağıda özetlenmiştir.

2.7.1. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, bir analitik yöntemde sonuçların gerçek değere veya gerçek olarak kabul edilen değere yakınlığı olarak ifade edilir ve bağıl ya da mutlak hata ile verilir. Kesinlik ise, analitik bir işlemde önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen örnekten birçok örnekleme yapılır ve bu örneklerin herbirinden alınan bir seri ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir ve % BSS (bağıl standart sapma) ile verilir.

i) Güniçi kesinlik: Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin aynı gün içerisinde tekrarlayan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı ($n=6$, n :ölçüm sayısı) % BSS değeri ile verilir.

ii) Günler arası kesinlik: Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin farklı günler (en az altı gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az $n=6$) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsüdür. Bu çalışmayla elde edilen değerler aynı zamanda yöntemin uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.

2.7.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)

Analiz süresince saklanan örneklerin bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Etkin maddeyi içeren kan örneklerinin normal laboratuvar koşullarında nem, sıcaklık, hava ve örneklerin dondurulup-eritilmesi ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bekletilmesi) gibi etkilere maruz kaldığında etkin maddenin bozunmadan sabit kaldığı süre tespit edilmeli ve aynı zamanda elde edilen bilgilerin literatür bilgileri ile de desteklenmesi gerekmektedir.

2.7.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Bir analiz yönteminde en düşük derişimden en yüksek derişime doğru çözeltiler hazırlanır. Analiz gerçekleştirilir. Sonra çözeltilerin derişimine karşı elde edilen cihazın cevabı (absorbans, akım, alan, yükseklik vb.) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisinden regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir.

2.7.4. Duyarlılık

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.

2.7.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Kromatografik çalışmalarda tayin alt sınırı değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının 10 olduğu derişim olarak belirlenir.

2.7.6. Gözlenebilme (Teşhis) Sınırı (LOD)

Bir analitik yöntemin gözlenebilme (teşhis) sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Gözlenebilme sınırında belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade etmeyip sadece bir sınır değeridir. Kromatografik çalışmalarda gözlenebilme sınırı değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının 3 olduğu derişim olarak ifade edilir.

2.7.7. Geri Kazanım

Analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

- Amlodipin (Sigma, Almanya)
- Hidroklorotiyazid (Sigma, Almanya)
- Cardofix Plus (Erzurum, Türkiye)
- Fosforik asit (HPLC grade, Merck, Almanya)
- Borik asit (Sigma, Almanya)
- Deiyonize su (Millipore)
- Azot (N₂) (% 99.9 saflıkta, Erzurum, Türkiye)

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Etüv (Memmert)
- Ultrasonik banyo (Elma LC 30)
- Terazî (Metler Toledo)
- Karıştırıcı (Vorteks, IKA)

3.3. Voltametre Sistemi

- Potansiyostat (Gamry Interface 1000)

3.3.1. Etik Kurul ve Voltametrik Yöntem Şartları

Bu çalışma invitro koşullarda yapılan bir çalışmadır. Bu amaçla 02.11.2017 tarihinde Eczacılık Fakültesi Etik Alt Kurulundan 93722986/56 Nolu kararla tez izni alınmıştır.

Voltametrik ölçümler dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak +0.50 ile +1.50 V potansiyel aralığında Gamry Interface 1000 markalı potansiyostatta gerçekleştirildi. Çalışmada camsi karbon elektrot indikatör elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanıldı. AML ve HCT çözeltilerinin dönüşümlü voltametricde taraması 100 mV tarama hızında gerçekleştirildi. Kare dalga voltametri yönteminde tarama

hızı 20 mV s^{-1} , frekans 25 Hz ve puls genliği 50 mV olarak seçilmiştir. Diferansiyel puls yönteminde ise 50 mV puls genliği değerinde voltamogramlar alınmıştır.

3.3.2. Amlodipin ve HCT için Kare Dalga Voltametri (SWV) Deneyinin Yapılışı

Kare Dalga Voltametri deneylerinde kullanılan elektrokimyasal hücrede, daha önce yapılan CV deneylerinde belirlenen potansiyel penceresinde, Kare Dalga Voltametri yöntemi için gerekli parametreler ayarlandıktan sonra çalışmalar gerçekleştirilmiştir. AML ve HCT stok standart çözeltisinden elde edilen farklı derişimler için kare dalga voltamogramların pik akımları kaydedilmiştir.

3.3.3. Amlodipin ve HCT için Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin Yapılışı

Diferansiyel puls voltametri deneylerinde kullanılan elektrokimyasal hücrede, daha önce yapılan DPV deneylerinde belirlenen potansiyel penceresinde, DPV yöntemi için gerekli parametreler ayarlandıktan sonra çalışmalar gerçekleştirilmiştir. AML'nin stok standart çözeltisinden elde edilen farklı derişimler için voltamogramların pik akımları kaydedilmiştir.

3.3.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

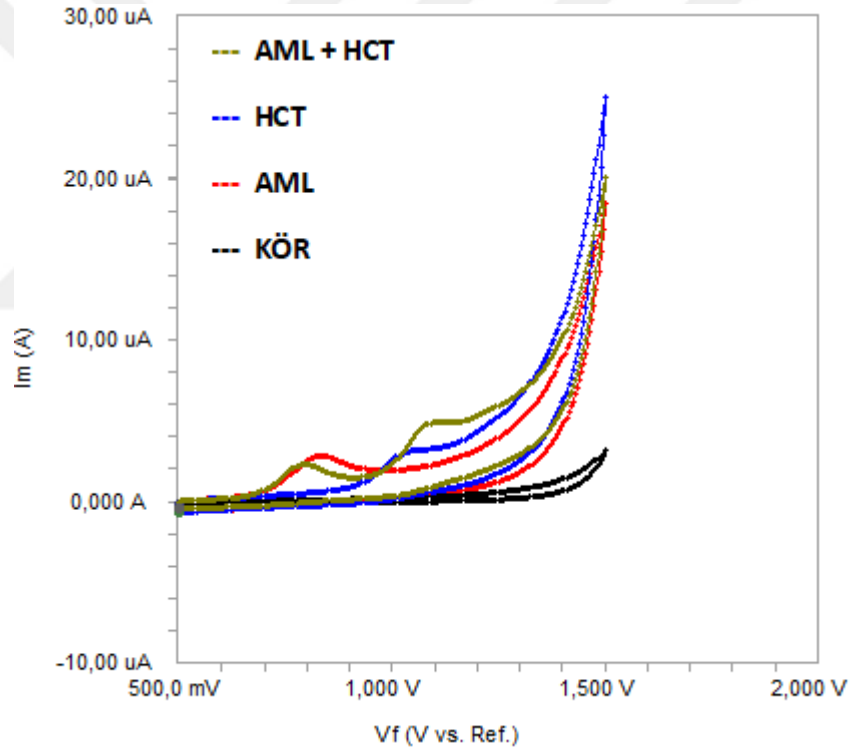
Geliştirilen ve geçerlilik testi (validasyonu) yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla AML ve HCT içeren farmasötik preparatta kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemi ile etkin madde miktar analizi yapıldı. Bu alışma için AML ve HCT içeren *Cardofix Plus* tabletten $25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözelti hazırlandı. Çözeltinin SWV ve DPV voltamogramı alınıp pik akımları okundu. Voltamogram standart çözeltilerin voltamogramları ile karşılaştırıldı

4. BULGULAR

4.1. Voltametri Yöntemi

4.1.1. Dönüşümlü Voltametri (CV) Deneyinin Yapılışı

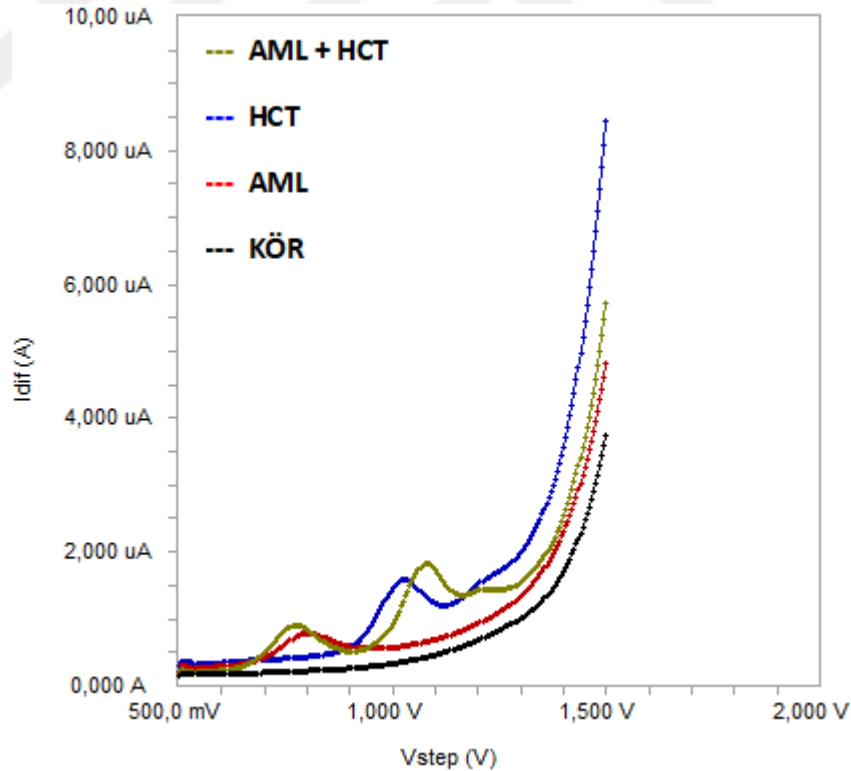
Destek elektrolit olarak seçilen 0.04 M Britton-Robinson (BR) çözeltisinden (pH 5.0) 5 mL alınarak elektrokimyasal hücreye konulmuş ve 3 dakika süre ile azot gazı geçirilmiştir. Çalışmaların yapılacağı sınır potansiyel değerlerinin belirlenmesi için bir takım ön denemeler yapılmış ve çalışma potansiyel penceresinin +0.50 V ile +1.50 V olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).



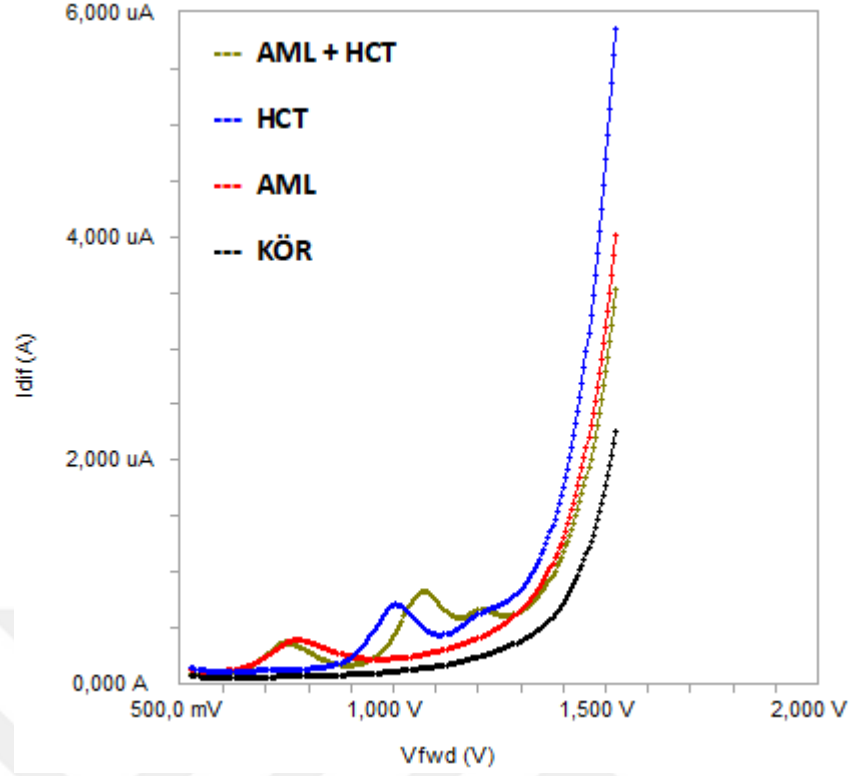
Şekil 4.1. AML ve HCT etkin maddesinin 0.04 M BR içindeki dönüşümlü voltamogramları (AML ve HCT, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$)

Potansiyel sınır değerleri belirlendikten sonra elektrokimyasal çalışma hucresindeki çözücü destek elektrolit içerisine belirlenen derişimlerde AML ve HCT bulunacak şekilde stok çözelti eklemeleri yapılmıştır. Bu eklemeler için mikro pipetler kullanılmıştır. AML ve HCT $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimleri için $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ olan stok çözeltiden alınan bir miktar, n seyreltme yapılarak eklemelerde olası hatalar nlenmiştir. CV çalışmalarında sabit AML ve HCT derişimlerinde tarama hızının pik akımına etkisi çalışılmıştır. Bu alışma için 0.01 V s^{-1} ile 1 V s^{-1} arasındaki tarama hızlarındaki voltamogramlar alınmıştır.

Aynı şekilde HCT ve AML için kare dalga ve diferansiyel puls voltamogramları da alınmış olup; AML için $+0.80 \text{ V}$ ve HCT için $+1.03 \text{ V}$ potansiyelde maksimum kare dalga akımı (şekil 4.2), AML için $+0.75 \text{ V}$ ve HCT için $+1.01 \text{ V}$ potansiyelde maksimum diferansiyel puls akımı gözlenmiştir (şekil 4.3).



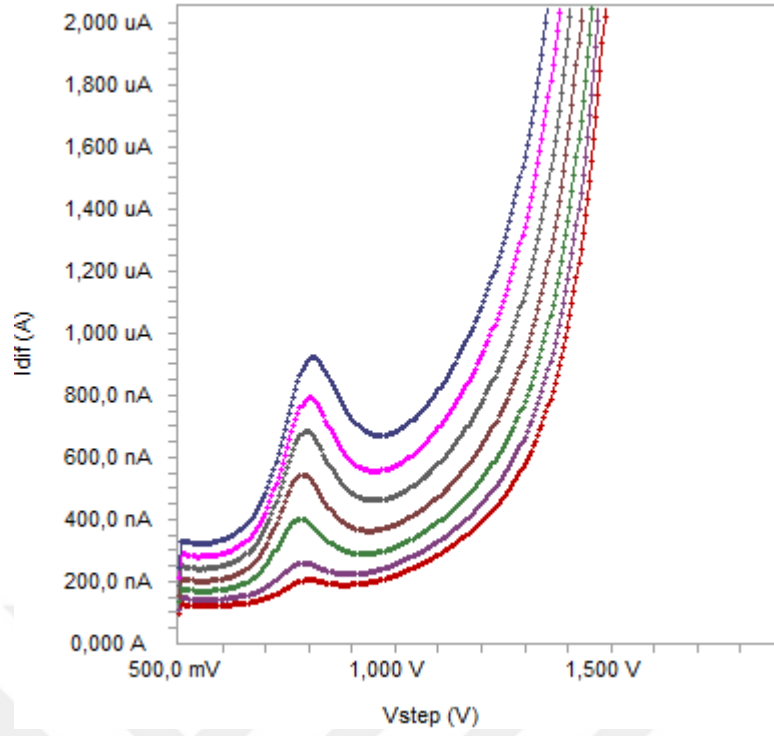
şekil 4.2. AML ve HCT etkin maddesinin 0.04 M BR içindeki kare dalga voltamogramları ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$)



Şekil 4.3. AML ve HCT etkin maddesinin 0.04 M BR içindeki diferansiyel puls voltamogramları ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$)

4.1.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

AML 0.04 M BR çözeltisi içinde $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp 0.04 M BR çözeltisi ile seyreltilerek 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde AML standart çalışma çözeltileri hazırlandı. AML'nin +0.80 Volt potansiyeldeki kare dalga voltamogramları alındı (Şekil 4.4).

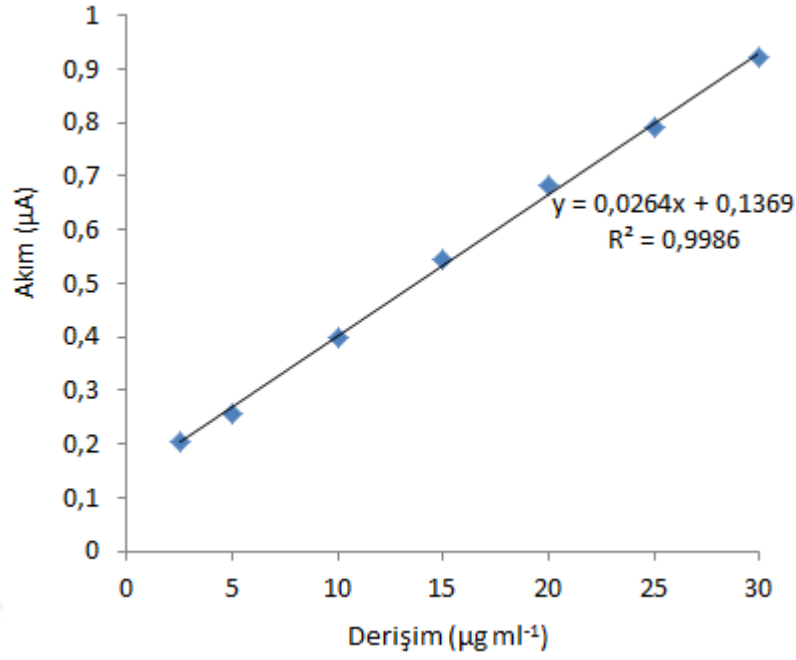


Şekil 4.4. AML etkin maddesinin 0.04 M BR çözeltisindeki kare dalga voltamogramları (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.1.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.1.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

2.5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında AML çözeltilerinin derişimlerine karşı +0.80 V potansiyelde okunan kare pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kare dalga voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi

Kare Dalga Voltametrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1. Kare dalga voltametrik çalışmada AML’ye ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri

Parametreler	Kare Dalga Voltametri
Potansiyel (E: V)	+0.80
Doğrusal aralık (µg ml ⁻¹)	2.5-30
Regresyon doğrusu denklemi	A=0.0264x+0.1369
S _a	1.726
S _b	0.312
Korelasyon katsayısı (r)	0.9986
S _r	1.13x10 ⁻⁴

S_a: Kaymanın standart sapması, S_b: Eğimin standart sapması, S_r: Korelasyon katsayısının standart sapması

4.1.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

AML için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapma (% BSS) değerleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20’den küçük

olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak tespit edildi. Kare Dalga Voltametrik yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0.80 µg ml⁻¹ ve 2.40 µg ml⁻¹ olarak bulundu.

4.1.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimdeki AML çözeltilerinin günüçi ve günler arası (farklı günlerde en az iki gün) pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da bağıl hata ile Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2. Kare dalga voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Günüçi				Günler arası		
Eklenen (µg ml ⁻¹)	Bulunan±std. Sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan ±std. sapma	% bağıl hata	% BSS
7.5	7.67±0.41	2.26	5.34	7.31±0.31	-2.53	4.24
17.5	17.95±0.62	2.57	3.45	16.47±0.81	-5.88	4.92
27.5	27.91±1.09	1.49	3.91	28.11±1.13	2.22	4.02

4.1.2.2.4. Kararlılık (Stabilite)

AML stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için AML'nin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20 °C'de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik akımları ölçüldü ve elde edilen değerler hemen standart çözeltilerin okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.3'de verildi.

Tablo 4.3. AML'nin kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Oda sıcaklığı 24 saat	Oda sıcaklığı 48 saat	4 °C 24 saat	4 °C 48 saat	-20 °C 24 saat	-20 °C 48 saat
10	99.1 $\pm$ 5.72	101.1 $\pm$ 3.51	97.9 $\pm$ 4.46	99.5 $\pm$ 1.41	101.1 $\pm$ 3.51	99.3 $\pm$ 1.79
20	102.1 $\pm$ 4.62	98.5 $\pm$ 4.21	99.1 $\pm$ 5.72	99.7 $\pm$ 1.17	99.5 $\pm$ 1.41	98.7 $\pm$ 2.59
30	98.5 $\pm$ 4.21	102.1 $\pm$ 4.62	98.3 $\pm$ 3.15	99.7 $\pm$ 1.17	97.6 $\pm$ 3.23	99.1 $\pm$ 1.68

4.1.2.2.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. *Cardofix Plus* tablet preparatının sırasıyla 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltileri hazırlanarak pik akımları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine AML'nin 3 farklı derişimdeki standart çözeltileri eklendi ve günüçi ve günler arası (farklı günlerde en fazla iki gün) pik akımları belirlendi. Belirlenen pik akımı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.4'de verildi.

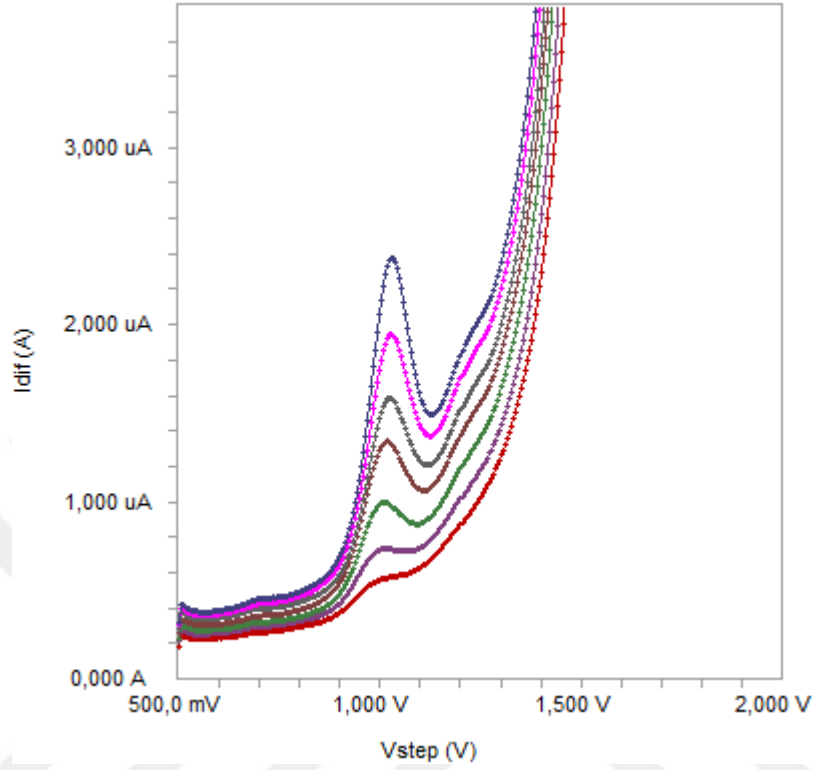
Tablo 4.4. Kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan $\pm$ std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan $\pm$ std. sapma	Geri kazanım	% BSS
<i>Cardofix Plus tablet</i> (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	5	4.9 $\pm$ 0.13	98.0	2.65	5.1 $\pm$ 0.18	102.0	3.53
	15	14.8 $\pm$ 0.27	98.7	1.82	14.6 $\pm$ 0.28	97.3	1.92
	25	24.89 $\pm$ 0.418	99.6	1.68	25.16 $\pm$ 0.597	100.6	2.37

4.2.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

HCT'nin 0.04 M BR çözeltisi içinde 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp 0.04 M BR çözeltisi ile seyreltilerek 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde HCT standart çalışma

çözeltileri hazırlandı. HCT'nin +1.03 Volt potansiyeldeki voltamogramları alındı (Şekil 4.6).

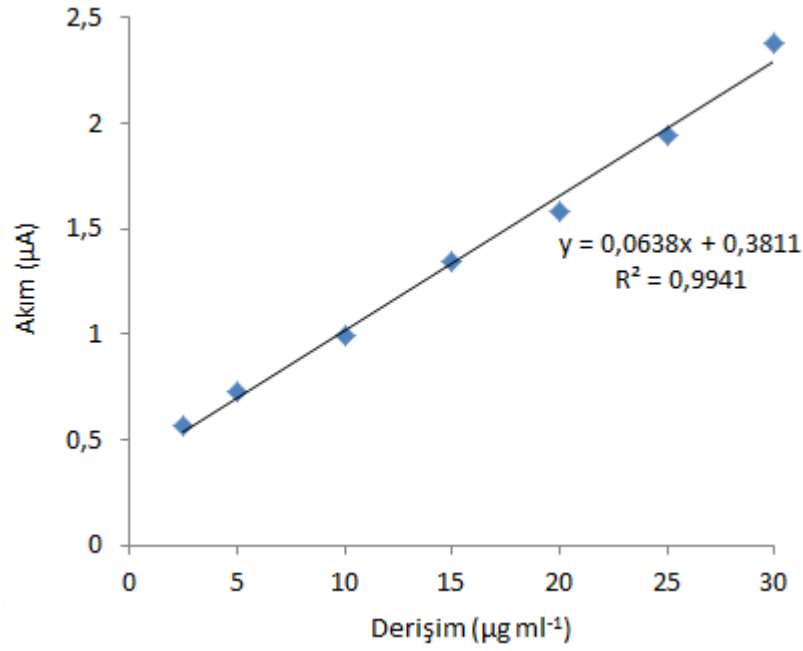


Şekil 4.6. HCT etkin maddesinin 0.04 M BR çözeltisi içindeki kare dalga voltamogramları (2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.2.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.2.2.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

2.5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında HCT çözeltilerinin derişimlerine karşı +1.03 V potansiyelde okunan pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kare dalga voltametik yöntem kalibrasyon eğrisi

Kare Dalga Voltametik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5. Kare dalga voltametik çalışmada HCT’e ait kalibrasyon eğrisinin istatistikî değerleri

Parametreler	Kare Dalga Voltametri
Potansiyel (E: V)	+1.03
Doğrusal aralık (µg ml ⁻¹)	2.5-30
Regresyon doğrusu denklemi	A=0.0638x+0.3811
S _a	0.234
S _b	0.712
Korelasyon katsayısı (r)	0.9941
S _r	1.73x10 ⁻⁴

S_a: Kaymanın standart sapması, S_b: Eğimin standart sapması, S_r: Korelasyon katsayısının standart sapması

4.2.2.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

HCT için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart

sapma (% BSS) değerleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak tespit edildi. Kare Dalga voltametrik yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0.80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ve 2.40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulundu.

4.2.2.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimdeki HCT çözeltilerinin günüçi ve günler arası (farklı günlerde en az iki gün) pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da bağıl hata ile Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.6. Kare dalga voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Günüçi			Günler arası		
	Bulunan $\pm$ std. sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan $\pm$ std. Sapma	% bağıl hata	% BSS
7.5	7.29 $\pm$ 0.19	-2.80	2.61	7.88 $\pm$ 0.23	5.06	2.91
17.5	18.13 $\pm$ 0.30	3.60	1.65	18.60 $\pm$ 0.32	6.29	1.72
27.5	26.86 $\pm$ 0.42	-2.32	1.56	28.04 $\pm$ 0.59	1.96	2.10

4.2.2.2.4. Kararlılık (Stabilite)

HCT stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için HCT'nin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20 $^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik akımları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.7'de verildi.

Tablo 4.7. HCT'nin kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Oda sıcaklığı 24 saat	Oda sıcaklığı 48 saat	4 °C 24 saat	4 °C 48 saat	-20 °C 24 saat	-20 °C 48 saat
10	99.1 $\pm$ 1.68	97.9 $\pm$ 4.46	99.5 $\pm$ 1.43	98.8 $\pm$ 2.56	101.1 $\pm$ 3.52	99.4 $\pm$ 1.79
20	99.8 $\pm$ 1.18	99.1 $\pm$ 5.72	99.7 $\pm$ 1.17	99.3 $\pm$ 5.41	101.1 $\pm$ 3.72	99.6 $\pm$ 1.45
30	98.6 $\pm$ 4.32	101.1 $\pm$ 4.02	97.3 $\pm$ 3.12	102.1 $\pm$ 4.62	98.5 $\pm$ 4.21	97.6 $\pm$ 3.23

4.2.2.2.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. *Cardofix Plus* tablet preparatının sırasıyla 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltileri hazırlanarak pik akımları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine HCT'nin 3 farklı derişimdeki standart çözeltileri eklendi ve günüçi ve günler arası (farklı günlerde en fazla iki gün) pik akımları belirlendi. Belirlenen pik akımı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.8'de verildi.

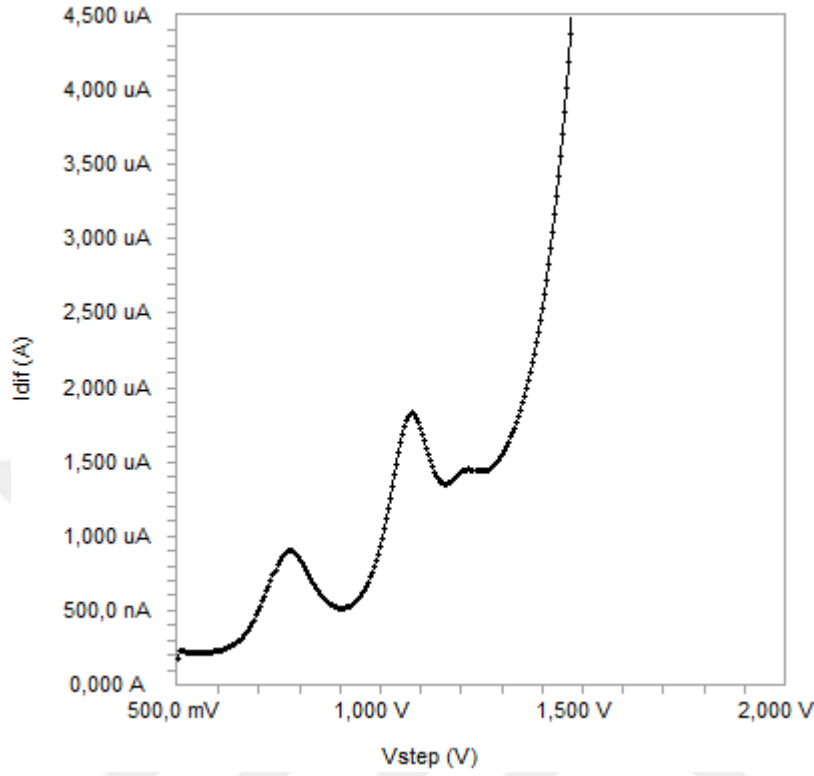
Tablo 4.8. Kare dalga voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan $\pm$ std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan $\pm$ std. Sapma	Geri kazanım	% BSS
<i>Cardofix Plus tablet</i> (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	7.5	7.31 $\pm$ 0.31	97.5	4.24	7.67 $\pm$ 0.41	102.2	5.34
	17.5	16.97 $\pm$ 0.84	96.9	4.94	17.95 $\pm$ 0.62	102.5	3.45
	25	25.68 $\pm$ 0.324	102.7	1.26	26.06 $\pm$ 0.589	104.2	2.26

4.2.2.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testi (validasyonu) yapılan yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla AML ve HCT içeren farmasötik preparatta etkin madde miktar analizi yapıldı. Bu çalışma için AML ve HCT içeren *Cardofix Plus* tabletten 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözelti hazırlandı. Çözeltinin kare dalga voltametrik voltamogramı alınıp pik

akımı okundu. Voltamogram standart çözeltilerin voltamogramları ile karşılaştırıldı ve Şekil 4.8’de verildi.

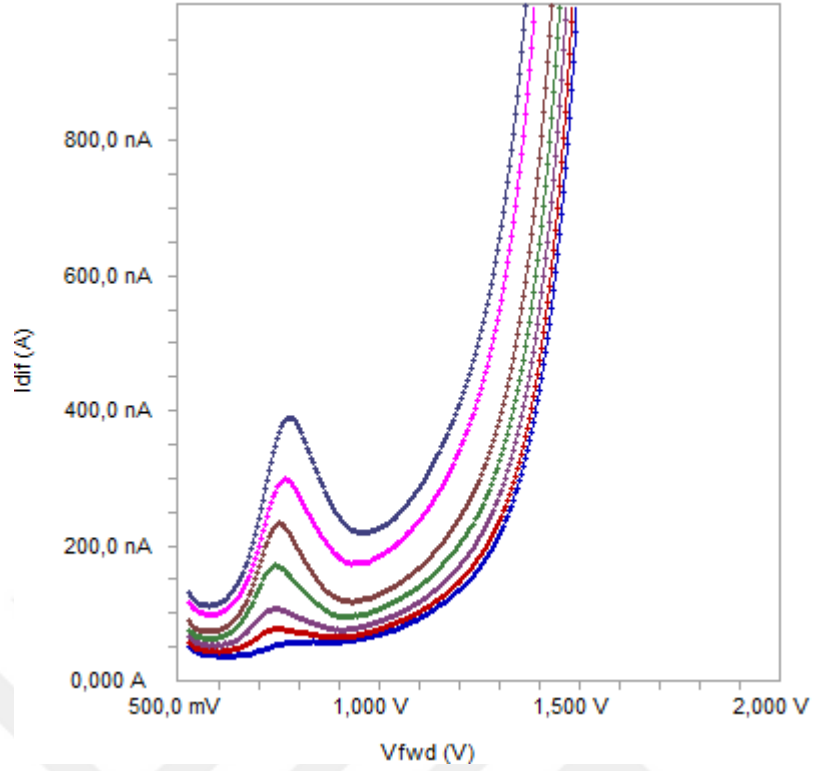


Şekil 4.8. *Cardofix Plus* farmasötik preparatının kare dalga voltametrik voltamogramı ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$)

4.4. Amlodipin İçin Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin Yapılışı

4.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

AML BR tamponu (pH 5) içinde $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp BR tamponu (pH=5) çözeltisi ile seyreltilerek 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde AML standart çalışma çözeltileri hazırlandı. AML +0.75 Volt potansiyeldeki voltamogramları alındı (Şekil 4.9).



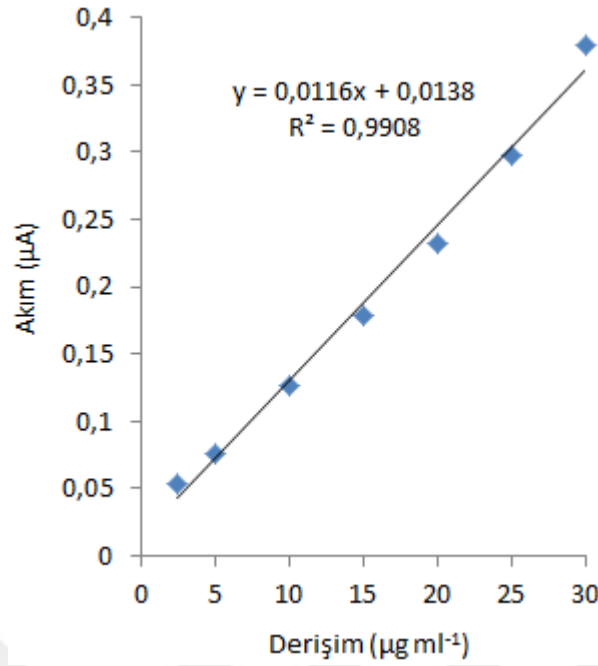
Şekil 4.9. AML etkin maddesinin BR tamponu ortamında (pH 5) diferansiyel puls voltamogramları ($2.5, 5, 10, 15, 20, 25$ ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ $\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.4.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

$2.5\text{-}30 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında AML çözeltilerinin derişimlerine karşı $+0.75 \text{ V}$ potansiyelde okunan pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.10).

Diferansiyel puls voltametrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.9’da verildi.



Şekil 4.10. Diferansiyel puls voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.9. Diferansiyel puls voltametrik çalışmada AML'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistikî değerleri

Parametreler	Diferansiyel Puls Voltametri
Potansiyel (E: V)	+ 0.75
Doğrusal aralık (µg ml ⁻¹)	2.5-30
Regresyon doğrusu denklemi	A=0.0116x+0.0138
S _a	0.512
S _b	0.143
Korelasyon katsayısı (r)	0.9908
S _r	1.75x10 ⁻⁴

S_a: Kaymanın standart sapması, S_b: Eğimin standart sapması, S_r: Korelasyon katsayısının standart sapması

4.4.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

AML için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapma (% BSS) değerleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı

değeri olarak tespit edildi. Diferansiyel puls voltametrik yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla $0.80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $2.40 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulundu.

4.4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimdeki HCT çözeltilerinin günüçi ve günler arası (farklı günlerde en az iki gün) pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da bağıl hata ile Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10. Diferansiyel puls voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Günüçi				Günler arası		
Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan $\pm$ std. sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan $\pm$ std. sapma	% bağıl hata	% BSS
7.5	7.29 $\pm$ 0.19	-2.80	2.61	7.88 $\pm$ 0.23	5.06	2.91
17.5	18.60 $\pm$ 0.32	6.29	1.72	18.13 $\pm$ 0.30	3.60	1.65
27.5	27.42 $\pm$ 0.88	-0.29	3.20	27.64 $\pm$ 0.93	0.51	3.36

4.4.2.4. Kararlılık (Stabilite)

AML stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için HCT'nin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20°C 'de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik akımları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.11'de verildi.

Tablo 4.11. AML'nin diferansiyel puls voltametik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Oda sıcaklığı 24 saat	Oda sıcaklığı 48 saat	4 °C 24 saat	4 °C 48 saat	-20 °C 24 saat	-20 °C 48 saat
10	99.3 $\pm$ 3.12	98.76 $\pm$ 3.216	100.1 $\pm$ 1.020	98.70 $\pm$ 0.264	97.4 $\pm$ 1.25	101.2 $\pm$ 3.14
20	98.09 $\pm$ 4.507	101.2 $\pm$ 3.62	98.6 $\pm$ 3.61	98.57 $\pm$ 0.214	100.8 $\pm$ 2.034	99.30 $\pm$ 0.094
30	103.0 $\pm$ 1.228	99.18 $\pm$ 1.234	103.7 $\pm$ 0.076	101.5 $\pm$ 0.096	102.9 $\pm$ 0.064	101.4 $\pm$ 4.12

4.4.2.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. *Cardofix Plus* tabletten 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltileri hazırlanarak pik akımları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine AML'nin 3 farklı derişimdeki standart çözeltileri eklendi ve günüçi ve günler arası (farklı günlerde en fazla iki gün) pik akımları belirlendi. Belirlenen pik akımı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.12'de verildi.

Tablo 4.12. Diferansiyel puls voltametik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan $\pm$ std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan $\pm$ std. sapma	Geri kazanım	% BSS
<i>Cardofix Plus tablet</i> (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	5	4.9 $\pm$ 0.13	98.0	2.65	5.1 $\pm$ 0.22	102.0	4.31
	15	14.8 $\pm$ 0.27	98.7	1.82	14.7 $\pm$ 0.34	98.0	2.31
	25	25.4 $\pm$ 0.92	101.6	3.62	25.1 $\pm$ 0.84	100.4	3.34

4.5. Hidroklorotiyazid İçin Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Deneyinin

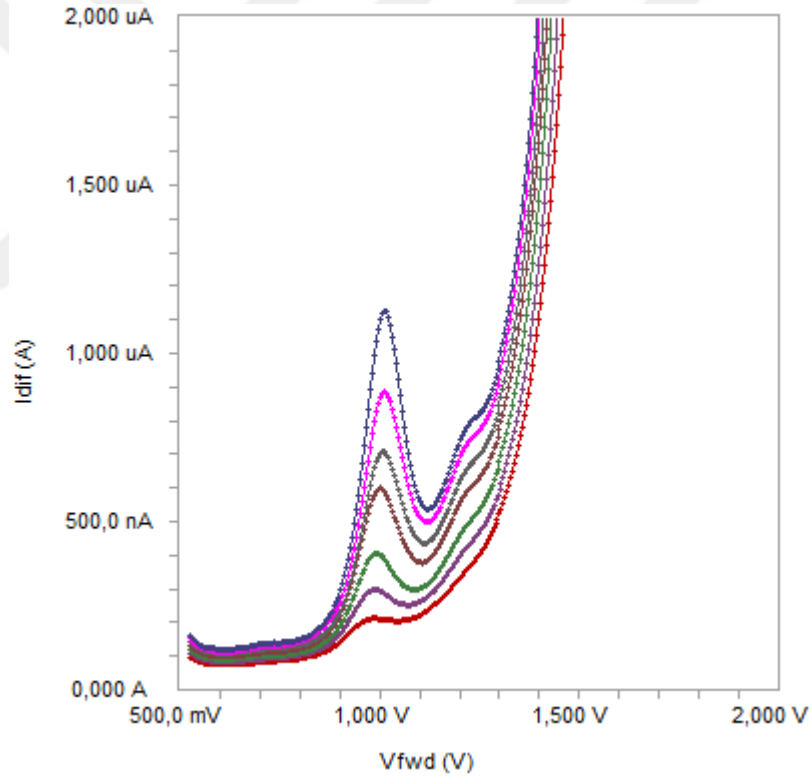
Yapılışı

Diferansiyel puls voltametri deneylerinde kullanılan elektrokimyasal hücrede, daha önce yapılan DPV deneylerinde belirlenen potansiyel penceresinde, DPV yöntemi için gerekli parametreler ayarlandıktan sonra çalışmalar gerçekleştirilmiştir. HCT'nin stok

standart çözeltisinden elde edilen farklı derişimler için voltamogramların pik akımları kaydedilmiştir.

4.5.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

HCT BR tamponu (pH 5) içinde $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp BR tamponu (pH 5) çözeltisi ile seyreltilerek 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişimlerde HCT standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Hidroklorotiyazidin +1.01 Volt potansiyeldeki voltamogramları alındı (Şekil 4.11).

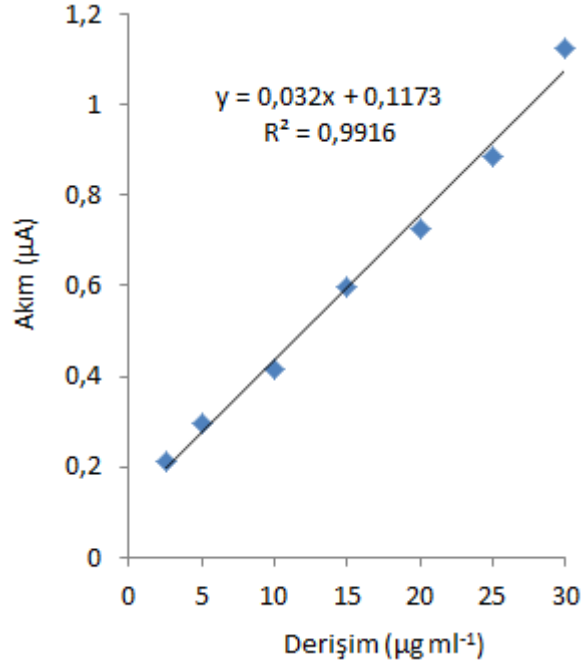


Şekil 4.11. AML etkin maddesinin BR tamponu ortamında (pH 5) diferansiyel puls voltamogramları ($2.5, 5, 10, 15, 20, 25$ ve $30 \mu\text{g ml}^{-1}$)

4.5.2. Diferansiyel Puls Voltametri Yönteminin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

2.5-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında HCT çözeltilerinin derişimlerine karşı +1.01 V potansiyelde okunan pik akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Diferansiyel puls voltametrik yöntem kalibrasyon eğrisi

Diferansiyel puls voltametrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.13’de verildi.

Tablo 4.13. Diferansiyel puls voltametrik çalışmada HCT'e ait kalibrasyon eğrisinin istatistiki değerleri

Parametreler	Diferansiyel Puls Voltametri
Potansiyel (E: V)	+1.01
Doğrusal aralık ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	2.5-30
Regresyon doğrusu denklemi	$A=0.032x+0.1173$
S_a	0.519
S_b	1.246
Korelasyon katsayısı (r)	0.9916
S_r	1.72×10^{-4}

S_a : Kaymanın standart sapması, S_b : Eğimin standart sapması, S_r : Korelasyon katsayısının standart sapması

4.5.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

HCT için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin yüzde bağıl standart sapma (% BSS) değerleri belirlendi. Yüzde bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak tespit edildi. Diferansiyel puls voltametrik yöntemin gözlenebilme sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla $0.80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $2.40 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulundu.

4.5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı derişimdeki HCT çözeltilerinin günüçi ve günler arası (farklı günlerde en az iki gün) pik akımları üç kez okundu. Okunan değerlerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası kesinliği yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da bağıl hata ile Tablo 4.14'da verildi.

Tablo 4.14. Diferansiyel puls voltametrik yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Günüçi				Günler arası		
Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan $\pm$ std. sapma	% bağıl hata	% BSS	Bulunan $\pm$ std. sapma	% bağıl hata	% BSS
7.5	7.69 $\pm$ 0.25	2.53	3.25	7.79 $\pm$ 0.34	3.86	4.36
17.5	16.81 $\pm$ 0.71	-3.94	4.22	18.42 $\pm$ 0.77	5.25	4.18
27.5	27.18 $\pm$ 1.09	-1.16	4.01	27.23 $\pm$ 1.29	-3.98	4.74

4.5.2.4. Kararlılık (Stabilite)

HCT stok ve standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için HCT'nin üç farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20 $^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik akımları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.15'de verildi.

Tablo 4.15. HCT'nin diferansiyel puls voltametrik yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Oda sıcaklığı 24 saat	Oda sıcaklığı 48 saat	4 $^{\circ}\text{C}$ 24 saat	4 $^{\circ}\text{C}$ 48 saat	-20 $^{\circ}\text{C}$ 24 saat	-20 $^{\circ}\text{C}$ 48 saat
10	99.7 $\pm$ 1.17	99.5 $\pm$ 1.41	98.7 $\pm$ 2.59	99.5 $\pm$ 1.41	97.6 $\pm$ 3.23	99.1 $\pm$ 1.68
20	99.7 $\pm$ 1.17	102.3 $\pm$ 4.12	101.4 $\pm$ 5.06	99.1 $\pm$ 5.72	102.1 $\pm$ 4.62	98.3 $\pm$ 3.15
30	98.5 $\pm$ 4.21	99.6 $\pm$ 5.84	99.1 $\pm$ 3.52	102.1 $\pm$ 4.62	98.3 $\pm$ 3.22	102.3 $\pm$ 3.72

4.5.2.5 Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. *Cardofix Plus* tabletten 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltileri hazırlanarak pik akımları okundu. Sonra bu çözeltiler üzerine HCT'nin 3 farklı derişimdeki standart çözeltileri eklendi ve günüçi ve günler arası (farklı günlerde en fazla iki gün) pik akımları belirlendi.

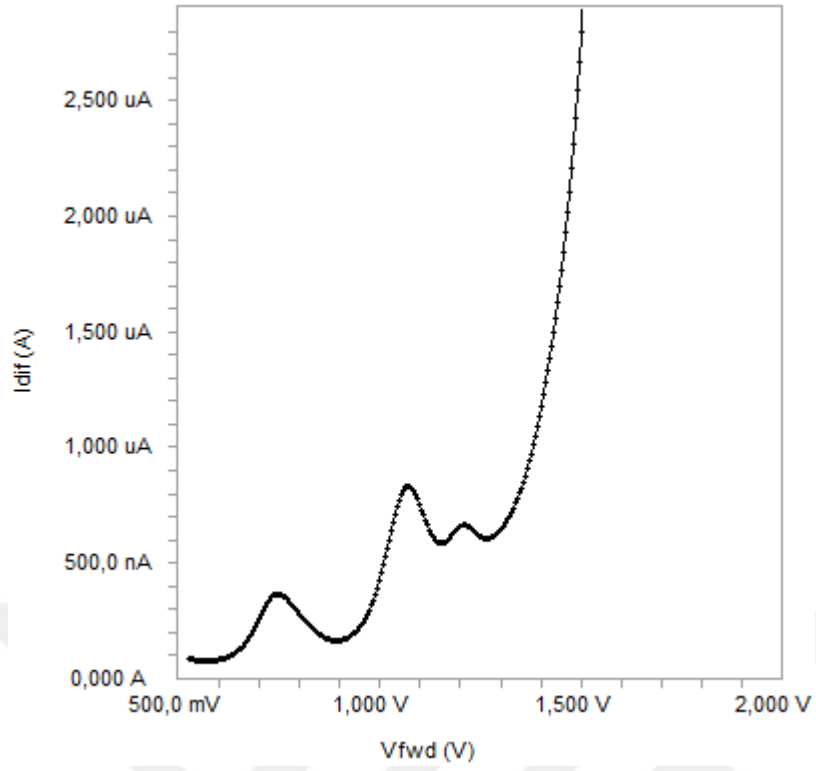
Belirlenen pik akımı değerleri aynı derişimdeki standart çözeltilerinin pik akımı değerleriyle kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.16’da verildi.

Tablo 4.16. Diferansiyel puls voltametrik yöntemle belirlenen farmasötik preparatın günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

Preparat	Günüçi				Günler arası		
	Eklenen ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Bulunan $\pm$ std. sapma	Geri kazanım	% BSS	Bulunan $\pm$ std. sapma	Geri kazanım	% BSS
<i>Cardofix Plus tablet</i> (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	5	4.8 $\pm$ 0.20	96.0	4.17	5.2 $\pm$ 0.21	104.0	4.04
	15	14.5 $\pm$ 0.29	96.7	2.00	14.6 $\pm$ 0.28	97.3	1.92
	25	25.2 $\pm$ 0.63	100.8	2.50	25.3 $\pm$ 1.02	101.2	4.03

4.5.2.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testi (validasyonu) yapılan yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla AML ve HCT içeren farmasötik preparatta etkin madde miktar analizi yapıldı. Bu çalışma için AML ve HCT içeren *Cardofix Plus* tabletten 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişimde çözeltili hazırlandı. Çözeltinin DPV voltamogramı alınıp pik akımı okundu. Voltamogram standart çözeltilerin voltamogramları ile karşılaştırıldı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Cardofix Plus* farmasötik preparatının diferansiyel puls voltametrik voltamogramı ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$)

5. TARTIŞMA

Analitik kimya, kimyasal analizle uğraşan bir bilim dalıdır. Analitik kimyada herhangi bir maddeyi analiz etmek için kullanılacak analitik yöntemlerin üstünlükleri ve sınırlamaları hakkında yeteri kadar bir bilgi donanımına ve iyi bir karar verme yetisine sahip olmak gerekir. Ayrıca analizi yapılacak madde ile ilgili iyi bir literatür taramasının yapılmış olması da gerekmektedir. Aslında analitik bir yöntemin nasıl seçileceği konusunda net bir şey söylemek mümkün değildir; çünkü laboratuvar koşullarına bağlı olarak kullanılacak yöntemler değişebildiğinden dolayı her zaman en iyi yol sadece bir tane olamayabilir. Koşullara bağlı olarak kullanılacak yöntemler değişebilmektedir. Bundan dolayı analitik kimya çalışmaları çok büyük bir çeşitlilik arz eder.

İlaç analizlerinde kullanılacak yöntem seçimi analizin gerçekleştirildiği ortama (farmasötik preparat veya biyolojik materyal) ve laboratuvar koşullarına göre yapılmaktadır. Bir analiz için analitik yöntem geliştirildikten sonra bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğrusal aralık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, tayin alt sınırı, geri kazanım ve stabilite parametreleri incelenerek yöntemin geçerlilik testinin (validasyonunun) yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada AML ve HCT ilaç etkin maddelerinin öncelikle elektrokimyasal davranışı, dönüşümlü voltametri yöntemi ile tersinirlik ve adsorpsiyon özellikleri gibi özelliklerinin incelenmesi amaçlandı. Bu düşünceyle derişim, pH, tarama hızı gibi deneysel parametreler değiştirilerek, en uygun deneysel koşullar belirlenmiş ve bu koşullarda nicel tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Genel olarak bütün elektrokimyasal yöntemlerde potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunur ve bu parametreler yöntemin adını belirler.⁵⁹

Voltametrizde deneyler üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirilmektedir. Üç elektrottan birisi zamanla potansiyeli değiştirilen indikatör elektrot veya çalışma elektrotudur.⁶⁰

Voltametrizde indikatör elektrot olarak, platin, paladyum, altın, civa, camsı karbon elektrot gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Referans elektrotun potansiyeli deney süresince sabit kalır. Günümüzde referans elektrot olarak genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrot kullanılır. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt veya yardımcı elektrottur. Karşıt elektrot olarak ise genellikle Pt tel kullanılır.⁶¹

Voltametrizde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin yükseltgenmesi veya indirgenmesi sonucunda gerçekleşir. Yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım ve indirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım denilmektedir.

AML ve HCT etkin maddeleri için yapılan literatür araştırmasında miktar tayinine yönelik UV dedektörlü HPLC, LC-MS, LC-MS/MS gibi kromatografik yöntemlere ulaşılmıştır.

Voltametrik analizde katı elektrotlarla yapılan çalışmalardaki en önemli problem maddelerin yüzeyde tutulmaları nedeniyle elektrot yüzeyinin kolayca temizlenememesi ve bu nedenle tekrar edilebilirliğin kötü olmasıdır. Bunun için zımpara ile veya alümina ile parlatma veya elektrokimyasal ön işlemler yapılmaktadır.⁴⁹ Bu engeli ortadan kaldırabilmek için modifiye elektrotlar veya özellikleri değiştirilerek geliştirilmiş elektrot dizayn çalışmalarının yapılabilmesi sağlanmıştır.

AML ve HCT'nin elektrokimyasal davranışlarını incelemekten önce, 0.04 M Britton-Robinson (BR) ortamı için potansiyel penceresi belirlendi. Bu amaçla, 0.04 M BR ortamında 50 µg ml⁻¹ olarak hazırlanan AML ve HCT çözeltilerinin dönüşümlü voltamogramı alındı ve Şekil 4.1'de verildi. Şekil 4.1'den de görüleceği gibi +0.50 V ile +1.50 V aralığında çözücü sistemine ait herhangi bir indirgenme-yükseltgenme pikine

rastlanmadı. Bu nedenle, çalışmaya uygun potansiyel penceresinin +0.50 V ile +1.50 V olarak seçilmesine karar verildi. 0.04 M BR ile hazırlanan AML ve HCT çözeltilerinin, 100 m Vs⁻¹ tarama hızında, +0.50 V ile +1.50 V potansiyel aralığında camı karbon elektrot kullanılarak alınan dönüşümlü voltamogramı Şekil 4.1’de görülmektedir.

Şekil 4.1’ de elektrokimyasal davranışı incelenen AML ve HCT’e ait elde edilen voltamogramda, bir anodik pik gözlenirken katodik pike rastlanmadı. Asidik ortamda anodik pik potansiyeli AML için +0.80 V, HCT için +1.03 V’dur. Voltamogramlarda bir katodik pikin gözlenmemesi, AML ve HCT’nin yükseltgenmesinin tersinmez olabileceğinin bir göstergesidir.

AML ve HCT’nin elektrot yüzeyine adsorplanıp adsorplanmadığının belirlenmesi için dönüşümlü voltametri yöntemi kullanıldı. AML ve HCT’nin elektrot yüzeyine adsorbe olup olmadığı farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları alınarak pik akımlarının tarama hızıyla değişiminden yararlanıldı.

Bu amaçla log *ip*-log *v* grafikleri çizildi. Bilindiği gibi, difüzyon dikate alınarak türetilen ve dönüşümlü voltamogramdaki pik akımını veren Randless-Sevcik eşitliğinden, log *ip* ve log *v* arasında, eğimi 0.5 olan bir doğru elde edilir.

Maddenin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu söz konusu ise, bu bağıntıdan ve dolayısıyla 0.5’den sapmalar meydana gelir ve genellikle bu durumda grafiklerin eğimi 0.5’den büyük olur.⁶² Yapılan çalışmada çizilen log *ip* ve log *v* arasındaki grafikte eğimin AML için 0.531 ve HCT için 0.541 olması difüzyon kontrollü mekanizma yanında AML ve HCT’nin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu da söz konusudur.

Kare dalga voltametri yönteminde +0.80 V potansiyeldeki 2.5-30 µg ml⁻¹ derişime sahip AML standart çözeltilerinin voltamogramları alındı (Şekil 4.4). Ayrıca yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığında (2.5-30 µg ml⁻¹) AML çözeltisi derişimine karşı okunan pik akımları şiddeti değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde

edildi. Voltametri yönteminin kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden regresyon doğrusu denklemi ve korelasyon katsayısı (r) sırasıyla $y=0.0264x+0.1369$ (y: Pik akım şiddeti, x: derişim) ve 0.9986 olarak, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) değeri $0.80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise $2.40 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası kesinlik belirlenmesinde yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk belirlenmesinde bağıl hata değerleri sırasıyla % 5.34 ve % 5.88'den küçük olarak tespit edildi. Yöntemin uygulaması AML ve HCT içeren farmasötik preparatlardan *Cardofix Plus* tablette miktar analizi yapılarak gerçekleştirildi. Yöntemin farmasötik preparattan geri kazanım değerleri % 97.3 ile % 102 arasında olduğu belirlendi.

HCT için geliştirilen kare dalga voltametri yönteminde ise; +1.03 V potansiyelde $2.5\text{-}30 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişim aralığında okunan kare dalga voltamogramlarının pik akım şiddetleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi üretildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden elde edilen regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı sırasıyla $y=0.0638x+0.3811$ ve $r^2=0.9941$ olarak bulunmuştur. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $0.80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $2.40 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Güniçi ve günler arası %BSS ve % bağıl hata değerleri sırasıyla % 5.06 ve % 6.29 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin uygulanması AML ve HCT içeren farmasötik preparatlardan *Cardofix Plus* tablette miktar analizi yapılarak geliştirildi. Yöntemin farmasötik preparattan geri kazanım değerleri %96.9 ile %102.7 arasında olduğu belirlendi.

Diferansiyel puls voltametri yönteminde +0.75 V potansiyeldeki $2.5\text{-}30 \mu\text{g ml}^{-1}$ derişime sahip AML standart çözeltilerinin voltamogramları alındı (Şekil 4.9). Ayrıca yöntemin doğrusal olduğu derişim aralığında ($2.5\text{-}30 \mu\text{g ml}^{-1}$) AML çözeltileri derişimine karşı okunan pik akımları şiddeti değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Voltametri yönteminin kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden regresyon doğrusu denklemi ve korelasyon katsayısı (r) sırasıyla $y=0.0116x+0.0138$ (y: Pik akım

şiddeti, x: derişim) ve 0.9908 olarak, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0.80 µg ml⁻¹ ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise 2.40 µg ml⁻¹ olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası kesinlik belirlenmesinde yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk belirlenmesinde bağıl hata değerleri, sırasıyla % 3.36 ve % 6.29'dan küçük olarak tespit edildi. Yöntemin uygulaması AML ve HCT içeren farmasötik preparatlardan *Cardofix Plus* tablette miktar analizi yapılarak gerçekleştirildi. Yöntemin farmasötik preparattan geri kazanım değerleri % 98 ile % 102 arasında olduğu belirlendi.

HCT için geliştirilen diferansiyel puls voltametri yönteminde ise; +1.01 V potansiyelde 2.5-30 µg ml⁻¹ derişim aralığında okunan diferansiyel puls voltamogramlarının pik akım şiddetleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi üretildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden elde edilen regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı sırasıyla $y=0.032x+0.1173$ ve $r^2=0.9916$ olarak bulunmuştur. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.80 µg ml⁻¹ ve 2.40 µg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Güniçi ve günler arası %BSS ve % bağıl hata değerleri sırasıyla % 4.74 ve % 5.25 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin uygulanması AML ve HCT içeren farmasötik preparatlardan *Cardofix Plus* tablette miktar analizi yapılarak geliştirildi. Yöntemin farmasötik preparattan geri kazanım değerleri %96.7 ile %104 arasında olduğu belirlendi.

Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlardan geri kazanım değerleri de oldukça yüksektir. Bu yöntemlerin başka bir avantajı da herhangi bir ön zenginleştirme, ekstraksiyon veya uzun bir numune hazırlama işlemine gerek duyulmadan doğrudan ölçüm yapılabilmesine izin vermesidir. Bu nedenle ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri başarıyla uygulanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, AML ve HCT etkin maddesinin standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda aynı anda miktar tayini için literatürdeki yöntemlere alternatif olacak kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemleri geliştirilip geçerlilik testi yapıldı.

Geliştirilen bu yöntem hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu geçerlilik testi ile gösterildiğinden dolayı yöntemin farmasötik preparatlarda AML ve HCT'nin miktar tayini için uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ileriki çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Bunlar;

Hipertansiyon hastalığında kullanılan ilaçların analizleri için kromatografik sistemler pahalı organik solvanları kullanırken, geliştirilen yöntemlerde minimum solvan sarfiyatı bulunmaktadır. Bunun için ön zenginleştirme, ekstraksiyon veya türevlendirme gibi basamaklara ihtiyaç duyulmadan kare dalga ve diferansiyel puls voltametri yöntemi ile direkt ölçüm yapılmasıyla literatürdeki diğer yöntemlere alternatif olabilir. Bu anlamda yapılan tez özgün bir çalışmadır.

Ayrıca yürütülen araştırmanın bilimsel katkısı ve pratik sonuçları şunlardır:

- Seçilen AML ve HCT etkin maddelerinin yükseltgenme ve indirgenme mekanizması aydınlatılmış, böylece bu etkin maddelerin vücutta nasıl bir mekanizma ile metabolize olduğu hakkında in vitro olarak bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır.
- AML ve HCT etkin maddesinin ileride insan plazmasında tayini için önerilecek ekonomik ve rutin analizlere uygulanabilecek özgün bir yöntem geliştirilmiş oldu. Bu nedenle özellikle tıp ve eczacılık alanlarında rutin analizlerin yapılması kolaylaşacak ve çok sayıda analiz kısa sürede yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. RxMedia Pharma. İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2014:13-17.
2. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons, Vol. 2, 4rd ed, *Pharmaceutical Press*, London, 2011:127-136.
3. Yücesoy C, Gölcü A. Spectrophotometric determination of amlodipine besylate in tablets with trinitrobenzene sulphonic acid. *J FacPharm Ankara*, 2001, 30:1-8.
4. Jain N, Jain R, Jain A, Sharad P, Jain DK. Spectrophotometric method development and validation for quantitative estimation of amlodipine besylate in bulk drug and their dosage forms by using hydrotropic agent. *Eurasian J Anal Chem*, 2010, 5:212-217.
5. Abdel-Wadood HM, Mohamed NA, Mahmoud AM. Validated spectrofluorometric methods for determination of amlodipine besylate in tablets *Spectrochim Acta*, 2008, 70:564-570.
6. Prasad CVN, Saha RN, Parimoo P. Simultaneous determination of amlodipine, enalapril maleate and amlodipine, lisinopril in combined tablet preparations by derivative spectrophotometry. *Pharm Pharmacol Commun*, 1999, 5:383-388.
7. Prasad CVN, Parihar C, Chowdhary TR, Purohit S, Parimoot P. Simultaneous determination of atenolol-amlodipine and haloperidol-trihexyphenidyl in combined tablet reparations by derivative spectroscopy. *Pharm Pharmacol Commun*, 1998, 4:325-330.
8. Juyal V, Chaudhary M, Kumar P, Gnanarajan G, Yadav PK. Method development and its validation for simultaneous estimation of atorvastatin and amlodipine in combination in tablet dosage form by uv spectroscopy, using multi-component mode of analysis. *J Pharm Res*, 2008, 1:182-187.

9. Ramesh D, Ramakrishna S. New spectrophotometric methods for simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatin calcium in tablet dosage forms. *International J Pharm Sci*, 2011, 2:215-219.
10. Rao L, Rajeswari KR, Sankar GG. Spectrophotometric method for simultaneous estimation of atorvastatin and amlodipine in tablet dosage form. *Research J Pharm Bio Chem Sci*, 2010, 1:66-69.
11. Abdallah OM, Badawey AM. Derivative-ratio spectrophotometric, chemometric and HPLC validated methods for simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in combined dosage form. *International J Industrial Chem*, 2011, 2:78-85.
12. Basavaiah K, Chandrashekar U, Prameela HC. Sensitive spectrophotometric determination of amlodipine and felodipine using iron(III) and ferricyanide. *IL Farmaco*, 2003, 58:141-148.
13. Rathee P, Rathee S, Thakur S, Kumar V. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and lisinopril dihydrate in tablet dosage forms by modified form of simultaneous equation method using derivative uvspectrophotometry. *International J Pharm Res*, 2010, 2:556-562.
14. Joshi HV, Patel JK. New spectrophotometric methods for simultaneous determination of amlodipine besylate and lisinopril in tablet dosage forms. *J Appl Pharm Sci*, 2011, 1:162-164.
15. Patil PR, Rakesh SU, Dhabale PN, Burade KB. Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form. *Asian J Res Chem*, 2009, 2:183-187.
16. Kaveri K, Saravanan C, Mozhi MT. Simultaneous estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form by UV spectrophotometer. *International Res J Pharm*, 2011, 2:96-100.

17. Rahman N, Azmi SNH. Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate with ninhydrin in drug formulations. *IL Farmaco*, 2001, 56:731-735.
18. Mehulkumar P, Ramesh V, Kumar VV, Srinivas R, Diwanl PV. Simultaneous spectroscopic estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoximil in tablet dosage form. *Asian J Res Chem*, 2009, 2:127-130.
19. Kardile DP, Kalyane NV, Thakkar TH, Patel MR, Moradiya RK. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil drug formulations by HPLC and UV-spectrophotometric methods. *J Pharm Sci Res*, 2010, 2:599-514.
20. Patil P, Barge V, More H, Piswkar S. Spectrophotometric method for simultaneous determination of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate from tablet dosage form. *International J Curr Pharm Res*, 2011, 3:74-79.
21. Muthu AK, Chidalla RS, Prasad S, Kumar DS, Manavala R. Simultaneous estimation of telmisartan and amlodipine by UV-spectrophotometric method using multi component mode analysis. *International Res J Pharm*, 2011, 2:175-180.
22. Gölcü A, Yücesoy C. Colorimetric determination of amlodipine besylate in tablets. KSU. *J Sci Engin*, 2006, 9:52-54.
23. Monkman SC, Ellis JS, Cholerton S, Thomason JM, Seymour RA, Idle JR. Automated gas chromatographic assay for amlodipine in plasma and gingival crevicular fluid. *J Chrom B*, 678:360-364.
24. Bahrami G, Mirzaeei S. Simple and rapid HPLC method for determination of amlodipine in human serum with fluorescence detection and its use in pharmacokinetic studies. *J Pharm Bio Anal*, 2004, 36:163-168.

25. Vora DN, Kadav AA. Development and validation of a simultaneous HPLC method for estimation of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate from tablets. *Indian J Pharm Sci*, 2008, 70:542-546.
26. Shah DA, Bhatt KK, Mehta RS, Baldania SL, Gandhi TR. Stability indicating RP-HPLC estimation of atorvastatin calcium and amlodipine besylate in pharmaceutical formulations. *Indian J Pharm Sci*, 2008, 70:754-760.
27. Prajapati J, Patel A, Patel MB, Prajapati N, Prajapati R. Analytical method development and validation of amlodipine besylate and perindopril erbumine in combine dosage form by RP-HPLC. *International J Pharm Res*, 2011, 3:801-808.
28. Rajitha S, Biswal VB, Reddy DN, Ramesh B. Method development and validation of telmisartan and amlodipine besylate by RP-HPLC in tablet dosage form. *International J Pharm Sci*, 2013, 3:365-369.
29. Chaudhari BG, Patel MN, Shah PB. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine from their combination drug products. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55:241-246.
30. Üstün FG, Atay O. Quantitative determination of amlodipine containing pharmaceuticals by IR spectroscopy and HPLC methods. *J Fac Pharm İstanbul*, 2006, 38:37-46.
31. Chitlange SS, Bagri K, Sakarkar DM. Stability indicating RP- HPLC method for simultaneous estimation of valsartan and amlodipine in capsule formulation. *Asian J Res Chem*, 2008, 1:15-18.
32. Klinkenberg R, Streel B, Ceccato A. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amlodipine residues on manufacturing equipment surfaces. *J Pharm Bio Anal*, 2003, 32:345-352.

33. Sah R, Saahil A. Development and validation of a HPLC analytical assay method for amlodipine besylate tablets: a potent Ca^{+2} channel blocker. *J Advanced Pharm Edu&Res*, 2012, 2:93-100.
34. Ma Y, Qin F, Sun X, Lu X, Li F. Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J Pharm Bio Anal*, 2007, 43:1540-1545.
35. Dongre VG, Shah SB, Karmusea PP, Phadke M, Jadhav VK. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC. *J Pharm Bio Anal*, 2008, 46:583-586.
36. Shentu J, Fu L, Zhou H, Hu XJ, Liu J, Chen J, Wu G. Determination of amlodipine in human plasma using automated online solid-phase extraction HPLC tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of chinese volunteers. *J Pharm Bio Anal*, 2012, 70:614- 618.
37. Qi W, Zhao Q, Jiang J, Hu P. Simultaneous determination of olmesartan and amlodipine in human plasma and urine by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chrom B*, 2013, 938:27-34.
38. Bathula SP, Devani KP. Quantitative determination of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography- electro spray ionization mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *Asian J Pharm Clin Res*, 2012, 5:89-93.
39. Zhou Y, Li J, He X, Jia M, Liu M, Li H, Xiong Z, Fan Y, Weiyong L. Development and validation of a liquid chromatography-tandem massspectrometry method for simultaneous determination of amlodipine, atorvastatin and its metabolites ortho-hydroxy atorvastatin and para-hydroxyatorvastatin in human plasma and its application in a bioequivalence study. *J Pharm Bio Anal*, 2013, 83:101-107.

40. Chang H, Li J, Li J, Guan X, Sun F, Qian Z, Bia K, Fan G. Simultaneous determination of amlodipine and bisoprolol in rat plasma by a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method and its application in pharmacokinetic study. *J Pharm Biol Anal*, 2012, 71:104-110.
41. Karra VK, Pilli NR, Inamadugu JK, Seshagiri JVL. Simultaneous determination of losartan, losartan acid and amlodipine in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Pharm Methods*, 2012, 3: 18-25.
42. Sirikatitham A, Panrat K, Tanmanee N. Determination of amlodipine in human plasma by electrospray ionization LC-MS/MS method: validation and its stability studies. *Songklanakarin J Sci Tech*, 2008, 30:455-462.
43. Abdel-Hay MH, Gazy AA, Hassan EM, Belal TS. Derivative and derivative ratio spectrophotometric analysis of antihypertensive ternary mixture of amiloride hydrochloride, hydrochlorothiazide and timolol maleate. *J Chin Chem Soc*, 2008, 55:971-978.
44. Kartal M, Erk N. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride by ratio spectra derivative spectrophotometry and highperformance liquid chromatography. *J Pharm Biol Anal*, 1999, 19:477-485.
45. Ferraro MC, F Castellano, PM Kaufman, TS. Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biol Anal*, 2004, 34:305-314.
46. Ferraro, MC, Castellano F, Kaufman PM. Simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in synthetic samples and pharmaceutical formulations by multivariate analysis of spectrophotometric data. *J Pharm Biol Anal*, 2002, 30:1121-1131.

47. Dinc E, Ustundag O. Chemometric resolution of a mixture containing hydrochlorothiazide and amiloride by absorption and derivative spectrophotometry. *J Pharm Biol Anal*, 2002, 29:371-379.
48. Elshanawane AA, Mostaf SM, Elgawish MS. Development and validation of an LC method for simultaneous determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in human urine. *J AOAC International*, 2009, 92:813-819.
49. Song M, Hang T, Zha H, Wang L, Ge P, Ma P. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionisation. *Rapid Commun Mass Spect*, 2007, 21:3427-3434.
50. Lu M, Tong P, Xiao H, Xia S, Zheng X, Liu W, Zhang L. A new method for screening and determination of diuretics by on-line CE-ESI-MS. *Electrophoresis*, 2007, 28:1461-1471
51. Goebel C, Trout GJ, Kazlauskas R. Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2004, 502:65-74.
52. Belal F, Rizk M, Ibrahiem F, El-Din MS. Spectrophotometric determination of benzothiadiazines in dosage forms. *Talanta*, 1986, 33:170-172.
53. Bebawy L, Abbas SS, Fattah LA, Refaa HH. Application of first-derivative spectrophotometry, TLC- densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and human plasma. *IL Farmaco*, 2005, 60:859-67.
54. Prasad CVN, Bharadwaj V, Narsimhan V, Chowdhary RT, Parimoo P. Simultaneous determination of metoprolol-hydrochlorothiazide and propranololhydrochlorothiazide

- in combined formulations by derivative spectroscopy. *J AOAC International*, 1997, 80:325-330.
55. Banoglu E, Ozkan Y, Atay O. Dissolution tests of benazepril-HCl and hydrochlorothiazide in commercial tablets: comparison of spectroscopic and high-performance liquid chromatography methods. *IL Farmaco*, 2000, 55:477-483.
 56. Erk N. Ratio-spectra zero-crossing derivative spectrophotometric determination of certain drugs in two-component mixtures. *Anal Lett*, 1999, 32:1371-1388.
 57. Shaikh B, Rummel N. Liquid chromatographic determination of chlorothiazide and hydrochlorothiazide diuretic drugs in bovine milk. *J Agricultur Food Chem*, 1998, 46:1039-1043.
 58. Ozkan SA. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide from tablets and human serum by RP-HPLC. *J Liq Chrom Rel Tech*, 2001, 24:2337-2346.
 59. Yılmazgüç B. Telmisartan'ın Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Voltametrik Yöntemle Tayini. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2008.
 60. Patriarche GJ, Chateau-Gosselin M, Vandenbalck JL. Polarography and electroanalytical techniques in pharmacy and pharmacology. *Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed. New York, J. A. Bord, 1979, 2:141-189.
 61. Zuman P, Brezina M. Polarographic analysis in pharmacy progress in polarography, 2th ed. New York, Intersence Publishers, 1962, 23-28.
 62. Kissinger PT, Heineman WR. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed. Revised and Expanded. New York, Marcel Dekker Inc, 1996: 141-163.
 63. Brezina M, Zuman P. Polarography in Medicine Biochemistry and Pharmacy, New York, Interscience Publishers, 1958:128-131.

64. Skoog DA, Holler FJ, West DM. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders collage publishing, 1991:460-496.
65. Bond AM. *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker Inc, 1980:8-102.
66. Wang H, Wang L, Shi Z, Guo Y, Cao X, Zhang H. Application of self-assembled ‘molecular wires’ monolayers for electroanalysis of dopamine. *Electrochem Commun*, 2006, 8:1779-1783.
67. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals Applications*, John Wiley and Sons. Inc. New York, 2001:13-18.
68. Sharma S, Sharma MC. Simultaneous spectrophotometric estimation of etoposide tablet formulations using hydrotropy solubilization agents. *J Optoelect Biomed Mat*, 2010, 2:227-229.
69. Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities, 1996:16-24.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Ümit KOÇAK Doğum tarihi: 06.11.1989 Doğum yeri: Körfez Medeni hali: Bekar Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 05342668629 Faks: 04422315201 E-mail: kocak_umit@windowslive.com
Eğitim
Lise: Şehit Oğuz Özgür Çevik Anadolu Lisesi-İzmir (2003-2007) Lisans: Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi-Kimya Bölümü (2009-2015) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2015-2018)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Kimyagerler Derneği (2011-)
Sürücü Belgesi
B Sınıfı
İlgi Alanları ve Hobiler
Yüzme, Kayak, Kültür gezileri

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/ 56
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

02/11/2017

Sayın Doç. Dr. Bilal YILMAZ

İlgi: 30.10.2017 tarih ve 1700301313 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 02.11.2017 tarihinde almış olduğu 11 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Ümit KOÇAK'ın "Amlodipin ve Hidroklorotiyazid Etkin Maddelerinin Kare Dalga ve Diferansiyel Puls Voltametri Yöntemi ile Farmasötik Preparatlarda Aynı Anda Miktar Tayini" başlıklı çalışma etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Başkan

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Üye

Prof. Dr. Halise İnci GÜL
Üye

Doç. Dr. Yasin BAYIR
Üye

Doç. Dr. Beyzagül POLAT
Üye

Karar-11- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Bilal YILMAZ'ın danışmanı olduğu yüksek lisans öğrencisi Ümit KOÇAK'ın Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yürüteceği "Amlodipin ve Hidroklorotiyazid Etkin Maddelerinin Kare Dalga ve Diferansiyel Puls Voltametri Yöntemi ile Farmasötik Preparatlarda Aynı Anda Miktar Tayini" başlıklı çalışma ile ilgili 30.10.2017 tarih ve 1700301313 sayılı yazı ile ekleri görüşülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.