

57455

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANTİHİPERTANSİF İLAÇ  
KARIŞIMLARININ TÜREV  
SPEKTROFOTOMETRİK  
YÖNTEMLE ANALİZİ

Kimyager Oğuz BORA

F.B.E. Kimya Anabilimdalı Analitik Kimya Programında

hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sıdika SUNGUR

İstanbul 1996

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
SUMMARY	VI
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. GENEL BÖLÜM	2
2.1. İncelenen İlaç Maddeleri	2
2.1.1. Hidroklorotiazid	2
2.1.1.1. Özellikleri ve Tarihçesi	2
2.1.1.2. Farmakolojik Etkisi	5
2.1.1.3. Tanınma Yöntemleri	6
2.1.1.4. Miktar Tayin Yöntemleri	8
2.1.2. Silazapril	14
2.1.2.1. Özellikleri	14
2.1.2.2. Farmakolojik Etkileri	17
2.1.2.3. Analiz Yöntemleri	17
2.1.3. Benazepril	18
2.1.3.1. Özellikleri	18
2.1.3.2. Farmakolojik Etkisi	20
2.1.3.3. Analiz Yöntemleri	20
2.2. Türev Spektroskopisi	21
3. DENEYSEL BÖLÜM	25
3.1. Maddeler , Çözücüler , Çözeltiler	25
3.1.1. İlaç Maddeleri ve Çözücüler	25
3.1.2. Standart Çözeltiler	25
3.2. Alet ve Diğer Gereçler	26
3.3. Yöntemler	26
3.3.1. Spektrumların Çizilmesi	26
3.3.2. Hidroklorotiazid - Silazapril Karışımının Analizi	26
3.3.2.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem	26
3.3.2.1.1. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	26

3.3.2.1.2.	Farmasötik Preparatlara Uygulanması	27
3.3.2.2.	Kıyas Yöntemi	27
3.3.3.	Hidroklorotiazid - Benazepril Karışımının Analizi	27
3.3.3.1.	Türev Spektrofotometrik Yöntem	27
3.3.3.1.	Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	27
3.3.3.1.2	Farmasötik Preparatlara Uygulanması	28
3.3.3.2.	Kıyas Yöntemi	28
4.	SONUÇLAR	29
4.1.	Hidroklorotiazid - Silazapril Karışımının Analizi	29
4.1.1.	Uygun Koşulların Saptanması	29
4.1.2.	Ölçü Eğrileri	36
4.1.3.	Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ve sonuçların kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	36 41 41
4.2.	Hidroklorotiazid - Benazepril Karışımının Analizi	41
4.2.1.	Uygun Koşulların Saptanması	41
4.2.2.	Ölçü Eğrileri	46
4.2.3.	Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ve sonuçların kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	46
5.	TARTIŞMA	51
	KAYNAKLAR	54
	ÖZGEÇMİŞ	61

## TEŞEKKÜR

Bana bu çalışmayı gerçekleőtirmek fırsatını ve olanaklarını tanıyan , çalışmanın tüm aőamasında yardım ve bilgilerini esirgemeyen çok değerli hıcam Sayın Prof. Dr. Sıdıka SUNGUR 'a sonsuz saygı ve sükranlarımı sunarım.

Çalıőmam boyunca daima bana destek olan aileme ve Analitik Kimya anabilim dalında görevli asistan arkadaşlara sonsuz teőekkürlerimi belirtmeyi bir borç bilirim .

Oğuz BORA

## ÖZET

Silazapril - hidroklorotiazid ve benazepril - hidroklorotiazid içeren iki adet antihipertansif tablet formülasyonu mor ötesi türev spektrofotometresi ile belirteç kullanmaksızın ve ön ayırma yapmaksızın tayin edildi. Bu ilaç karışımlarının analizi spektral çakışma sebebiyle doğrudan mor ötesi absopsiyon ölçülerek yapılamaz. Türev spektrofotometrisi pik - sıfır tekniği ile bu tür karışımların kantitatif analizine imkan sağlamaktadır.

Bu iki karışımın , türev spektrofotometrik analizi için en uygun çözücü , türev derecesi ve dalga boylarının saptanması için ilaç maddelerinin metanol , 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl 'deki çözeltilerinin 1. , 2. , ve 3. derecede türev spektrumları alındı . Metanolün , her iki karışımın analizi için en uygun çözücü olduğu görüldü . Silazapril - hidroklorotiazid karışımı için 2. derece türev spektrumunda 215 nm ve 3. derece türev spektrumunda 272.9 nm dalga boylarının sırasıyla silazapril ve hidroklorotiazid 'in ölçülmesi için en uygun olduğu saptandı . Diğer karışımın analizi için ise 2. derece türev spektrumunda 224.7 nm 'nin benazepril , 3. derece türev spektrumunda 253.7 nm 'in hidroklorotiazid tayinine uygun olduğu sonucuna varıldı . Ölçü eğrileri , silazapril için 4- 12 µg.ml<sup>-1</sup> , benazepril ve hidroklorotiazid için 2 - 10 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltilerin bu dalga boylarında ölçülen türev absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasında oluşturuldu . Bu doğrulara ait regresyon eşitlikleri ;

Silazapril - hidroklorotiazid karışımı için ;

$${}^2D_{215} = 0.146 C + 0.025 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{silazapril})$$

$${}^3D_{272.9} = 0.119 C - 0.000 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{hidroklorotiazid})$$

Benazepril - hidroklorotiazid karışımı için ;

$${}^3D_{224.7} = 0.061 C - 0.013 \quad (r = 0.9996) \quad (\text{benazepril})$$

$${}^2D_{253.7} = 0.226 C + 0.023 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{hidroklorotiazid})$$

şeklindedir .

Silazapril ( 5 mg ) - hidroklorotiazid ( 12.5 mg ) ve benazepril ( 10 mg ) - hidroklorotiazid ( 12.5 mg ) içeren ticari tabletlerin analizi metanol ile ekstraksiyon , süzme , uygun seyreltme ve türev absorpsiyonlarının ilgili dalga boylarında ölçümü ile gerçekleştirildi . Tabletlerdeki ilaç etken maddelerinin miktarları , ilgili ölçü eğrilerinden yararlanılarak hesaplandı . Bu karışımların analizi farmakopede yer almadığından elde edilen sonuçların karşılaştırılması , yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem ile yapıldı . Her iki yöntemle yapılan 5 'er adet analiz üzerinden ortalamalar ve standart sapmalar hesaplandı . İstatiksel değerlendirmeler , her iki karışım için iki yöntemin ortalamalar ve prezisyonlar açısından anlamlı fark olmadığını gösterdi .



## SUMMARY

Two antihypertensive tablet formulations containing cilazapril - hydrochlorothiazide and benazepril - hydrochlorothiazide were assayed by derivative UV spectrophotometry without using any separation techniques and reagents.

The simultaneous determination of these drug mixtures is not possible by direct UV absorption measurements because of the spectral overlap. Derivative spectrophotometry allows the quantitative analysis of such mixtures using a zero-crossing technique of measurement.

For the selection of the optimum solvent, derivative order and wavelength for the derivative spectrophotometric analysis of the two mixtures, first, second and third derivative spectra of the drug solutions in methanol, 0.1 N NaOH and 0.1 N HCl were recorded.

Methanol was selected as the most suitable solvent for the analysis of both mixtures. For cilazapril - hydrochlorothiazide mixture zero-crossing wavelengths of 215 nm in the second derivative spectrum and 272.9 nm in the third derivative spectrum were selected for the determination of cilazapril and hydrochlorothiazide respectively. Zero-crossing wavelengths of 224.7 nm in the second derivative spectrum and 253.7 nm in the third derivative spectrum were chosen as the optimal wavelengths for the determination of benazepril and hydrochlorothiazide respectively in other mixture.

Calibration curves were constructed by plotting derivative absorbance values measured at selected zero-crossing wavelengths against corresponding concentrations of standard drug solutions in 2 - 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for cilazapril and 4-12  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for hydrochlorothiazide range. Regression equations of the calibration curves were as follows.

For cilazapril - hydrochlorothiazide mixture ;

$${}^2D_{215} = 0.146C + 0.025 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{cilazapril})$$

$${}^3D_{272.9} = 0.119C - 0.000 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{hydrochlorothiazide})$$

For benazepril - hydrochlorothiazide mixture ;

$${}^3D_{224.7} = 0.061C - 0.013 \quad (r = 0.9996) \quad (\text{benazepril})$$

$${}^2D_{253.7} = 0.226C + 0.023 \quad (r = 0.9999) \quad (\text{hydrochlorothiazide})$$

Commercially available tablets containing cilazapril (5 mg) - hydrochlorothiazide (12.5 mg) and benazepril (10 mg) - hydrochlorothiazide (12.5 mg) were analysed by extracting of the drug from tablets with methanol, filtration, appropriate dilution and measurement of derivative absorbances at corresponding zero-crossing wavelengths. Drug contents of tablet formulations were calculated using the corresponding calibration curves. For comparison the tablets were also assayed with high pressure liquid chromatographic method since a pharmacopial method is not available for these mixtures. Mean values and standard deviations were calculated from five determinations for both methods. The statistical evaluations indicated that there was no significant difference between the mean values and precisions of the two methods for both mixtures at 95% confidence level.



## 1 . GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Hipertansiyon tedavisinde dünyada son yıllarda kullanılmaya başlanmış olan ACE inhibitörlerinin , bir diüretik ile kombinasyonu da aynı amaçla kullanılmaktadır . Ülkemizde de bu gruptan silazapril ve benazepril'in eski bir diüretik olan hidroklorotiazid ile kombinasyonlarını içeren iki adet tablet preparatı çok yakın zamanda piyasaya çıkarılmıştır .

Silazapril ve benazepril , oldukça yeni ilaç maddeleri olduğundan , literatürde bu maddelerin analizleri ile ilgili olarak yayınlanmış çalışmalar yok denecek kadar azdır . İlaç kalite kontrolünde , kombine prepratların analizinde genellikle kromatografik yöntemler ve özellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmaktadır . Pahalı ve zaman alıcı bu yöntemlere karşı , özellikle ikili karışımların analizinde basitlik ve ucuzluk ile alternatif olan türev spektrofotometresi farmasötik analizlere başarıyla uygulanmaktadır ( Yurdakul et al. , 1991 , Üstün and Sungur , 1992 ) . Bu düşünceden hareket ile ülkemizde kullanıma giren bu iki kombine preparatın analizine , türev spektrofotometrik yöntemin uygulanabilirliğini araştırmak ve elde edilen sonuçları değerlendirerek , yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntemle elde edilerek karşılaştırma amacıyla bu çalışma yapılmıştır .

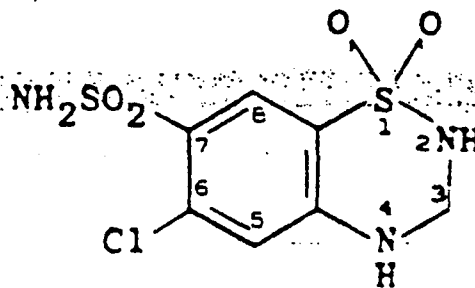
## 2 . GENEL BÖLÜM

### 2 . 1 . İncelenen İlaç Maddeleri

#### 2 . 1 . 1 . Hidroklorotiazid

#### 2 . 1 . 1 . Özellikleri ve Tarihçesi ( Florey , 1981 )

Hidroklorotiazid , 1958 yılında Stevens ve arkadaşları tarafından 4 amino-6 kloro-3,5 disülfonamid ile formaldehit'in reaksiyonundan sentez edilmiştir . Bu tarihten itibaren de , düşük toksik etkisi sebebiyle bir diüretik olarak geniş kullanım alanı bulmuştur. Hidroklorotiazid şu şekilde isimlendirilir ; 6-kloro-3,4-hidro-7-sülfamin-2H-1,2,4-benzotiazid-1,1dioksit .



Kapalı Formül :  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

Molekül Ağırlığı : 297,73 g / mol

Elementel Analizi :

Element	C	H	Cl	N	O	S
Hesaplanan %	28,24	2,71	11,91	14,12	21,49	21,54
Bulunan %	28,21	2,72	12,15	14,18	21,26	21,45

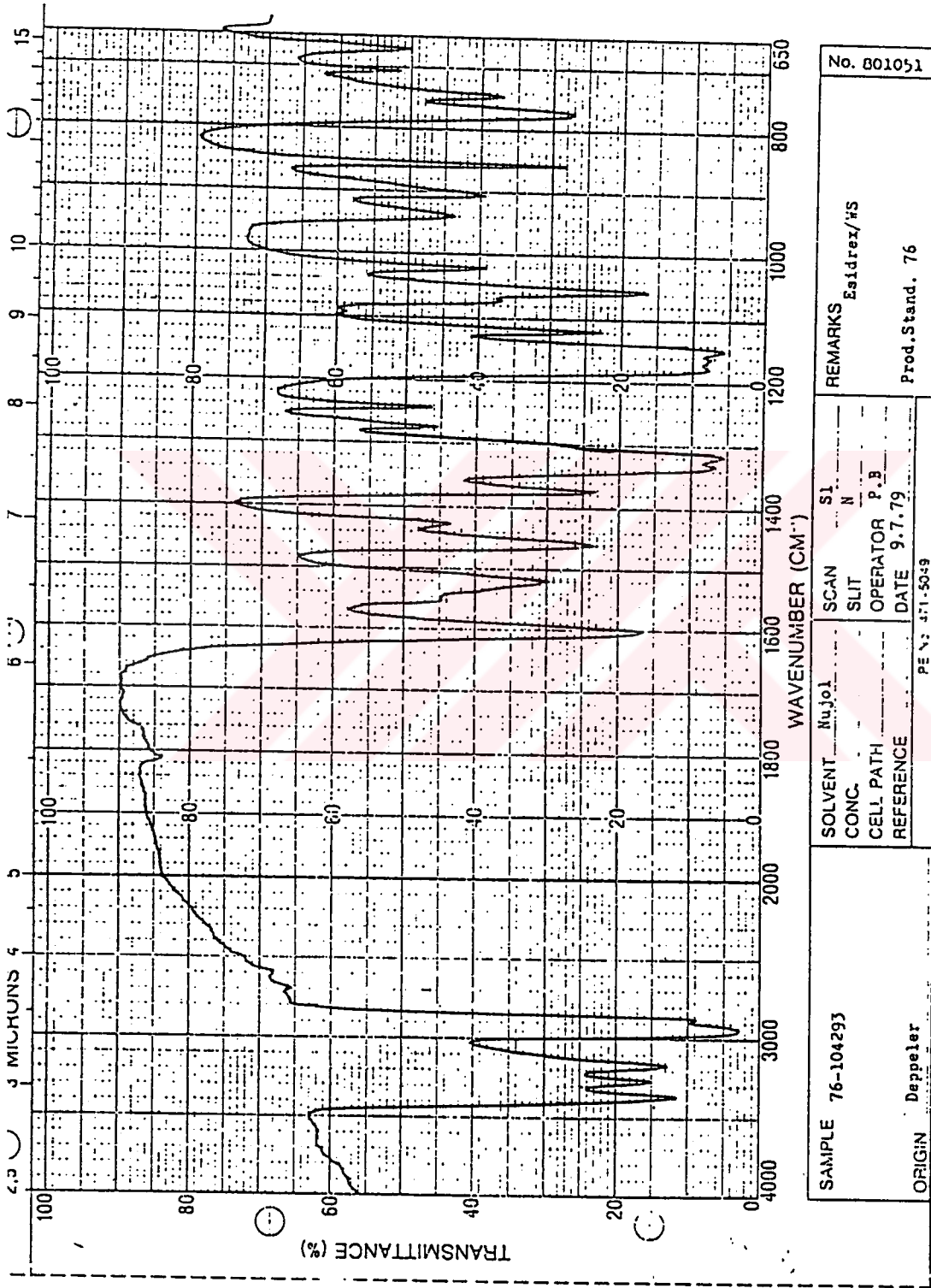
Beyaz kristalize toz görünümünde , kokusuz ve hafif acı lezzette bir maddedir . Çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü g / 100 ml cinsinden ; suda  $60,9 \times 10^3$  , 0,1 N HCl 'de  $60,8 \times 10^{-3}$  , 0,1 N NaOH 'de 1,79 , asetonda 13,7 , % 96 'lık etanolde 1,4 ve metanolde 4,1 dir.

Yoğunluğu :  $1,68 \mp 0,01 \text{ g.cm}^{-3}$

Erime Noktası :  $263 - 275^{\circ} \text{C}$  arasındadır .  $307^{\circ} \text{C}$  'de bozunur .  $280^{\circ} \text{C}$  'nin altında % 0,1 'den daha az uçucu safsızlık içerir.

pK<sub>a</sub> değerleri : pK<sub>a</sub> = 8,6  
pK<sub>a</sub><sub>2</sub> = 9,9

IR spektrumu : Şekil 2. 1 'de hidroklorotiazid 'in mineral yağ karışımında alınmış IR spekturumu görülmektedir.



Şekil 2. 1. Hidrokloroziazid 'in IR spektrumu

UV spekturumu : Hidroklorotiazid 'in çeşitli çözücülerdeki absorpsiyon özellikleri tablo 2.1. de verilmiştir.

Tablo 2.1. Hidroklorotiazid 'in absorpsiyon özellikleri (Florey , 1981)

Çözücü	$\lambda_{max}(nm)$	log $\epsilon$
Etanol	225	4,576
	269	4,307
	316	3,505
Metanol	226	4,513
	271	4,279
	317	3,471
Su	270	4,286
	315	3,495
0.01 N HCl	270	4,290
	315	3,500
0.01 N NaOH	272	4,193
	323	3,435

**Sentezi :** Kleeman (1978) sentezini 2 ayrı reaksiyonla gerçekleştirmiştir. 1.reaksiyonda ; 5-kloro-2,4 disülfamilanilin ve paraformaldehit , 2.reaksiyonda ; sulu bazik ortamda 6 - kloro - 7 sülfamil - 2H - , 1 , 2 , 4 benzothiadiazin - 1 , 1 - dioksit ile formaldehit , hidroklorotiazid vermiştir .

**Stabilitesi :** Katı toz halindeki madde , oda sıcaklığında 5 yıl bozunma göstermeden saklanabilir . Sıcaklık değişimlerinden çok az etkilenir . Sulu çözeltilerinde hidroliz olup formaldehit ve 6-kloro-2,4 disülfamil anilin verir . pH = 7,2 'de hidroliz reaksiyonunun hızı maksimumdur .

#### 2 . 1 . 1 . 2 . Farmakolojik Etkisi

Diüretik ilaçlar, böbrek tubulusları üzerine etki ederek sodyum ve su kaybını arttıran ajanlardır . Bütün hipertansiyon şekillerinde kan basıncını düşürerek , tansiyon yükselmesini engellerler. Hafif hipertansiyon olgularında , tek başına kullanıldıklarında

yaptıkları kan basıncı azalması genellikle yeterli olur ve başka bir antihipertansif ilaç kullanılmasına gerek olmayabilir . Orta ve ağır hipertansiyon tedavisinde daha güçlü bir antihipertansif ilaçla ( ACE inhibitörleri ,  $\beta$  blokerler , kalsiyum antagonistleri gibi ) birlikte kullanılır .

Hidroklorotiazid tiazid grubu bir diüretiktir . Diğer tiazid grubu diüretiklerde ( klorotiazid , metiklotiazid , politiazid , hidroflumetiazid vs ) olduğu gibi diüretik etkiyi 7 numaralı karbona bağlanmış , serbest sülfonamid grubu sağlar . Hidroklorotiazid bu grup ilaçlar içerisinde tekli veya kombine preparatı halinde en çok kullanılanıdır ( Karayalp , 1990 ) .

### 2 . 1 . 1 . 3 . Tanınma Yöntemleri

Hidroklorotiazid 'e ait tanınma yöntemleri , genellikle kromatografik esaslı olup , ince tabaka kromatografisi ( İTK ) , yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ( HPLC ) ve gaz kromatografisi ( GC ) ile yapılmıştır . Bu yöntemler farmasötik preparatlara , idrar ve kan örneklerine uygulanmıştır .

İTK , ayırma ve tanıma yöntemi olarak çok kullanılmıştır . Bu yöntemde çeşitli adsorbanlar kullanılmış olup , en çok kullanılanı silikajeldir .  $Al_2O_3$  ve selüloz da bazı çalışmalarda kullanılmıştır . İTK yönteminde maddenin tanınması için maddenin kendisinin püskürtme belirteçleri ile oluşturduğu lekelerden ya da hidrolizden sonra diazolama , kenetleme veya sodyum kromatopat ile reaksiyon yolu ile olan renk reaksiyonlarından yararlanılmıştır ( Thielemann et al . , 1973 , Stohs ve Scratchley , 1975 , Wallace et al . , 1977 ) .

İTK yönteminde maddenin çeşitli çözücü sistemlerindeki Rf değerlerinden yararlanılıp , tanınması sağlanmıştır . Örnek olarak  $23^{\circ}C$  'de etilasetat + kloroform + metanol ( 11+8+1 ) çözücü sisteminde maddenin Rf değeri 0,3 olarak bulunmuştur . Bu sistem yarı kantitatif stabilite teslerinde ve saflık kontrolünde kullanılmıştır ( Florey , 1981 ) .

Yuen (1985) , bitkisel karışımlara uyguladığı bir çalışmada etanol ile elde ettiği ekstraktları iki ayrı çözücü sistemi kullanarak analiz etmiştir . Oluşan lekeler kısa ve uzun dalga boylu UV lamba ile belirlenmiştir . Valladao ve arkadaşları (1994) 4 ayrı diüretigin ayrılması ve tanınmasını 2 adsorban , 9 ayrı mobil faz ve

6 değişik püskürtme belirteci kullanarak sağlamışlardır .

Tanıma amacıyla geliştirilmiş HPLC yöntemlerinde genellikle ters faz sıvı kromatografisi ( RP - HPLC ) kullanılmıştır . Bu çalışmalarda tekli veya çoklu preparatlarda maddenin tanınmasının yanında olabilecek safsızlıklardan veya diğer bileşenlerden ayrılması da sağlanmıştır .

Değişik bileşenli ikili tablet karışımlarına uygulanmış çalışmalarda RP - HPLC yöntemi kullanılmıştır . Erram ve Tipnis (1992 a,b,c) bu çalışmalarda C - 18 kolon kullanılmışlar ve tablet örneklerindeki hidroklorotiazidi 'i 220 nm 'de belirlemişlerdir . Bu çalışmalarda , hidroklorotiazid 'in penbutolol sulfat ( a ) , betaxolol HCl ( b ) ve nadolol ( c ) ' dan ayrılması , pH = 3,5 'a tamponlanmış , değişik oranlardaki fosfat tamponu-asetonitril mobil fazlarının kullanılmasıyla sağlanmıştır . Bu çalışmaların tümünde hidroklorotiazid 'in alıkönme zamanı ortalama 3,5 dak. civarında bulunmuştur .

RP - HPLC yönteminin kullanıldığı bazı çalışmalarda , kolon değiştirme (Colom - Switching) tekniği yardımıyla daha duyarlı ve seçici analizler yapılmıştır . Saarinen ve arkadaşları (1993) bu teknikle idrar örneklerindeki 16 değişik diüretik maddenin belirlenmesini gerçekleştirmişlerdir . Bu çalışmalarında idrar örnekleri bir miktar su ile beraber kısa bir ekstraksiyon kolonuna alınıp , örneklerdeki polar matriksli bileşenler elue edilmiştir . Sonra analiz edilecek karışım , analitik kolona alınıp , pH = 3,1 fosfat tamponu ve asetonitrilden oluşan mobil faz kullanılarak ayrılmıştır . Compins ve çalışma grubu ise (1994) yine idrar örneklerindeki diüretiklerin belirlenmesini aynı tekniği kullanarak gerçekleştirmişlerdir .

RP - HPLC yöntemlerinin yanında normal faz sıvı kromatografisi yöntemleri de ayırma ve tanıma amaçlı olarak kullanılmıştır . Honigberk ve arkadaşları (1975) antihipertansif maddelerin karışımlarını normal faz kolonlar kullanarak ayırmışlar ve maddeleri belirlemişlerdir . Campins ve arkadaşları ise (1993) idrar örneklerindeki diüretiklerin belirlenmesini , normal faz kolonlar yardımıyla gerçekleştirmişlerdir .

Gaz kromatografisi kullanılarak , idrardaki diüretiklerin ayrıldığı bir çalışmada , örneklerdeki diüretikler metil türevleri haline getirildikten sonra G.C + MS ( gaz kromatografisi - kütle spektrometrisi ) ile belirlenmişlerdir . Bunun için 3 ayrı

metilasyon tekniği geliştirilmiş olup , bu yolla 20 ayrı diüretiğin tanınması sağlanmıştır ( Carreras et al. , 1994 ) .

Wallace ve arkadaşları (1977) hidroklorotiazid 'in metillendirme yolu ile gaz kromatografik analizini, İTK yöntemine karşılaştırma yöntemi olarak kullanmışlardır . Vandennevel ve arkadaşları (1975) ise bu yöntemi kan ve plazmadaki , diüretiklerin belirlenmesi amaçıyla geliştirmişlerdir .

Hidroklorotiazid 'in tanınmasına yönelik olarak kapiler zon elektroforez 'in kullanıldığı bir çalışmada , idrar ve kan örneklerindeki değişik diüretikler saptanmıştır . Bunun için sülfonamid veya karboksilik fonksiyonel grup içeren diüretikler pH =10,6 'da , amin grubu içerenler ise pH = 4,5 'da ayrılmışlardır . En iyi ayrılma 20<sup>0</sup>C 'de olup , 30 dakika içinde ayrılan bileşiklerin yapı analizleri de GC - MS ile yapılmıştır (Jumppanen , 1993) .

#### 2. 1. 1. 4. Miktar Tayin Yöntemleri

Hidroklorotiazid , oldukça eski bir ilaç maddesidir ve toksik etkisi çok düşüktür . Bu nedenle uzun zamandan bu yana çeşitli farmasötik preparatlarda geniş kullanım alanı bulmuş bir diüretiktir . Farmasötik preparatların yanında , idrar ve kan gibi değişik vucut sıvılarındaki analizi için birçok teknik geliştirilmiştir . Literatürde bu konularla ilgili olarak yayınlanmış olan çalışmaların sayısı çok fazladır . Bu yüzden bu bölümde , bizim çalışma konumuzla aynı olması bakımından ikili karışımlardaki , hidroklorotiazid 'in miktar tayinine yönelik çalışmalara ağırlık verilmiştir . Diğer çalışmalar sınıflandırılarak , örnek olması bakımından sadece birkaç kaynak verilecektir .

Tekli preparatlardaki hidroklorotiazid 'in kantitatif tayininde genellikle titrimetrik yöntemler kullanılmış olup , bazı çalışmalarda UV - VIS spektrofotometrik , HPLC ve polarografik tayinlere de yer verilmiştir .

Titrimetrik tayinler direkt ve indirekt titrasyon şeklinde sınıflandırılabilirler . USP XIX 'da (1975) n - butilamin de çözülmüş hidroklorotiazid 'in azoviole indikatörlüğünde sodyum metoksit ile titre edilmesi önerilmektedir . BP 73 (1973) de ise pridinde çözülmüş hidroklorotiazid potansiyometrik olarak



$\text{NH}_4\text{OH}$  ile titre edilmiştir. El - Brashy ve arkadaşları (1994) hidroklorotiazid 'i sodyum hidroksit ve civa asetat ile kondüktometrik olarak titre etmişlerdir . Przyborawski ve arkadaşları (1976)  $\text{Pb}^{++}$  ve  $\text{Hg}^{++}$  ile kondüktometrik olarak , Madqeanu ve arkadaşları (1969) sodyum nitrit ile amperometrik olarak , Daleo ve arkadaşları (1966) sodyum hidroksit ile termometrik olarak titre etmişlerdir . Mineralleştirmeden sonra Gonzales ve çalışma grubu (1968) sülfat tayini şeklinde , Friedrick ve grubu ise (1976) arjantimetrik titrasyon şeklinde tayin etmişlerdir .

İndirekt titrasyonda genellikle halojenli titrantlar kullanılmıştır . Shukla ve arkadaşları (1983) K. Hekzasiyoneferrat III ve N-klorosüksinimid (NCS) , Amer ve arkadaşları (1989) N - klorosüksininimid (NCS) , N - bromosüksinimid (NBS) ve dibromohidantoin , Belal ve arkadaşları (1988) ise NBS ve 1,3dibromo-5,5dimetil hidantoin kullanarak titre etmişlerdir . İndirekt tayinlerin hepsinde reaktan fazlası , KI ilavesi ile açığa çıkan  $\text{I}_2$ 'un nişasta indikatörlüğünde  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ile titre edilmesiyle belirlenmiştir .

Değişik vucut sıvılarındaki İTK esaslı tayinlerde 2 ng miktarındaki hidroklorotiazid 'i Steinbach ve arkadaşları (1978) 272 nm 'de dansitometrik , Schacfer ve arkadaşları (1977) ise fluorodansitometrik ölçümlerden yararlanarak tayin etmişlerdir .

Tekli preparatlardaki hidroklorotiazid 'in UV-VIS spektrofotometrik kantitatif analizinde, maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boylarındaki direkt absorbans ölçümleri kullanılmıştır . Hu ve arkadaşları (1984) , hidroklorotiazid 'in metanoldeki çözeltisinin absorbansını 253 , 274 ve 323 nm 'de ölçmüştür . Xiao (1986) ise 272 nm 'deki ölçümleri kullanmıştır . Her iki çalışmada da tabletlerdeki diğer maddelerin , hidroklorotiazidin absorbansını etkilemedikleri belirtilmiştir .

HPLC yönteminin kullanıldığı , hidroklorotiazidin tekli preparatlarının analizlerinde genellikle ters faz kolonlar kullanılmıştır . Bu amaçla Dang (1991-) metanol - asetonitril - su (11:9:80) mobil fazını kullanmış ve 270 nm 'de hidroklorotiazid 'in miktarını saptamıştır .

Polarografik bir çalışmada ise Ling ve arkadaşları (1994) tabletlerdeki hidroklorotiazid 'i , diferansiyel puls polarografi tekniği kullanılarak saptamışlardır . Kokolos ve arkadaşları (1975) ise yine tabletlerdeki hidroklorotiazid 'i değişik polarografik teknikler yardımıyla belirlemişlerdir .

İkili karışımlardaki hidroklorotiazid ' in kantitatif analizlerinde UV - VIS spektrofotometrik , İTK - dansitometrik ve HPLC esaslı teknikler kullanılmıştır . UV - VIS spektrofotometrik tayinlerde , ikili karışımı oluşturan maddeler ya UV alanda doğrudan yada çeşitli renkli türevleri oluşturularak görünür bölgede analiz edilmişlerdir . UV alanda yapılan çalışmalarda , maddelerin maksimum absorbans verdikleri dalga boylarında yapılan absorbans ölçümlerinin yanında , ikili karışımı oluşturan maddelerin absorbanslarının eşit olduğu dalga boylarında yani isosbestik noktalarda yapılan ölçümler de kullanılmıştır . Bu çalışmaların yanında UV alanda türev spektroskopik ölçüm tekniklerinin kullanıldığı çalışmalar da oldukça fazladır . Görünür bölgede yapılan çalışmalarda hidroklorotiazid renkli türevleri haline getirildikten sonra , görünür alandaki absorbans ölçülmüştür .

HPLC yöntemlerinde ikili karışımı oluşturan maddeler değişik mobil fazlar yardımıyla ve genellikle UV veya floresans detektörlerin kullanılmasıyla saptanmıştır . Bu çalışmalar gerek tabletlerin gerekse idrar ve kan örneklerinin analizi için yapılmıştır .

Kantitatif amaçlı bir İTK yönteminde , propranol HCL ve hidroklorotiazid ' in ikili karışımının , benzen - metanol - etilasetat - amonyak (8:2:1:0,2) mobil fazında ayrılıp , 280 nm ' de dansitometre yardımıyla analizi gerçekleştirilmiştir (Shinde et al . , 1994) . El - Sadek ve çalışma grubu (1993) , hidroklorotiazid ' in spironolakton ve kaptopril ile olan iki ayrı ikili karışımının analizinde de yine spektrodansitometrik ölçümleri kullanmışlardır .

UV alandaki analizlerde , tek dalga boyunda absorbans ölçümlerinin yanında , iki dalga boyunda yapılan ölçümler ( bir dalga boyu isosbestik nokta ) ile türev spektrofotometrik ölçümlere de yer verilmiştir . İkili karışımların doğrudan absorbans ölçümleri yolu ile miktar tayininin yapıldığı çalışmalarda , maddelerden birinin absorbans vermediği dalga

boyunda diğerinin absorbansı ölçülmüştür. Böylece her madde, birbirlerinin absorbanslarından etkilenmedikleri dalga boylarında tayin edilmiştir. Hidroklorotiazid 'in; metoprolol tartarat ile (Nowakowaska 1988), spironolakton ile (Nowakowaska 1989), triamteren ile (Nowakowaska 1992) ve amilorid ile (Nowakowaska 1993) olan ikili karışımlarının analizlerinde, tabletlerdeki hidroklorotiazid 318 nm 'de saptanmıştır. Zhu (1987) ise hidroklorotiazid 'in timolol ile olan ikili tablet karışımının analizinde maddelerin bu özelliğini kullanmıştır. Qiu ve çalışma grubu (1987) yine hidroklorotiazid - triamteren karışımını bu yolla analiz etmiştir.

UV alanda ikili karışımlara uygulanmış miktar tayini yöntemlerinin bazılarında isosbestik noktadaki ölçümlerden yararlanılmıştır. Bu çalışmalarda karışımı oluşturan maddelerin eşit absorbans verdikleri isosbestik noktada, karışımı oluşturan maddelerin toplam absorbansı belirlenmektedir. Karışımı oluşturan maddelerden birinin absorpsiyon yapmadığı ikinci bir dalga boyunda ise, karışımdaki diğer maddelerin absorbansı belirlenip, maddelerin miktarları iki ayrı dalga boyunda yapılan ölçümler kullanılarak saptanmaktadır. Erram ve çalışma grubu bu teknik yardımıyla hidroklorotiazid 'in ; pindolol ile (1993 a), asebutolol veya atenelol ile (1993 b), propranol HCl ile (1994 a) ve satalol HCl ile (1994 b) olan ikili tablet karışımlarının analizini gerçekleştirmişlerdir.

Bulut ve arkadaşları (1984) ise hidroklorotiazid 'in spironolakton ile ikili tablet karışımının analizini absorbans oranları tekniği yardımıyla yapmışlardır.

UV alanda kantitatif amaçla yapılan analizlerde türev spektroskopisi teknikleride kullanılmıştır. Bu tekniklerde, türev absorpsiyonlarının okunmasında pik - sıfır (zero - crossing) ve pik - pik (peak to peak) yöntemleri kullanılmıştır. Pik - sıfır tekniğinde, spektrumdaki diğer maddenin türev absorbansının sıfır olduğu dalga boyunda türev pikinin yüksekliğinin absise olan uzaklığının, ordinata paralel olarak ölçülmesi ile elde edilen ölçümler kullanılır. Pik - pik tekniğinde ise birbirini izleyen iki ekstremum arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülür. Hidroklorotiazid 'in ikili karışımlarının türev spektroskopik analizlerinde daha çok pik - sıfır tekniği kullanılmıştır. Hidroklorotiazid 'in kaptopril ile olan ikili tablet karışımının analizini Mahgoub ve arkadaşları (1992), 1. derece türev spektrumlarından pik - sıfır tekniği kullanarak yapmışlardır. Aynı karışımın analizini Salem ve arkadaşları (1991) 'da yine aynı tekniği kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bedair ve

arkadaşları (1991) , hidroklorotiazid ile triamteren 'in kombine olduğu tabletlerin analizlerinde , pik - sıfır tekniğini 1. ve 2. derece türev spektrumlarında kullanmışlardır . Carlucci ve arkadaşları (1993) enalapril maleat - hidroklorotiazid ikili karışımının analizinde 2. derece türev spektrumunda , pik - sıfır tekniği ile yapılan ölçümleri kullanmışlardır .

İkili karışımlara uygulanmış bazı çalışmalarda maddelerden biri türev absorbans değerlerinden yararlanılarak pik - sıfır tekniği ile ölçülürken , diğeri birinci maddenin absorpsiyon yapmadığı bölgedeki bir dalga boyunda absorbansı ölçülerek tayin edilmiştir . Örneğin Yücesoy (1990) yaptığı bir çalışmada hidroklorotiazid 'in amilorid HCl ile olan ikili karışımının analizinde , hidroklorotiazid 'i 1. derece türev spektrumundan , amilorid HCl 'i ise 361,5 nm 'deki absorbansını ölçmek yolu ile belirlemiştir .

Pik - sıfır tekniğinin yanında pik - pik tekniği de bazı ikili karışımların türev spektroskopik analizlerinde kullanılmıştır . Porissi ve arkadaşları (1989) hidroklorotiazid 'in amilorid ile olan ikili tablet karışımlarının analizlerinde her iki madde 2. derece türev spektrumundaki ekstremumlar arasındaki uzaklıkların kullanıldığı pik - pik ölçümleri kullanılarak hesaplanmıştır .

UV alanda yapılan bu çalışmaların yanında , görünür bölgede yapılan analizler de oldukça fazladır . Görünür bölgede yapılan çalışmalarda , maddenin kendisinin veya hidroliz ürünlerinin renkli türevleri oluşturulmuştur . Sulu çözeltide hızla hidroliz olan hidroklorotiazid 'in , hidroliz ürünü olan 5 - kloro - 2,4 disülfamil anilin 'in diazolanması ve diazolanmış bu ürünün aromatik bir amin veya fenol ile kenetlenmesiyle oluşan kararlı azo boyar maddelerinin absorbansının ölçülmesi , hidroklorotiazid 'in kantitatif tayinine olanak sağlamaktadır . Bu amaçla kenetlenme belirteci olarak Sheppard ve arkadaşları (1960) N-(1- naftil)-etilendiamin , Magalhaes ve çalışma grubu (1971) benzen sülfonik asit , Rehm ve arkadaşları (1960) kromotropik asit ve Kala (1965) ise timol kullanmışlardır . Hidroliz ürünlerinin diazolanmasının yanında , maddenin kendisinin bazı renk reaksiyonlarından da yararlanılmıştır . Moussa ve arkadaşları (1985) tabletlerde spironolakton ile ikili karışım halinde bulunan hidroklorotiazid 'in butilamin ve susuz  $CoCl_2$  ile verdiği mavi viole rengin kolorimetrik olarak ölçülmesiyle belirlemişlerdir . Elsayed ve arkadaşları (1979) ise tabletlerdeki hidroklorotiazid 'in saptanmasında , bazik safranin boyaları ile iyon çifti ekstraksiyonunu kullanmışlardır .

HPLC tekniklerinin kullanıldığı kantitatif amaçlı ikili tablet karışımlarının analizlerinde özellikle ters faz kolonlar kullanılmıştır. Nitekim USP XXII 'da hidroklorotiazid 'in Metildopa , Propranol , Amilorid HCl , Metoprolol tartarat ve Timolol Maleat ile olan ikili karışımlarının analizleri için değişik oranlardaki metanol - fosfat tamponu karışımından oluşan mobil fazların , ters faz kolonlarda kullanılması önerilmiştir . De Croo ve arkadaşları (1985) ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemiyle hidroklorotiazid 'in amilorid HCl ile kombine olan tabletlerinin analizini gerçekleştirmişlerdir . Sane ve arkadaşları (1992) yöntemi hidroklorotiazid - lisinopril karışımının analizinde kullanmışlardır . Jain ve çalışma grubu (1992) ise RP-HPLC yöntemi ile hidroklorotiazid 'in enalapril maleat ile kombine tabletlerinin analizini gerçekleştirmişlerdir .

Sıvı kromatografisi yöntemlerinde detektör olarak genellikle UV detektörler kullanılmaktadır . Jain ve arkadaşları (1991) hidroklorotiazid - kaptopril tabletlerinin analizinde metanol - sodyum fosfat (30:70) mobil fazı kullanmışlar ve kolonda ayrılan bileşikleri UV detektör yardımıyla belirlemişlerdir . Fatmi ve çalışma grubu (1990) ise metanol - butil amonyum fosfat mobil fazı kullanarak hidroklorotiazid - hidralazin HCl karışımını , UV detektör yardımıyla analiz etmişlerdir . Ficcaro ve arkadaşları (1986) metoprolol tartarat - hidroklorotiazid karışımının analizini gerçekleştirmişlerdir . Bu çalışmada asetik asit - asetonitril mobil fazı ve UV detektör kullanmışlardır . Sasa ve arkadaşları (1988) ise hidroklorotiazid 'in atenolol ile kombine olduğu tabletlerin analizinde yine UV detektör kullanmışlardır .

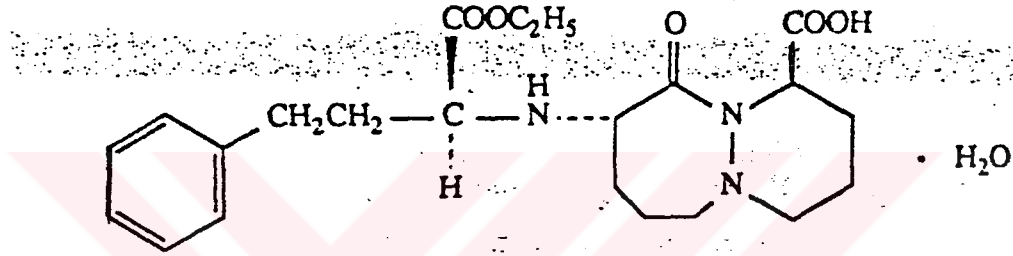
UV detektörlerin yanında , floresans detektörler de kantitatif sıvı kromatografisi çalışmalarında kullanım alanı bulmuştur . Cieri (1988) tabletlerdeki hidroklorotiazid - reserpin karışımının kantitatif analizi için yaptığı çalışmada , tablet karışımını metanolde çözdükten sonra , çeşitli mobil fazlar yardımıyla karışımı kromatografiye etmiştir . Bu karışımın analizinde seri bağlanmış 2 ayrı detektör kullanılmıştır . Karışımındaki reserpin 'i floresans detektör yardımıyla (280 nm 'de uyarma ve 360 nm 'de emisyon) saptamıştır . Hidroklorotiazid 'i ise 345 nm 'de UV detektör yardımıyla tayin etmiştir . Cieri (1994) yaptığı bir başka çalışmada bu ikili karışıma ilave olarak hidralazin HCl 'in kombine olduğu tabletlerin tayinini amaçlamıştır . Çalışmada reserpin yine floresans detektör ile belirlenmiş olup , karışımındaki hidroklorotiazid ve hidralazin HCl UV detektör ile 260 nm 'de saptanmıştır .

## 2 . 1 . 2 . Silazapril

### 2 . 1 . 2 . 1 . Özellikleri ( Merck Index )

Silazapril antihipertansif tedavi amacıyla kullanılan ve ACE inhibitörü olan bir ilaç maddesidir . Aşağıdaki biçimde isimlendirilir .

[1s - [1 , 9 (R\*) ] ] - 9 - [ [ 1 - (Etoksi karbonil) - 3 - Fenil propil ] - amino ] oktahidro - 10 - okso - 6 H - piridazino - [ 1 , 2 - a ] [ 1 , 2 ] diazepin - 1 - karboksilik asit - monohidrat .



Kapalı Formülü :  $C_{22} H_{31} N_3 O_3 \cdot H_2O$

Molekül Ağırlığı : 435 , 52 g mol<sup>-1</sup>

Elementel Bileşimi : C (% 60,67) , H ( % 7,64) , N (% 9,65) , O (% 22,04)

Erime Noktası : 95 - 97 °C

Beyaz kristalize ve kokusuz tozdur . Literatürde etanolde çözüldüğü bildirilmiştir . Yaptığımız incelemelerde , organik çözücülerde (metanol , kloroform , aseton) çok iyi , asitik ve bazik çözücülerde (0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH) zor ve suda çok az çözüldüğü belirlenmiştir .

Optik Çevirmesi :  $[\alpha]_D^{20} = - 62,51$  (Etanoldeki % 1'lik çözeltisinin)

Silazapril vucuda alındıktan sonra , aktif metaboliti olan silazaprilat ' a dönüşür . Bu madde dikarboksilik asit yapısındadır ve şu şekilde isimlendirilir :

9 (s) - [1(s) - karboksi - 3 fenil propil amino] - oktahidro - 10 - oksa - 6H - piridazino - [ 1 , 2 , -a ] [1 , 2] - diazepin - 1 (s) - karboksilik asit

Kapalı Formülü :  $C_{20}H_{27}N_3O_5$

Molekül Ağırlığı :  $389,25 \text{ g mol}^{-1}$

Erime Noktası :  $242 \text{ }^{\circ}\text{C}$

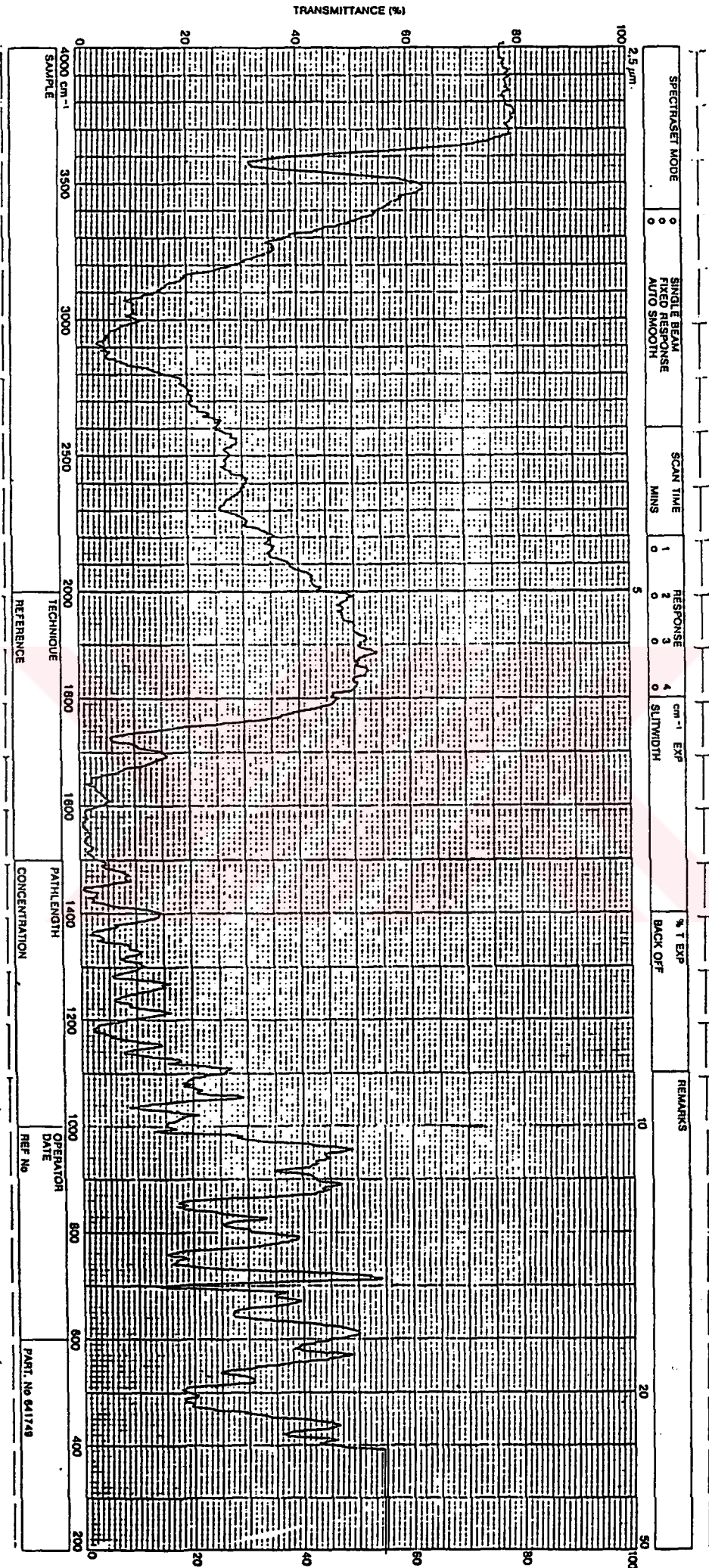
Optik Çevirmesi :  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -74,7$  (1 M NaOH 'deki 0,5 M 'lik çözeltisinin)

IR Spektrumu : Silazapril 'in IR spektrumu KBr disk kullanılarak alınmıştır . Şekil 2.2. 'de bu spektrum gösterilmiştir .

UV spektrumu : Silazaprilin çeşitli çözücülerdeki absorpsiyon özellikleri tablo 2.2. verilmiştir .

Tablo 2. 2. Silazaprilin absorbans özellikleri

Çözücü	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\log \epsilon$
Metanol	214,5	4,098
Etanol	209,6	4,080
0,1 N HCl	208,8	4,132
0,1 N NaOH	219,2	3,918



Şekil 2. 2. Silazapril 'in IR spektrumu



## 2 . 1 . 2 . 2 . Farmakolojik Etkisi

ACE ( Anjiontensin converting enzyme ) inhibitörleri , hipertansiyon tedavisinde kullanılan maddelerdir . Birer ACE inhibitörü olan silazapril ve Benazepril sentezleri ve kullanımları bakımından yeni ilaç maddeleridir . Lisinopril , Perindopril , Enalapril ve Kaptopril bu gruba giren diğer ilaç maddeleridir .

Böbreklerden salgılanan Anjiotensin I enzimi , kanda bulunan anjiotensin dönüştürücü enzim 'in etkisiyle Anjiotensin II 'ye dönüşür . Bu enzim , Anjiotensin I'e göre daha kuvvetli damar büzücü etkiye sahiptir . Bunun sonucunda damarların büzülmesi ile tansiyon yükselmesi meydana gelir . Oral yolla alınan ACE inhibitörü ilaç maddeleri de Anjiotensin I 'ın , Anjiotensin II 'ye dönüşümünü engeller . Bu sebeple plazmada ve dokularda Anjiotensin II düzeyi azalır . Dolayısıyla atar ve toplar damarlardaki genişlemeye bağlı kan basıncının (tansiyon) düşmesine neden olur .

ACE inhibitörü ilaçların yaptığı tansiyon düşmesi , farkedilecek kadar belirgin olur . Özellikle diüretiklerle kombine preparatların kullanılmasıyla , ilerlemiş hipertansiyon olgularda bile kısa sürede azalma görülür . (Dökmeci 1979) .

## 2 . 1 . 2 . 3 . Analiz Yöntemleri

Silazapril , sentezi ve kullanımı ile oldukça yeni bir ilaç maddesidir . Literatürde silazapril ile yapılmış çalışmalar daha çok farmakolojik özellikleri üzerinedir . Analiz metodları için yapılmış çalışmalar da çok az olmakla beraber aşağıda yer verilmiştir .

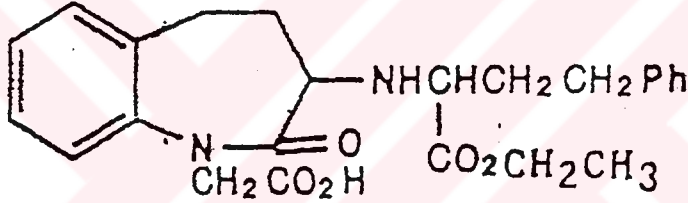
Ezawa ve arkadaşları (1989) yaptıkları çalışmalarda silazaprilin fizikokimyasal özelliklerini açıklamışlardır . Yaptıkları çalışmada silazapril 'in elementel , IR , NMR ve kütle spektroskopik analizlerini yapmışlardır . Ayrıca erime noktası , dağılma katsayısı , pK<sub>a</sub> değeri ve optik çevirmesi gibi özelliklerini de belirlemişlerdir . Bunun yanında silazaprilin stabilitesi ve bozunma ürünleri hakkında açıklamalar getirmişlerdir . Ancak bu çalışmanın yer aldığı literatürü bulmak olanığımız olmadığı için daha ayrıntılı bilgilere yer verilemedi .

Tanaka ve arkadaşları (1987) yaptıkları çalışmada enzim immünassay yöntemiyle silazapril ve aktif metaboliti olan silazaprilat'ı farklıdır , kantitatif olarak tayin etmişlerdir . Yöntemi plazma ve serum örneklerine uygulamışlar ve sonuçları radyo enzimik tayinlerle karşılaştırmışlardır .

### 2 . 1 . 3 . Benazepril

#### 2. 1 . 3 . 1 . Özellikleri

Benazepril silazapril gibi yeni kullanım alanı bulan bir ACE inhibitörüdür . Madde ve metaboliti hakkında literatürde bilgi bulunamamıştır . Verilen bu bilgiler Ciba - geigy A.Ş 'den sağlanmıştır .



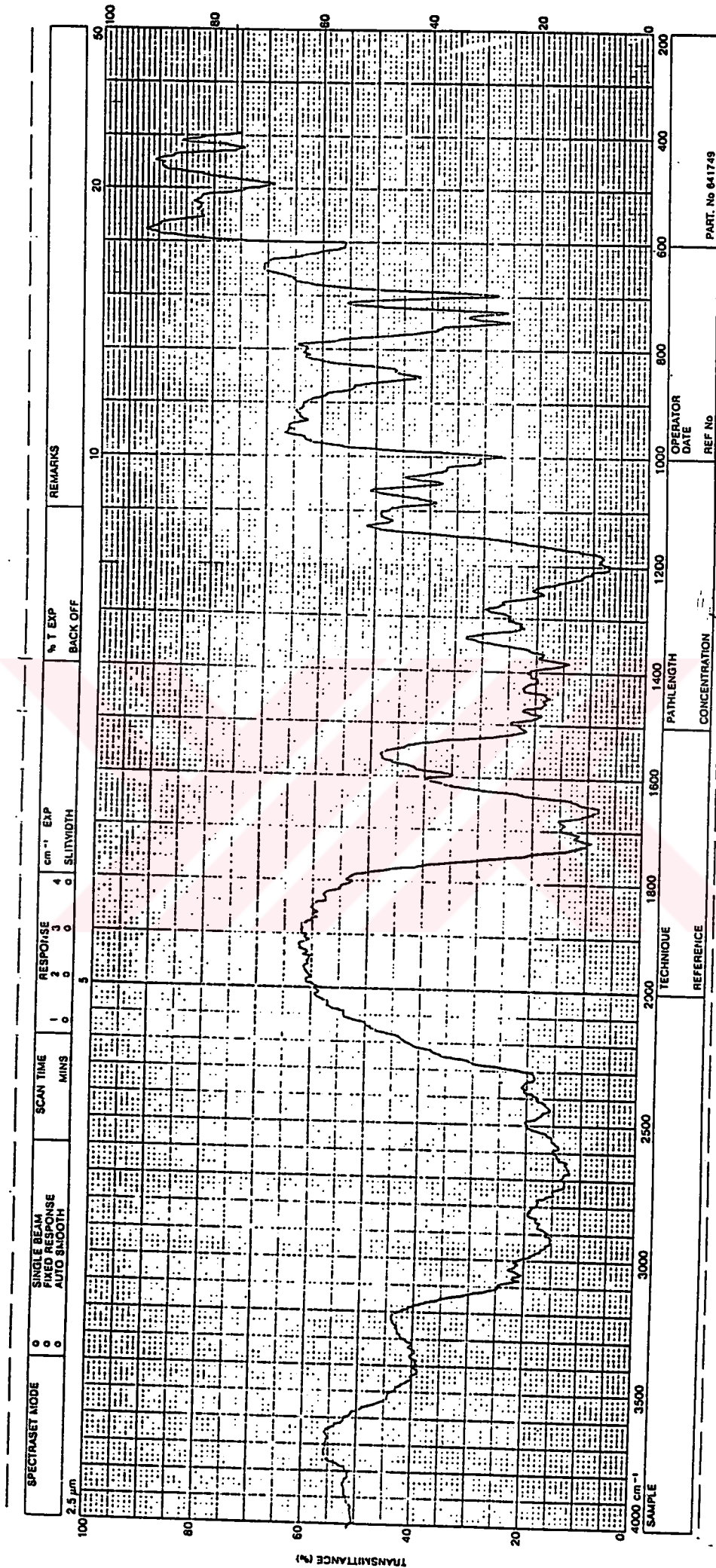
Kapalı Formülü :  $C_{24} H_{28} N_2 O_5 \cdot HCl$

Molekül Ağırlığı :  $461 \text{ g.mol}^{-1}$

Erime Noktası :  $176 - 181 \text{ } ^\circ\text{C}$

Beyaz , kristalize kokusuz tozdur . Metanol ve etanolde serbestçe , diklorometan , sikloheksan , etil asetat ve suda az çözünür . Bunlara ilaveten yaptığımız çözünürlük testlerinde kloroformda çok , asidik ve bazik sulu çözeltilerde (  $0,1 \text{ N HCl}$  ,  $0,1 \text{ N NaOH}$  ) zor çözüldüğü belirlenmiştir .

IR Spektrumu : Benazepril 'in IR spektrumu KBr disk kullanılarak alınmıştır ve şekil 2.3. ' de gösterilmiştir .



Şekil 2.3. Benzepiril'in IR spektrumu

### UV Spektrumu :

Benazepril 'in çeşitli çözücülerdeki absorbans özellikleri tablo 2. 3. 'de verilmiştir .

Tablo 2 . 3 . Benazepril 'in çeşitli çözücülerdeki absorpsiyon özellikleri

Çözücü	$\lambda_{max}(nm)$	log $\epsilon$
Metanol	209	4,448
	241	4,015
Etanol	208	4,484
	240	4,027
0,01 N HCl	206,7	4,465
	236,8	4,047
0,01 N NaOH	217,6	4,078
	241,6	4,045

### 2 . 1 . 3 . 2 . Farmakolojik Etkisi

Benazepril , silazapril gibi ACE inhibitörleri grubuna giren bir ilaç maddesidir . Farmakolojik etkisi , silazaprilinkine ile aynı olduğu için bu bölümde tekrar yer verilmemiştir .

### 2 . 1 . 3 . 3 . Analiz Metodları

Benazepril de silazapril gibi sentezi ve kullanımı ile oldukça yeni bir ilaç maddesidir . Bu yüzden literatürde bu maddenin analizine ilişkin yapılmış çalışmalar çok azdır . Bulabildiğimiz birkaç çalışma aşağıda verilmiştir .

Kaiser ve arkadaşları (1987) yaptıkları bir çalışmada benazepril ve metaboliti olan benazeprilat 'ı gaz kromatografisi - kütle spektroskopisi yöntemi ( GC - MS ) ile tayin etmişlerdir . Benazepril ve benazeprilat plazma ve idrardan asidik XAD - 2 reçinesi veya Extrelut 1 kolonunu kullanarak izole etmişlerdir . İzole edilen maddeler diazometan ile türevlendirilmiş ve bu türevler dolgu kolon gaz kromatografisi - iyon seçicili elektron impact kütle spektroskopisi ile analiz edilmiştir . Bu analizin plazma ve idrar örneklerinin farmakokinetik ve

biyoyararlanım çalışmaları için kullanışlı ve hassas olduğu belirtilmiştir. Sioufi ve arkadaşları (1988) aynı çalışmayı kapiler kolonlarla tekrarlayarak daha duyarlı bir çalışma yapmışlardır.

## 2.2. Türev Spektroskopisi

Türev spektroskopisi, UV - VIS spektroskopisinin nispeten yeni bir uygulamasıdır. 1950'li yıllarda absorpsiyon spektrumlarının ayrıntılarının belirginleştirilmesi amacıyla ortaya konmuş ancak analitik kimyadaki uygulaması 1970'li yıllarda analitik cihazlarda kullanılması ile başlamıştır (Geise et al 1955, Hammond et al 1953, Morrison 1953, Tannenbaver et al 1953). Günümüzde özellikle farmasötik analizlerde geniş uygulama alanı bulmuştur.

Türev spektrometrisinin prensibi, klasik absorpsiyon spektrumlarının yerine, türev spektrumlarının kullanılmasıdır. Türev spektrumlarının oluşturulması için gerekli olan matematiksel işlemler spektrofotometredeki bilgisayarlar yardımı ile yapılmaktadır.

Bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi  $dy/dx$ 'dir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda ise, türev  $dA/d\lambda$  olacaktır. Spektrumun herhangi bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp, dalga boyunun fonksiyonu olarak grafik edildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde  $d^2A/d\lambda^2$ .....  $d^nA/d\lambda^n$  derecesinde türev spektrumları elde edilir.

Absorpsiyon spektrumlarında herhangi bir dalga boyunda Lambert - Beer yasası geçerli ise bu yasanın ifadesinden hareketle n. dereceden türev spektrumunda türev absorbansı  ${}^nD$ 'in konsantrasyon ile ilişkisini ifade eden eşitlik türetilir.

$A = \epsilon.b.c$ . Absorbans molar absorptivite ile doğru orantılı olduğu için:  
 ${}^nD = d^nA/d\lambda^n = (d^n\epsilon/d\lambda^n).b.c$  yazılabilir. Görüldüğü gibi türev absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında doğrusal ilişki vardır. Bu da türev spektrofotometresinin kantitatif uygulamalarının temelini oluşturur.

UV - VIS Türev spektroskopisinin avantajları ve kullanım alanları oldukça çeşitlidir :

$\lambda_{\max}$  ' un kesin olarak belirlenmesi :

Orjinal spektrumda maksimum absorbansın bulunduğu dalga boyunda 1 . türev eğrisinin sıfırdan geçmesi , bu dalga boyunun çok daha kesin bir şekilde saptanabilmesine olanak sağlar .

Rezolüsyondaki artış :

Türev spektrumlarının 2 . bir avantajı da orjinal spektrumda zor görülebilen ince yapının , ortaya çıkması yani rezolüsyonun artmasıdır . Bunun için çift sayılı türev spektrumları daha avantajlıdır . Çünkü orjinal spektrumda bulunan maksimum ve minimumlar bu spektrumlarda yine aynı dalga boylarında birer ekstremum halinde ortaya çıkar .

İdentifikasyon :

Özellikle absorpsiyonu görünür bölgede olan renkli maddelerin absorpsiyon spektrumları geniş bantlar halinde olduğu için bu spektrumlar maddenin karakterizasyon ve identifikasyonunda önem taşımaz . Buna karşın orjinal spektrumundaki omuzların türev spektrumlarında özellikle yüksek dereceli olanlarda ekstremum haline dönüşmesi , piklerin sayısının artması ve keskinleşmesi ile spektrumun ince yapısı ortaya çıkar ve adeta infrared parmak izi spektrumlarına benzeyen spesifik spektrumlar elde edilir . (Talsky 1987) .

Bulanık çözeltilerde kantitatif analiz :

Bulanık çözeltiler ve süspansiyon ya da emülsiyon katı veya sıvı maddeler içeren çözeltilerle spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur . Özellikle UV alanda ışın saçılması sebebi ile , analitin spektrumu kuvvetli yada zayıf bir zemin absorpsiyonu ile çakışır . Türev spektrumdaki uygun pik - pik uzaklıkları değerlendirilerek , bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi yok edilebilir . Bu teknik atık sularda fenol tayinini amaçlayan bir çalışmada kullanılmıştır . ( Talsyk 1983 )

### Matriks etkisinin giderilmesi :

Türev spektrumların alınması ile orjinal spektrumladaki keskin spektral özellikler kuvvetlenmekte ve keskinleşmekte , buna karşın geniş ve yaygın bantlar daha da basıklaşmaktadır . Bu özellik analit piki ile çalışan değişken zemin absorpsiyonunun düzeltilmesine ve bu şekilde matriks etkisinin giderilmesine olanak sağlar ( Davidson et al 1982)

### Safılık kontrolü :

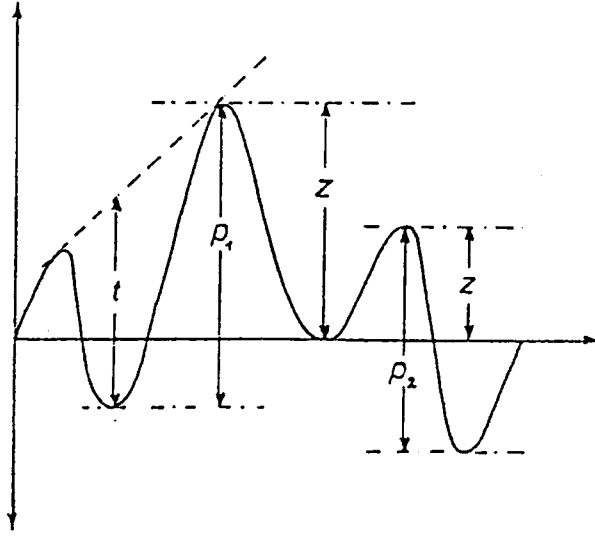
Türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar maddelerin safılık testlerinde de avantaj sağlar . Eser miktardaki safsızlıklara ait küçük absorpsiyon pikleri türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür . Bu spektrumların saf maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumları ile karşılaştırılması ile safılık kontrolü yapılabilir .

### Eser analiz :

İlaç maddesi , besinler v.b. maddelerde bulunabilen eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarının tayin edilmesi de türev spektrofotometresinin bir başka uygulama alanıdır . Buna örnek olarak etanolde eser miktarda bulunan benzenin tayini gösterilebilir ( Talsky et al. 1978 ) .

### Karışımları simultane analizi :

Türev spektrofotometresinin oldukça yaygın bir kullanım alanı da absorpsiyon bantları çakışan ve bir sebeple absorpsiyon spektrofotometresi ile bir ön ayırma yapmaksızın tayin edilemeyen karışımların simultane analizidir . Bu konuda yapılmış çalışmalar kombine ilaç preparatlarında ve besinlerdeki katkı maddelerinin analizine yoğunlaşmıştır . Bu analizlerde pik - sıfır ( Morelli 1988 a,b, 1990 ) , pik - pik ( Morel , 1988 ) , ve pik - pik oranı (Talsky et al 1987 ) ölçümleri kullanılmıştır .



**z : pik - sıfır ölçümü**

**p : pik - pik ölçümü**



### 3 . DENEYSEL BÖLÜM

#### 3 . 1 . Maddeler , Çözücüler ve Çözeltiler

##### 3 . 1 . 1 . İlaç Maddeleri ve Çözücü

Farmasötik saflıkta hidroklorotiazid<sup>1</sup> , silazapril<sup>1</sup> , benazepril<sup>2</sup> temin edildiği şekilde kullanıldı . Çözücü olarak metanol<sup>3</sup> kullanıldı .

##### 3 . 1 . 2 . Standart Çözeltiler

Hidroklorotiazid , silazapril ve benazepril 10 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki standart çözeltileri spektrumların alınması ve deney koşullarının saptanması için kullanıldı . 40 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki diğer standart çözeltiler ise ölçü eğrilerinin hazırlanması için kullanıldı .

---

1 : Roche A.Ş. , 2 : Ciba - Geigy A.Ş. , 3 : Merck

### 3.2. Alet ve Diğer Gereçler

Spektrofotometre (Philips PU 8700 UV-VIS), analitik terazi (August Sourter GmbH D-700, 0,1 mg'a duyarlı), çalkalayıcı (NÜVE SL50) 3.9 µm çapında, 30cm boyunda 10 µm Bandopak C<sub>18</sub> ters faz kolon, 510 model yüksek basınç pompası, 481 model değişken dalga boylu spektrofotometre, bilgisayar ve yazıcıdan oluşan sıvı kromatografisi cihazı (Waters), 25 µl hamilton enjektör.

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Spektrumların Çizilmesi

Hidroklorotiazidin silazapril ve benezepril ile olan ikili karışımlarının analizinde absorpsiyon (A), birinci türev (<sup>1</sup>D), ikinci türev (<sup>2</sup>D) ve üçüncü türev (<sup>3</sup>D) spektrumları metanole karşı 200 - 300 nm dalga boyu aralığında, 2 nm band genişliğinde, 500 nm.dakı tarama hızı ile alındı.

#### 3.3.2. Hidroklorotiazid - Silazapril Karışımının Analizi

##### 3.3.2.1. Türev Spektrofotometrik Yöntem

###### 3.3.2.1.1. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Hidroklorotiazid'e ait ölçü eğrisinin hazırlanması için 40 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki standart hidroklorotiazid çözeltisi kullanıldı. Bu standart çözeltilerden sırayla 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ml. ayrı ayrı 10 ml.'lik balon jöjelere konuldu ve balon jöjeler çözücü ile hacmine tamamlandı. Balon jöjeler iyice karıştırıldıktan sonra bölüm 3.3.1'de belirtilen koşullarda 3. derece türev absorpsiyon değerleri (<sup>3</sup>D<sub>272,9</sub>) okundu. Bu türev değerleri ile bu değerlere karşılık gelen konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi oluşturuldu. Ölçü eğrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre saptandı.

Silazapril'e ait ölçü eğrisinin hazırlanması için 40 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki standart silazapril çözeltisi kullanıldı. Bu standart çözeltilerden sırayla 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 ml. ayrı ayrı 10 ml.'lik balon jöjelere konuldu ve balon jöjeler çözücü ile hacmine tamamlandı. Balon jöjeler iyice karıştırıldıktan sonra, bölüm 3.3.1.'de belirtilen koşullarda, 2. derece türev spektrumları alındı. Bu spektrumlardan 215 nm'deki 2. derece türev absorpsiyon değerleri (<sup>2</sup>D<sub>215</sub>) alındı. Bu türev değerleri ile bu değerlere karşılık gelen konsantrasyonlar arasında ölçü eğrisi oluşturuldu.

Ölçü eğrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre saptandı .

### 3 . 3 . 2 . 1 . 2 . Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Hidroklorotiazid - silazapril karışımı içeren tabletlerin analizi için 10 tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı bulundu . Tabletler birarada toz edildi ve buradan 2,5 mg civarında hidroklorotiazid içeren bir miktar doğru olarak tartılıp 25 ml ' lik balon jojeye konuldu . 10 - 15 ml metanol ilavesi ile çalkalayıcıda 15-20 dak. çalkaladıktan sonra hacmine tamamlandı . Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra , mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü . Süzültünün ilk 15 ml 'si atıldıktan sonra , süzüntüden 1 ml . alınarak 10 ml ' lik balon jodede metanolla hacmine tamamlandı . Hazırlanan bu çözeltinin bölüm 3.3.1 'de belirtilen koşullarda 2. ve 3. derece türev spektrumları alındı . 2. derece türev spektrumundan silazapril için 215 nm 'deki , 3.derece türev spektrumundan hidroklorotiazid için 272,9 nm 'deki türev absorbans değerleri okundu . Bu değerlerin ölçü eğrisindeki karşılıkları bulunarak tabletteki madde miktarları tayin edildi.

### 3 . 3 . 2 . 2 . Kıyas Yöntemi

Kıyas yöntemi olarak ters faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi kullanılmıştır . Yöntemde mobil faz olarak metanol - pH = 4 fosfat tamponu (70:30) kullanılmıştır . Detektör olarak UV detektör kullanılmış ve maddeler 209 nm 'de belirlenmiştir . Akış hızı 1 ml / dak. (1500 pSI) 'dır ( Çetin ,1996) .

### 3 . 3 . 3 . Hidroklotiazid - Benazepril Karışımının Analizi

#### 3 . 3 . 3 . 1 . Türev Spektrofotometrik Yöntem

##### 3 . 3 . 3 . 1 . 1 . Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması.

Ölçü eğrilerinin çizilmesi için her iki maddenin metanoldeki 40 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki standart çözeltileri kullanıldı . Bu standart çözeltiden ayrı ayrı alınan 0,5 , 1,0 , 1,5 , 2,0 , 2,5 ml. hacimler ayrı ayrı 10 ml 'lik balon jodelerde hacmine tamamlandı . Elde edilen standart çözeltilerin bölüm 3.3.1 'de belirtilen koşullarda

spektrumları alındı. Benazepril için 3.derece türev spektrumlarından 224,7 nm 'deki 3.derece türev absorbands değerleri ( ${}^3D_{224,7}$ ), hidroklorotiazid için 2. derece türev spektrumlarından 253,7 nm 'deki 2. derece türev absorbands değerleri ( ${}^2D_{253,7}$ ) okundu. Bu değerler ile bu değerlere karşılık gelen konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek her iki madde için ölçü eğrileri oluşturuldu. Ölçü eğrilerine ait doğru denklemleri en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

### 3.3.3.1.2. Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Hidroklorotiazid - Benazepril karışımı içeren tabletlerin analizi için 10 tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı bulundu. Tabletler birarada toz edildi ve burada 4,7 mg civarında hidroklorotiazid içeren bir miktar doğru olarak tartılıp 50 ml 'lik balon jøjeye konuldu. 15 - 20 ml metanol ilavesi ile çalkalayıcıda 15 - 20 dak. çalkaladıktan sonra hacmine tamamlandı. Çözelti mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 15 ml 'si atıldıktan sonra süzüntüden alınan 2 ml 25 ml 'lik balon jøjede hacmine tamamlandı. Elde edilen bu çözeltinin bölüm 3.3.1 'de belirtilen koşullarda 2. ve 3. derece türev spektrumları alındı. Elde edilen bu çözeltinin 3.derece türev spektrumundan benazepril için 224,7 nm 'deki , 2. derece türev spektrumundan hidroklorotiazid için 253,7 nm 'deki türev absorbands değerleri okundu. Bu değerlerin ölçü eğrisindeki karşılıkları bulunarak tabletteki madde miktarları tayin edildi.

### 3.3.3.2. Kıyas Yöntemi

Bu tabletlerin sıvı kromatografisi ile analizi hidroklorotiazid - silazapril karışımını içeren diğer tabletlerin sıvı kromatografik analizi gibi olduğu için bölüm 3.3.2.2.1. 'de anlatıldığı gibidir. Bu yüzden tekrar bahsedilmeyecektir.

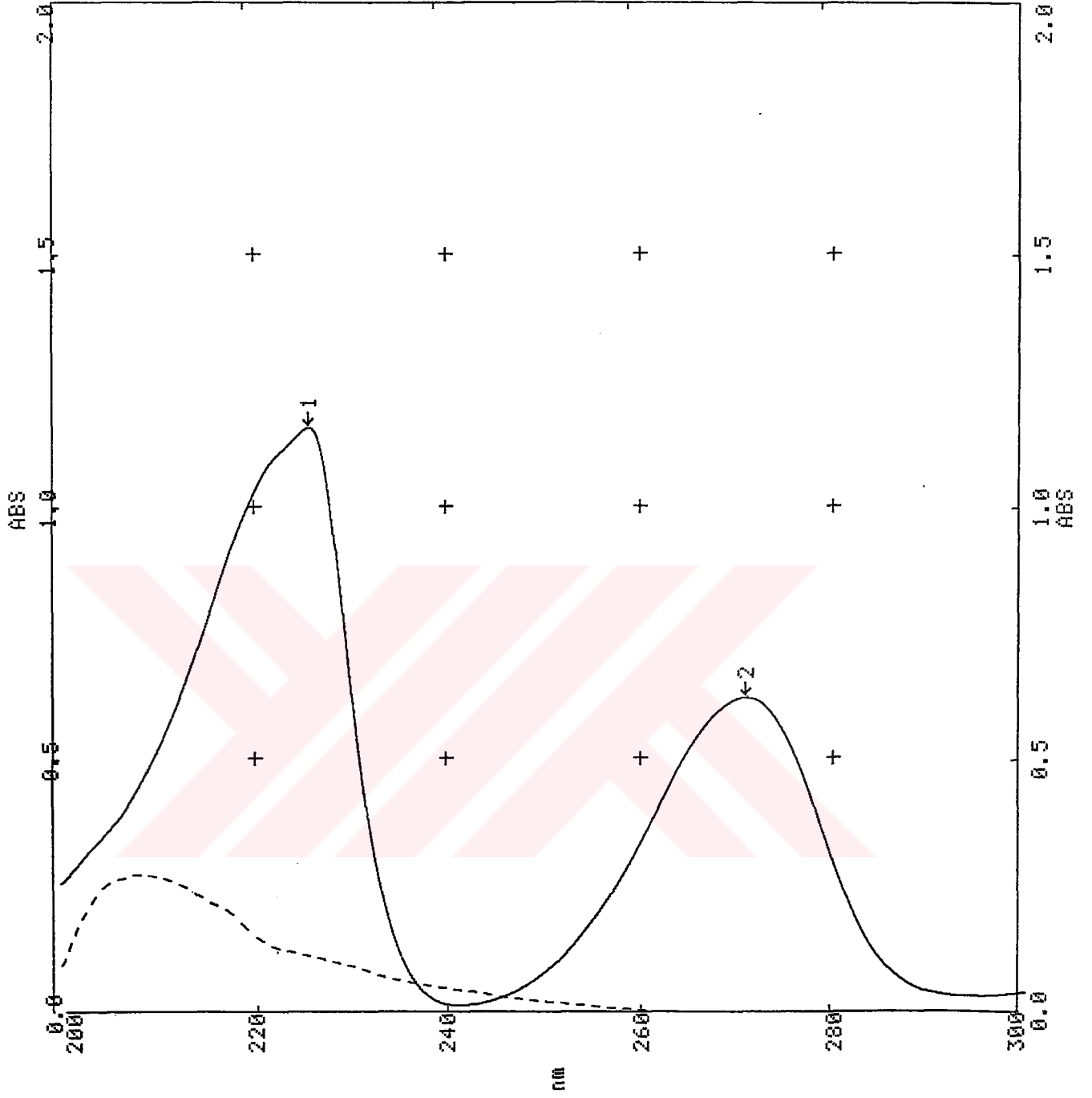
## 4 . SONUÇLAR

### 4 . 1 . Hidroklorotiazid - Silazapril Karışımının Analizi

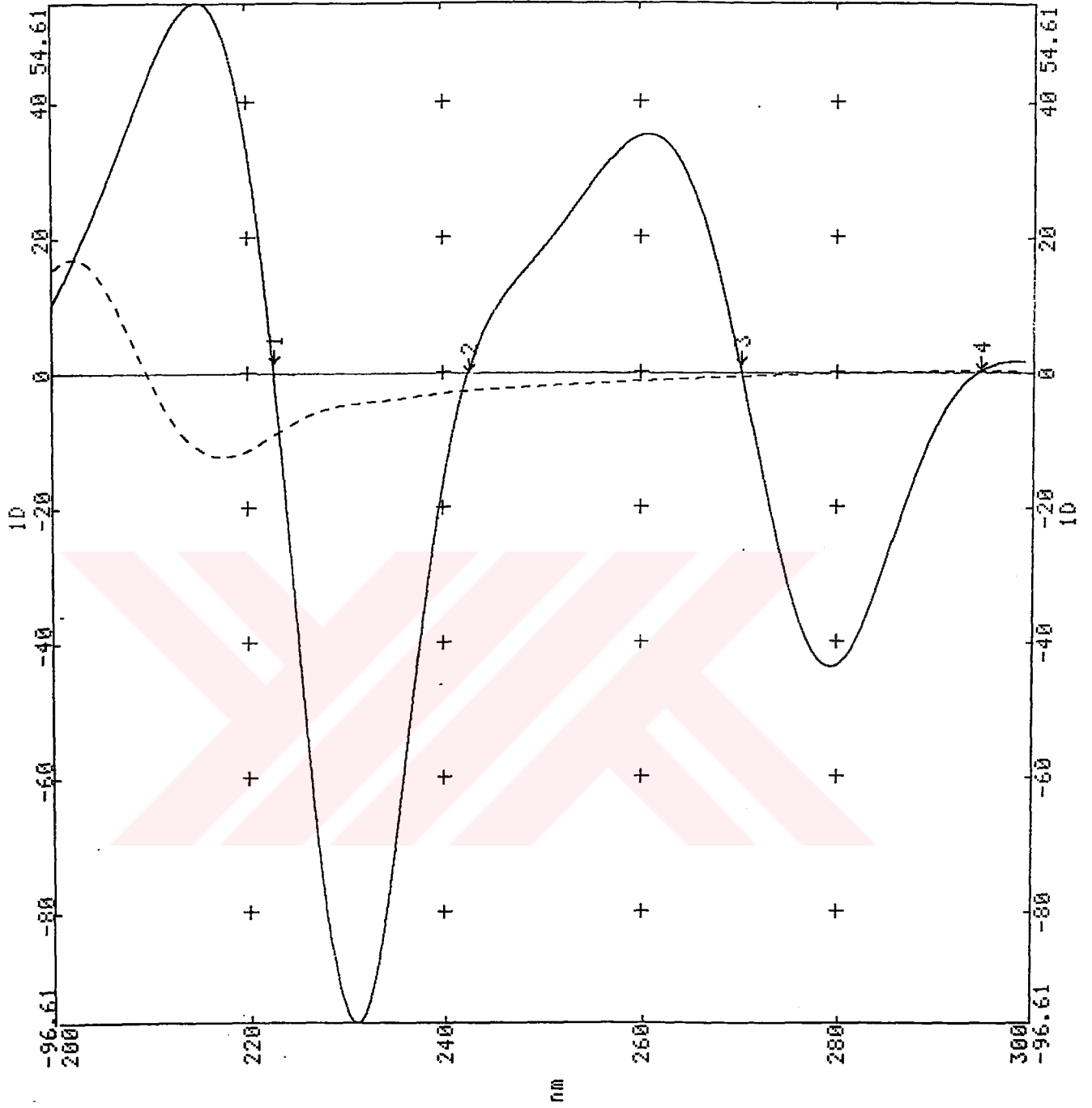
#### 4 . 1 . 1 . Uygun Koşulların Belirlenmesi

Hidroklorotiazid ve silazapril 'in 0,1 N HCl , 0,1 N NaOH ve metanoldeki 10 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı . Bölüm 3 . 3 . 1 . ' de verilen ölçüm koşullarında absorpsiyon ve 1 . , 2 . , 3 . derece türev absorpsiyon spektrumları alındı . Bu üç çözücüdeki absorpsiyon spektrumlarına bakıldığında bu maddelerin absorpsiyon piklerinin üst üste çakıştığı görülmüştür . Bu yüzde bu iki maddenin birarada tayini , bir ön ayırma yapmaksızın , absorpsiyon spektrofotometrisi ile mümkün değildir . Bu yüzden bu iki maddenin bir arada tayininde türev spektrumlarından yararlanılmıştır . Yine bu üç çözücüde alınan türev spektrumlarına bakıldığında maddelerin analizleri için spektrumların birbirine üstünlük sağlamadıkları görülmüştür . Bundan dolayı çözücü seçerken , maddelerin bu çözücülerdeki çözünürlükleri göz önüne alınmıştır . Her iki maddenin de metanoldeki çözünürlüğü çok iyi olduğu için çözücü olarak metanol seçilmiştir .

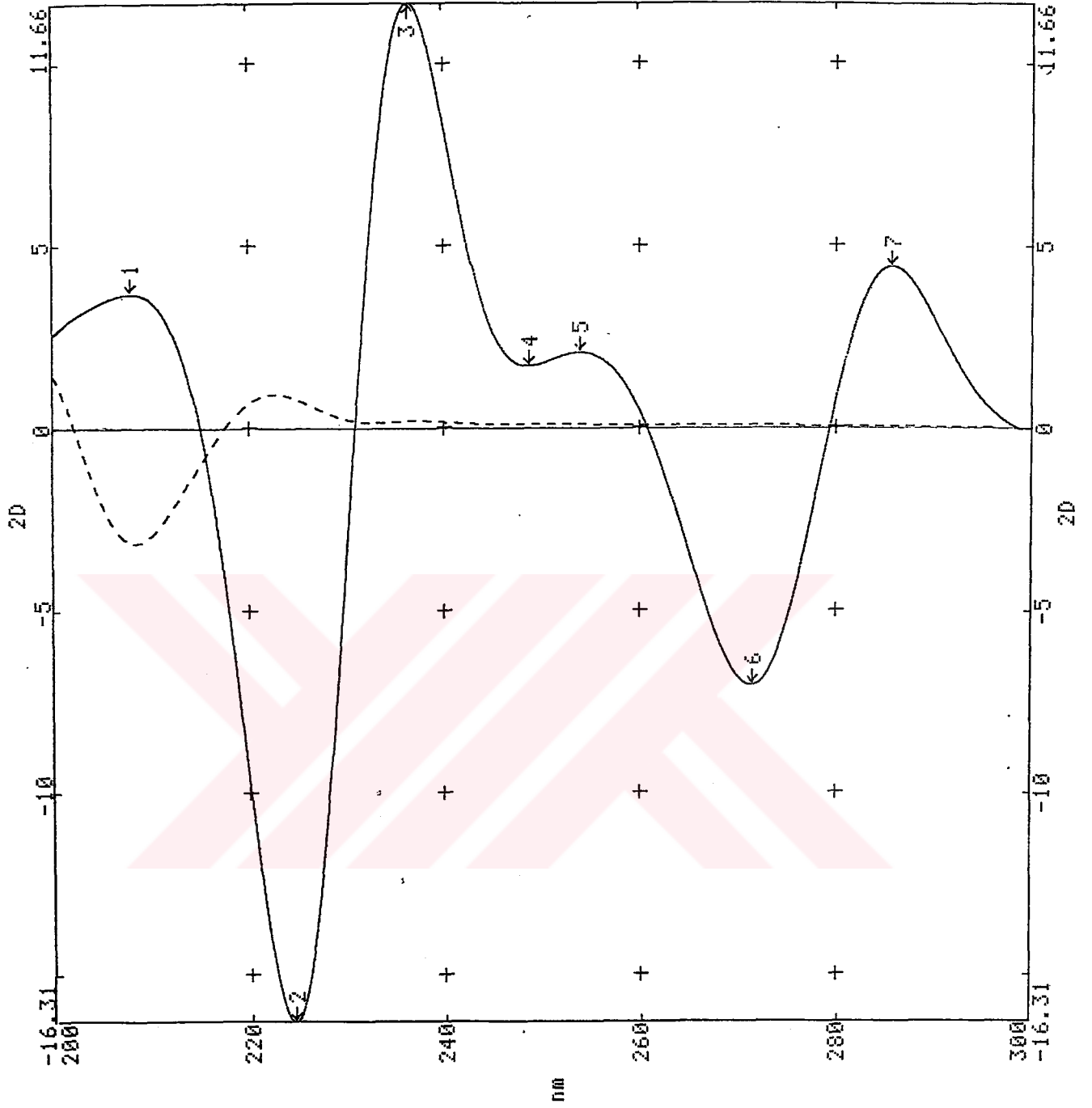
Silazapril ve hidroklorotiazid 'in metanoldeki 10 µg .ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki çözeltilerinin absorpsiyon ve 1 . , 2 . , 3 . derece türev absorpsiyon spektrumları şekil 4 . ( 1,2,3,4 ) 'de gösterilmiştir .



Şekil 4. 1 . Silazapril (—) ve hidroklorotiazid' in (---) metanoldeki ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

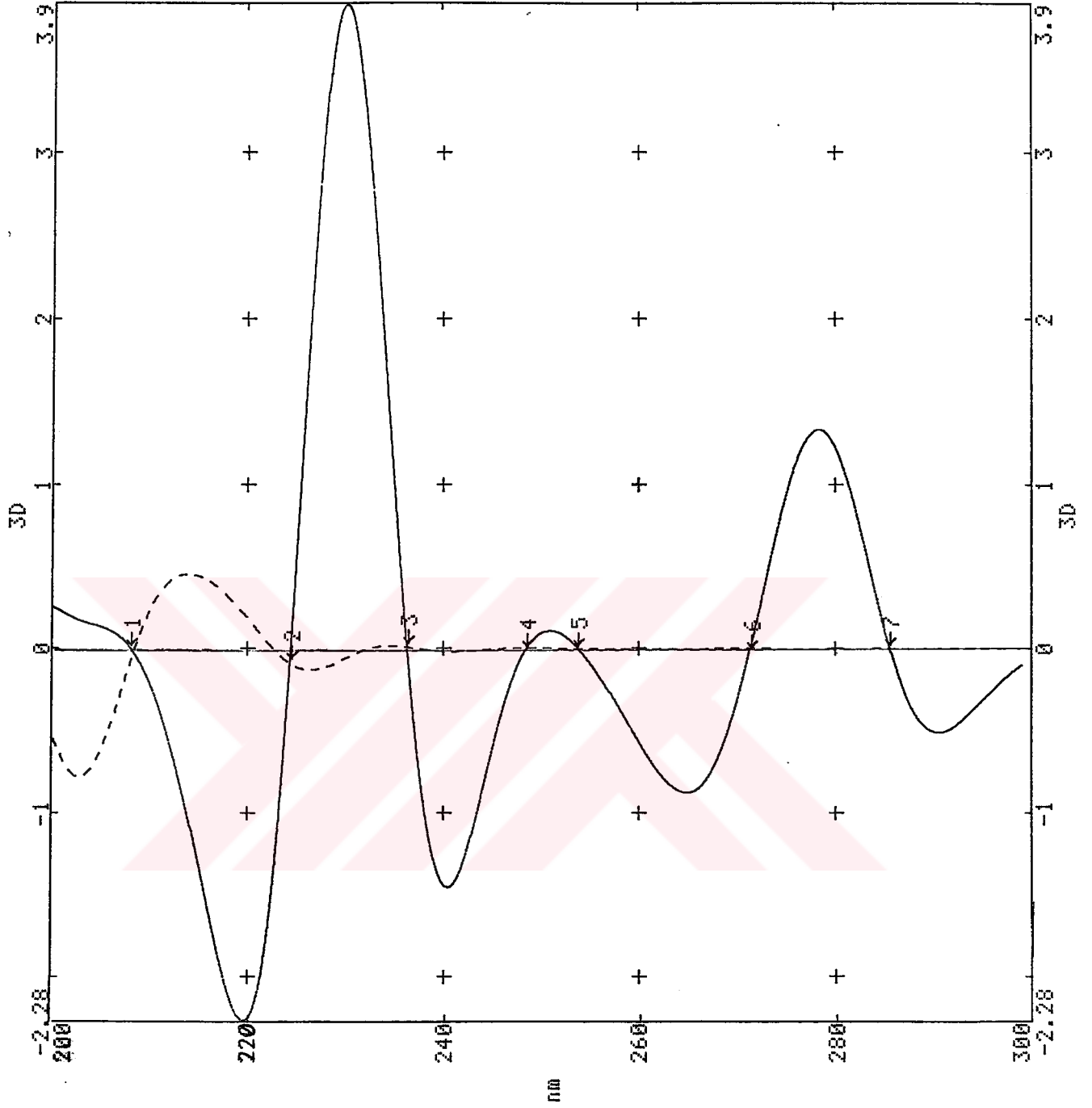


Şekil 4. 2 . Silazapril (—) ve hidroklorotiazid 'in (---) metanoldeki ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin 1. derece türev absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.3 . Silazapril (—) ve hidroklorotiazid'in(---) metanoldeki ( $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin 2. derece tüver absorpsiyon spektrumları





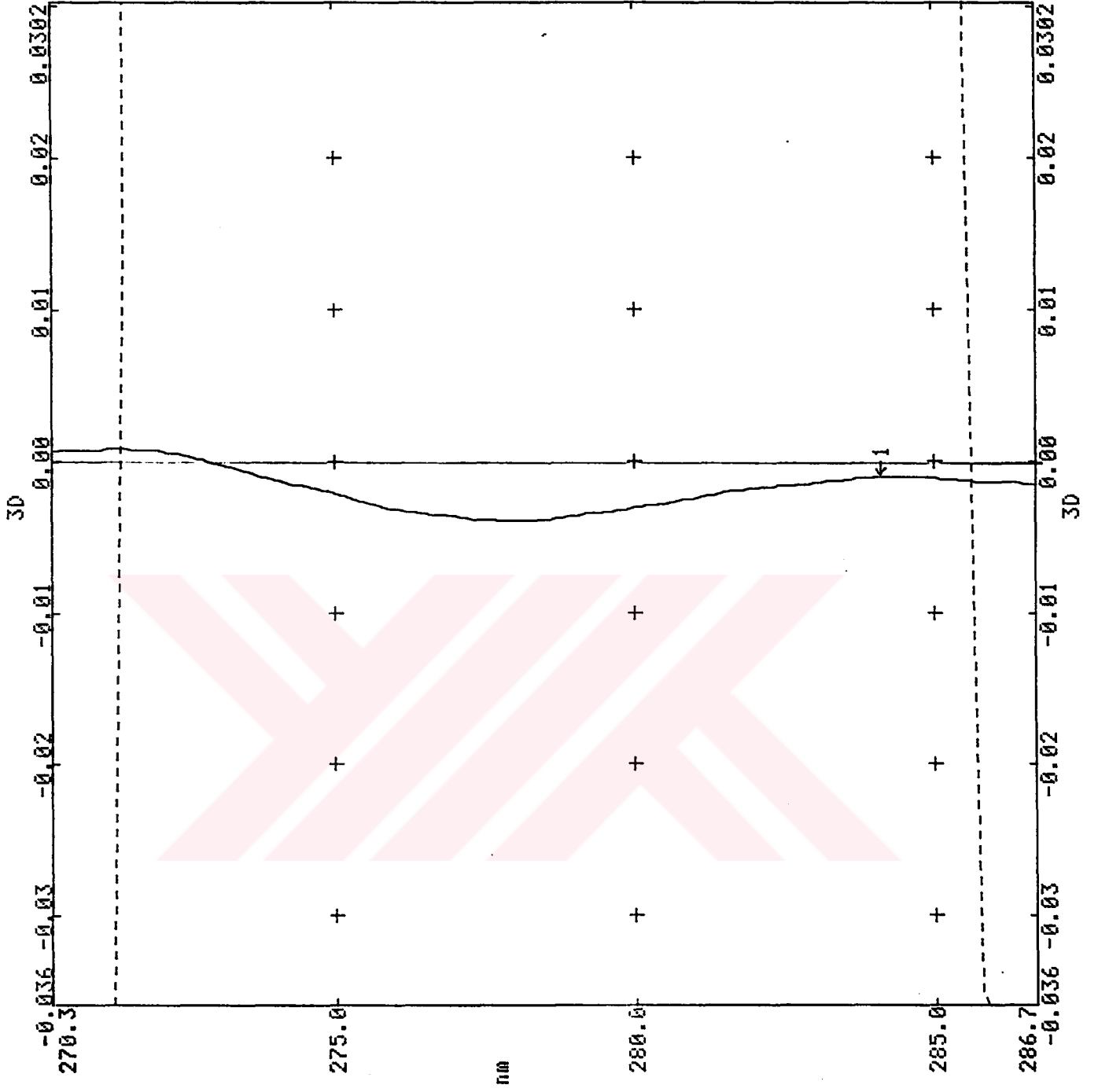
Şekil 4. 4. Silazapril (—) ve hidroklorotiazid'in (---) metanoldeki ( $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) çözeltilerinin 3. derece türev absorpsiyon spektrumları

Türev spektrumlarına bakılarak , maddelerin belirleneceği dalga boyları ve türev derecesinin belirlenmesi için spektrumlar incelenmiştir . İkili karışımın analizi , türev spektrumlarında , maddelerden birinin türev absorbansının sıfır olduğu noktada diğer maddenin türev absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır . 1. derece türev spektrumunda hidroklorotiazid'in türev absorbansının sıfır olduğu nokta (silazapril tayini için) 222,7 nm 'dir . Fakat bu dalga boyunda , hidroklorotiazid'in yüksek absorbansına karşılık , silazapril'in absorbansı çok düşüktür . Oysa tabletlerdeki hidroklorotiazid miktarı , silazapril'in miktarının 2,5 katıdır .

2. derece türev spektrumunda silazapril tayininin yapılabileceği dalga boyu 215 nm 'dir . Bu dalga boyunda hidroklorotiazid ile silazapril'in absorbansları arasındaki fark çok daha azdır .

3. derece türev spektrumuna bakıldığında , silazapril tayini yapılabilecek uygun bir nokta bulunmamaktadır . Bu yüzden bu karışımındaki silazapril'in , türev spektrofotometrik kantitatif tayini , 2. derece spektrumunda 215 nm 'de yapılmıştır .

Karışımındaki , hidroklorotiazid'in belirlenmesinde , 260 nm 'den sonra silazaprilin absorbansı hemen hemen sıfır olduğundan , bütün türev spektrumlarında bu dalga boyundan sonraki bölgelerde çalışmanın uygun olduğu görülmektedir . Bunların arasında en uygun olarak 3. derece türev spektrumu seçilmiştir . 270 - 285 nm arası büyütülerek incelendiğinde şekil 4.5. 'den de görüldüğü gibi , 272,9 nm 'de silazapril'in türev absorbansının sıfır olduğu saptanmıştır . Bu nedenle hidroklorotiazid miktarının saptanması için bu dalga boyundan yararlanılmıştır .



Şekil 4.5 . Silazapril 'in 270-285 nm arasındaki büyütülmüş spektrumu .

#### 4.1.2. Ölçü Eğrileri

Ölçü eğrileri silazapril için 4 - 12  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  hidroklorotiazid için 2 - 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve türev spektrumları bu konsantrasyon aralıklarındaki standartlar kullanılarak alınmıştır .

Çözeltilerdeki silazapril ve hidroklorotiazid konsantrasyonları ile , silazapril için 2. derece türev spektrumunda 215 nm 'de okunan 2. derece türev absorbens değerleri ( ${}^2D_{215}$ ) ve hidroklorotiazid için 3. derece türev spektrumunda 272,9 nm 'de okunan 3. derece türev absorbens değerleri ( ${}^3D_{272,9}$ ) tablo 4.1. ve tablo 4.3. 'de ve bu değerler yardımıyla oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler tablo 4.2. ve 4.4. 'de verilmiştir . Ortalama  ${}^2D$  ve  ${}^3D$  değerleri ile oluşturulan ölçü eğrileri şekil 4.6. ve 4.7. 'de gösterilmiştir . Bu ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri , silazapril ve hidroklorotiazid içeren tabletlerin analizinde kullanılmıştır .

#### 4.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Hidroklorotiazid ve silazapril 'i bir arada içeren tabletlerde bu ilaç maddelerinin miktarları bölüm 3.3.2.1.2. 'de anlatıldığı gibi çalışılarak türev spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi . Elde edilen sonuçların kıyaslanması amacıyla aynı tabletler HPLC yöntemiyle de analiz edildi . Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar tablo 4.5. 'de toplu olarak verilmiştir . Aynı tabloda 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ( $\bar{X}$ ) , standart sapma ( S ) ve bağıl standart sapma ( % S ) ve % 95 'lik güvenilirlik düzeyinde güven aralığı ( $\bar{X} \pm t.s / \sqrt{n}$ ) değerleride gösterilmiştir .

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçlar student (t) testi ile ortalamalar , Fisher (F) testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırılmıştır . Tablo 4.5. 'de görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri , ilgili güven düzeyi ve beş deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür . Buna göre bu ilaç maddelerinin analizinde geliştirilen yöntem ile karşılaştırma yöntemi arasında gerek doğruluk , gerek presizyon yönünden anlamlı fark bulunmamaktadır .

Tablo 4. 1. Silazapril 'in türev spektrofotometrik yöntem ile hazırlanan ölçü eğrilerinin 2. derece türev absorbans değerleri ( $^2D$ ) ve regresyon analizleri

No	C $\mu\text{g.ml}^{-1}$	$^2D_1$	$^2D_2$	$^2D_3$	$^2D_4$	$^2D_5$	$^2\bar{D}$	S	%S
1	4	0.608	0.611	0.606	0.599	0.602	0.605	0.004	0.787
2	6	0.909	0.911	0.908	0.904	0.914	0.909	0.003	0.407
3	8	1.184	1.987	1.184	1.182	1.187	1.185	0.002	0.183
4	10	1.480	1.488	1.488	1.490	1.480	1.485	0.005	0.324
5	12	1.774	1.774	1.777	1.778	1.773	1.775	0.002	0.122
$^2D_{215} = 0.146 C + 0.025 \quad r = 0.9999$									

Tablo 4. 2. Tablo 4.1. 'deki ölçü eğrilerine ait parametreler .

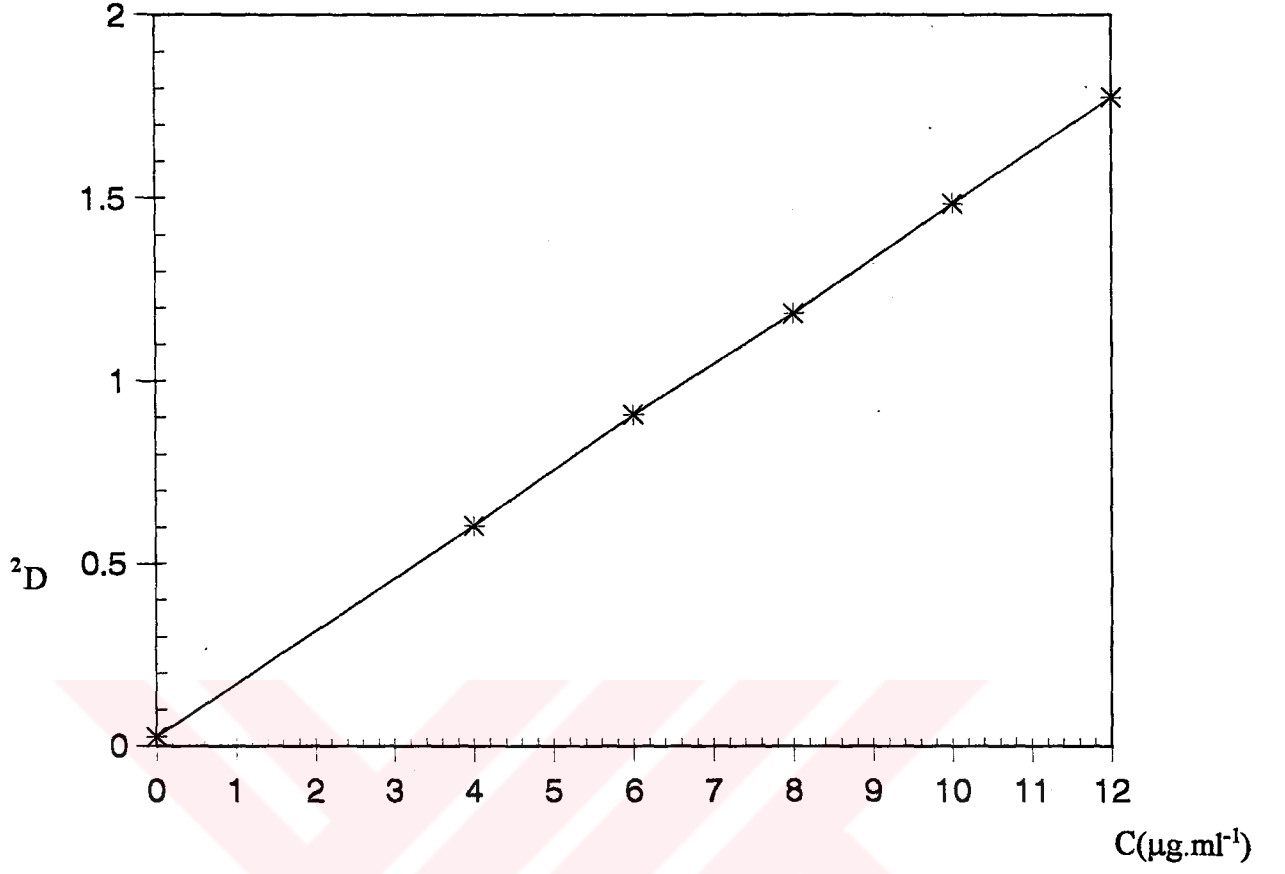
	1	2	3	4	5	ORTALAMA
a	0.030	0.033	0.024	0.016	0.028	0.026
b	0.145	0.145	0.146	0.147	0.145	0.146
r	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998	0.9997	0.9998

Tablo 4 . 3. Hidroklorotiazid 'in türev spektrofotometrik yöntem ile hazırlanan ölçü eğrilerinin 3. derece türev absorbans değerleri ( ${}^3D$ ) ve regresyon analizleri

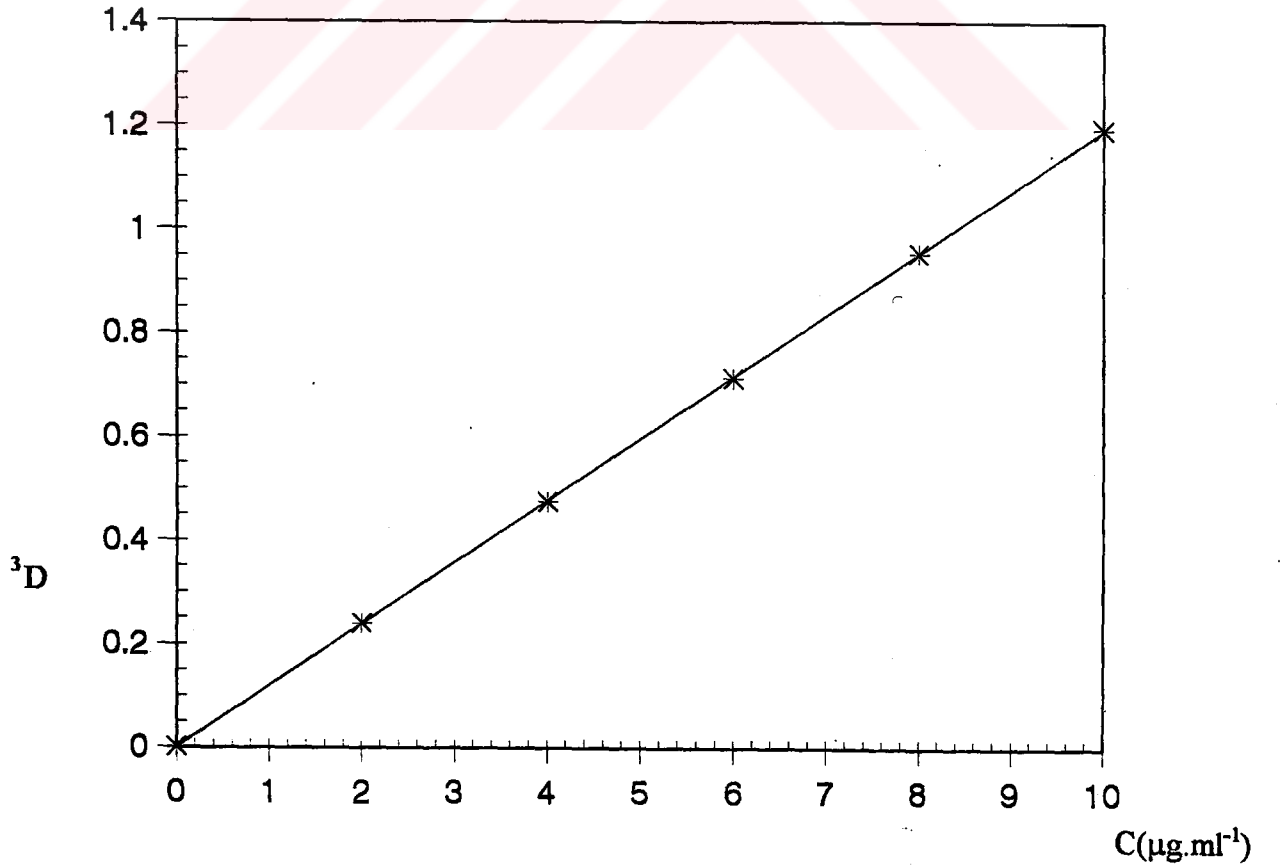
No	C $\mu\text{g.ml}^{-1}$	${}^3D_1$	${}^3D_2$	${}^3D_3$	${}^3D_4$	${}^3D_5$	${}^3\bar{D}$	S	%S
1	2	0.241	0.240	0.240	0.243	0.238	0.240	0.002	0.757
2	4	0.473	0.485	0.478	0.497	0.445	0.475	0.002	0.421
3	6	0.714	0.712	0.716	0.716	0.711	0.714	0.002	0.319
4	8	0.959	0.960	0.946	0.962	0.947	0.955	0.007	0.802
5	10	1.192	1.190	1.201	1.197	1.191	1.194	0.004	0.390
${}^3D_{272.9} = 0.119 C + 0.000 \quad r = 0.9999$									

Tablo 4 . 4 . Tablo 4.3. 'deki ölçü eğrilerine ait parametreler .

	1	2	3	4	5	ORTALAMA
a	0.000	0.005	0.000	0.011	-0.016	0.000
b	0.119	0.119	0.119	0.118	0.119	0.119
r	0.9999	0.9999	0.9998	0.9998	0.9995	0.9997



Şekil 4. 6. Silazapril ' e ait ölçü eğrisi .



Şekil 4. 7. Hidroklorotiazid ' de ait ölçü eğrisi .

Tablo 4.5. İnhibace Plus (5 mg silazapril + 12,5 mg hidroklorotiazid) tabletlerinin analizi

İstatiksel parametreler.		SİLAZAPRİL				HİDROKLOROTİAZİD			
		Türev Spektrofotometrik Yöntem		HPLC Yöntemi		Türev Spektrofotometrik Yöntem		HPLC Yöntemi	
		mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%
n	1	4.970	99.40	5.000	100.00	12.520	100.16	12.500	100.00
	2	4.971	99.42	4.950	99.00	12.503	100.02	12.450	99.60
	3	4.956	99.12	4.940	98.80	12.513	100.10	12.520	100.16
	4	4.945	98.90	4.920	98.40	12.420	99.36	12.410	99.28
	5	4.960	99.20	4.960	99.20	12.515	100.12	12.360	99.88
$\bar{x}$		4.960	99.20	4.950	99.08	12.495	99.95	12.450	99.78
S		0,010		0,029		0,042		0,065	
% S		0,216		0,585		0,336		0,522	
$\bar{x} \pm t \cdot s / \sqrt{n}$		4,949 - 4,971		4.920 - 4.980		12.484 - 12.505		12.383 - 12.517	
t testi		0.623 < 2.31				1.03 < 2,31			
F testi		5.93 < 6.39				2.39 < 6.39			
$n_1 = n_2 = 5$ $p = 0,05$		$t_{\text{tablo}} = 2.31$				$F_{\text{tablo}} = 6,39$			



## 4.2. Hidroklorotiazid - Benazepril Karışımının Analizi

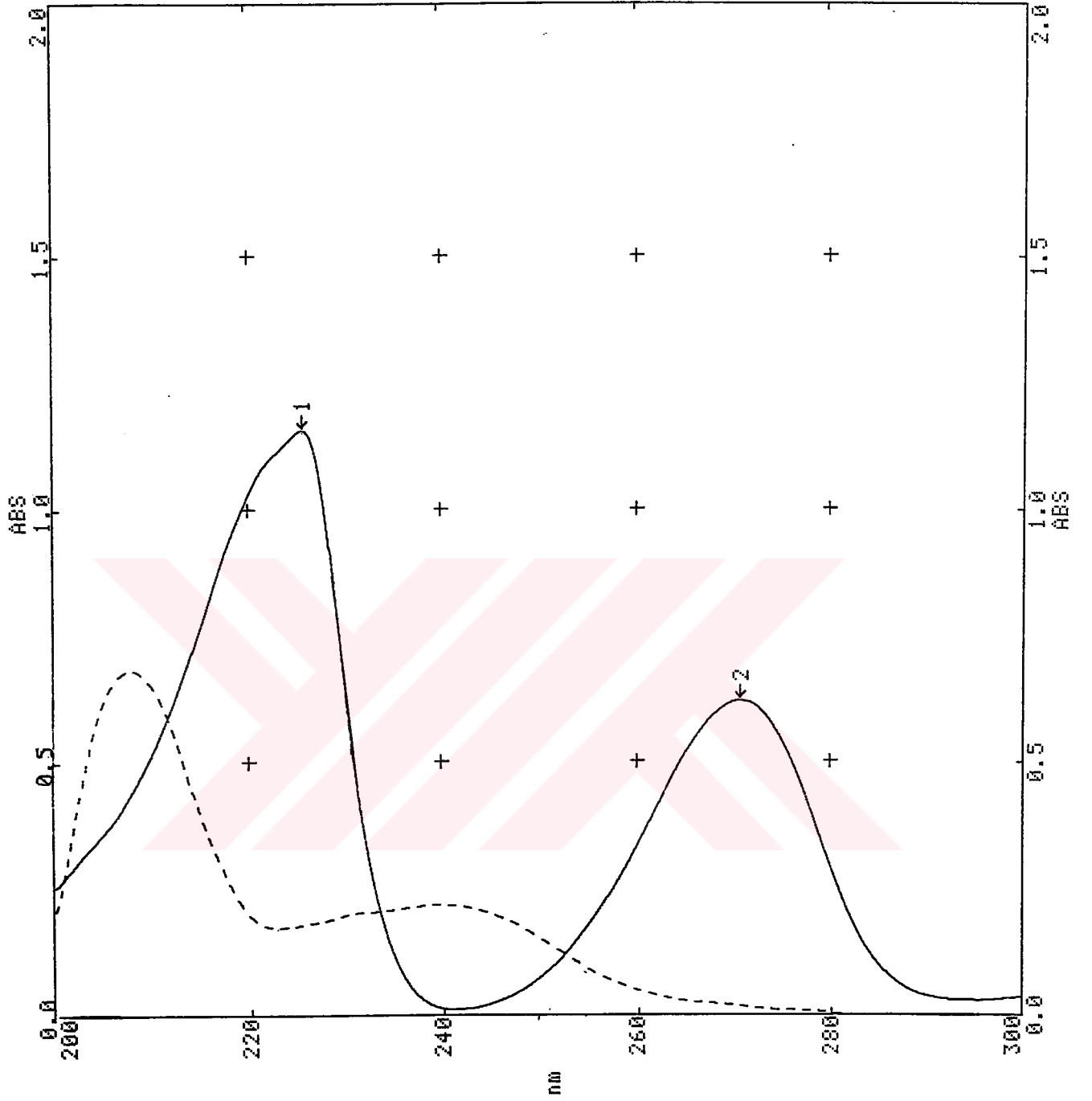
### 4.2.1. Uygun Koşulların Saptanması

Hidroklorotiazid ve benazepril 'in 0,1 N HCl , 0,1 N NaOH ve metanoldeki 10 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı . Bölüm 3.3.1. ' de verilen ölçüm koşullarında absorpsiyon ve 1. , 2. , 3. derece türev absorpsiyon spektrumları alındı . Bu üç çözücüdeki absorbans spektrumlarına bakıldığında piklerin üst üste çakıştığı görülmüştür . Bu yüzden bu iki maddenin bir arada tayini , bir ön ayırma yapmaksızın absorpsiyon spektrofotometrisi ile mümkün değildir . Bu yüzden bu iki maddenin bir arada tayininde türev spektrumlarından yararlanılmıştır . Yine bu üç çözücüde alınan türev spektrumlarına bakıldığında , maddelerin analizleri için spektrumların birbirlerine üstünlük sağlamadıkları görülmüştür . Bundan dolayı çözücü seçerken , maddelerin bu üç çözücüdeki çözünürlükleri göz önüne alınmıştır . Her iki maddenin de metanoldeki çözünürlüğü çok iyi olduğu için , çözücü olarak metanol seçilmiştir .

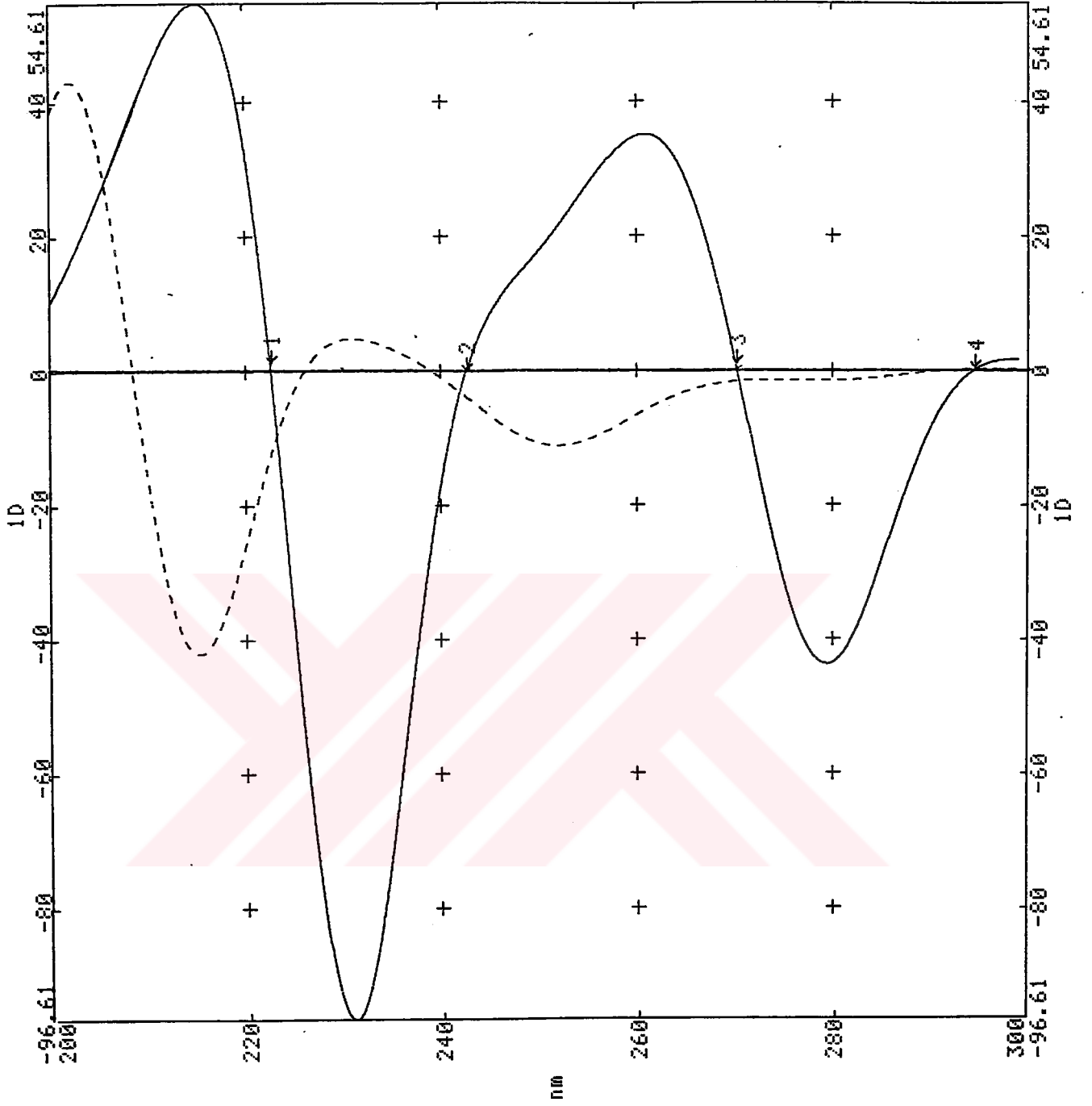
Benazepril ve hidroklorotiazid ' in metanoldeki 10 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyondaki çözeltilerinin absorpsiyon ve 1. , 2. , 3. derece türev absorpsiyon spektrumları şekil 4.(8 -11) ' de gösterilmiştir .

Bu ikili karışımın analizinde de , diğer karışımın analizinde olduğu gibi , maddelerin tayini için seçilecek türev derecesi ve dalga boylarının belirlenmesi için türev absorpsiyon spektrumları incelenmiştir . Karışımındaki benazepril 'in tayini için kullanılabilinecek dalga boyları (hidroklorotiazid 'in türev absorbansının sıfır olduğu noktalar) , 1. derece türev absorpsiyon spektrumunda 222.7 nm ve 242.7 nm ' dir . 2. derece türev absorpsiyon spektrumunda 261 nm ve 3. derece türev absorpsiyon spektrumunda 224.7 nm ' dir . Bunlar arasında benazepril 'in türev absorbans değerinin en yüksek ve tepe noktasına en yakın olduğu dalga boyu 3. derece türev absorpsiyon spektrumundaki 224.7 nm ' dir . Bu bakımdan , karışımındaki benazepril tayini bu noktada yapılmıştır .

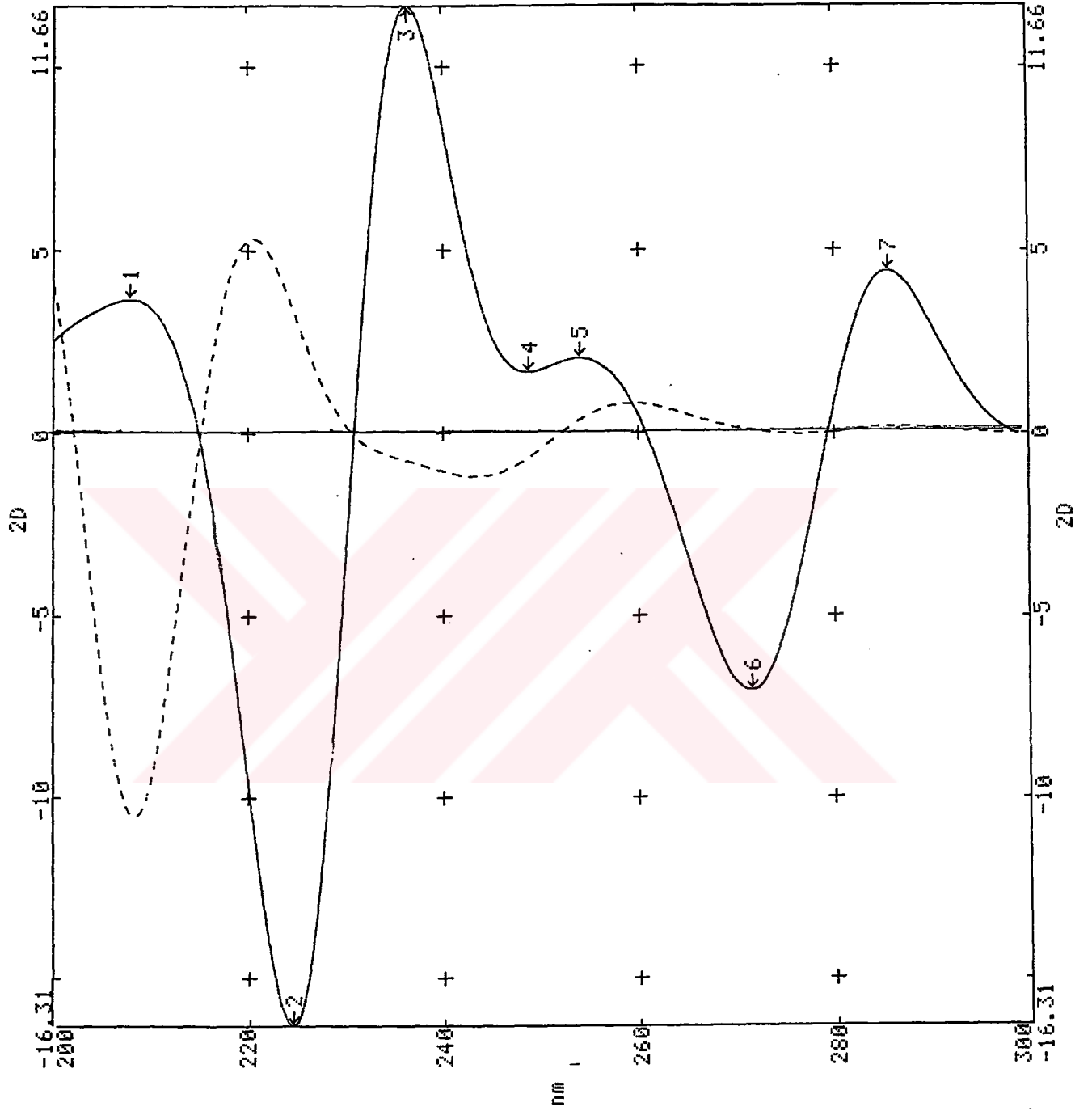
Karışımındaki hidroklorotiazid 'in belirlenmesi için kullanılacak dalga boyunun ve türev derecesinin seçiminde , o dalga boyundaki spektrumun şekli ve elde edilen sonuçların tekrarlanabilirlikleri göz önüne alınmıştır . Tüm bunlar düşünüldüğünde , karışımındaki hidroklorotiazid 'in belirlenebileceği dalga boyu olarak 2. derece türev spektrumundaki 253.7 nm seçilmiştir .



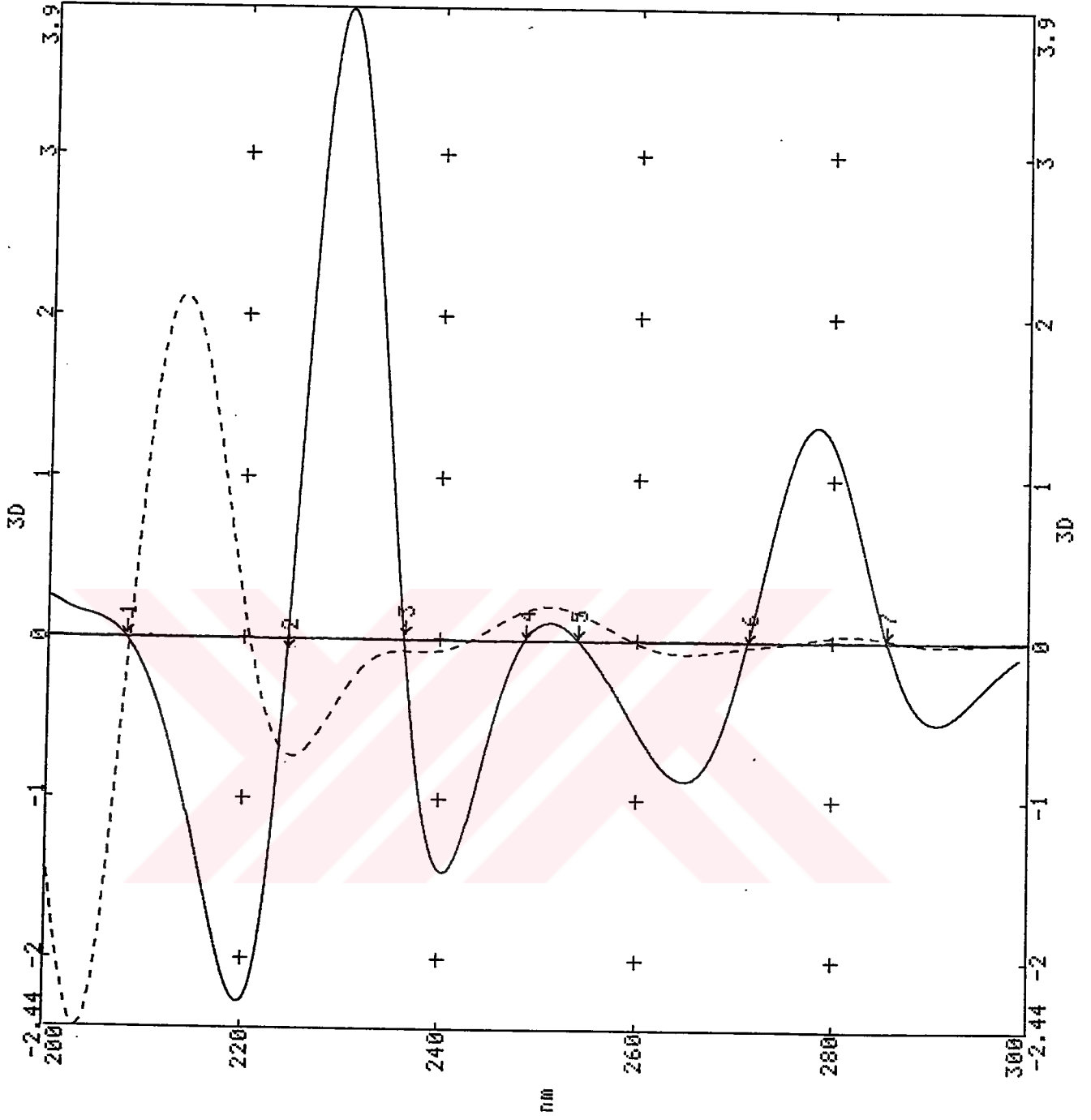
Şekil 4. 8. Benazepril (—) ve hidroklorotiazid'in (---) metanoldeki (10 µg.ml ) çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 4. 9. Benazepril (—) ve hidroklorotiazid'in (---) metanoldeki (10 µg.ml ) çözeltilerinin 1. derece türev absorpsiyon spektrumları



Şekil 4. 10. Benazepril (—) ve hidroklorotiazid'in (---) metanoldeki (10 µg.ml ) çözeltilerinin 2. derece türev absorpsiyon spektrumları



Şekil 4. 11. Benazepril (—) ve hidroklorotiazid'in (---) metanoldeki (10 µg.ml ) çözeltilerinin 3. derece türev absorpsiyon spektrumları

#### 4 . 2 . 2 . Ölçü Eğrileri

Ölçü eğrileri benazepril ve hidroklorotiazid için 2 - 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve spektrumlar bu standartlar kullanılarak alınmıştır .

Çözeltilerdeki benazepril ve hidroklorotiazid konsantrasyonları ile benazepril için 3. derece türev spektrumunda 224,7 nm 'de okunan 3. derece türev absorban değerleri ( ${}^3D_{224.7}$ ) ile hidroklorotiazid için 2. derece türev spektrumunda 253,7 nm 'de okunan 2. derece absorban değerleri ( ${}^2D_{253.7}$ ) tablo 4. 6. ve 4. 8. 'de ve bu değerler yardımıyla oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler tablo 4. 7. ve 4. 9. 'de verilmiştir . Ortalama  ${}^3D$  ve  ${}^2D$  değerleri ile oluşturulan ölçü eğrileri şekil 4. 12. ve 4. 13. 'de gösterilmiştir . Bu ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri benazepril ve hidroklorotiazid içeren tabletlerin analizinde kullanılmıştır .

#### 4 . 2 . 3 . Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Hidroklorotiazid ve benazepril 'i bir arada içeren tabletlerde bu ilaç maddelerinin miktarları 3. 3. 3. 1. 2. 'de anlatıldığı gibi çalışılarak türev spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi . Elde edilen sonuçların kıyaslanması amacıyla aynı tabletler HPLC yöntemiyle de analiz edildi . Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar tablo 4. 10. 'da toplu olarak verilmiştir . Aynı tabloda 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ( $\bar{X}$ ), standart sapma (S) ve bağıl standart sapma (% S) ve % 95 'lik güvenirlilik düzeyinde güven aralığı ( $\bar{X} \mp t.s \sqrt{n}$ ) değerleri de gösterilmiştir .

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçlar student (t) testi ile ortalamalar , Fisher (F) testi ile prezisyonlar yönünden % 95 güvenirlilik düzeyinde karşılaştırılmıştır . Tablo 4. 10 'da görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri , ilgili güven düzeyi ve beş deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür . Buna göre bu ilaç maddelerinin analizinde geliştirilen yöntem ile karşılaştırma yöntemi arasında gerek doğruluk , gerek prezisyon yönünden anlamlı bir fark bulunmamıştır .

Tablo 4. 6. Benazapril 'in türev spektrofotometrik yöntem ile hazırlanan ölçü eğrilerinin 3. derece türev absorbens değerleri ( $^3D$ ) ve regresyon analizleri

No	C $\mu\text{g.ml}^{-1}$	$^3D_1$	$^3D_2$	$^3D_3$	$^3D_4$	$^3D_5$	$^3\bar{D}$	S	%S
1	2	0.116	0.112	0.112	0.115	0.119	0.115	0.003	2.565
2	4	0.223	0.230	0.230	0.228	0.232	0.228	0.003	1.506
3	6	0.343	0.351	0.340	0.358	0.358	0.350	0.008	2.382
4	8	0.466	0.476	0.432	0.488	0.499	0.472	0.025	5.440
5	10	0.611	0.617	0.601	0.599	0.601	0.606	0.007	1.290
$^3D_{224.7} = 0.061 C - 0.013 \quad r = 0.9996$									

Tablo 4. 7. Tablo 4.6. 'deki ölçü eğrilerine ait parametreler .

	1	2	3	4	5	ORTALAMA
a	-0.018	-0.019	-0.011	-0.011	-0.008	-0.013
b	0.061	0.062	0.059	0.061	0.061	0.061
r	0.9998	0.9993	0.9996	0.9996	0.9996	0.9996

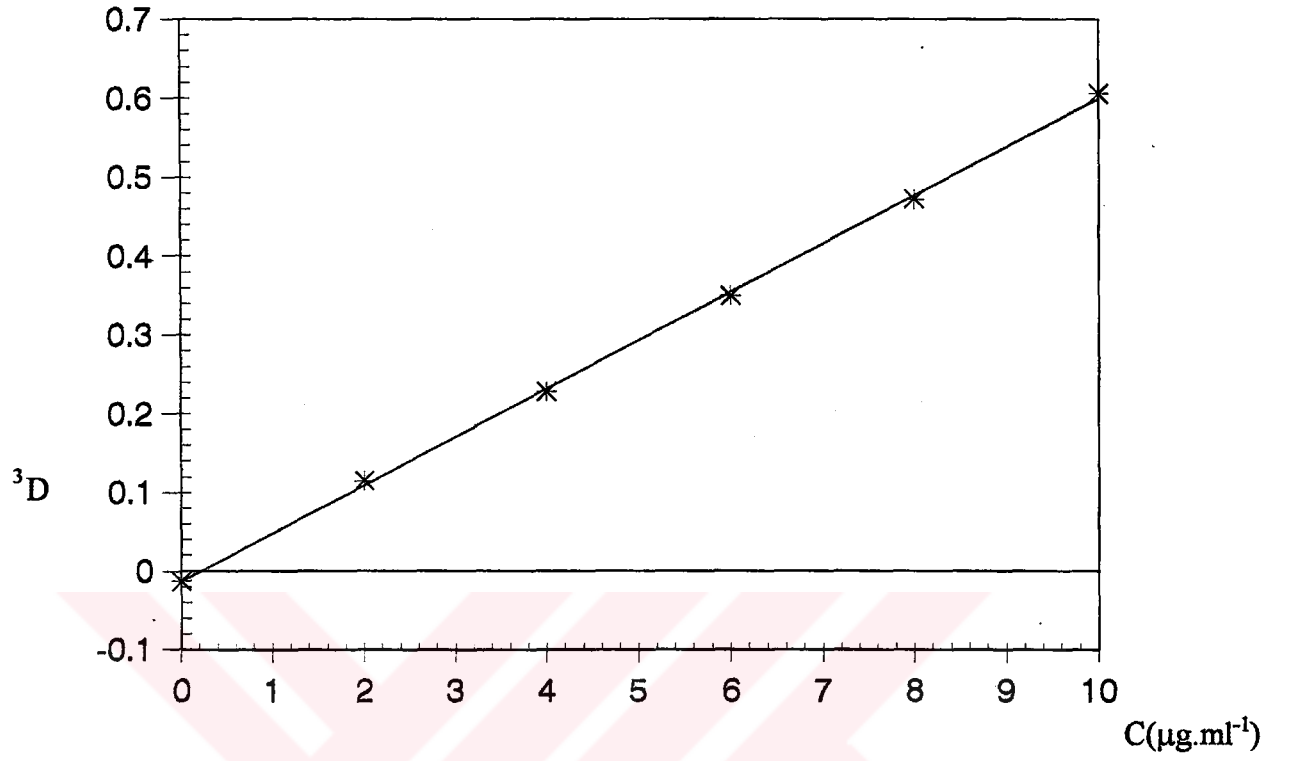
Tablo 4. 8. Hidroklorotiazid 'in türev spektrofotometrik yöntem ile hazırlanan ölçü eğrilerinin 2. derece türev absorbans değerleri ( $^2D$ ) ve regresyon analizleri

No	C $\mu\text{g.ml}^{-1}$	$^2D_1$	$^2D_2$	$^2D_3$	$^2D_4$	$^2D_5$	$^2\bar{D}$	S	%S
1	2	0.468	0.445	0.515	0.498	0.439	0.473	0.033	6.975
2	4	0.924	0.927	0.940	0.930	0.937	0.931	0.006	0.720
3	6	1.397	1.351	1.431	1.378	1.381	1.387	0.029	2.116
4	8	1.839	1.813	1.933	1.729	1.831	1.829	0.072	3.978
5	10	2.309	2.273	2.265	2.300	2.287	2.287	0.018	0.798
$^2D_{253.7} = 0.226 C + 0.023 \quad r = 0.9999$									

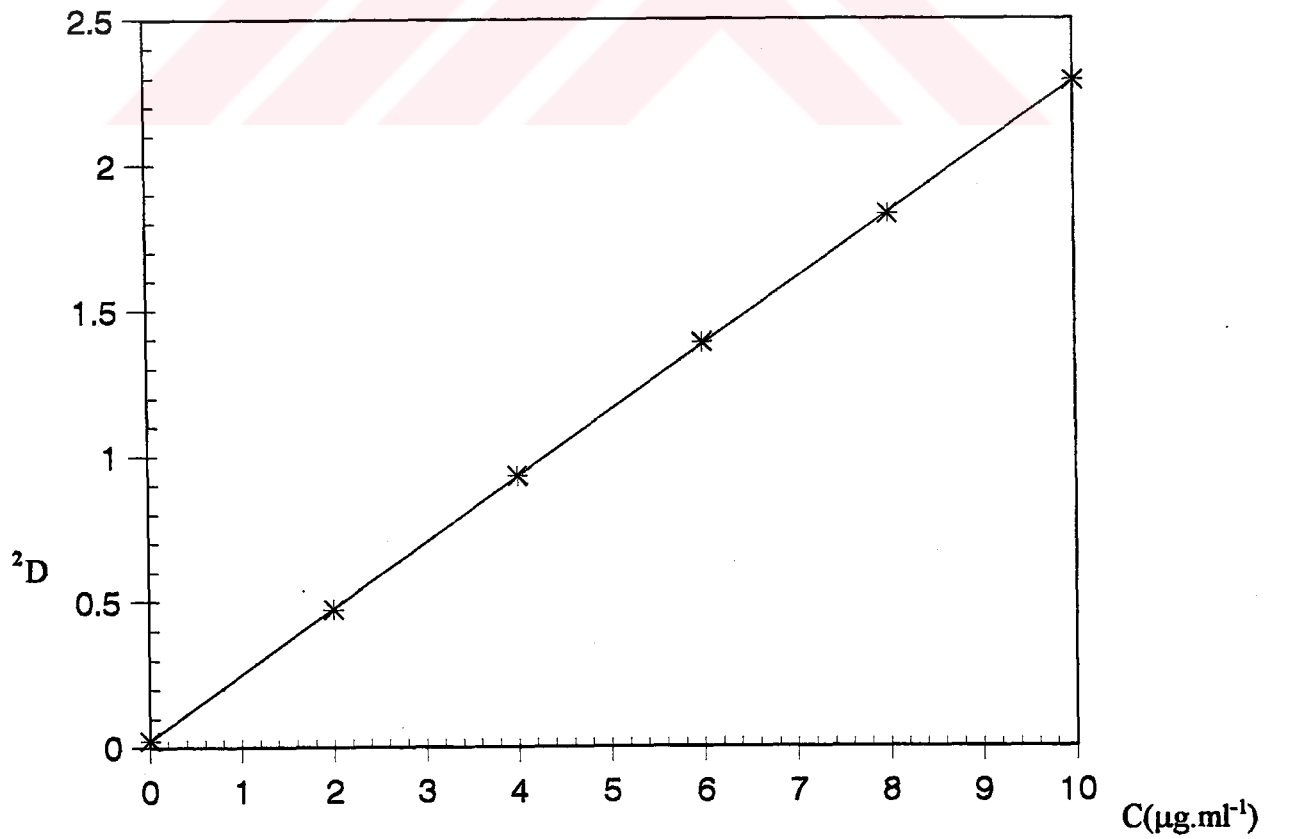
Tablo 4. 9. Tablo 4.8. 'deki ölçü eğrilerine ait parametreler .

	1	2	3	4	5	ORTALAMA
a	0.008	0.000	0.068	0.046	-0.002	0.024
b	0.229	0.227	0.224	0.220	0.229	0.226
r	0.9999	0.9999	0.9998	0.9980	0.9998	0.9995





Şekil 4. 12. Benazepril 'e ait ölçü eğrisi .



Şekil 4. 7. Hidroklorotiazid 'de ait ölçü eğrisi .

Tablo 4 . 10. Cibadrex (10 mg benazepril + 12,5 mg hidroklorotiazid) tabletlerinin analizi

İstatiksel parametreler.		BENAZEPRİL				HİDROKLOROTİAZİD			
		Türev Spektrofotometrik Yöntem		HPLC Yöntemi		Türev Spektrofotometrik Yöntem		HPLC Yöntemi	
		mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%
n	1	9.994	99.94	10.080	100.80	12.506	100.04	12.580	100.64
	2	9.880	98.80	9.940	99.40	12.490	99.92	12.470	99.76
	3	9.872	98.72	9.970	99.70	12.453	99.62	12.480	99.84
	4	9.988	99.88	10.050	100.50	12.480	99.84	12.490	99.92
	5	9.980	99.80	9.960	99.60	12.480	99.84	12.520	100.16
$\bar{x}$		9.943	99.43	10.000	100.00	12.482	99.85	12.510	100.06
S		0.061		0.061		0.019		0.044	
% S		0.616		0.610		0.155		0.351	
$\bar{x} \pm t \cdot s / \sqrt{n}$		9.880 - 10.006		9.937 - 10.063		12.462 - 12.502		12.465 - 12.555	
t testi		0.779 < 2.31				1.22 < 2,31			
F testi		1.72 < 6.39				4.00 < 6.39			
$n_1 = n_2 = 5$ p = 0,05		$t_{\text{tablo}} = 2.31$				$F_{\text{tablo}} = 6,39$			

## 5 . TARTIŞMA

Çok bileşenli ilaç preparatlarında bulunan etken maddelerin analizinde ,bu maddelerin UV absorpsiyon spektrumları çakıştığı zaman ince tabaka kromatografisi ,klasik sütün kromatografisi veya ekstraksiyon ile ayırmadan türev spektrofotometrik ölçüm yapılmakta yada ince tabaka kromatografisi , dansitometri , yüksek basınçlı sıvı kromatografisi , gaz kromatografisi gibi yöntemler kullanılmaktadır . Bunların dışında etken maddelerin kimyasal reaksiyonlarla türevlendirilerek birarada bulunduğu diğer maddelerin tekisi olmadan tayin edildiği özel durumlarda vardır . Son yıllarda farmakopelerde bu tür preparatların analizi için genellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi önerilmektedir .

Diğer yandan 1980 'li yıllarda analitik kimyada kullanılmaya başlanan türev spektrofotometrisi diğer bazı alanlarda olduğu gibi çok bileşenli ilaç preparatlarının analizinde de başarıyla uygulanmaktadır . Bu şekilde bir kimyasal reaksiyon ya da bir ayırma yapılmaksızın kısa zamanda analiz mümkün olmaktadır .

Bu tez çalışmasında da ülkemizde piyasaya yeni çıkarılmış olan ve iki etken maddeyi birarada içeren iki adet antihipertansif tablet 'in türev spektrofotometrisi ile analizi incelenmiştir . Bu tabletlerden birisi 5 mg silazapril ile 12.5 mg hidroklorotiazid , diğeri ise 10 mg benazepril ile 12.5 mg hidroklorotiazid

içermektedir . Benazepril ve silazapril çok yeni maddeler olduğundan henüz farmakopede yer almamışlardır . Hidroklorotiazid ise oldukça eski bir diüretiktir ve birçok antihipertansif ilaç maddesi ile kombine preparatları halinde kullanılmaktadır . 1990 Amerikan farmakopesinde bu maddelerin amilorid .HCl , metildopa , metoprolol tartarat , propranolol ve timolol ile birarada bulunduğu tabletlerin analizi için ters faz HPLC yöntemleri önerilmiştir , rezepin ile kombine tabletlerinde ise hidroklorotiazid ekstraksiyon ile türev spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir .

Türev spektrofotometrik yöntemle analiz için çalışmalara çözücünün saptanması ile başlandı . Benazepril ve silazapril suda zor çözünmektedir . Asitik ve bazik ortamda da çözünürlüğü oldukça azdır . Alkollerde ise her üç madde çok kolay çözünmektedir . Diğer yandan spektrumlara bakıldığında çözücünün değişmesiyle çok fazla farklılık olmadığı görülmüştür . Bu yüzden çözücü olarak metanol kullanılmıştır . Analiz için en uygun türev derecesi ve dalga boyunun seçimi yapılırken maddelerden herbiri için diğerinin türev absorbansının sıfır olduğu dalga boyu araştırıldı . Buna imkanveren seçenekler arasından seçim yapılırken maddelerin tabletteki oranlarında gözönüne alındı . Çünkü türev spektrofotometrisinde türev almaya ait matematiksel işlemler bir yana bırakılırsa , analizin temeli absorban ölçümü olur . Özellikle silazapril tayininde hem silazaprilin molar absopitvitesinin HPLC 'e göre daha düşük hem de tabletteki oranının 2.5 kez daha az olduğu düşünülerek bu maddelerin absorbansının yüksek olduğu bölgedeki seçenek tercih edildi .

Benazepril - hidroklorotiazid karışımında ise tablettiki oranların 1.25 olduğundan bu durum fazla önem taşımadı . Sonuçta silazapril - hidroklorotiazid karışımının analizi için silazapril 2. derece türev spektrumunda 215 nm 'de , hidroklorotiazid 3. derece türev spektrumunda 272.9 nm 'de , benazepril - hidroklorotiazid karışımının analizi için ise benazepril 3. derece türev spektrumunda 224.7 nm 'de , hidroklorotiazid 2. derece türev spektrumunda 253.7 nm 'de yapılacak türev absorbans ölçümlerinin en uygun olduğu sonucuna varıldı .

Saptanan bu koşullarda piyasadan alınan ticari tabletler analiz edildi . Elde edilen sonuçların geçerliliğini saptamak için aynı tabletler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile de analiz edildi . Her iki yöntemle elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapıldığında gerek doğruluk gerekse presizyon yönünden

anamlı bir fark bulunamadı . Bu durum bu tabletlerin analizinde türev spektrofotometrik yöntemi HPLC yöntemi kadar doğru ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir . İki yöntem için gerek cihaz , çözücü ve zaman karşılaştırılırsa türev spektrofotometrik yönteminin çok daha avantajlı olduğu görülmektedir .Bu bakımdan bu tabletlerin rutin analizinde rahatlıkla kullanılabilir .



**KAYNAKLAR**

- Amer , M. M. , Khattab , F. I. , Hassan , N. Y. M. , 1989 , Egypt J. Pharm. Sci. , 30(1-4) , 207-30 . Ref. CA. 112 , 62754 p (1990) .
- Bedair , M. M. , Barary , H. , 1991 , Bull. Fac. Pharm. , 29(2) , 1-5  
Ref. CA. 116 , 46440 k (1992) .
- Belal , F. , Ibrahim , F. , El-Brashy , A. , 1988 , Analyst , 113(4) , 637-9 .
- Bonet , D. , Torres , L. J. R. , 1994 , Anal. Chim. Acta , 283(3) , 201-10 .
- Bulut , P. , Ordu , H. , 1984 , Fabad. Tarm. Bilimleri derg. , 9(4) , 223-30 .
- Campins , F. P. , Herrarez , H. R. , Sevillano , C. , 1993 , J. Chromatog. Biomed. Appl. , 612(2) , 245-51 . Ref. CA. 118 , 182677 m (1993) .
- Campins , F. P. , Herrarez , H. R. , Sevillano , C. , 1994 , Anal. Chem. , 66(2) , 244-8 .
- Carlucci , G. , Di Giuseppe , E. , Mazzeo , P. ; 1993 , Int. J. Pharm. , 93(1-3) , 245-8 .  
Ref. CA. 119 , 125354 a (1993) .

Carreras , D. , Imes , C. ; Navajos , R. , 1994 , J. Chromatog. A. , 683(1) , 195-202 .

Cieri , U.R. , 1988 , J. Assoc. Off. Anal. Chem. , 71(3) , 515-8  
Ref. CA. 108 , 226980 e (1988) .

Cieri , U.R. , 1994 , J. Aoac. Int. , 77(5) , 1104-8  
Ref. CA. 121 , 263827 z (1994) .

Çetin , G. , 1996 , Yıldız Teknik Üniv. , Doktora Tezi (Henüz yayınlanmadı).

Dang , Q. , 1991 , Yaowu Fenxi Zazhi , 11(3) , 144-4  
Ref. CA. 115 , 166754 s (1991) .

Davidson , A. G. , Elsheikh , H. , 1982 , Analyst , 107 , 879 .

De. Croo , F. , Vanden Bossche , W. , De , M. P. , 1985 , Chromatographia , 20(8) ,  
477-81 . Ref. CA. 103 , 183640 w (1985) .

Daleo , A. B. , Stern , M. J. , 1966 , J. Pharm. Sci. , 55 , 173-80 .

Dökmeci , İ. , 1979 , Farmakoloji .

El-Brashy , A. M. , Walash , M. I. , Sutan , M. A. , 1994 , Pharmazie , 49(6) , 456-7 .

El-Sadek , M. A. , El-Shanawani , A. , El-Adl , 1993 , Zagazig J. Pharm. Sci. , 2(2) ,  
139-49 . Ref. CA. 121 , 42881 k (1994) .

Erram , S. , Tipnis , H. P. , 1992 (a) , Indian J. Pharm. Sci. , 54(6) , 245-9 .  
Ref. CA. 118 , 261124 g (1993) .

Erram , S. , Tipnis , H. P. , 1992 (b) , Indian Drugs , 29(12) , 553-7 .  
Ref. CA. 117 , 220243 f (1992) .

Erram , S. , Tipnis , H. P. , 1992 (c) , Indian Drugs , 29(11) , 484-8 .  
Ref. CA. 117 , 157758 k (1992) .

- Erram, S. , Tipnis , H. P. , 1993(a) , *Indian Drugs* , 30(7) , 319-23 .  
Ref. CA. 119 , 167881 a (1993) .
- Erram , S. , Tipnis , H. P. , 1993(b) , *Indian Drugs* , 30(9) , 427-7 .  
Ref. CA. 119 , 234188 v (1993) .
- Erram , S. , Tipnis , H. P. , 1994(a) , *Indian Drugs* , 31(2) , 65-5 .  
Ref. CA. 120 , 307625 t (1994) .
- Erram , S. , Tipnis , H. P. , 1994(b) , *Indian Drugs* , 31(1) , 16-20 .  
Ref. CA. 120 , 173607 c (1994) .
- Ezawa , T. , Hashimoto , M. , Abe , M. , 1989 , *Iyakuhin Kenkyu* , 20(3) , 602-12 .  
Ref. CA. 111 , 180558 e (1989) .
- Fatmi , A. , Williams , G. V. , 1990 , *Drug Dev. Ind. Pharm.* , 16(5) , 779-89 .  
Ref. CA. 112 , 185929 g (1990) .
- Ficcara , P. , Ficcara , R. , Tommasini , A. , 1986 , *Farmaco Ed. Prat.* , 41(10) , 332(7) .  
Ref. CA. 106 , 55996 s (1987) .
- Florey , K. , 1981 , *Analytical Profiles of Drug Substances* , 10 , 405-441 .
- Friedrich , F. , Kottke , K. , 1976 , Ref. 30 .
- Giese , A.T. , French , G. S. ; 1955 , *Appl. Spectrosc.*
- Ganzales , O. M. A. , Meier , G. N. , 1968 , *Farm. Nueva* , 33 , 269-276 .  
Ref. CA. 69 , 99476 u (1969) .
- Hammond , U. J. , Price , W. C. , 1953 , *J. Opt. Soc. Am.* , 43 , 924 .
- Honigberg , I. L. , Sterwart , J. T. , Smith , A. P. , 1975 , *J. Pharm. Sci.* , 64 , 1201-04 .
- Hu , Y. , Yu , R. , 1984 , *Nanjing Yaoxveyuan Xvebao* , 2 , 19-24 .  
Ref. CA. 102 , 32421 d (1985) .



- Jain , R. , Jain , C. L. , 1991 , Indian Drugs , 380-2 . Ref. CA. 115 , 57311 z (1991) .
- Jain , R. , Jain , C. L. , 1992 , Indian , J. Pharm. Sci . , 54(6) , 250-2 .
- Jumppanen , J. , Siren , H. , Riekkola , M. L. , 1993 , J. Chromatog. , 652(2) , 441-50 .
- Kaiser , G. , Ackermam , R. , Dieterle , W. , Dubois , J. P. , 1987 , 419 , 123-33 .
- Kala , H. , 1965 , Pharmazie , 20 , 82-92 .
- Karayalp , O. , 1990 , Tibbi Farmakoloji Cilt II .
- Kkolos , E. , Walker , J. , 1975 , Anal. Chim. Acta , 80 , 17-30 .
- Kleemann , A. , 1978 , Ref. 30 .
- Liang , Y. , Sun , L. , 1994 , Fenxi Shiyonshi , 13(3) , 57-9.  
Ref. CA. 121 , 141860 j (1994) .
- Madgearu , M. , Beral , H. , Cucivreanu , E. , Farmacia , 16 , 471-76 .
- Magelhaes , J. F. , Piros , M. G. , 1971 , Reu Farm. Bioguim. , 8 , 273-80 .  
Ref. CA. 75 , 121466 p (1971) .
- Mahgoub , H. , El-Yazbi , F. A. , Barrary , M. H. , 1992 , Sci. Pharm. , 60(4) , 239-45 .
- Merck Index , 1989 , Merck and Co Inc. , Rahway N. J. , USA .
- Mollica , J. A. , Rehm , G. R. , Smith , J. B. , 1971 , J. Pharm. Sci. , 60 , 1380-4 .
- Morelli , B. , 1988 , Anal. Lett. , 2143 .
- Morelli , B. , 1998(a) , J. Pharm. Sci. , 77 , 1042-46 .
- Morelli , B. , 1988(b) , J. Pharm. Sci. , 77 , 615-21 .

- Morelli , B. , 1990 , J. Pharm. Sci. , 79 , 261-65 .
- Morrison , J. D. , 1953 , J. Chem. Phys. , 21 , 1767 .
- Moussa , B. , El-Kousy , Naglao , M. , 1995 , Pharm. Weekol Sci. Ed. , 7(2) , 79-82 .  
Ref. CA. 103 , 59396 q (1985) .
- Nowakowska , Z. , 1988 , Farm. Pol. , 44(9) , 521-3 . Ref. CA. 110, 219198 u (1989) .
- Nowakowska , Z. ; 1989 , Farm. Pol. , 45(7) , 454-7 . Ref. CA. 113 , 218357 v (1990) .
- Nowakowska , Z. , 1992 , Farm. Pol. , 48(9-10) , 549-52 .  
Ref. Ca. 119 , 803369 r (1993) .
- Nowakowska , Z. , 1993 , Farm. Pol. , 49(3-4) , 41-4 . Ref. CA. 119 , 146713 q (1993) .
- Parissi , P. , Reizopoulos , U. , Koupparis , M. , 1989 , Int. J. Pharm. , 51(2) , 169-74 .  
Ref. CA. 110 , 219217 z (1988) .
- Przyborowski , L. , Pionka , G. , 1976 , Farm . Pol. , 32 , 399 - 402 .  
Ref. Anal. Abs. 31(5) , E64 .
- Qui , Y. , Zheng , L. , Shen , Q. , 1987 , Zhanguo Yaoke Daxve Xuebao , 18(2) , 130-2  
Ref. CA. 107 , 121204 f (1987) .
- Rhem , C. R. , Smith , S. B. , 1960 , J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed. , 49 , 386-9 .  
Ref. CA. 56 , 7431 c (1962) .
- Saarinen , M. , Siren , H. , Riekkola , M. L. , 1993 , J. Liq. Chromatog. , 16(18) ,  
4063-78 . Ref. CA. 120 , 94586 s (1994) .
- Salem , H. , El-Maomli , M. , El-Sadek , M. , 1991 , Spectroc. Lett. , 24(3) , 451-70 .  
Ref. CA. 114 , 214555 f (1991) .
- Sane , R. T. , Valiyare , G. R. , 1992 , Indian Drugs , 29( 12 ) , 558 - 60 .  
Ref. CA. 117 , 220244 g (1992) .

- Sa' sa , S. I. , Jelal , I. M. , Khalil , H. S. , 1988 , J. Liq. Chromatog. , 11(8) , 1673-96 .
- Schaefer , M. , Geissler , H. E. , Mutschler , E. , J. Chromatog. , 143 , 615-623 .
- Sheppard , H. , Mowles , T. F. , Plummer , A. J. , 1960 , J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed. , 49 , 722-23 . Ref. CA. 56 , 7431 c (1962) .
- Shukla , I. C. , Ahmad , S. , Singh , D. , Srivastava , M. K. , 1983 , Indian J. Pharm. Sci. 45(6) , 249-50 .
- Shinde , U. M. , Desai , B. S. , Tendolkar , N. M. , 1994 , Indian Drugs , 31(5) , 192-6 . Ref. CA. 121 , 117923 m (1994) .
- Sioufi , A. , Pommier , F. , Kaiser , G. , 1988 , J. Chromatog. , 434(1) , 239-46 .
- Steinbach , O. , Moeller , H. , 1978 , Pharm. Ztg. 123 , 271-77 .
- Stevens , G. , Werner , L. H. , Halamandaris , A. , 1958 , Ref. 30 .
- Stohs , S. J. , Scratchley , G. A. , 1975 , J. Chromatog. , 114 , 329-333 .
- Talsky , G. , Mayring , L. , Krevzer , H. , 1978 , Angew. Chem. Int. Ed. Engl. , 17 , 785
- Talsky , G. , 1983 , Inter J. Environ. Anal. Chem. , 14(81) .
- Talsky , G. , Ristic-Solajic , M. , 1987 , Anal. Chim. Acta , 196 , 123 .
- Tanaka , H. , Yoneyama , Y. , Sugawara , M. , 1987 , J. Pharm. Sci. , 76(3) , 224-7 .
- Tannenbaver , E. , Merkel , P. B. , Hamill , W. H. , 1953 , J. Phys. Chem. , 21 , 311 .
- Thielemann , H. , Paepke , M. , 1973 , Anal. Chem. , 266 , 128 .
- Üstün , M. , Sungur , S. , 1992 , Pharmazie , 47 , 459 .

Valladao , D. M. S. , Zuanon , N. J. , Inashiro , M. , 1994 , *Ecletica Quim* , 19 , 57-65 .  
Ref. CA. 122 , 248495 s (1995) .

Vandenheuvel , W. J. A. , Gruber , V. F. ; Walker , R. W. , 1975 , *J. Pharm. Sci.* , 64 ,  
1309-12 .

Wallace , J. E. , Hamilton , H. E. , Skrdlont , H. , 1977 , *J. Chromatog.* , 138 , 111-18 .

Xiao , C. , 1986 , *Yiyao Gongye* , 17(5) , 232-31 . Ref. CA. 105 , 85270 x (1986) .

Yuen , S. , 1985 , *J. Chromatog.* , 329(1) , 107-12 .

Yurdakul , G. , Ersoy , L. , Sungur , S. , 1991 , *Pharmazie* , 46 , 885 .

Yücesoy , C. , 1990 , *Pharmacia (Ankara)* , 30(2) , 53-9 .

Zhu , D. , 1987 , *Youwu Fenxi Zazhi* , 7(2) , 83-5 . Ref. CA. 107 , 46396 q (1987) .

**ÖZ GEÇMİŞ**

**Doğum Tarihi** : 21 Şubat 1972

**Doğum Yeri** : İstanbul

**Üniversite** : 1989 - 1993 , Yıldız Teknik Üniversitesi  
Fen - Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

**Yüksek Lisans** : 1993 - , Yıldız Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı  
Analitik Kimya Programı