

57584

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANTİHİPERTANSİF İLAÇLARIN
SPEKTROFOTOMETRİK VE SIVI KROMATOĞRAFİK
ANALİZİ

Kimya Müh.(Yüksek Lisans, Kimya) Gülten ÇETİN

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında
hazırlanan

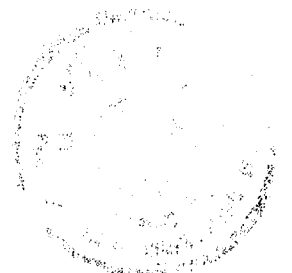
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Sıdika SUNGUR

İSTANBUL, 1996

57584

F.B.E. YÜKSEKÖĞRETİM ENSTİTÜSÜ
DOKÜMANTASYON MERKEZİ



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BÖLÜM	3
2.1. İlaç Maddeleri	3
2.1.1. Amlodipin Besilat	3
2.1.1.1. Özellikleri	3
2.1.1.2. Farmakolojik Etkisi	5
2.1.1.3. Tanınma Yöntemleri	7
2.1.1.4. Miktar Tayini Yöntemleri	8
2.1.2. Silazapril	10
2.1.2.1. Özellikleri	11
2.1.2.2. Farmakolojik Etkisi	13
2.1.2.3. Miktar Tayini Yöntemleri	14
2.1.3. Benazepril Hidroklorür	15
2.1.3.1. Özellikleri	15
2.1.3.2. Farmakolojik Etkisi	18
2.1.3.3. Miktar Tayini Yöntemleri	18
2.1.4. Hidroklorotiazid	19
2.1.4.1. Özellikleri ve Sentezi	19

2.1.4.2.	Farmakolojik Etkisi	24
2.1.4.3.	Tanınma Yöntemleri	25
2.1.4.4.	Miktar Tayini Yöntemleri	28
2.2.	1,2-Naftokinon-4-Sülfonik Asit Sodyum Tuzu (NQS)	39
2.3.	Demir Hidroksamat Reaksiyonu	41
3.	DENEYSEL BÖLÜM	45
3.1.	Maddeler, Çözücüler, Çözeltiler	45
3.1.1.	İlaç Maddeleri	45
3.1.2.	Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	45
3.1.3.	Çözeltiler	46
3.2.	Aletler ve Diğer Gereçler	50
3.3.	Yöntemler	51
3.3.1.	Amlodipin Besilat 'ın Spektrofotometrik Analizi	51
3.3.1.1.	Deney Koşullarının Saptanması	51
3.3.1.1.a.	Uygun pH ve Tampon Çözelti	51
3.3.1.1.b.	Uygun Ekstraksiyon Çözücüsü	52
3.3.1.1.c.	Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	52
3.3.1.1.d.	Belirteç Miktarı	53
3.3.1.2.	Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	54
3.3.1.3.	Farmasötik Preparata Uygulanması	54
3.3.2.	Kıyas Yöntemi	55
3.3.3.	Silazapril 'in Spektrofotometrik Analizi	57
3.3.3.1.	Deney Koşullarının Saptanması	57

3.3.3.1.a. Disikloheksilkarbodiimid (DCC) Miktarı	57
3.3.3.1.b. Hidroksilaminhidroklorür (HAHC) Miktarı	58
3.3.3.1.c. Fe (III) Perklorat Miktarı	59
3.3.3.1.d. Perklorik Asit Çözeltisinin Konsantrasyonu	59
3.3.3.1.e. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	60
3.3.3.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	61
3.3.3.3. Farmasötik Preparata Uygulanması	61
3.3.4. Kıyas Yöntemi	62
3.3.5. Hidroklorotiazid-Benazepril Hidroklorür ve Hidroklorotiazid-Silazapril Karışımlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analizi	64
3.3.5.1. Detektör Dalga Boyunun Saptanması	64
3.3.5.2. pH 'ın Alıkonma Zamanlarına Etkisi	64
3.3.5.3. Mobil Fazdaki Organik Çözücü Oranının Alıkonma Zamanlarına Etkisi	65
3.3.5.4. Kantitatif Analiz	66
3.3.5.4.1. Uygun iç Standart Maddenin Saptanması	66
3.3.5.4.2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	66
3.3.5.4.3. Farmasötik Preparatların Analizi	68
3.3.5.4.4. Kıyas Yöntemleri	69
4. SONUÇLAR	71
4.1. Amlodipin Besilat 'ın Spektrofotometrik Analizi	71
4.1.1. Deney Koşulları	71

4.1.1.a.	Uygun pH ve Tampon Çözelti	71
4.1.1.b.	Uygun Ekstraksiyon Çözücüsü	73
4.1.1.c.	Türevin Dayanıklılığı	74
4.1.1.d.	Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	75
4.1.1.e.	Belirteç Miktarı	77
4.1.2.	Ölçü Eğrisi	78
4.1.3.	Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması	81
4.2.	Silazapril 'in Spektrofotometrik Analizi	83
4.2.1.	Deney Koşulları	83
4.2.1.1.	Silazapril 'in Demir Hidroksamat Türevi	83
4.2.1.2.a.	Disikloheksilkarbodiimid (DCC) Miktarı	83
4.2.1.2.b.	Hidroksilamin Hidroklorür (HAHC) Miktarı	86
4.2.1.2.c.	Fe (III) Perklorat Miktarı	86
4.2.1.2.d.	Perklorik Asit Çözeltisinin Konsantrasyonu	88
4.2.1.2.e.	Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	90
4.2.1.2.f.	Türevin Dayanıklılığı	91
4.2.2.	Ölçü Eğrisi	92
4.2.3.	Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması	94

4.3.	Hidroklorotiazid-Benazepril	
	Hidroklorür ve	
	Hidroklorotiazid-Silazapril	
	Karışımlarının Yüksek Basıncılı Sıvı	
	Kromatografisi ile Analizi	97
4.3.1	Detektör Dalga Boyu	97
4.3.2.	pH 'ın Alıkonma Zamanlarına Etkisi	101
4.3.3.	Mobil Fazdaki Organik Çözücü Oranının	
	Alıkonma Zamanlarına Etkisi	109
4.3.4.	Kantitatif Analiz	117
4.3.4.1.	Ölçü Eğrileri	118
4.3.4.1.a.	Hidroklorotiazid 'in Ölçü Eğrisi	118
4.3.4.1.b.	Benazepril Hidroklorür 'ün Ölçü Eğrisi	122
4.3.4.1.c.	Silazapril 'in Ölçü Eğrisi	125
4.3.4.2.	Yöntemin Farmasötik Preparatlara	
	Uygulanması ve Sonuçların Kıyas	
	Yöntemleri ile Elde Edilen	
	Sonuçlarla Karşılaştırılması	128
5.	TARTIŞMA	132
6.	KAYNAKLAR	137
	ÖZGEÇMİŞ	

TESEKKÜR

Çalışmalarımı büyük bir dikkat ve titizlikle yöneten, karşılaştığım her sorunda bilgisi ve ileri görüşü ile yardımlarını ve ilgilerini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Sıdika Sungur 'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca bana daima destek olan aileme, özellikle anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi belirtmeyi bir borç bilirim.



ÖZET

Kalsiyum kanal blokerleri ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, antihipertansif ilaç maddelerinin yeni ve önemli gruplarıdır. Bu çalışmanın birinci bölümünde, bir kalsiyum kanal blokeri olan amlodipin ile ACE inhibitörü olan silazapril 'in miktar tayini için iki adet spektrofotometrik yöntem geliştirildi. İkinci bölümde ise silazapril ve diğer bir ACE inhibitörü olan benazepril hidroklorür 'ün hidroklorotiazid ile karışımlarını içeren iki adet dozaj şeklinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi incelendi.

Amlodipin (besilat) 'in spektrofotometrik analizi, bu maddenin amino grubunun 1,2-naftokinon-4-sülfonik asit sodyum tuzu (NQS) ile kondensasyon reaksiyonu sonunda kırmızı renkli kromofor oluşumuna ve bir organik çözücüye ekstraksiyondan sonra absorpsiyon ölçümüne dayanır. Analizin optimum koşulları : a) tampon çözeltinin pH 'ı ve cinsi, b) reaksiyonun süresi ve sıcaklık, c) ekstraksiyon çözücüsünün cinsi, d) belirteç miktarı 'na bağlı olarak incelendi. En yüksek absorbans değeri, pH:10 fosfat tamponu ile elde edildi. Sıcaklık ve zamanın reaksiyon hızına etkisi, 25-70 °C aralığında incelendi ve reaksiyonun 70 ° C de 20 dakikada tamamlandığı gözlemlendi. n-Bütanol, ekstraksiyon için

en uygun çözücü olarak belirlendi ve en yüksek absorbands, 494 nm de elde edildi. Optimum belirteç miktarı, 5×10^{-7} mol amlodipin için % 1,0 'lık NQS çözeltisinden 0,5 ml olarak saptandı. Bu koşullarda amlodipin besilat konsantrasyonu (c) ile absorbands (A) arasında (15-75) $\mu\text{g.ml}^{-1}$ aralığında doğrusal bağıntı bulunduğu saptandı. Regresyon eşitliği,

$$A = 9,86 \times 10^{-3} c + 0,01 \quad (r=0,9998) \quad \text{dir.}$$

Bu yöntem amlodipin besilat içeren ticari tabletlere uygulan-
dı ve sonuçlar farmakope yöntemi bulunmadığı için UV-spekto-
fotometrik yöntem ile kıyaslandı. İki yöntem arasında anlamlı
fark bulunmadı.

Silazapril 'in spektrofotometrik analizi, bu maddenin karboksil grubunun, disikloheksilkarbodiimid (DCC) varlığında hidroksilamin hidroklorür ile reaksiyona girerek hidroksamik asit oluşturmaları ve daha sonra etanollü perklorik asit çözeltisinde demir (III) perklorat ile demir hidroksamat kompleksi meydana gelmesine dayanır. Hem hidroksamik asit hem de kompleks oluşumuna ait optimum koşullar incelendi. Hidroksamik asit oluşumu, reaksiyon süresi ve sıcaklık ve di- sikloheksilkarbodiimid ile hidroksilamin hidroklorür 'ün miktarları yönünden incelendi. 5×10^{-6} mol silazapril için reaksiyon etanollü ortamda 0,5 ml 0,3 M hidroksilamin hidro- klorür ve 0,4 ml 0,3 M DCC çözeltileri ile 30 °C de 10 dakı- kada tamamlandı. Kompleks oluşumu için demir (III) perklorat ve perklorik asit konsantrasyonları incelendi ve Fe (III) perklorat 'ın 0,2 M etanollü perklorik asitteki 0,02 M çözeltisinden 1,0 ml gerektiği görüldü. Meydana gelen kızıl- kahverenkli çözeltinin absorbandsı, 517 nm (λ_{max}) de ölçüldü ve

silazapril konsantrasyonu (c) ile absorbands (A) arasındaki ilişkinin, (60-300) $\mu\text{g.ml}^{-1}$ aralığında doğrusal olduğu bulundu. Regresyon eşitliği,

$$A = 1,42 \times 10^{-3} c + 0,004 \quad (r=0,9998) \quad \text{dir.}$$

Bu yöntem, tabletlerde silazapril tayinine uygulandı. Silazapril için monograf bulunmadığından sonuçlar UV-spektrofotometrik yöntem ile analiz sonunda bulunanlarla karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı fark bulunmadı.

Çalışmanın son bölümünde ters faz sıvı kromatografisi sisteminde silazapril, benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid 'in alıkonma davranışları ve silazapril ile benazepril hidroklorür 'ün hidroklorotiazid ile ikili karışımlarının analizi incelendi. Mobil fazın pH 'ının ve organik çözücü içeriğinin alıkonma hacimlerine etkisi, C_{18} kolon kullanılarak araştırıldı. Hidroklorotiazid, pH değişiminden etkilenmedi. Silazapril ve benazepril hidroklorür 'ün alıkonma hacimleri, mobil fazın pH 'ının yükselmesi ile azaldı. Her iki karışımın analizi, μ -Bondapak C_{18} ters faz kolon ve metanol-pH:4,0 fosfat tamponu (70:30) isokratik mobil faz kullanılarak gerçekleştirildi. İç standart olarak fenobarbital kullanıldı. Maddeler, 209 nm de değişken dalga boylu detektör ile saptandı. 1500 PSI (1,0 ml.dak⁻¹ akış hızı) da hidroklorotiazid, fenobarbital, silazapril ve benazepril hidroklorür için alıkonma zamanları sırasıyla, 2,56 ; 3,53 ; 5,30 ve 5,34 dakika olarak saptandı. ilaç maddelerinin pik alanlarının iç standardinkine oranı ile herbir ilaç

maddesinin konsantrasyonu arasında doğrusal ilişki olduğu görüldü. Bu karışımları içeren ticari tabletler analiz edildi. Yine ofisiyel yöntem bulunmaması sebebiyle aynı tabletler türev UV-spektrofotometrisi ile analiz edilerek sonuçlar karşılaştırıldı ve anlamlı fark bulunmadı.



SUMMARY

Calcium channel blockers and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors are new and important groups of antihypertensive drugs. In the first part of the present study two spectrophotometric methods have been developed for the assay of a calcium channel blocker, amlodipine and an ACE inhibitor, cilazapril. In the second part, high pressure liquid chromatographic analysis of two pharmaceutical dosage forms containing cilazapril-hydrochlorothiazide and benazepril hydrochloride (ACE inhibitor)-hydrochlorothiazide mixtures were investigated.

Spectrophotometric analysis of amlodipine besylate is based on the formation of a red coloured chromophore by the condensation reaction of the amino group of this drug with 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt (NQS) and the measuring its absorption after extraction into an organic solvent. The optimum conditions for the analysis were investigated as a functions of : a) pH and the type of the buffer, b) reaction temperature and time, c) the type of extraction solvent, d) the reagent amount. The maximum absorbance value was obtained with pH 10 phosphate buffer. The effects of temperature and time on the reaction rate were

examined in 25-70 °C interval and it was observed that the reaction was completed in 20 min. at 70 °C. n-Butanol was the best solvent for the extraction and maximum absorbance was obtained at 494 nm. The optimum amount of the reagent was determined as 0.5 ml of 1.0 % NQS solution for 5×10^{-7} mole of amlodipine. Under these conditions a linear relationship existed between absorbance (A) and amlodipine besylate concentration (c) over 15-75 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ range. The regression equation is

$$A = 9.86 \times 10^{-3} c + 0.01 \quad (r = 0.9998).$$

The method was applied to the determination of amlodipine besylate in commercially available tablets and the results were compared with those obtained by UV-spectrophotometric method since a pharmacopoeial method is not available. There was no significant difference between the two methods.

Spectrophotometric analysis of cilazapril involves the reaction of its carboxyl group with hydroxylamine hydrochloride in the presence of, dicyclohexylcarbodiimide (DCC) to give the corresponding hydroxamic acid and then the formation of the reddish brown coloured ferric hydroxamate complex with iron (III) perchlorate in ethanolic solution of perchloric acid. The optimum conditions were investigated for both hydroxamic acid and hydroxamate complex formation. Hydroxamic acid formation was studied in respect of the reaction temperature and time and the amounts of dicyclohexylcarbodiimide and hydroxylamine hydrochloride. The reaction was

completed in 10 min. at 30 °C with 0.5 ml of 0.3 M ethanolic hydroxylamine hydrochloride and 0.4 ml 0.3 M ethanolic DCC solutions for 5×10^{-5} mole cilazapril. Iron (III) perchlorate and perchloric acid concentrations for complex formation were examined and it was found that 1.0 ml of 0.02 M iron (III) perchlorate solution in 0.2 M ethanolic perchloric acid solution was required. The absorbance of the resulted reddish brown coloured solution was measured at 517 nm (λ_{max}), and a linear relationship was obtained between absorbance (A) and cilazapril concentration (c) in the range of (60-300) $\mu\text{g.ml}^{-1}$. The regression equation is

$$A = 1.42 \times 10^{-3} c + 0.004 \quad (r=0.9998).$$

The method was applied to the assay of cilazapril tablets. Since there is no monograph on cilazapril, the results were compared with those obtained by UV-spectrophotometric method. There was no significant difference between the two methods.

The last part of the study involves the investigation of the retention behaviour of cilazapril, benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide and the assay of cilazapril-hydrochlorothiazide, benazepril hydrochloride-hydrochlorothiazide mixtures in reversed phase liquid chromatographic system. The effects of the pH and organic solvent content of the mobil phase on the retention volumes were studied using a C_{18} column. Hydrochlorothiazide was not effected by the pH changes. The retention volumes of cilazapril and benazepril hydrochloride were decreased with the increasing pH of the

mobile phase. The assay of both mixtures were performed using μ -Bondapak C₁₈ RP column and methanol-pH:4.0 phosphate buffer (70:30) as isocratic mobile phase. Phenobarbital was used as an internal standard. The substances were detected by a variable wavelength detector operating at 209 nm. At 1500 PSI (1.0 ml.min⁻¹ flow rate), retention times of hydrochlorothiazide, phenobarbital, cilazapril and benazepril hydrochloride were 2.56 ; 3.53 ; 5.30 and 5.34 min. respectively.

A linear relation was obtained between the ratio of peak area of drugs to internal standard and the concentration of each drug. Commercial tablets containing these mixtures were assayed by this method. These tablets were also assayed by derivative UV-spectrophotometric methods since there is no official methods for the analysis of these mixtures. There was no significant difference between the two methods.

1. GİRİŞ

Yüksek tansiyona karşı kullanılan ilaç etken maddelerine zamanla yenileri eklenmektedir. Kalsiyum kanal blokerleri ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, bu amaçla son yıllarda dünyada ve ülkemizde çok popüler olan yeni gruplardır. Kullanıma giren yeni ilaç maddelerinin gerek ilaç preparatlarında gerekse biyolojik ortamlarda analizi için duyarlı ve seçici yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. Bu tezde bu iki gruptan ilaç preparatlarının analizi için spektrofotometrik ve sıvı kromatografik yöntemler geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Amlodipin, kalsiyum kanal blokerleri grubundandır. Literatürde bu maddenin analizi ile ilgili sıvı kromatografik ve gaz kromatografik birkaç yöntemle rastlanmıştır, ancak spektrofotometrik bir yöntem bulunamamıştır. Yapısında bulunan alifatik primer amin grubundan yararlanılarak, renkli bir türev oluşturulması ve görünür bölge spektrofotometrik bir analiz yöntemi geliştirilmesi düşünülmüştür. Bunun için

belirteç olarak, 1,2-naftokinon-4-sülfonik asit sodyum tuzu seçilmiştir.

Silazapril, ACE inhibitörü olan yeni bir ilaç maddesidir. Literatür incelemesinde bu maddenin analizi için sadece bir adet enzimatik immünolojik yöntemle rastlanmıştır. Silazapril'in yapısında bulunan karboksil grubundan hareketle, renkli demir (III) hidroksamat kompleksinin oluşumuna dayanan bir spektrofotometrik analiz yönteminin koşullarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Silazapril ve aynı gruptan diğer bir ilaç etken maddesi olan benazepril hidroklorür'ün bir diüretik olan hidroklorotiazid ile kombinasyonlarını içeren iki tablet preparatı, ülkemizde çok yakın zamanda piyasaya çıkarılmıştır. İki etken maddeyi birarada içeren bu tabletlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi için, önce bu maddelerin ters faz sıvı kromatografisindeki davranışlarının incelenmesi, sonra en uygun sistemde analizi amaçlanmıştır.

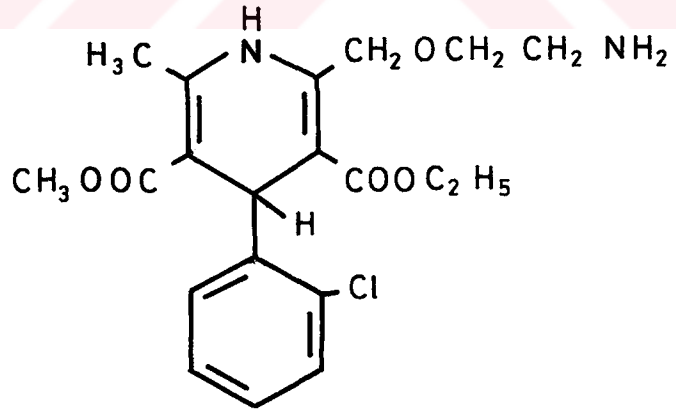
2. GENEL BÖLÜM

2.1. ilaç Maddeleri

2.1.1. Amlodipin Besilat

2.1.1.1. Amlodipin 'in Özellikleri (Merck Index)

Amlodipin, ilk olarak Alker et al., (1983) tarafından tanımlanan bir dihidropiridin bileşiğidir.



Kimyasal ismi : { 2-[(2-Aminoetoksi)metil]-4-(2-klorofenil)-
1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridindikarboksilik asit 3-etil,
5-metil ester }

Kapalı Formülü : $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$

Molekül Ağırlığı : $408.88 \text{ g.mol}^{-1}$

Elementel Analizi :

Element	C	H	Cl	N	O
%	58,75	6,16	8,67	6,85	19,56

Görünüşü : Beyaz renkli, kristalize yapıdadır. Etilasetat'dan kristallendirilir.

Erime Derecesi : $178-179 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Amlodipin Besilat 'ın Çözünürlüğü : Literatürde amlodipin 'ın çözünürlüğüne ait bilgi verilmemiştir. Yapılan incelemelerde amlodipin besilat 'ın çözünürlüğünün, etanol, metanol ve kloroform gibi organik çözücülerde çok iyi, sulu asidik çözeltilerde (0,1 N HCl) iyi olduğu, sulu bazik çözeltilerde (0,1 N NaOH) zor çözündüğü, etilasetat ve eter gibi organik çözücülerde ve suda çözünmediği belirlenmiştir.

Amlodipin Besilat 'ın UV Spektrumu : Literatürde Amlodipin'in UV spektrumu hakkında bilgi bulunamamıştır. Amlodipin besilat 'ın, bazı çözücüler içinde hazırlanan $10 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyonundaki çözeltilerinin UV spektrumları alınarak, UV absorpsiyonu hakkında veriler elde edilmiştir. Bu veriler cetvel 2.1. de verilmiştir.

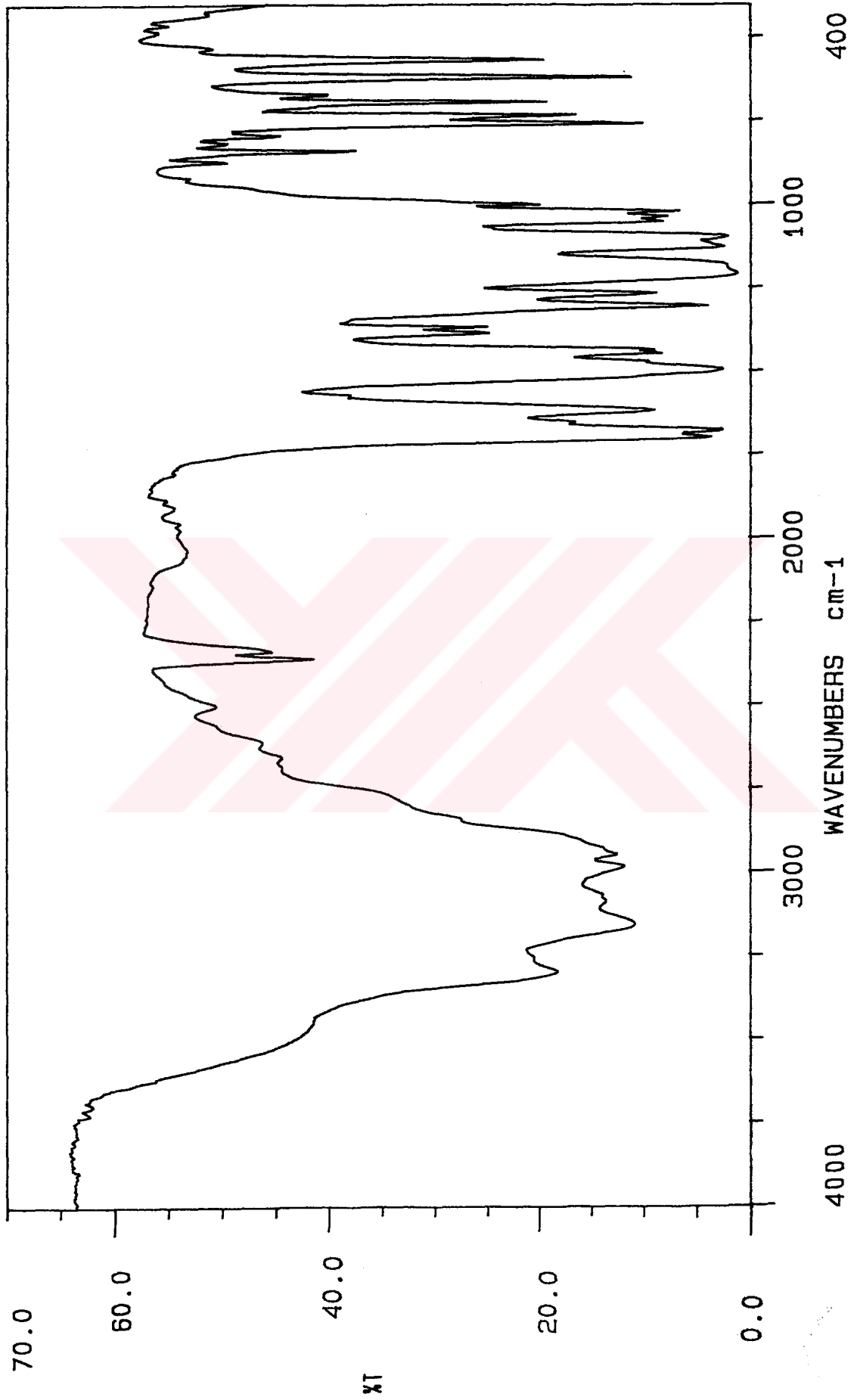
Cetvel 2.1. Amlodipin Besilat 'ın UV Absorpsiyonu

Çözücü	λ_{max} (nm)	log ϵ
0,1 N HCl	239,0	4,376
	365,0	3,951
Etanol	212,0	4,428
	238,0	4,308
	363,0	3,859
Metanol	212,0	4,431
	238,0	4,300
	362,0	3,835

Amlodipin Besilat 'ın FTIR Spektrumu : Amlodipin besilat 'ın FTIR spektrumu Şekil 2.1. de yer almaktadır.

2.1.1.2. Farmakolojik Etkisi

Bir dihidropiridin türevi olan amlodipin, Kalsiyum kanal blokerleri sınıfına girmektedir. Bu sınıfın yeni ve uzun etkili bir üyesi olarak, anjina pectoris ve yüksek tansiyona karşı kullanılmaktadır (Burges et al., 1985, 1987, 1990). Amlodipin 'ın (+) ve (-) olmak üzere iki enantiomeri vardır. Yapılan farmakolojik çalışmalarda, amlodipin 'ın bir dihidropiridin kalsiyum kanal blokeri olarak sağladığı etkinliğin, (-)-enantiomeri şeklinde bulunmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu nedenle farmasötik preparatlar içinde (-)-amlodipin şeklinde yer almaktadır.



Sekil 2.1. Amlodipin Besilat 'in FTIR Spektrumu
Spektrum, MATTSON 1000 Model FTIR Spektrometresinde
KBr diskinden elde edilmistir.

Amlodipin, insan, fare ve köpekte büyük miktarda metabolize edilir. İdrarda, dozun yalnızca %5 'i değişmemiş halde bulunabilir. Bu metabolizmanın karmaşık olduğu ve piridin analoguna oksidasyonu içerdiği belirtilmektedir. Higuchi et al., (1980) ve Beresford et al., (1989) metabolitleri idrardan izole ederek Gaz kromatografisi-Kütle spektroskopisi (GC-MS) ve Sıvı kromatografisi-Kütle spektroskopisi (LC-MS) yöntemleri ile tanımlamışlardır. Amlodipin 'in damardan ve ağız yoluyla verildikten sonra saptanan ortalama plazma yarı ömrü, 33-36 saattir (Faulkner et al., 1986., Beresford et al., 1988).

2.1.1.3. Tanınma Yöntemleri

Amlodipin yeni bir ilaç maddesi olduğundan henüz farmakopede yer almamıştır.

Amlodipin ve diğer kalsiyum kanal blokerlerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ayrılması ve tanınması için gerek isokratik koşullarda gerekse gradient elüsyon ile incelemeler yapılmış, pH 'ın ayırmaya etkisi incelenmiştir (Barbato et al., 1993).

Bretnall et al., (1995) ise amlodipin 'in diğer bazı kalp ilaçları ile karışımının ayrılması ve tanınması için miselli elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC) yöntemini kullanmışlar ve pH, sodyum dodesil sülfat konsantrasyonu,

organik çözücünün cinsinin ve konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir.

Amlodipin 'in enantiomerlerinin ayrılmasında da yine yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. (-)-Mentil kloroformat ile türevlendirmeden sonra poröz grafit kolon ve diklorometan-asetonitril-formik asitden oluşan hareketli faz kullanılmıştır (Josefsson et al., 1993). Vandenbosch et al., (1992) ise bu ayrımı kiral duran fazlar kullanarak gerçekleştirmiştir.

2.1.1.4. Miktar Tayini Yöntemleri

Literatürde amlodipin 'in miktar tayini için sadece birkaç çalışmaya rastlanmıştır.

Farmasötik preparatlarda bulunan amlodipin 'in tayini, yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ile yapılmıştır (Chandrashekar et al., 1994). Tayin sınırı 0.2 ng olarak belirtilmiştir.

Amlodipin 'in insan, fare ve köpek plazması gibi biyolojik örneklerde elektron yakalama detektörü (ECD) kullanılarak gaz kromatografisi yöntemiyle tayinleri yapılmıştır (Beresford et al., 1987., Scharpf et al., 1994). Bu çalışmalarda amlodipin, trimetilasetil klorür, (+)-(S)-metoksi-triflorometilfenilasetil klorür belirteçleri kullanılarak amid türevlerine dönüştürülmüştür.

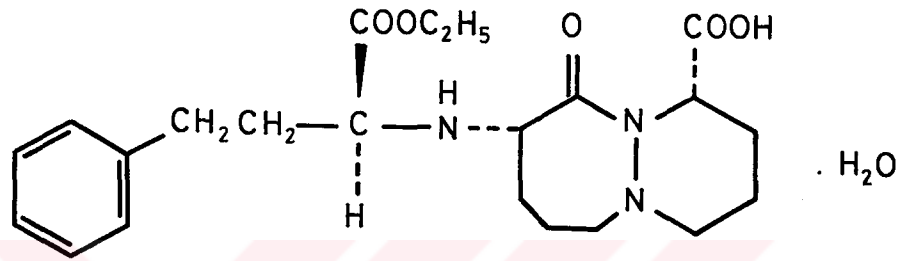
Amlodipin 'in gerek farmasötik preparatlar (Patki et al., 1994) ve gerekse biyolojik sıvılardaki analizi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayinleri yapılmıştır. Biyolojik sıvılar içinde yapılan tayinlerde, fareler üzerinde yapılan farmakokinetik çalışmalarda elektrokimyasal detektör kullanılmıştır (Shimooka et al., 1989). Çalışma aralığı, 0,2-2,0 ng.ml⁻¹ olarak belirtilmiştir.

Bir başka çalışmada ise tavşanlara ait plazma örnekleri, ters faz sıvı kromatografisi sistemiyle, UV detektör kullanılarak analiz edilmiştir (Yeung et al., 1991). Mobil faz olarak, %0,02 trietilamin içeren metanol-0,04 M amonyum asetat-asetonitril karışımı (38:38:24) kullanılmıştır. Çalışma aralığı, 2,5-100 ng.ml⁻¹ olarak belirtilmiştir.

2.1.2. Silazapril

2.1.2.1. Özellikleri (Merck Index)

Silazapril, antihipertansif etki amacıyla kullanılan bir ilaç maddesidir.



Kimyasal İsmi : { [1S-[1 α ,9 α (R*)]]-9-[[1-(Etoksikarbonil)-3-fenilpropil]amino]oktahidro-10-okso-6H-piridazino[1,2-a][1,2] diazepin-1-karboksilik asit monohidrat }

Kapalı Formülü : C₂₂H₃₁N₃O₆.H₂O

Molekül Ağırlığı : 435.52 g.mol⁻¹

Elementel Analizi :

Element	C	H	N	O
%	60,67	7,64	9,65	22,04

Görünüşü : Beyaz renkli, kristalize yapıdadır. Sulu etanolden kristallendirilir.

Erime Derecesi : 95-97 °C

Çözünürlüğü: Literatürde silazapril 'in çözünürlüğüne ait bilgi verilmemiştir. Yapılan incelemelerde çözünürlüğünün etanol, metanol, aseton ve kloroform gibi organik çözücülerde çok iyi olduğu, asidik ve bazik sulu çözeltilerde (0,1 N HCl ve 0,1 N NaOH) zor çözündüğü ve suda çözünmediği belirlenmiştir.

Optikçe Aktivlik : Silazapril, optikçe aktiftir. Polarize ışığı sola çevirir. $[\alpha]_D^{20} = -62,51^\circ$ (%1 'lik etanol çözeltisinde) dir.

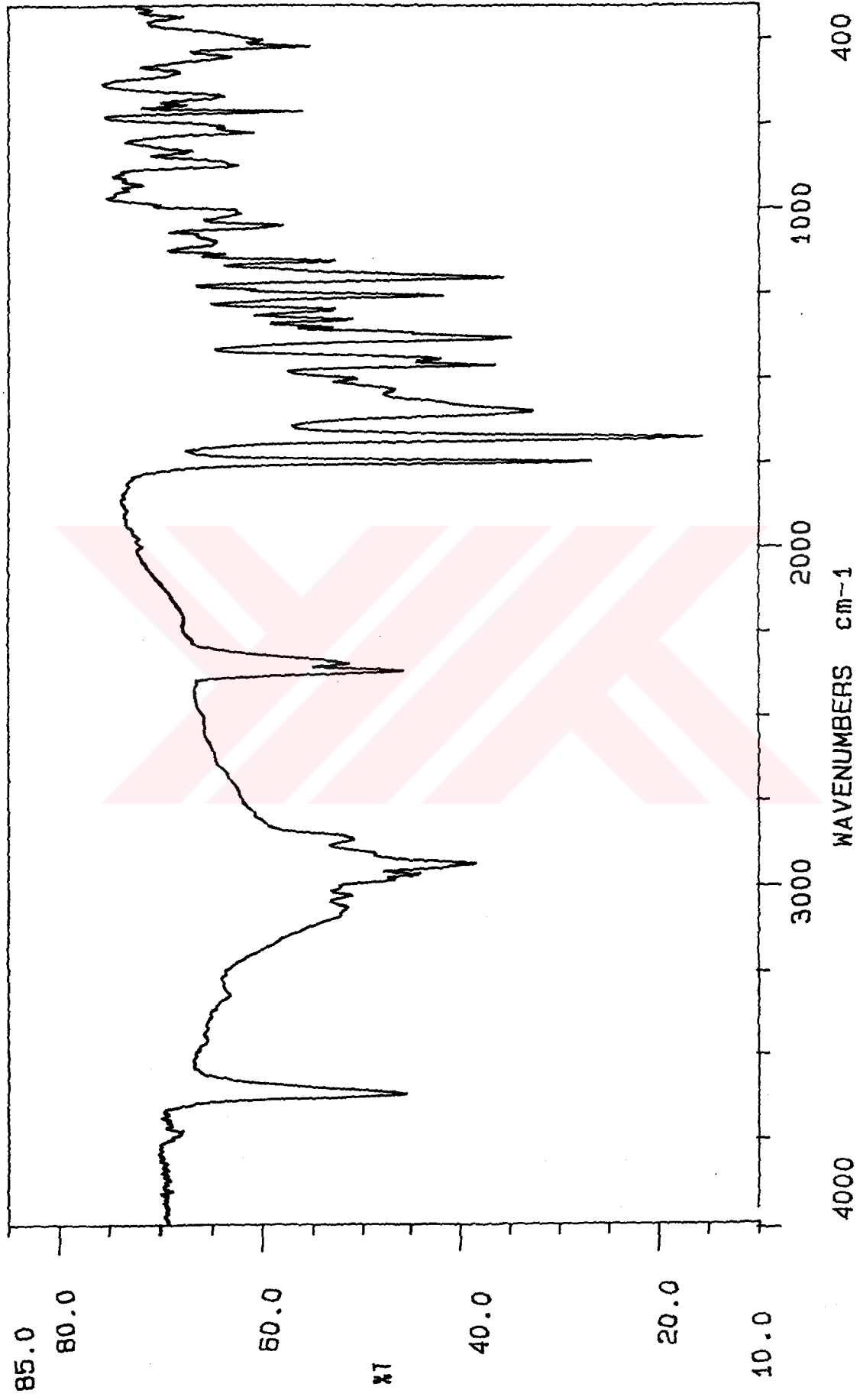
UV Spektrumu : Cetvel 2.2. de silazapril 'in bazı çözücüler içindeki UV absorpsiyonu hakkında bilgi verilmektedir.

Cetvel 2.2. Silazapril 'in UV Absorpsiyonu

Çözücü	λ_{max} (nm)	log ϵ
0,1 N HCl	208,8	4,113
0,1 N NaOH	219,2	3,899
Etanol	209,6	4,061
Metanol	209,0	4,117

Literatürde silazapril 'in UV spektrumu hakkında bilgi olmadığı için, cetvel 2.2. de verilen değerler, silazapril 'in değişik çözücüler içinde hazırlanan $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyonundaki çözeltilerinin UV spektrumlarının alınmasıyla elde edilmiştir.

FTIR Spektrumu : Silazapril 'in FTIR Spektrumu, şekil 2.2 de yer almaktadır.



Sekil 2.2. Silazapril 'in FTIR Spektrumu
Spektrum, MATTSON 1000 Model FTIR Spektrometresinde
KBr diskinden elde edilmiştir.

2.1.2.2. Farmakolojik Etkisi

Silazapril, kalp-damar sistemi ilaçlarından olan ACE (Anjiotensin dönüştürücü enzim) inhibitörleri sınıfına giren yeni bir ilaç maddesidir (Belz et al., 1994). Bu ilaç maddeleri, sentezleri ve kullanımları bakımından oldukça yenidir.

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. Ağız yoluyla alınan ACE inhibitörü ilaç maddeleri, Anjiotensin I 'in Anjiotensin II 'ye dönüşmesini engelleyerek plazma ve dokularda Anjiotensin II düzeyini azaltırlar. Dolayısıyla atar ve toplar damarlardaki genişlemeye bağlı kan basıncının düşmesine neden olurlar (Canay, O. 1992).

Silazapril, vücuda alındıktan sonra ester grubunun hidrolizi ile aktif metaboliti olan silazaprilat 'a dönüşür. Silazapril 'in farmakolojik yarılanma ömrü, yaklaşık 4 saat olarak tayin edilmiştir. Anjiotensin dönüştürücü enzimin aktivitesinin 3 saat içinde %50 azalması için, silazapril 'in yaklaşık 0,6 mg dozunun yeterli olduğu belirtilmektedir (Belz et al., 1994).

Literatürden, silazapril 'in tanınmasıyla ilgili bilgi

edinilememiştir.

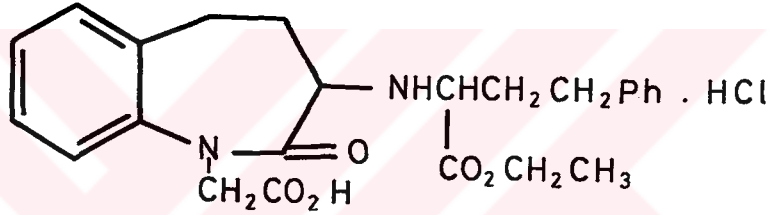
2.1.2.3. Miktar Tayini Yöntemleri

Silazapril, sentezi ve kullanımıyla oldukça yeni bir ilaç maddesidir. Silazapril 'in miktar tayini ile ilgili olarak yapılan araştırmada, farmakokinetik özelliklerinin incelendiği yalnızca tek bir çalışmaya rastlanmıştır: Tanaka et al., (1987) enzimatik immünolojik yöntemle (enzyme immunoassay) silazapril ve aktif metaboliti olan silazaprilat 'ı farklılaştırıp, kantitatif olarak tayin etmişlerdir. Yöntemi plazma ve serum örneklerine uygulamışlar ve sonuçları radyo enzimik tayinlerle karşılaştırmışlardır.

2.1.3. Benazepril Hidroklorür

2.1.3.1. Özellikleri

Benazepril hidroklorür, silazapril gibi yeni kullanım alanı bulan bir ACE inhibitörüdür. Literatürde benazepril hidroklorür hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Burada verilen bilgiler, Ciba-geigy A.Ş.'den elde edilmiştir.



Kimyasal ismi : { 3-[(1-Etoksikarbonil-3-fenil-(1S)-propil) amino]-2,3,4,5-tetrahidro-2-okso-1H-1-(3S)-benzazepin-1-asetik asit hidroklorür }

Kapalı Formülü : $C_{24}H_{28}N_2O_5 \cdot HCl$

Molekül Ağırlığı : 461 g.mol^{-1}

Görünüşü : Beyaz renkli, kristalize yapıdadır.

Erime Derecesi : $176,6-181 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Çözünürlüğü : Metanol, etanol ve kloroform içinde kolayca çözünür. Sulu asidik ve bazik çözeltilerde (0,1 N HCl ve

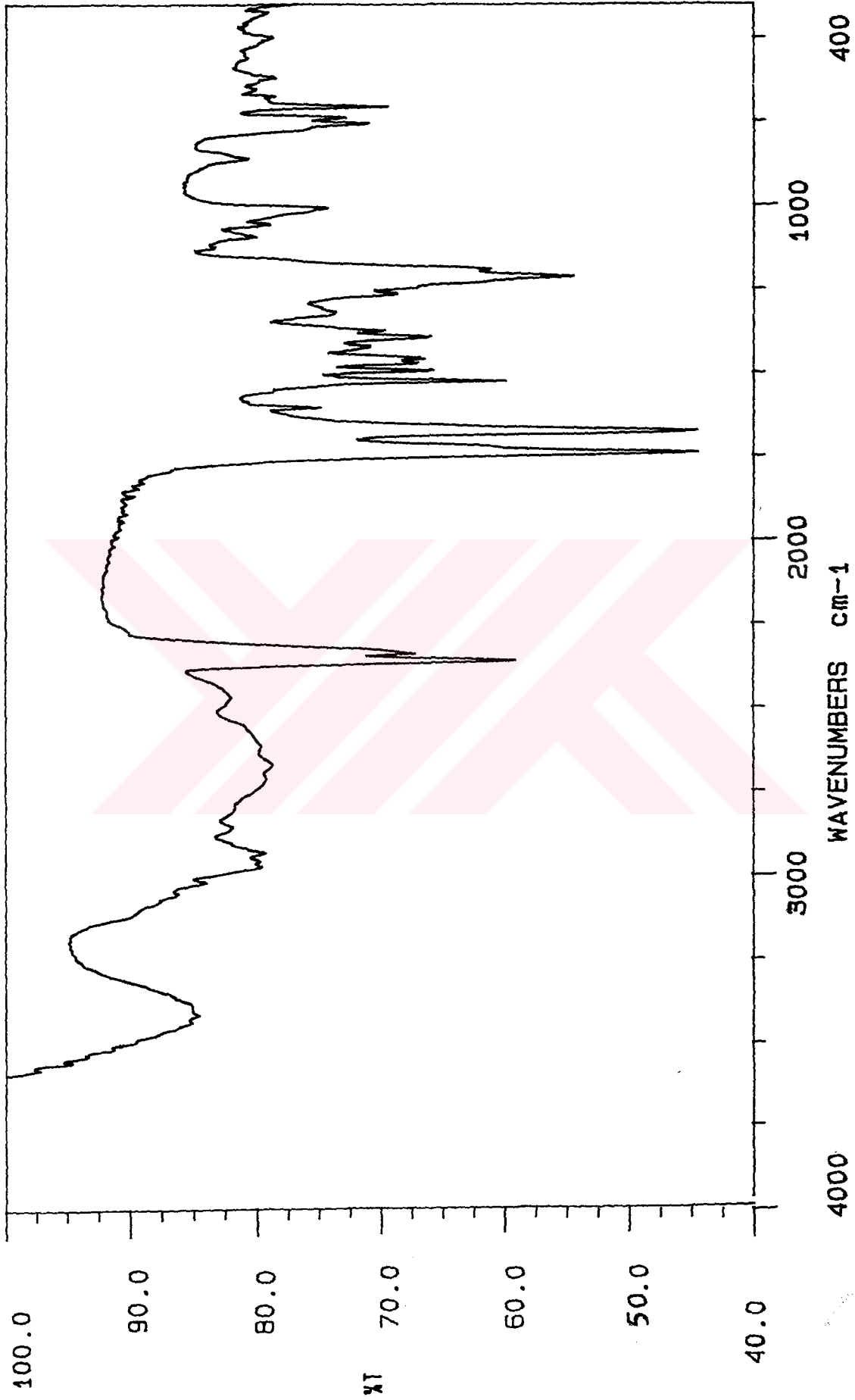
çözünürlüğü çok azdır. Aseton, sikloheksan ve suda çözünmez. Optikçe Aktiflik : Benazepril hidroklorür optikçe aktiftir. Polarize ışığı sola çevirir. $[\alpha]_D^{20} = (-136^{\circ}) - (-142^{\circ})$ (etanol 'de) dir.

UV Spektrumu : Literatürde benazepril hidroklorür 'ün UV spektrumu hakkında bilgi bulunamamıştır. Benazepril hidroklorür 'ün bazı çözücüler içindeki $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik çözeltilerinin UV spektrumları alınarak UV absorpsiyonu üzerine veriler elde edilmiştir. Bunlar, cetvel 2.3. de verilmiştir.

Cetvel 2.3. Benazepril Hidroklorür 'ün UV Absorpsiyonu

Çözücü	λ_{max} (nm)	log ϵ
0,1 N HCl	206,7	4,466
	236,8	4,048
0,1 N NaOH	217,6	4,079
	241,6	4,046
Etanol	208,0	4,484
	240,0	4,027
Metanol	208,1	4,496
	240,0	4,008

FTIR Spektrumu : Benazepril hidroklorür 'ün FTIR spektrumu şekil 2.3. de yer almaktadır.



Sekil 2.3. Benazepril Hidroklorür 'ün FTIR Spektrumu
Spektrum, MATTSON 1000 Model FTIR Spektrometresinde
KBr diskinden elde edilmiştir.

2.1.3.2. Farmakolojik Etkisi

Benazepril hidroklorür, ACE (Anjiotensin dönüştürücü enzim) inhibitörleri sınıfına giren yeni bir ilaç maddesidir.

Benazepril hidroklorür vücuda alındıktan sonra, ester grubunun hidrolizi ile aktif metaboliti olan, dikarboksilik asit yapısındaki benazeprilat 'a dönüşür.

ACE inhibitörlerinin farmakolojik etkisi bölüm 2.1.2.2. de anlatıldığı için bu bölümde tekrar yer verilmemiştir.

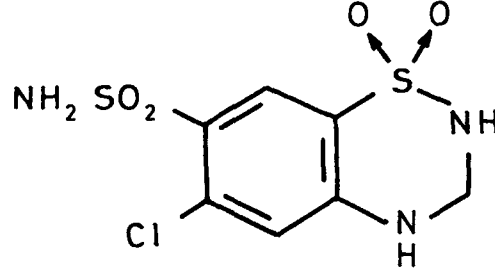
Benazepril hidroklorür yeni bir ilaç maddesi olduğundan, farmakopede ve literatürde herhangi bir tanıma yöntemine rastlanmamıştır.

2.1.3.3. Miktar Tayini Yöntemleri

Benazepril 'in miktar tayini ile ilgili olarak yapılan kaynak araştırmasında iki adet çalışma bulunmuştur. Bunlarda, benazepril ve aktif metaboliti olan benazeprilat 'ın plazma ve idrardaki analizleri gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemiyle yapılmıştır. Bu çalışmaların birinde dolgu kolon (Kaiser et al., 1987) diğerinde ise kapiler kolon (Sioufi et al., 1988) kullanılmıştır.

2.1.4. Hidroklorotiazid

2.1.4.1. Özellikleri ve Sentezi (Florey, K. 1981)



Kimyasal İsmi : { 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin
-7-sülfonamid-1,1-dioksit }

Kapalı Formülü : $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

Molekül Ağırlığı : $297,73 \text{ g.mol}^{-1}$

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

Görünüşü : Beyaz renkli, kristalize yapıdadır.

Erime Derecesi : $273-275 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Çözünürlüğü : Hidroklorotiazid, nötral ve asidik ortamda

bulunan sulu çözeltilerde hemen hemen çözünmez. Sodyum hidroksit veya amonyum hidroksit gibi inorganik bazların sulu çözeltilerinde ve n-bütilamin gibi organik bazlar içinde çözünür. Ayrıca, metanol, etanol, aseton içinde çözünür.

Kararlılığı : Hidroklorotiazid, oda sıcaklığında bozunma göstermeden 5 yıl saklanabilir. Isıdan çok yavaş etkilenir. 307 °C nin üzerinde bozunmaya uğrar. Normal gün ışığında oldukça kararlıdır. Sulu çözeltiler içinde formaldehit ve 6-kloro-2,4-disülfamoilanilin vermek üzere hidroliz olur (Florey, K. 1981).

Ayrışma Sabiti : Hidroklorotiazid 'in sulu çözeltiler içinde potansiyometrik titrasyon yöntemi ile saptanan pKa değerleri Analytical Profiles of Drug Substances (Florey, K. 1981) da, $pK_{a1}=8,6$ ve $pK_{a2}=9,9$ olarak bildirilmektedir.

Dağılma Oranı : Hidroklorotiazid 'in n-oktanol:su sisteminde farklı pH 'larda 25 °C de tayin edilen dağılma oranları, cetvel 2.4. te gösterilmektedir. Bu cetveldeki dağılma oranları, maddenin organik ve sulu fazdaki konsantrasyonlarının oranı olarak ifade edilmiştir.

Cetvel 2.4. Hidroklorotiazid 'in Dağılma Oranları (Florey, K. 1981)

Organik Faz	Sulu Faz	Dağılma Oranı
n-Oktanol	0,1 N HCl (pH=1,06)	1,940
n-Oktanol	0,1 M Glisin Tamponu (pH=3,0)	0,866
n-Oktanol	0,067 M Fosfat Tamponu (pH=7,4)	0,855

UV Spektrumu : Cetvel 2.5. de hidroklorotiazid 'in bazı çözücüler içindeki UV absorpsiyonu hakkında bilgi verilmektedir.

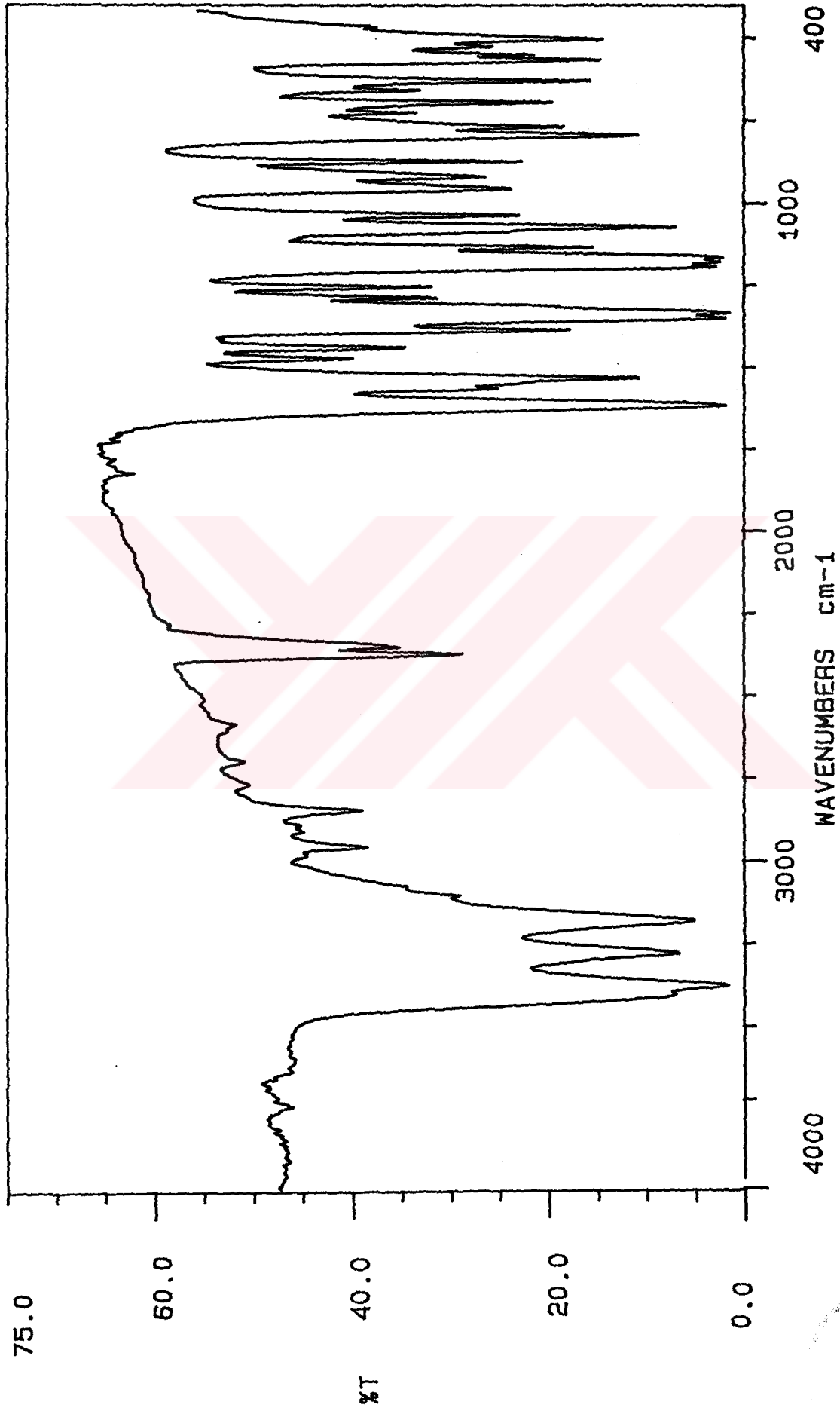
FTIR Spektrumu : Hidroklorotiazid 'in FTIR spektrumu şekil 2.4. de yer almaktadır.

Cetvel 2.5. Hidroklorotiazid 'in UV Absorpsiyonu
(Florey, K. 1981)

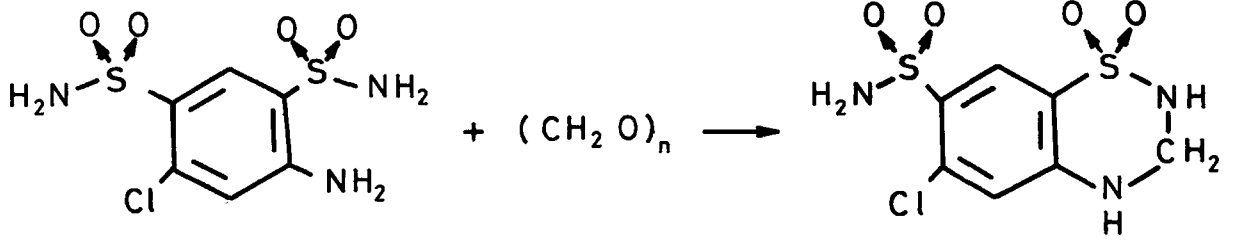
Çözücü	λ_{max} (nm)	log ϵ
Su	270	4,286
	315	3,495
0,01 N HCl	270	4,290
	315	3,500
0,01 N NaOH	272	4,193
	323	3,435
Etanol	225	4,576
	269	4,307
	316	3,505
Metanol	226	4,513
	271	4,279
	317	3,471

Sentezi : Kleemann, A. (1978) hidroklorotiazid 'in sentezinin iki şekilde yapılabileceğini göstermiştir. Buna göre,

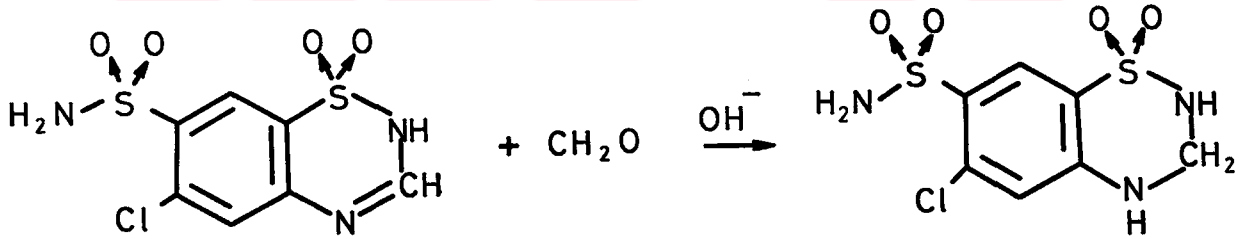
1) 5-kloro-2,4-disulfamoilanilin ve paraformaldehit, susuz ortamda hidroklorotiazid oluşturmak üzere reaksiyona girerler.



Sekil 2.4. Hidroklorotiazid 'in FTIR Spektrumu
Spektrum, MATTSON 1000 Model FTIR Spektrometresinde
KBr diskinden elde edilmiştir.



ii) 6-kloro-7-sülfamoil-2H-1,2,4-benzotiadiazin-1,1-dioksit ve formaldehit 'den sulu alkali çözelti içinde hidroklorotiazid elde edilir.



2.1.4.2. Farmakolojik Etkisi

1958 'de De Stevens tarafından keşfedilen hidroklorotiazid, bir benzotiadiazin türevi olup, tiazid grubu

diüretikler sınıfına girmektedir.

Tiazidler, diüretik etkilerinin dışında antihipertansif etki de gösterdiklerinden, tiazid grubu diüretikler bugün klinikte geniş ölçüde kullanılmakta olup antihipertansif ilaç kombinasyonlarında en sık yer alan ilaçlardır.

Tiazidlerin çoğu, mide-bağırsak kanalından % 50-65 oranında absorbe edilirler. Hidroklorotiazid, aç karna alındığında ortalama % 65, yemek sırasında alındığında ise % 75 oranında ve oldukça çabuk bir şekilde absorbe edilir. Etkisi 8-12 saat kadar sürer. Alınan dozun tamamı değişmemiş halde idrar yoluyla vücuttan atılır. Günlük doz 50-100 mg dır. Hidroklorotiazid 'in plazmadaki eliminasyon yarılanma ömrü, yaklaşık 3-4 saat olarak belirtilmiştir (Kayaalp, O. 1990).

Tiazidler başlıca, yüksek tansiyon, kalp yetmezliğine bağlı ödem, karaciğer sirozuna bağlı asit ve ödem, nefrotik ödem, şeker hastalığı tedavilerinde kullanılmaktadır.

2.1.4.3. Tanınma Yöntemleri

Hidroklorotiazid 'in tanınması için bazı kimyasal testler tanımlanmış (Kertesz, P. 1964., Kala, H. 1965., Perez et al., 1967) ve De Zoeten, E. (1960), Groenewegen, H. (1960), Kala, H. (1960) ve Auerbach, L. (1978) tarafından mikro

kimyasal tanıma yöntemleri açıklanmıştır.

Hidroklorotiazid 'in tanınması için USP XXII de, KBr diski kullanılarak infrared spektrumunun veya metanol içindeki % 1 'lik çözeltisinin ultraviyole spektrumunun alınması önerilmiştir.

Literatür araştırmasında hidroklorotiazid 'in tanınmasında genellikle IR (Baltazar et al., 1965., Kala, H. 1961), UV (Siek et al., 1976) ve kütle spektrumlarının (Yoon et al., 1990., Ehrhardt, J.D. 1992) kullanıldığı görülmüştür.

Hidroklorotiazid 'in kromatografik olarak tanınmasına ilişkin birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda önceleri kağıt kromatografisinden (Pilsbury et al., 1966., Kala, H. 1961., Sheppard et al., 1960., Hentrich, K. 1963., Macek et al., 1965) yararlanılmıştır. Daha sonra bunun yerini ekseriyetle silikajel plaklar kullanılarak uygulanan ince tabaka kromatografisi (TLC) almıştır.

Biyolojik örnekler (Schaefer et al., 1977., Wallace et al., 1977., Osborne, B.G. 1972., Sohn et al., 1973) ve farmasötik ürünler (Steinbach et al., 1978., Macek et al., 1965., Smith et al., 1968) içinde bulunan hidroklorotiazid 'in silikajel plaklar kullanılarak çok sayıda kalitatif analizleri yapılmıştır. Bu çalışmalardan aktif maddenin saflık testleri veya yarı kantitatif stabilite testleri

amacıyla yararlanılmıştır.

Bir çalışmada sülfonamid yapısındaki S içeren ilaçların Ehrlich belirteci (pdab), $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6\text{NO}]$ ve $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ile farklılaştırılarak saptandığı belirtilmektedir (Frank et al., 1979).

Kan örneklerinde bulunan asidik ve nötral ilaçların analizinde alev iyonizasyon detektörünün yer aldığı gaz kromatografisi yöntemi kullanılmıştır (Sharp, M.E. 1987). Türevlendirme yapmadan kolon üzerinde metilasyon tekniğinden yararlanılmış olan bu çalışmada hidroklorotiazid de incelenmiştir.

Hidroklorotiazid 'in sıvı kromatografisi ile yapılan analizleri, önceleri düşük basınç şartlarında gerçekleştirilmiştir. Tablet bileşenleri içinde bulunan hidroklorotiazid 'in düşük basınç şartlarında ayrılma ve tanınmasında alkali celite kolonlar (Fazzari, F.R. 1970, 1972), çok bileşenli farmasötik ürünler içinde bulunan hidroklorotiazid 'in analizinde ise iyon değiştirici kolonlar kullanılmıştır (Urbanyi et al., 1972., Chu, R. 1971). Daha sonra düşük basınç yöntemlerinin yerini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi almıştır.

İdrar örneklerinde bulunan hidroklorotiazid ve diğer diüretikler, C_{18} kolon ve propilamin hidroklorür-fosfat

tamponu-asetonitril 'den oluşan gradient elüsyon şartlarında ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemi ile ayrıldıktan sonra diod array (foto diyot dizisi) detektör ile saptanmış ayrıca, gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi (GC-MS) ile de alternatif analiz yapılmıştır (Tsai et al., 1991).

Campins-Falco et al., (1994) ise hidroklorotiazid 'i diğer diüretikler ile birlikte idrarda, C₁₈ kolonda asetonitril-pH: 3.0 fosfat tamponuyla gerçekleştirilen gradient elüsyon sistemiyle kolon değiştirme (column switching) tekniğini kullanarak HPLC yöntemiyle saptamışlardır.

2.1.4.4. Miktar Tayini Yöntemleri

Hidroklorotiazid 'in titrimetrik tayini için kuvvetli bazlarla susuz ortamda yapılan titrasyonlar (Kala,H. 1965., Chiang, H.C. 1961., De Paulis et al., 1960., Weclawska et al., 1968., Stark et al., 1970., Wu et al., 1983., Schnekenburger et al., 1984) geniş ölçüde uygulanmıştır.

Hidroklorotiazid USP XIX da, n-bütilamin içinde sodyum metoksitle azo viyole indikatörlüğünde titre edilmiştir. İngiliz farmakopesinde (BP73) piridin içinde tetrabutylamon-yumhidroksit ile potansiyometrik bir titrasyon önerilmiştir.

Farmasötik preparatların ve ham madde örneklerinin

analizinde indirekt titrasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu titrasyonlarda titrant olarak 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoin, N-bromosüksinimid, N-klorosüksinimid gibi halojenli bileşikler kullanılmış, belirtecin aşırısı iyodometrik olarak geri titre edilmiştir (Amer et al., 1989., Belal et al., 1988., Shukla et al., 1983). Titrant olarak amonyum metavanadat 'ın kullanıldığı bir çalışmada belirtecin aşırısı, N-fenilantranilik asit indikatörlüğünde Fe (II) çözeltisi ile geri titre edilmiştir (Shukla, I.C. 1991).

Uygulanan diğer titrasyon yöntemleri ; Pb (II) (Przyborowski et al., 1976) veya Hg (II) (Teodorescu et al., 1967., Kolusheva et al., 1963) ile yapılan çöktürme işleminden sonra kompleksometrik, nitrit ile amperometrik (Madgearu et al., 1968), bromatometrik (Kertesz, P. 1963), sodyum hidroksit ile termometrik (Deleo et al., 1966), gümüş sülfür membran elektrodu kullanılarak potansiyometrik (Malecki et al., 1982) ve kondüktometrik (Walash et al., 1994) titrasyonlar olarak belirtilmiştir.

Hidroklorotiazid 'in ultraviyole spektrofotometrik analizinin, hidroliz ürünü olan 5-kloro-2,4-disülfamoil anilin 'in varlığında uygun olmadığına belirtilmesine (Rehm et al., 1960) rağmen bazı araştırmacılar, hidroklorotiazid tabletlerinin analizinde bu yöntemi kullanmışlardır (Steinbach et al., 1978., Ruiz Rodriguez et al., 1973). Fazzari, F.R. (1970) ise ölçümden önce kolonda ekstraksiyon ile ayırma

yapmıştır. Bir başka çalışmada ise tabletler içinde bulunan hidroklorotiazid, 0,1 N sodyum hidroksit içinde çözülerek 272 nm de ultraviyole absorpsiyonunun ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Xiao, C. 1986., Chen, X. 1990). Hidroklorotiazid, farmasötik preparatlar içinde ortogonal fonksiyon uygulamalı spektrofotometrik yöntemle, diğer bileşenlerin girişim etkisi ortadan kaldırılarak tayin edilmiştir (Xu et al., 1982).

Cok bileşenli farmasötik örnekler içinde bulunan hidroklorotiazid 'in spektrofotometrik tayinine ilişkin birçok çalışma yapılmıştır. Hidroklorotiazid, tabletler içinde spironolakton (Bulut et al., 1984., Nowakowska, Z. 1989), amilorid hidroklorür (Bulut et al., 1983., Nowakowska et al., 1993), alprenolol hidroklorür (Barary et al., 1984), sotalol hidroklorür (Erram et al., 1994), propranolol hidroklorür (Erram et al., 1994), pindolol (Erram et al., 1993), asebutolol hidroklorür (Erram et al., 1993), atenolol (Erram et al., 1993), timolol (Zhu, D. 1987) ve metoprolol tartarat (Nowakowska, Z. 1988) gibi ilaç maddeleri ile oluşturduğu ikili karışımlar içinde isobestik dalga boylarındaki UV absorpsiyonlarının ölçülmesi ile ön ayırma yapılmaksızın tayin edilmiştir.

Hidroklorotiazid 'in türev spektrofotometrisi yöntemi ile de tayinleri yapılmıştır. Tek bileşenli tabletler içinde bulunan hidroklorotiazid 1. türev spektrometrisi ile tayin

edilmiştir (Xu et al., 1982). Hidroklorotiazid, iki bileşenli farmasötik preparatlar içinde, enalapril maleat (Carlucci et al., 1993), hidralazin hidroklorür (Bedair et al., 1986), amilorid (Parissi-Poulou et al., 1989) ve spironolakton (Salem et al., 1991) gibi ilaç maddeleri ile karışım halinde 2. türev UV spektrofotometrisi yöntemi ile kaptopril ile oluşturduğu ikili karışımlarda ise 1. türev UV spektrofotometrisi yöntemi ile pik-sıfır (zero-crossing) tekniği kullanılarak tayin edilmiştir (Mahgoub et al., 1992., Panderi et al., 1992).

Hidroklorotiazid 'in miktar tayini için görünür bölgede spektrofotometrik ölçümler de yapılmıştır. Bu çalışmalar, uygun bir kimyasal reaksiyonla renkli bir türev oluşturulmasına dayanmaktadır.

Benzotiadiazin yapısındaki diüretikleri içeren tabletlerin analizleri için pH: 6,0 da fenotiazin ve N-bromosüksinimid ile (Youssef et al., 1992) veya sodyum asetatlı ortamda 7,7,8,8-tetrasiyanoekinodimetan ile (Mohamed, A.M.I. 1988) elde edilen renkli türevlerden yararlanılmıştır.

Sastry et al., (1989) tarafından ham madde ve preparat analizleri için yapılan bir çalışmada hidroklorotiazid, p-N,N-dimetilfenilendiamin dihidroklorür ve kloramin-T belirteçleri ile elde edilen renkli ürüne dayanılarak analiz edilmiştir.

Ham madde ve preparat analizlerinde hidroklorotiazid 'in susuz ortamda butilamin ve kobalt klorür ile (Moussa et al., 1985) veya derişik sülfirik asit varlığında farklı belirteçler ile (Perez et al., 1967., Sheppard et al., 1960., Vachek, J. 1961) direkt renk reaksiyonlarına dayanılarak kolorimetrik tayinleri yapılmıştır.

Tabletler içinde bulunan hidroklorotiazid, alkali ortamda tetraklorobenkinon ile yük transfer kompleksinin oluşması üzerinden tayin edilmiştir (Long et al., 1993).

Farmasötik preparatların analizinde hidroklorotiazid, asidik yada alkali çözeltiler içinde hidroliz edilerek, elde edilen hidroliz ürünü (5-kloro-2,4-disülfamoilanilin) diazolandırılmış ve takiben bir aromatik amin yada fenol ile kenetlenerek kararlı azo boyaları elde edilmiştir. Bu çalışmalarda N-(1-naftil)-etilendiamin (Sheppard et al., 1960., Suria, D. 1978., McLeod et al., 1970., Esteve-Romera et al., 1993), kromotropik asit (Rehm et al., 1960), guayakol sülfonik asit (Magalhaes et al., 1971), timol (Kala, H. 1965) ve etil asetoasetat (Belal et al., 1986) gibi kenetleme ajanları kullanılmıştır. Diğer yöntemler, hidroliz ürünlerinin kondensasyon reaksiyonları üzerine geliştirilmiştir (Mollica et al., 1971., Namigohar et al., 1977., Moussa et al., 1983).

Hidroklorotiazid içeren tabletlerin analizlerinde ametist viyole (Prasad et al., 1987) ve safranin (Elsayed et

al., 1979) bazık boyaları ile iyon çifti ekstraksiyonu yapılarak ekstraktif spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

Hidroklorotiazid, bir çalışmada tris(2,2'-bipiridin)-rutenyum(III) belirteci ile gerçekleştirilen kemilüminesans reaksiyonuna dayanılarak kantitatif olarak tayin edilmiştir (Holeman et al., 1993).

Hidroklorotiazid 'in, gerek çok bileşenli ilaç preparatları gerekse biyolojik sıvılardaki analizinde, ince tabaka kromatografisi ile ayırmadan sonra dansitometrik ölçümlerden de yararlanılmıştır. İlk olarak, Steinbach et al., (1978) tarafından 272 nm de dansitometrik ölçüm yapılmıştır.

Hidroklorotiazid, spironolakton ve kaptopril gibi ilaç maddeleri ile oluşturduğu iki bileşenli farmasötik preparatlar içinde (El-Sadek et al., 1993) ve idrar ekstrelerinde (Lu et al., 1983., Chen et al., 1983) de TLC-dansitometrik yöntemle analiz edilmiştir.

Hidroklorotiazid, propranolol hidroklorür ile oluşturduğu iki bileşenli tablet örneği içinde yüksek işlevli ince tabaka kromatografisinden (HPTLC) sonra 280 nm de dansitometrik olarak tayin edilmiştir (Shinde et al., 1994).

Hidroklorotiazid 'in ince tabaka kromatografisi ile analizinde, uygun bir çözücünün püskürtülmesinden sonra yapılan fluorodansitometrik ölçümlerden de yararlanılmıştır.



Bu yöntem ilk kez Schaefer et al., (1977) tarafından tanımlanmıştır.

Bir çalışmada, biyolojik örnekler içinde bulunan hidroklorotiazid etilasetatla ekstrakte edildikten sonra, TLC-fluorodansitometrik yöntemle tayin edilmiştir (Schaefer et al., 1980). Burada fluoresans indikatörü olarak trietanol amin kullanılmıştır.

Hidroklorotiazid 'in gaz kromatografisi ile tayinine yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Lindstroem et al., (1975) ve Fagerlund et al., (1979) tarafından plazma, idrar ve kan örnekleri içinde gaz kromatografik tayinleri tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda ekstraktif-alkilasyon işlemi kullanılarak, hidroklorotiazid metiliyodür ile türevlendirilmiştir. Bir çalışmada, türevlendirmeden sonra faz transfer reaktifinin organik fazdan birlikte ekstrakte edilmesini önlemek için makro ağ şeklinde akrilik kopolimer kullanılmıştır (Lisi et al., 1992). Bu çalışmalarda, elektron yakalama detektörü (ECD, 300 °C) veya alev iyonizasyon detektörü (FID, 270 °C) kullanılmıştır. Bu yöntem, Beermann et al., (1976, 1977, 1978, 1979) ve Backman et al., (1979) tarafından biyolojik ve kinetik çalışmalara uygulanmıştır.

Vandenheuvel et al., (1975) kan ve plazma analizleri için tetrametilamilinyum hidroksit ile kolonda metilasyon tekniğine dayalı bir yöntem geliştirmiştir.



Hidroklorotiazid, plazma içinde elektron yakalama detektörü (ECD) kullanılarak kapiler gaz kromatografisi yöntemiyle tayin edilmiştir (Lutz et al., 1985).

Hidroklorotiazid 'in sıvı kromatografisi yöntemiyle çok sayıda tayini yapılmıştır.

Hidroklorotiazid, kan, plazma ve serum içinde C_8 kolon ve UV detektör kullanılarak 272 nm de ters faz iyon çifti kromatografisi yöntemiyle tayin edilmiştir (Weinberger et al., 1983).

Biyolojik sıvılar içinde bulunan hidroklorotiazid, herhangi bir örnek hazırlama işlemi yapılmadan direkt enjeksiyonla, ters faz kolonda miselli elektrokinetik kapiler kromatografi tekniği ile analiz edilmiştir (Fett et al., 1991).

İdrar içindeki doping ajanlarının analizi amacıyla yapılan bir çalışmada diüretikler, ters faz sıvı kromatografisi sistemiyle diod array (foto diyot dizisi) detektör kullanılarak tayin edilmiştir (Park et al., 1990). Bu çalışmaya alternatif olarak GC-MS yöntemi önerilmiştir. İdrar içindeki diüretiklerin tayininde aynı koşullarla yapılan başka bir çalışmada ise kolon değiştirme (column switching) tekniği kullanılmıştır (Saarinen et al., 1993).

McKinley, W.A. (1981), biyolojik sıvılar içindeki

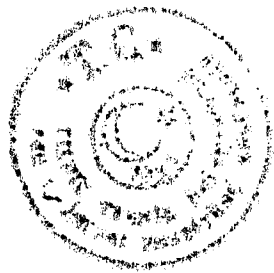


maddelerinin analizinde hidroklorotiazid ve diğer bazı sülfonamidlerin tayinini fotoiletkenlik detektörü kullanarak gerçekleştirmiştir.

Hidroklorotiazid, insan plazması ve idrar örnekleri içinde amilorid (Van der Meer et al., 1987) ve klorotiazid (Barbhaiya et al., 1981) ile birlikte ikili karışımlar şeklinde birarada tayin edilmiştir. Bu çalışmalarda C₁₈ kolon ile ters faz sıvı kromatografisi sistemi kullanılmıştır. Amilorid-hidroklorotiazid karışımının analizinde iki farklı detektör kullanılmıştır. Amilorid 'in tayini 368/415 nm de floresans detektör ile, hidroklorotiazid 'in tayini ise 271 nm de UV detektör ile gerçekleştirilmiştir.

Ham madde ve tablet formülasyonları içinde bulunan hidroklorotiazid, metanol ile ekstre edildikten sonra C₁₈ kolonda pH 'ı 4.5 a ayarlanan metanol-su (5:95) mobil fazı ile ters faz sıvı kromatografisi sisteminde analiz edilmiştir (Daniels et al., 1981). Bu çalışmada iç standart madde olarak sülfadiazin kullanılmıştır.

Hidroklorotiazid, USP XXII de metildopa, metoprolol tartarat, amilorid hidroklorür, propranolol hidroklorür ve timolol maleat ile oluşturduğu ikili tablet kombinasyonları içinde, UV detektör ile 254-295 nm arasındaki dalga boylarında saptanarak ters faz sıvı kromatografisi sistemiyle simultane olarak tayin edilmiştir.



Hidroklorotiazid, farmasötik tablet formülasyonları içinde metoprolol tartarat (Ficarra et al., 1986., Ramana Rao et al., 1985), enalapril maleat (Jain et al., 1992), spironolakton (La Rotonda et al., 1980), metildopa (Rao et al., 1982., Ting, S. 1983., Ting, S. 1984), propranolol hidroklorür (Hitscherich et al., 1987), asebutolol hidroklorür (Erram et al., 1992., Sane et al., 1993), triamteren (Korany et al., 1983), kaptopril (Jain et al., 1991., Kirschbaum et al., 1984), amilorid hidroklorür (De Croo et al., 1985), hidralazin hidroklorür (Fatmi et al., 1990), lisinopril (Sane et al., 1992), betaksolol hidroklorür (Erram et al., 1992), nadolol (Erram et al., 1992), penbutolol sülfat (Erram et al., 1992) ve pindolol (Erram et al., 1992) ile oluşturduğu ikili kombinasyonlarda UV detektör kullanılarak 210-290 nm arasında ters faz sıvı kromatografisi sistemiyle simultane olarak tayin edilmiştir. Bu çalışmalarda genellikle okta-desil, oktil, siyanopropil, amino, fenil tiplerinde ters faz kolonlar kullanılmıştır.

Hidroklorotiazid, bazı tablet formülasyonları içinde elektrokimyasal detektör kullanılarak tayin edilmiştir. Bu şekilde guanetidin sülfat (Stewart et al., 1986) ve spironolakton (Bachman et al., 1990) ile oluşturduğu ikili karışımlar içinde ters faz sıvı kromatografisi sistemiyle simultane olarak tayin edilmiştir.

Hidroklorotiazid yine ters faz sıvı kromatografisi



sistemiyle, atenolol-klortalidon (Sa'sa et al., 1988) ve atenolol-amilorid hidroklorür (Sane et al., 1991) ile oluşturduğu üç bileşenli tablet kombinasyonları içinde simultane olarak tayin edilmiştir.

Hidroklorotiazid, normal faz sıvı kromatografisi sistemiyle UV detektör kullanılarak, plazma, idrar, kan ve safra içinde (Yamazaki et al., 1984), reserpin ile birlikte iki bileşenli tablet karışımı içinde (Cieri, U.R. 1988) ve reserpin-hidralazin hidroklorür ile birlikte üç bileşenli tablet karışımı içinde (Cieri, U.R. 1994) tayin edilmiştir.

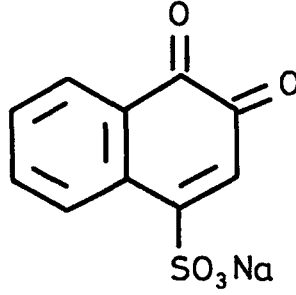
Ruggieri, R. (1960) tarafından hidroklorotiazid 'in kantitatif analizi için elektroforez yöntemi uygulanmıştır.

Hidroklorotiazid, dihidralazin sülfat ile oluşturduğu iki bileşenli tablet karışımı içinde klasik (DC) ve diferensiyal puls polarografi (DPP) yöntemleri ile simultane olarak tayin edilmiştir (Van Kerchove et al., 1982).

Hidroklorotiazid, ham madde ve örnek analizlerinde 1. türev diferensiyal puls polarografi yöntemiyle kantitatif olarak tayin edilmiştir (Liang et al., 1994).



2.2. 1,2-Naftokinon-4-Sülfonik Asit Sodyum Tuzu (NQS)



Sodyum -naftokinon-4-sülfonat olarak da isimlendirilen bu belirteç, ilk kez 1922 yılında Folin tarafından sentez edilmiştir.

NQS, alifatik veya aromatik yapıdaki primer ve sekonder aminlerle, aminin cinsine bağlı olarak değişen renklerde türevler oluşturmaktadır. NQS 'in primer ve sekonder aminler için duyarlı bir renk belirteci olmasına dayanılarak, çeşitli kalitatif ve kantitatif analiz yöntemleri geliştirilmiştir.

NQS, aminoasitlerin tayininde kullanılmıştır (Furman et al., 1950., Evans et al., 1993). Prokain ve tetrakain 'in tayininde, belirteç fazlasının sodyum tiyosülfatla giderilmesi gerektiği belirtilmiştir (Feldmann et al., 1959). Asebutolol 'un asidik hidrolizi ile elde edilen bozunma ürününün tayininde NQS belirteci kullanılarak, ilaç maddesinin



stabilitesi incelenmiştir (Hakyemez, G. 1988).

Farmasötik preparatlar içinde bulunan alifatik veya aromatik amin yapısındaki çeşitli ilaç maddelerinin tayininde NQS belirteci ile renkli kondensasyon ürünlerinin oluşmasına dayanılarak, spektrofotometrik çalışmalar yapılmıştır. Bu şekilde, prokain (Salama et al., 1980., Gutierrez et al., 1989), klorpromazin, prometazin ve promazinin hidroklorür tuzları (Hussein et al., 1973), bendrofluazid (Salama et al., 1983), siprofloksasin hidroklorür (Shanbhag et al., 1991), pindolol (Sastri et al., 1992), baklofen (Bilgiç et al., 1991), isoniazid, saluzid gibi isonikotinik asit türevleri (Filipeva et al., 1989), aminoglutetimid (Özkırımlı et al., 1989), analjin (Filipeva et al., 1989), fluoren (Tachibana et al., 1990), dihidralazin sülfat (Salman, A. 1987), dapson (İskender et al., 1986), prokainamid hidroklorür (Gürkan, T. 1982) ve efedrin (Campins Falco et al., 1994) gibi ilaç maddeleri NQS belirteci kullanılarak tayin edilmiştir.

İdrar içinde bulunan amfetamin ve metamfetamin 'in ekstraktif-spektrofotometrik tayininde de NQS belirteci kullanılmıştır (Campins Falco et al., 1994).

Amin grubu içeren maddelerin, NQS belirteci ile kondensasyonunu takiben sodyum ve potasyum boro hidrür ile indirgenerek fluoresans özellik gösteren ürünlere dönüştürülmesi ile fluorometrik tayinleri yapılmıştır. Primer ve sekonder



alifatik aminler (Pesez et al., 1969) ile farmasötik preparatlarda bulunan amfetamin (Gürkan, T. 1980) ve hidralazin (Danielson et al., 1983) NQS belirteci ile türevlendirilerek fluorometrik olarak analiz edilmiştir.

Feniletilamin türevlerini (Hashimoto et al., 1979) ve primer aromatik amino gruplarını (Vasyuk et al., 1989) içeren ilaçlar, NQS ile türevlendirilerek TLC-dansitometrik olarak tayin edilmiştir.

Biyolojik sıvılar içinde bulunan feniletilamin türevi bileşikler (Nakahara et al., 1989), primer ve sekonder aminler ile amfetamin ve benzeri bileşikler (Nakahara et al., 1988), guanidin bileşikler (Kobayashi et al., 1987) ve met-amfetamin ile metabolitinin (Sekine et al., 1991) tayininde NQS belirteci ile türevlendirme işleminden sonra ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmalarda genel olarak elektrokimyasal detektör kullanılmıştır.

NQS belirteci ile polarografik yöntemle yapılan çalışmalara da rastlanmıştır (Vire et al., 1979).

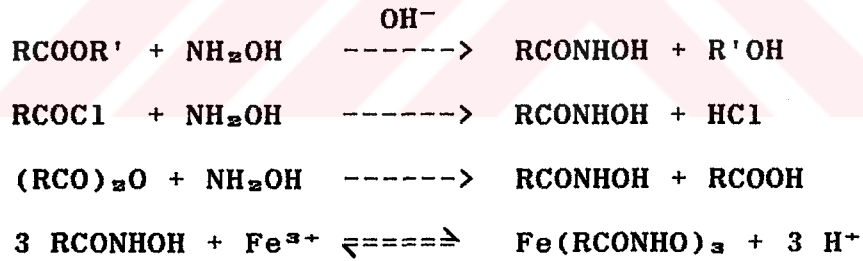
2.3. Demir Hidroksamat Reaksiyonu

Karboksilli asitler, asit anhidritler, esterler, nitriller ve amidlerin hidroksilamin ile hidroksamik asitleri



oluşturması, bu maddelerin tanınmasına olanak sağlar. Hidroksamik asitlerin oluşması için, asit anhidritler, esterler, nitriller ve amidler hidroksilamin ile direkt olarak reaksiyon verirken, karboksilli asitlerin daha önceden ester yada klorürlerine dönüştürülmesi gerekir. Oluşan hidroksamik asitlerin Fe (III) iyonu ile reaksiyonu sonunda, kırmızı-mor renkli demir hidroksamat kompleksleri meydana gelir. Bu bileşiklerin demir hidroksamat komplekslerinin oluşmasına dayanılarak yapılan tanınma reaksiyonlarına ilaveten, kantitatif analiz yöntemleri de geliştirilmiştir.

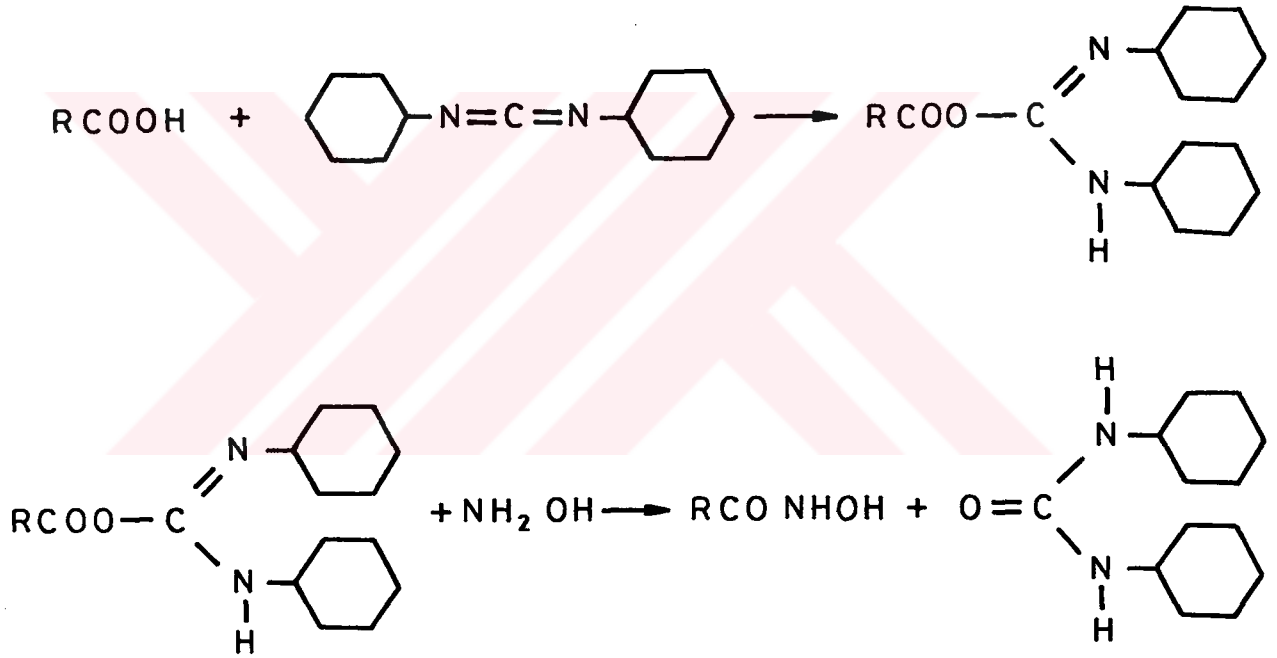
Demir hidroksamat reaksiyonu, esterler, asit klorürler ve asit anhidritler için aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir:



Hidroksamik asit oluşumu için karboksilli asitlerin, aktif açıl grubu oluşturulmak üzere esterlerine yada klorürlerine dönüştürülmesi gereklidir. Bu dönüştürme reaksiyonları, susuz ortamda gerçekleşmektedir. Bu yüzden, sulu örneklerle uygulanması zordur. İlk kez Sheehan ve Hess (1955) tarafından, peptid bağı oluşturmak amacıyla kullanılmış olan disikloheksilkarbodiimid (DCC) 'in, daha sonra (Franzblau et al., 1963) serbest karboksilli asitlerin hidroksilamin hidro-



klorür ile hidroksamik aside dönüştürülmesinde kullanılabileceği ortaya konmuştur. Tanimura et al., (1972) bu reaksiyondan bazı karboksilli asitlerin tanınmasında yararlanmışlar, daha sonra (Kasai et al., 1975) benzoik, kaprilik, laktik ve p-nitrofenil asetik asitlerin bu reaksiyona dayanan spektrofotometrik tayini için optimum koşulları incelemişlerdir. Bu araştırmacılar reaksiyonun, aşağıdaki şekilde gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir.

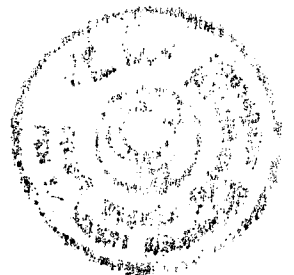


Bartos et al., (1974) da, bazı karboksilli asitlerin analizinde, bu yöntemi kullanmışlardır.

İngiliz farmakopesinde (1993) indometazin ve klofibrat adlı ilaç maddelerinin tanınmasında, demir hidroksamat reaksiyonu önerilmektedir.



Rieko et al., (1986) ise ibuprofen, mefenamik asit, kaptopril ve sodyum valproat gibi karboksil grubu içeren bazı ilaç maddelerinin spektrofotometrik tayininde bu yöntemi kullanmışlardır.



3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Maddeler, Çözücüler, Çözeltiler

3.1.1. İlaç Maddeleri

Farmasötik saflıkta amlodipin besilat, silazapril (% 99,5), benazepril hidroklorür, hidroklorotiazid ve fenobarbital kullanıldı. Amlodipin besilat, Pfizer A.Ş.; silazapril ve hidroklorotiazid, Roche A.Ş.; benazepril hidroklorür, Ciba A.Ş.; fenobarbital, Fako A.Ş. ilaç Fabrikalarından temin edildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

1,2-Naftokinon-4-sülfonik asit sodyum tuzu (NQS) (Fluka), oniki mol sulu disodyum hidrojen fosfat (Merck), oniki mol sulu trisodyum fosfat (Merck), sodyum dihidrojen fosfat mono hidrat (J.T.Baker), borik asit (Merck), potasyum klorür (Merck), sodyum hidroksit (Merck), sodyum karbonat (Merck),



hidroksilamin hidroklorür (Merck), disikloheksilkarbodiimid (Merck), dokuz mol sulu Fe (III) perklorat (Fluka), % 37 'lik hidroklorik asit (Merck), % 85 'lik fosforik asit (Merck), % 20 'lik perklorik asit (Panreac), metanol (Merck), kloroform (Merck), n-bütanol (Merck), metilizobutilketon (Merck), benzen (Merck), etilasetat (Merck), 1,2-dikloroetan (Merck).

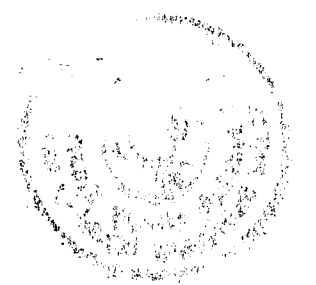
Etanol (Tekel), distillendikten sonra kullanıldı. Sulu çözeltilerin hazırlanmasında potasyum permanganat üzerinden distillenmiş bidistile su kullanıldı.

HPLC ile ilgili olan çalışmalarda HPLC grade saflıkta metanol ve asetonitril (J.T.Baker ve Merck) kullanıldı.

3.1.3. Çözeltiler

a) Amlodipin Besilat 'ın Spektrofotometrik Analizinde Kullanılanlar

Amlodipin besilat ile yapılan spektrofotometrik çalışmada deney koşullarının saptanması ve ölçü eğrisinin çizilmesi için, amlodipin besilat 'ın su-etanol (97:3) içinde $3,00 \text{ mg.ml}^{-1}$ konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin aynı çözücü ile seyreltilmesiyle elde edilen $100-600 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyonlarında amlodipin besilat çözeltileri kullanıldı.



Reaksiyon ürününün, organik faza ekstraksiyonunda kullanılmak üzere 0,1 M HCl çözeltisi hazırlandı.

Amlodipin besilat 'ın etanol içinde $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin etanol ile seyreltilmesiyle elde edilen $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik çözelti, UV spektrofotometrik yöntem ile yapılan çalışmada kullanıldı.

Belirteç Çözeltisi : NQS 'ın sudaki % 1,0 'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti, hergün taze olarak hazırlandı ve karanlıkta saklandı.

Tampon Çözeltiler :

0,1 M pH:4,0 Fosfat tamponu : 0,1 M KH_2PO_4 ve 0,1 M HCl çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

0,2 M pH:6,0 ve pH:8,0 Fosfat tamponları : 0,2 M KH_2PO_4 ve 0,2 M NaOH çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

0,1 M pH:9,0, pH:9,5, pH:10,0 ve pH:10,5 Fosfat tamponları : 0,1 M Na_2HPO_4 ve 0,125 M Na_3PO_4 çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

0,05 M pH:9,0 ve pH:10,0 Borat tamponları : 0,05 M H_3BO_3 , 0,05 M KCl ve 0,2 M NaOH çözeltileri kullanılarak hazırlandı.



0,05 M pH:10,0 Karbonat tamponu : 0,05 M Na_2CO_3 ve 0,05 M NaHCO_3 çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

**b) Silazapril 'in Spektrofotometrik Analizinde
Kullanılanlar**

Silazapril ile yapılan spektrofotometrik çalışmada deney koşullarının saptanması için, silazapril 'in etanol içindeki 5 mM çözeltisi, 0,3 M etanolik hidroksilamin hidroklorür ve 0,3 M etanolik disikloheksilkarbodiimid çözeltileri hazırlandı. 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi, Fe (III) perklorat 'ın 0,2 M etanolik perklorik asit içinde çözülmesiyle hazırlandı.

Perklorik asit konsantrasyonunun saptanması için, 0,10 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 ve 0,30 M etanolik perklorik asit çözeltileri hazırlandı.

Ölçü eğrisinin çizilmesinde, silazapril 'in metanol içindeki $3,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ 'lik stok çözeltisi hazırlandı.

Silazapril 'in UV spektrofotometrik yöntemle tayininde, metanol içinde $500 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyonunda stok çözeltisi ve bu çözeltinin metanol ile seyreltilmesiyle elde edilen $10 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik çözeltisi kullanıldı.



c) Karışımların HPLC ile Analizinde Kullanılanlar

HPLC yöntemi ile yapılan çalışmada, silazapril, benazepril hidroklorür, hidroklorotiazid ve fenobarbital 'in mobil faz içinde, $1000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ 'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin mobil fazla seyreltilmesiyle elde edilen $25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ 'lik çözeltiler, çalışma koşullarının saptanmasında kullanıldı.

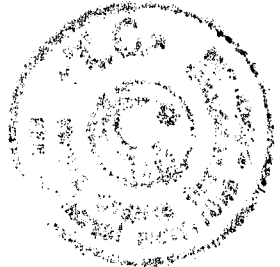
Detektör dalga boyunun saptanması için, hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril 'in asetonytril ve metanol içinde hazırlanan $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ 'lik çözeltileri kullanıldı.

Silazapril ve benazepril hidroklorür 'ün ölçü eğrilerinin çizilmesinde, herbirinin içinde $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ fenobarbital bulunan $5-15 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlandı.

Hidroklorotiazid 'in ölçü eğrisinin çizilmesinde, herbirinin içinde $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ fenobarbital bulunan $10-30 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlandı.

Tampon Çözeltiler :

$0,02 \text{ M}$ pH:3,0 ve pH:4,0 Fosfat tamponları : $0,02 \text{ M}$ NaH_2PO_4 ve $0,02 \text{ M}$ H_3PO_4 çözeltileri kullanılarak hazırlandı.



0,02 M pH:5,0 ve pH:6,0 Fosfat tamponları : 0,02 M NaH_2PO_4 ve 0,02 M Na_2HPO_4 çözeltileri kullanılarak hazırlandı.

Mobil Faz : Mobil faz olarak, metanol-pH:4,0 fosfat tamponu (70:30) karışımı kullanıldı.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

- 1- Spektrofotometre (Philips PU 8700 UV-Visible)
- 2- Spektrofotometre (Unicam UV2-100 UV-Visible)
- 3- Spektrofotometre için 1 cm 'lik cam ve kuvars küvetler (Hellma, 10x10x45 mm)
- 4- Analitik terazi (Sartorius analytic A 200B, 0,1 mg 'a kadar duyarlı)
- 5- FTIR Spektrometre (Mattson 1000)
- 6- Girdap Karıştırıcı (Nüve)
- 7- Çalkalayıcı (Nüve SL50)
- 8- Santrifüj (Janetzki T 30)
- 9- pH metre (Metrohm E-510 Herisau) ve pH elektrodu (Metrohm AG CH-9101 Herisau)
- 10- Vakum pompası (Edwards High vacuum pump E2M5)
- 11- Ultrasonik banyo (Azaklı)
- 12- 3,9 μm çapında 30 cm boyunda, 10 μm Bondapak C_{18} ters faz kolon, 510 model yüksek basınç pompası, 481 model değişken dalga boylu spektrofotometre, U6K universal enjektör, bilgisayar ve yazıcıdan



oluşan sıvı kromatografi cihazı (Waters)

13- Hamilton enjektör (25 µl 'lık)

14- Mobil faz ve örnek çözeltilerinin süzülmesi için, HA (0,45 µm), HV (0,45 µm), FH (0,5 µm) tiplerinde milipor filtreler

15- Plastik kapaklı ve şilifli 15 ml 'lik cam santrifüj tüpleri (spektrofotometrik çalışmalarda kullanıldı)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Amlodipin Besilat 'ın Spektrofotometrik Analizi

3.3.1.1. Deney Koşullarının Saptanması

Amlodipin ile NQS belirteci arasındaki reaksiyonun sonunda meydana gelen kırmızı renkli kromoforun oluşmasında, uygun pH ve tampon çözeltinin cinsi, ekstraksiyonda kullanılan çözücünün cinsi, sıcaklık, reaksiyon süresi ve belirteç miktarı gibi parametrelerden herbirinin etkisi aşağıdaki gibi incelendi.

3.3.1.1.a. Uygun pH ve Tampon Çözelti

Kapaklı ve şilifli tüpler içine, $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ amlodipin besilat içeren çözeltiden 0,5 'er ml alındı. 1,0 ml tampon çözelti ve 0,5 ml % 1,0 'lık NQS çözeltisi ilave edilerek 70 °C de 20 dakika ısıtıldı. Daha sonra soğutulan çözeltilere 2,0 ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 2,0 ml su ilave edilerek toplam hacim 6,0 ml 'ye tamamlandı. Farklı pH ve tampon çözeltiler,



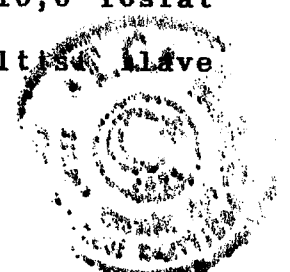
kullanılarak elde edilen çözeltilerin, boş deneme çözeltilerine karşı spektrumları alındı ve bu spektrumlara dayanılarak reaksiyonun gerçekleşmesi için uygun pH ve tampon çözelti saptandı. Elde edilen sonuçlar, bölüm 4.1.1.a. 'da verilmiştir.

3.3.1.1.b. Uygun Ekstraksiyon Çözücüsü

Kapaklı ve silifli tüpler içine, $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ amlodipin besilat içeren çözeltiden 1,0 'er ml alındı. 0,5 ml pH 10,0 fosfat tamponu çözeltisi ve 0,5 ml % 1,0 'lik NQS çözeltisi ilave edilerek 70°C de 20 dakika ısıtıldı. Daha sonra soğutulan çözeltilere 1,0 ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 4,0 ml organik çözücü ilave edilerek, girdap karıştırıcısında 1,5 dakika karıştırıldı ve 5 dakika santrifüj yapıldı. Organik fazlar, bir pastör pipet yardımıyla sulu fazdan ayrıldı. Farklı organik çözücüler kullanılarak ekstre edilen renkli türevlerin, boş deneme çözeltilerine karşı spektrumları alındı. λ_{max} 'lar ve bu dalga boyundaki absorpsiyonlar saptandı. Uygun çözücü saptandıktan sonra, elde edilen türevin bu çözücü içindeki dayanıklılığı incelendi. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.1.1.b. 'de gösterilmiştir.

3.3.1.1.c. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

Santrifüj tüpleri içine, $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ amlodipin besilat içeren çözeltiden 1,0 'er ml alındı. 0,5 ml pH 10,0 fosfat tamponu çözeltisi ve 0,5 ml % 1,0 'lik NQS çözeltisi ilave



edildi. Bir de boş deneme çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan örnek ve boş deneme çözeltileri, belirli sıcaklıklarda 10, 20, 30 ve 40 'ar dakika bekletildi. Çözeltilerin oda sıcaklığına soğutulmasının ardından tüm örnek ve boş deneme çözeltilerine, 1,0 ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 4,0 ml n-bütanol ilave edilerek girdap karıştırıcısında 1,5 dakika karıştırıldı. 5 dakika santrifüj yapıldı. Tüm çözeltilerde organik fazlar, bir pastör pipet yardımıyla sulu fazdan ayrılarak, herbir sıcaklık ve zaman periyodunda elde edilen türevin 494 nm de boş deneme çözeltisine karşı absorbanı ölçüldü. Elde edilen veriler ve bunlara dayanılarak varılan sonuçlar, 4.1.1.d. bölümünde yer almaktadır.

3.3.1.1.d. Belirteç Miktarı

Santrifüj tüpleri içine, $600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ amlodipin besilat içeren çözeltiden 0,5 'er ml alındı. 0,5 ml pH 10 fosfat tamponu çözeltisi ve sırasıyla 0,15 ; 0,25 ; 0,35 ; 0,40 ; 0,50 ; 0,60 ve 1,0 ml % 1,0 'lık NQS çözeltileri ilave edildi. Hazırlanan çözeltilere, herbirinde toplam hacim 2,0 ml olacak şekilde su ilave edildi. Boş deneme çözeltileri de hazırlanarak, örnek çözeltileri ile birlikte 70 °C de 20 dakika ısıtıldı. Çözeltilerin soğutulmasının ardından herbirine, 1,0 ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 4,0 ml n-bütanol ilave edilerek girdap karıştırıcısında 1,5 dakika karıştırıldı. 5 dakika santrifüj yapıldı. Hazırlanan örnek ve boş deneme çözeltilerindeki organik fazlar, bir pastör pipet yardımıyla sulu fazdan ayrıldı. Farklı belirteç miktarları kullanılarak



elde edilen türevlerin 494 nm de boş deneme çözeltilerine karşı absorbanları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, bölüm 4.1.1.e. de yer almaktadır.

3.3.1.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Santrifüj tüpleri içine, $300 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ amlodipin besilat içeren çözeltilerden, sırasıyla 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ve 1,0 ml alındı. Üzerlerine, toplam hacim 1,0 ml olacak şekilde su-etanol (97:3) çözeltisi, 0,5 ml pH 10,0 fosfat tamponu çözeltisi ve 0,5 ml % 1,0 'lik NQS çözeltisi ilave edildi. Bir de boş deneme çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 70°C de 20 dakika ısıtıldı. Çözeltilerin oda sıcaklığına soğutulmasının ardından, 1,0 ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 4,0 ml n-bütanol ilave edilerek, girdap karıştırıcısında 1,5 dakika karıştırıldı. 5 dakika santrifüj yapıldı. Organik fazlar, bir pastör pipet yardımıyla sulu fazdan ayrıldı. Hazırlanan standart çözeltilerin, 494 nm de boş deneme çözeltisine karşı absorbanları ölçüldü. Bu işlem, herbir standart çözelti için 5 kez tekrarlanarak standart sapmalar hesaplandı. Bu değerler ile konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek, amlodipin besilat 'ın ölçü eğrisi oluşturuldu. Ölçü eğrisine ait doğru denklemi en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

3.3.1.3. Farmasötik Preparata Uygulanması

20 adet tablet tek tek tartıldı. Ortalama tablet ağırlığı saptandı. Tabletler cam havanda ezilerek toz haline



getirildi. Bu toz karışımdan, 10 mg civarında amlodipin besilat 'a eşdeğer miktarda bir porsiyon hassas olarak tartılarak, 50 ml 'lik balonjojeye konuldu. 30-40 ml su-etanol (97:3) çözeltisi ilave edilerek çalkalayıcıda yarım saat karıştırıldıktan sonra aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 10 ml 'si atıldı. Kuru ve temiz bir balonjojede toplanan kalan kısımdan 1,0 ml alınarak, santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine, 0,5 ml pH 10,0 fosfat tamponu çözeltisi ve 0,5 ml % 1,0 'lik NQS çözeltisi ilave edildi. Bir de boş deneme çözeltisi hazırlanarak, çözeltiler 70 °C de 20 dakika ısıtıldı. Çözeltilerin oda sıcaklığına soğutulmasının ardından, 1,0 ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 4,0 ml n-bütanol ilave edilerek, girdap karıştırıcısında 1,5 dakika karıştırıldı. 5 dakika santrifüj yapıldı. Organik fazların bir pastör pipet yardımıyla sulu fazdan ayrılmasını takiben, örnek çözeltisinin 494 nm de boş deneme çözeltisine karşı absorbanı ölçüldü. Bu absorbanı değerinin ölçü eğrisindeki karşılığı bulunarak, tabletteki madde miktarı tayin edildi. İşlem farklı tartımlar alınarak 5 kez tekrarlandı.

3.3.2. Kıyas Yöntemi

Kıyas yöntemi olarak, ultraviyole spektrofotometrik yöntemden yararlanıldı. Amlodipin besilat 'ın etanol içinde 10 µg.ml⁻¹ konsantrasyonunda standart çözeltisi hazırlanarak,



ultraviyole bölgede spektrumu alındı ve λ_{max} (238 nm) ile absorbands değeri kaydedildi. Daha önce toz haline getirilen tablet örneğinden 2,3-2,5 mg amlodipin 'e eşdeğer miktarda tartım alınarak, 25 ml 'lik balonjoje içine aktarıldı. 20 ml kadar etanol ilave edilerek çalkalayıcıda yarım saat karıştırıldı. Etanol ile hacmine tamamlandıktan sonra iyice karıştırılan çözelti, mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 5-10 ml 'si atıldı. Kuru ve temiz bir balonjojede toplanan kalan kısımdan 1,0 ml alınarak, 10 ml 'lik balonjojeye aktarıldı. Etanol ile hacmine tamamlandıktan sonra karıştırılan çözeltinin 238 nm de etanole karşı absorbandsı ölçüldü. Bu işlem, farklı tartımlar alınarak 5 kez tekrarlandı. Tabletdeki madde miktarı, elde edilen absorbands değerlerinden yararlanılarak tek standart yöntemi ile tayin edildi.



3.3.3. Silazapril 'in Spektrofotometrik Analizi

Silazapril, yapısında karboksil grubu bulunan bir ilaç maddesidir. Bu karboksil grubu üzerinden, renkli demir hidroksamat türevi haline dönüştürülerek, spektrofotometrik tayini için optimum koşullar incelendi. Demir hidroksamat oluşumu, iki kademede tamamlanmaktadır. Birinci kademe, silazapril 'in karboksil grubu üzerinden, disikloheksilkarbodiimid ve hidroksilamin hidroklorür ile alkollü ortamda hidroksamik asite dönüşmesi, ikinci kademe ise perklorik asitli ortamda Fe (III) iyonu ile kıvı-kahverenkli demir hidroksamat oluşmasıdır. Bu reaksiyonlarla ilgili reaksiyon denklemleri, genel bölümde verilmiştir (Bölüm 2.3.).

Sekil 4.5. de , bu türevin UV-görünür bölge spektrumu, boş deneme çözeltisinininki ile birlikte görülmektedir. Görüldüğü gibi absorpsiyon maksimumu, 517 nm dedir. Her iki kademeye ait optimum koşulların belirlenmesi için, disikloheksilkarbodiimid, hidroksilamin hidroklorür, demir (III) perklorat miktarları ve perklorik asit çözeltisinin konsantrasyonu, birinci kademe için sıcaklık ve reaksiyon süresi incelendi.

3.3.3.1. Deney Koşullarının Saptanması

3.3.3.1.a. Disikloheksilkarbodiimid (DCC) Miktarı

Diğer belirteçlerin miktarları sabit tutularak, değişen DCC miktarları ile birlikte, silazapril 'in demir hidroksamat



türevleri oluşturuldu. Bu amaçla, şilifli tüpler içine, 5mM silazapril içeren etanolik çözeltiden 1,0 ml alındı. Üzerlerine, 1,0 ml 0,3 M hidroksilamin hidroklorür çözeltisi ve sırasıyla 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 1,0 ve 1,5 ml 0,3 M DCC çözeltileri ilave edildi. Aynı şekilde boş deneme çözeltileri de hazırlanarak, tüm çözeltiler 30 °C de 20 dakika ısıtıldı. Çözeltilerin oda sıcaklığına soğumasının ardından herbirine 1,0 ml 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 10 ml 'lik balonjojelere transfer edilen çözeltiler, etanol ile hacmine tamamlandı ve karıştırıldı. Değişen DCC miktarları ile elde edilen çözeltilerin λ_{max} 'unun saptanmasından sonra, bu dalga boyundaki (517 nm) absorbansları boş deneme çözeltisine karşı ölçüldü. Bulunan değerler, 4.2.1.2.a. bölümündedir.

3.3.3.1.b. Hidroksilamin Hidroklorür (HAHC) Miktarı

DCC miktarı ile Fe (III) perklorat 'ın miktarı sabit tutularak, hidroksilamin hidroklorür miktarlarının absorbansa etkisini incelemek amacıyla, şilifli tüpler içine 5mM silazapril içeren etanolik çözeltiden 1,0 ml alındı. Üzerlerine 0,4 ml 0,3 M DCC çözeltisi ve sırasıyla 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 1,0 ve 1,5 ml 0,3 M HAHC çözeltisi ilave edildi. Aynı şekilde boş deneme çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 30 °C de 20 dakika ısıtıldı. Oda sıcaklığına soğumalarının ardından herbirine 1,0 ml 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi ilave edildi. Örnek ve boş deneme çözeltileri 10 ml 'lik balon-



Jojelere transfer edilerek etanol ile hacmine tamamlandı ve karıştırıldı. Değişen HAHC miktarları ile elde edilen çözeltilerin, 517 nm de boş deneme çözeltilerine karşı absorbanları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, bölüm 4.2.1.2.b. de yer almaktadır.

3.3.3.1.c. Fe (III) Perklorat Miktarı

Belirlenen DCC ve HAHC miktarları kullanılarak, Fe (III) perklorat miktarları değiştirildi. Bu amaçla şilifli tüpler içine, 5 mM etanolik silazapril çözeltisinden 1,0 ml alındı. Üzerlerine 0,4 ml 0,3 M DCC ve 0,5 ml 0,3 M HAHC çözeltileri ilave edildi. Aynı şekilde boş deneme çözeltileri de hazırlanarak tüm çözeltiler, 30 °C de 20 dakika ısıtıldı. Çözeltilerin oda sıcaklığına soğumalarını takiben örnek ve boş deneme çözeltilerine sırasıyla 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 1,0 ve 1,5 ml 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 10 ml 'lık balonjojelere transfer edilen çözeltiler etanol ile hacmine tamamlandı ve karıştırıldı. Değişen Fe (III) perklorat miktarları ile elde edilen çözeltilerin boş deneme çözeltilerine karşı absorbanları, 517 nm de ölçüldü. Sonuçlar, bölüm 4.2.1.2.c. 'de verilmiştir.

3.3.3.1.d. Perklorik Asit Çözeltisinin Konsantrasyonu

Ortamda bulunan perklorik asit konsantrasyonunun, silazapril 'in demir hidroksamat kompleksinin oluşması üzerine



olan etkisi incelendi. Bu amaçla, şilifli tüpler içine 1,0 ml 5 mM etanolik silazapril çözeltisi, 0,4 ml 0,3 M DCC çözeltisi ve 0,5 ml 0,3 M HAHC çözeltisi konuldu. Aynı şekilde bir seri boş deneme çözeltisi hazırlandı. Çözeltiler 30 °C de 20 dakika ısıtıldı. Oda sıcaklığına soğumalarını takiben örnek ve boş deneme çözeltilerine sırasıyla 0,10 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 ve 0,30 M etanolik perklorik asit içinde çözülerek hazırlanmış 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltilerinden 1,0 'er ml ilave edildi. Daha sonra 10 ml 'lik balonjojelere transfer edilen çözeltiler, etanol ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı. Bu şekilde farklı konsantrasyonlarda perklorik asit çözeltileri içinde oluşturulan demir hidroksamat türevlerinin, boş deneme çözeltilerine karşı absorbanları, 517 nm de kaydedildi. Sonuçlar bölüm 4.2.1.2.d. 'de gösterilmektedir.

3.3.3.1.e. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

Şilifli bir seri tüp içine, 5 mM etanolik silazapril çözeltisinden 1,0 ml, 0,4 ml 0,3 M DCC çözeltisi ve 0,5 ml 0,3 M HAHC çözeltisi konuldu. Aynı şekilde boş deneme çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan örnek ve boş deneme çözeltileri 15 °C ve 30 °C olmak üzere iki ayrı sıcaklıkta 5, 10, 20 ve 30 'ar dakika bekletildi. Herbir örnek ve boş deneme çözeltisine, tatbik edilen sürenin sonunda 1,0 'er ml 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 10 ml 'lik balonjojelere transfer edilen çözeltiler, etanol ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı. Bu şekilde farklı



sıcaklık ve sürelerin sonunda elde edilen çözeltilerin, boş deneme çözeltilerine karşı absorbanları, 517 nm de kaydedildi. Elde edilen sonuçlar, bölüm 4.2.1.2.e. dedir.

3.3.3.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Silifli bir seri tüp içine, silazapril'in 3,0 mg.ml⁻¹ 'lik stok çözeltisinden sırasıyla 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ve 1,0 ml alınarak, üzerlerine toplam hacim 1,0 ml olacak şekilde metanol, 0,4 ml 0,3 M DCC çözeltisi ve 0,5 ml 0,3 M HAHC çözeltisi ilave edildi. Bir de boş deneme çözeltisi hazırlandı. Çözeltiler 30 °C de 10 dakika ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına soğumalarını takiben üzerlerine 1,0 ml 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 10 ml 'lik balonjojelere transfer edilen çözeltiler, etanol ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı. Hazırlanan standart çözeltilerin absorbanı 517 nm de boş deneme çözeltisine karşı ölçüldü. Bu işlem herbir standart çözelti için 5 kez tekrarlanarak ortalamalar ve standart sapmalar hesaplandı. Absorban değerleri ile konsantrasyonlar arasında bir grafik çizilerek silazapril 'in ölçü eğrisi oluşturuldu. Ölçü eğrisine ait doğru denklemi, en küçük kareler yöntemine göre hesaplandı.

3.3.3.3. Farmasötik Preparata Uygulanması

20 adet tablet tek tek tartıldı. Ortalama tablet ağır-



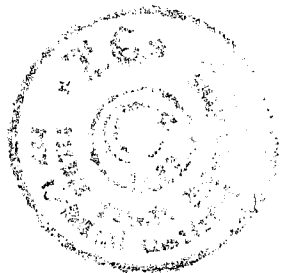
lığı saptandı. Tabletler cam havanda ezilerek toz haline getirildi. Bu toz karışımdan alınan 25 mg silazapril 'e eşdeğer miktarda örnek, hassas olarak tartılarak 25 ml 'lik balonjoje içine konuldu. Üzerine 15-20 ml metanol ilave edilerek çalkalayıcıda yarım saat karıştırıldı. Daha sonra metanol ile hacmine tamamlanarak iyice karıştırılan çözelti, temiz ve kuru bir balonjoje içine mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 5-10 ml 'si atıldı. Kalan kısımdan şilifli tüp içine 1,0 ml alınarak üzerine, 0,4 ml 0,3 M DCC çözeltisi ve 0,5 ml 0,3 M HAHC çözeltisi ilave edildi. Bir de boş deneme çözeltisi hazırlanarak, örnek çözeltisi ile birlikte 30 °C de 10 dakika ısıtıldı. Çözeltilere, oda sıcaklığına soğumalarının ardından 1,0 ml 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 10 ml 'lik balonjojelere transfer edilen çözeltiler, etanol ile hacmine tamamlandı ve karıştırıldı. Örnek çözeltisinin absorbanı, 517 nm de boş deneme çözeltisine karşı ölçüldü. Bu absorbanın ölçü eğrisindeki karşılığı bulunarak, tabletteki madde miktarı tayin edildi. Bu işlem, farklı tartımlar alınarak 5 kez tekrarlandı.

3.3.4. Kıyas Yöntemi

Kıyas yöntemi olarak, ultraviyole spektrofotometrik yöntemden yararlanıldı. Silazapril 'in metanol içinde hazırlanan 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ konsantrasyonundaki standart çözeltisinin ultraviyole spektrumu alınarak, λ_{max} (209 nm) ve absorbanı



değeri saptandı. Daha önce toz haline getirilen tablet örneğinden, 25 mg silazapril 'e eşdeğer miktarda tartım alındı. 25 ml 'lik balonjoje içinde 20 ml kadar metanol ilavesiyle çalkalayıcıda yarım saat karıştırıldı. Çözelti metanol ile hacmine tamamlandıktan sonra iyice karıştırıldı ve temiz ve kuru bir balonjoje içine mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 5-10 ml 'si atıldı. Kalan kısmından 0,1 ml alınarak, 10 ml 'lik balonjojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. Çözelti karıştırıldıktan sonra 209 nm de metanole karşı absorbanı ölçüldü. Bu işlem, farklı tartımlar alınarak 5 kez tekrarlandı. Elde edilen absorbanı değeri lerinden yararlanılarak tabletteki madde miktarı, tek standart yöntemi ile tayin edildi.



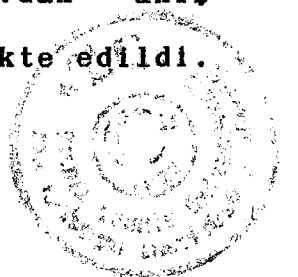
**3.3.5. Hidroklorotiazid-Benazepril Hidroklorür ve
Hidroklorotiazid-Silazapril Karışımlarının
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analizi**

3.3.5.1. Detektör Dalga Boyunun Saptanması

Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril içeren tabletlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizinde detektör dalga boyunun saptanması için, hidroklorotiazid, silazapril ve benazepril hidroklorür 'ün metanol ve asetonitril içinde hazırlanan $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ konsantrasyonundaki çözeltilerinin spektrumları alındı. Bu spektrumlar, bölüm 4.3.1. de belirtildiği gibi incelenerek hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımları için absorbansın gözleneceği en uygun dalga boyu belirlendi.

3.3.5.2. pH 'ın Alıkonma Zamanlarına Etkisi

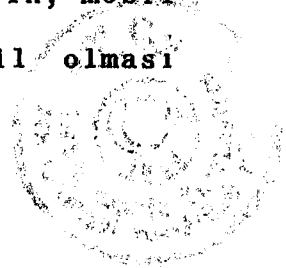
Hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril 'in alıkonma zamanları ile mobil fazın pH 'ı arasındaki ilişkinin incelenmesinde, pH 'ı 3 ila 7 arasında değişen fosfat tamponu çözeltileri ile metanol veya asetonitrilin belirli oranlardaki karışımlarından elde edilen mobil fazlar kullanıldı. Hidroklorotiazid, silazapril ve benazepril hidroklorür 'ün kullanılan mobil faz içinde hazırlanan $25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ konsantrasyonundaki çözeltilerinden $25 \mu\text{l}$, $1,0 \text{ ml}.\text{dak}^{-1}$ akış hızında (1500 PSI basınçta) sıvı kromatografa enjekte edildi.



Elde edilen kromatogramların incelenmesiyle silazapril, benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid 'in çeşitli pH 'larda asetonytril veya metanol içeren mobil fazlar kullanıldığında kolondaki alıkonma hacimleri belirlendi. Mobil fazın metanol veya asetonytril içerdiği durumda maddelerin herbiri için pH ile alıkonma hacmi arasındaki ilişki incelendi ve buna dayanarak hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımlarının analizi için uygun pH aralığı belirlendi. Elde edilen verilere dayanılarak varılan sonuçlar bölüm 4.3.2. de gösterilmektedir.

3.3.5.3. Mobil Fazdaki Organik Çözücü Oranının Alıkonma Zamanlarına Etkisi

Mobil fazdaki organik çözücü oranı ile hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril 'in alıkonma zamanları arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla mobil faz olarak, asetonytril veya metanolün pH 4,0 fosfat tamponu ile çeşitli oranlarda karıştırılması ile elde edilen çözeltiler kullanıldı. Hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril 'in kullanılan mobil faz içinde $25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ konsantrasyonunda çözeltileri hazırlanarak, bu çözeltilerden sıvı kromatografa $1,0 \text{ ml}.\text{dak}^{-1}$ akış hızında $25 \mu\text{l}$ enjekte edildi. Elde edilen kromatogramların incelenmesiyle silazapril, hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorür 'ün çeşitli oranlarda asetonytril veya metanol içeren mobil fazlar kullanıldığında kolondaki alıkonma hacimleri belirlendi. Maddelerin herbiri için, mobil fazdaki organik çözücünün metanol veya asetonytril olması



durumunda mobil fazdaki organik çözücü oranı ile alıkonma hacmi arasındaki ilişki incelendi. Elde edilen veriler, bölüm 4.3.3. de yer almaktadır.

3.3.5.4. Kantitatif Analiz

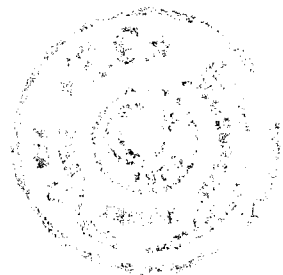
3.3.5.4.1. Uygun iç Standart Maddenin Saptanması

Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımlarının kantitatif analizlerinde iç standart yöntemi kullanıldı.

Uygun iç standart maddenin belirlenmesi için, kafein, parasetamol, antipirin, fenobarbital, askorbik asit, salisilik asit ve sakkarin gibi maddeler test edildi. Bu amaçla mobil faz olarak metanol-pH 4,0 fosfat tamponu (70:30) karışımı kullanılarak, iç standart olarak incelenen maddelerin mobil faz içinde $25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ 'lik çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden sıvı kromatografa $1,0 \text{ ml}.\text{dak}^{-1}$ akış hızında $25 \mu\text{l}$ enjekte edildi. Elde edilen kromatogramların incelenmesiyle hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımlarının analizi için uygun iç standart madde belirlendi.

3.3.5.4.2. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

incelenen ilaç maddelerinin konsantrasyonları ile pik alanları arasındaki ilişkiyi incelemek üzere aşağıdaki karışımlar hazırlandı:



Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür karışımının analizi için, hidroklorotiazid 'in mobil faz içinde hazırlanan $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik stok çözeltisinden 10 ml 'lik balonjojeler içine (100-300) μl 'lik hacimler alındı. Üzerlerine benazepril hidroklorür 'ün $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik stok çözeltisinden (50-150) μl 'lik hacimler ve $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik fenobarbital çözeltisinden 100 μl ilave edildi ve balonjojeler mobil fazla hacmine tamamlandı.

Hidroklorotiazid-silazapril karışımının analizi için, hidroklorotiazid 'in mobil faz içinde hazırlanan $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik stok çözeltisinden 10 ml 'lik balonjojeler içine (100-300) μl 'lik hacimler alındı. Üzerlerine, silazapril 'in $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik stok çözeltisinden (50-150) μl 'lik hacimler ve $1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ 'lik fenobarbital çözeltisinden 100 μl ilave edilerek, balonjojeler mobil fazla hacmine tamamlandı.

Hazırlanan bu standart çözeltiler, süzöldükten sonra 25 μl 'lik hacim, sıvı kromatografa enjekte edildi. Kromatografi işlemi, metanol-pH:4,0 fosfat tamponu (70:30) mobil fazı ile $1,0 \text{ ml.dak}^{-1}$ akış hızında yapıldı. Detektör, 209 nm dalga boyunda tutuldu.

Aynı koşullarda 5 kez çalışılarak, hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril 'in herbir konsantrasyonda elde edilen pik alanları, iç standart madde olan fenobarbital 'in pik alanlarına oranlandı. Pik alanları oranları-



nın ortalaması ($\bar{A}$) ve bağıl standart sapmalar $[(S/\bar{A}) \times 100]$ hesaplandı. Hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril 'in ortalama pik alanları oranı değerleri ile karşılık olan konsantrasyon değerleri arasında ölçü eğrileri çizildi. Ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı.

3.3.5.4.3. Farmasötik Preparatların Analizi

Her iki preparatın analizinde 10 adet tablet tek tek tartıldı ve ortalama tablet ağırlıkları saptandı. Daha sonra tabletler, bir porselen havanda ince toz haline getirilerek toz tablet karışımları hazırlandı. Toz tablet karışımlarından, hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür karışımının analizi için 3,0 mg benazepril hidroklorür 'e (ve 3,75 mg hidroklorotiazid 'e) eşdeğer miktarda ; hidroklorotiazid-silazapril karışımının analizi için ise 2,5 mg silazapril 'e (ve 6,0 mg hidroklorotiazid 'e) eşdeğer miktarda örnek alınarak hassas olarak tartıldı. Alınan tartım, 50 ml 'lik balonjojeler içinde 30-40 ml metanol ilavesiyle çalkalayıcıda yarım saat karıştırıldı. Daha sonra, metanol ile hacmine tamamlanarak iyice karıştırılan çözelti, mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 5-10 ml 'si atıldıktan sonra, kalan kısımdan 10 ml 'lik balonjoje içine 2,0 ml alındı. Üzerine, $1000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 'lik fenobarbital çözeltisinden 100 μl ilave edildi ve balonjoje, mobil fazla hacmine tamamlanarak karıştırıldı. Elde edilen çözelti süzüldükten sonra,



HPLC çalışması için 25 µl 'lık hacim alınarak, bölüm 3.3.5.4.2. de anlatıldığı şekilde çalışıldı. İşlemler 5 'er kez tekrarlandı. Ölçülen pik alanı oranları değerlerine karşılık olan hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril miktarları, ilgili ölçü eğrileri yardımları ile hesaplanarak, bir tablet içinde bulunan hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril miktarları tayin edildi.

3.3.5.4.4. Kıyas Yöntemleri

Kıyas yöntemleri olarak, türev spektrofotometrik yöntemden yararlanıldı. Bu yöntemde, hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür karışımının analizi için hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorür 'ün metanol içinde 2-10 µg.ml⁻¹ arasındaki standart çözeltileri ile hidroklorotiazid-silazapril karışımının analizi için hidroklorotiazid ve silazapril 'in metanol içinde sırasıyla 2-10 µg.ml⁻¹ ve 4-12 µg.ml⁻¹ arasındaki standart çözeltileri hazırlandı. Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür karışımının analizi için hazırlanan hidroklorotiazid içeren standart çözeltilerin, 253,7 nm de 2.derece türev absorbens değerleri ve hidroklorotiazid-silazapril karışımının analizi için hazırlanan hidroklorotiazid içeren standart çözeltilerin, 272,9 nm de 3.derece türev absorbens değerleri, benazepril hidroklorür içeren standart çözeltilerin 224,7 nm de 3.derece türev absorbens değerleri ve silazapril içeren standart çözeltilerin 215 nm de 2.derece türev absorbens değerleri ölçüldü. Türev absorbens değerleri ile konsantrasyonlar arasında grafikler çizilerek hidrokloro-



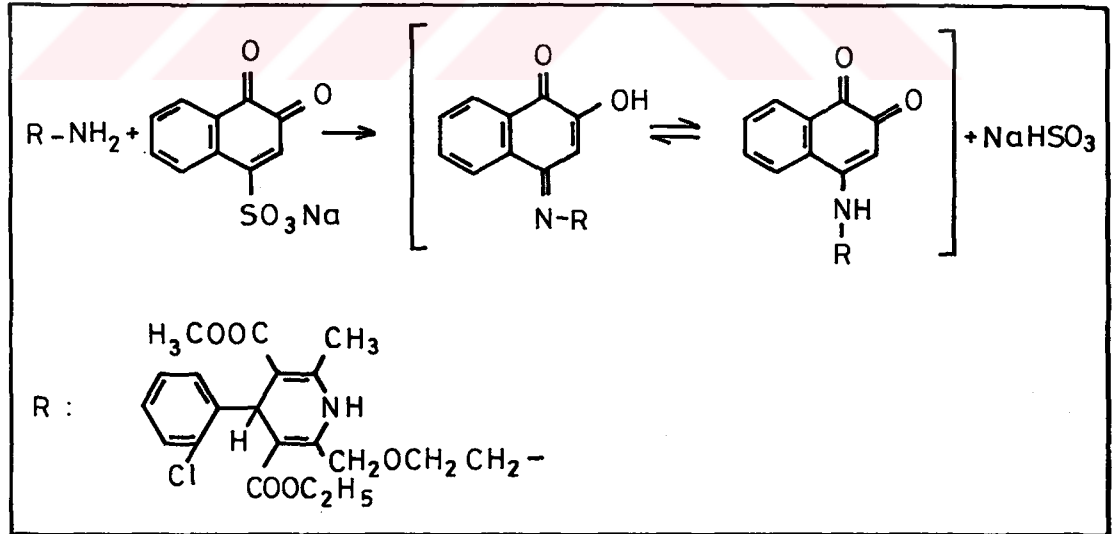
tiazid, silazapril ve benazepril hidroklorür 'e ait ölçü eğrileri oluşturuldu. ilaç maddeleri, toz tablet karışımlarından metanol ile alındıktan sonra, hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür karışımını içeren tablet içinde bulunan hidroklorotiazid miktarı, 253,7 nm de 2.derece türev absorbans değerinin ölçülmesiyle, hidroklorotiazid-silazapril karışımını içeren tablet içinde bulunan hidroklorotiazid miktarı 272,9 nm de 3.derece türev absorbans değerinin ölçülmesiyle, tablet içinde bulunan benazepril hidroklorür miktarı 224,7 nm de 3.derece türev absorbans değerinin ölçülmesiyle ve tablet içinde bulunan silazapril miktarı ise 215 nm de 2.derece türev absorbans değerinin ölçülmesiyle, bu absorbans değerlerinin ölçü eğrilerindeki karşılıkları bulunarak tayin edildi (Bora, O. 1996).



4. SONUÇLAR

4.1. Amlodipin Besilat 'ın Spektrofotometrik Analizi

Amlodipin ile NQS arasındaki reaksiyon, NaHSO_3 eliminasyonu ile gerçekleşen basit bir kondensasyon reaksiyonudur. Reaksiyon denklemi aşağıda görülmektedir.

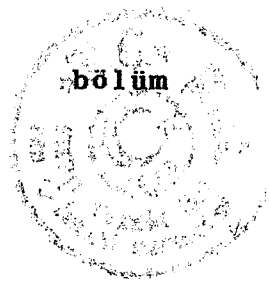


4.1.1. Deney Koşulları

4.1.1.a. Uygun pH ve Tampon Çözelti

Amlodipin-NQS renkli türevinin oluşmasında,

bölüm



3.3.1.1.a. da belirtildiği gibi çalışılarak çeşitli pH ve tampon sistemlerinin kullanılmasıyla, $16,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ amlodipin besilat 'a eşdeğer olan amlodipin-NQS türevleri oluşturulmuştur. Elde edilen türevlerin boş deneme çözeltisine karşı spektrumları alınarak, λ_{max} ve absorbans değerleri incelenmiştir. Cetvel 4.6. da, çeşitli pH ve tampon sistemleri ile elde edilen amlodipin-NQS türevlerinin λ_{max} ve absorbans değerleri görülmektedir.

Cetvel 4.6. Çeşitli pH 'larda elde edilen amlodipin-NQS türevlerinin spektral özellikleri

Tampon Sistemi	pH	λ_{max} (nm)	A
Fosfat	6,0	482	0,069
Fosfat	8,0	485	0,105
Fosfat	9,0	486	0,101
Fosfat	9,5	487	0,103
Fosfat	10,0	479	0,167
Fosfat	10,5	485	0,117
Borat	9,0	487	0,048
Borat	10,0	493	0,095
Karbonat	10,0	499	0,152

Elde edilen verilere göre, amlodipin-NQS türevinin oluşmasında uygun pH ve tampon sistemi olarak, pH:10,0 fosfat tamponu belirlenmiştir.



4.1.1.b. Uygun Ekstraksiyon Çözücüsü

Bölüm 3.3.1.1.b. de belirtildiği gibi, 100 µg amlodipin besilat 'a eşdeğer olan amlodipin-NQS türevleri oluşturularak, elde edilen türevler çeşitli organik çözücülere ekstrakte edilmiştir. Ekstraktların sulu fazlardan ayrılmasını takiben boş deneme çözeltilerine karşı spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlarda amlodipin-NQS türevinin, kullanılan organik çözücüye göre değişen λ_{max} ve absorbens değerleri elde edilmiştir. Elde edilen veriler, cetvel 4.7. de gösterilmektedir.

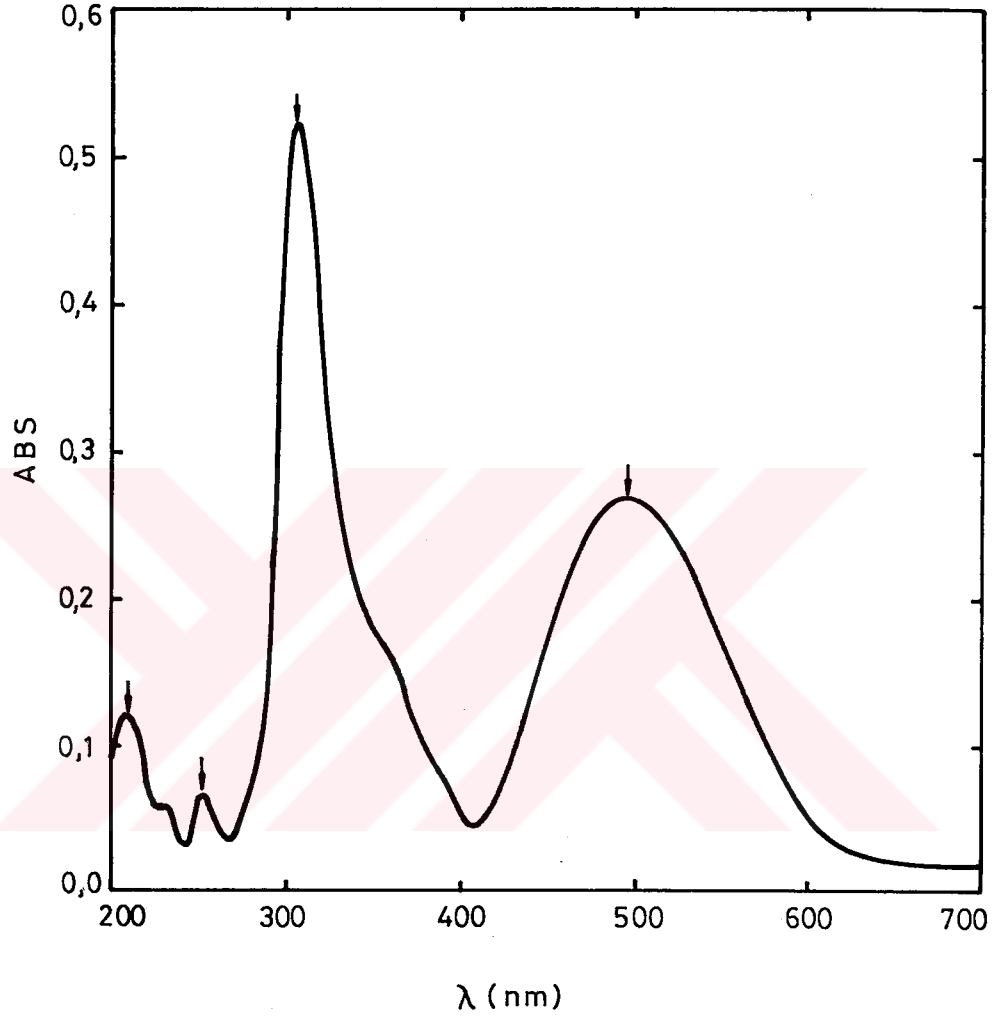
Cetvel 4.7. Amlodipin-NQS türevinin, organik çözücüler içindeki spektral özellikleri

Çözücü	λ_{max}	A
Kloroform	445	0,126
Kloroform : n-Bütanol (1 : 1)	445	0,201
n-Bütanol	494	0,254
Metilizobütilketon	456	0,081
Benzen	440	0,031
Etilasetat	447	0,023
1,2-Dikloroetan	444	0,084

Cetvel 4.7.de yer alan absorbens değerleri incelendiğinde, amlodipin-NQS türevinin ekstraksiyonu için en uygun çözücünün, n-bütanol olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.1.1. de,



n-bütanol 'e ekstre edilmiş olan türevin boş deneme çözeltisine karşı spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.1. Amlodipin-NQS türevinin, UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumu

4.1.1.c. Türevin Dayanıklılığı

Amlodipin-NQS türevinin n-bütanol içindeki dayanıklılığının incelenmesi için, $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyonundaki



amlodipin besilat çözeltisinin 1,0 ml 'si ile bölüm 3.3.1.1.b. deki gibi çalışılarak, elde edilen n-bütanol ekstresinin oda sıcaklığındaki dayanıklılığı incelenmiştir. Cetvel 4.8. de, türev çözeltisinin oda sıcaklığında bekletildiğinde, 10, 20,30, 40, 50 ve 60 dakika sonra 494 nm de boş deneme çözeltisine karşı ölçülen absorbands değerleri görülmektedir.

Cetvel 4.8. Amlodipin-NQS türevinin, n-bütanol içindeki dayanıklılığı ($\lambda=494$ nm)

Zaman	Başlangıçta	10' sonra	20' sonra	30' sonra	40' sonra	50' sonra	60' sonra
A	0,507	0,508	0,506	0,506	0,504	0,503	0,503

Görüldüğü gibi türev, oda sıcaklığında en az bir saat dayanıklı kalmaktadır.

4.1.1.d. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

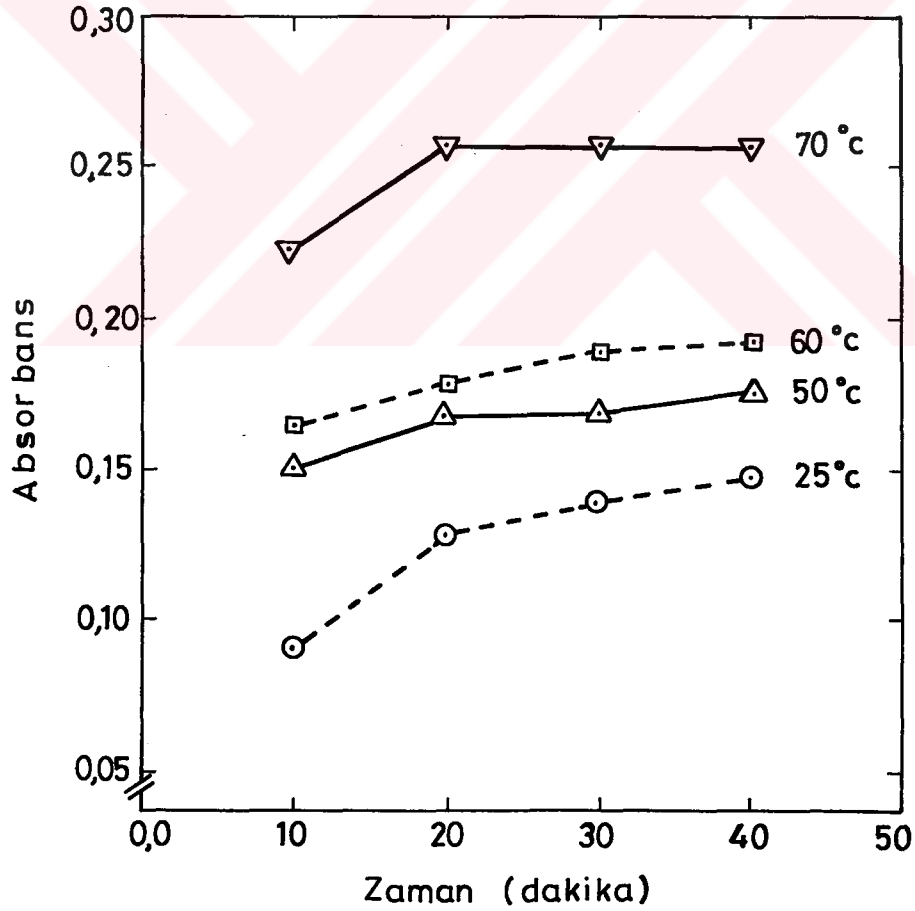
Amlodipin besilat ile NQS arasındaki reaksiyonun gerçekleştirilmesinde uygun sıcaklık ve reaksiyon süresinin saptanması amacıyla, bölüm 3.3.1.1.c. de anlatıldığı gibi, çeşitli sıcaklık ve sürelerde amlodipin-NQS türevleri oluşturulmuştur. Elde edilen türevlerin, sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişen absorbands değerleri, cetvel 4.9. da gösterilmektedir.



Cetvel 4.9. Amlodipin-NQS türevinin absorbansı üzerine sıcaklık ve zamanın etkisi ($\lambda=494$ nm)

Sıcaklık Zaman (dak)	25 °C	50 °C	60 °C	70 °C
10	0,090	0,151	0,164	0,222
20	0,129	0,168	0,179	0,257
30	0,139	0,170	0,189	0,258
40	0,148	0,177	0,193	0,258

Cetvel 4.9. daki verilerin grafik üzerinde gösterilmesiyle, şekil 4.2. deki grafik, elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Amlodipin-NQS türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zamanın etkisi



Elde edilen verilerin incelenmesi üzerine, amlodipin besilat ile NQS arasındaki reaksiyonun tamamlanması için 70 °C de 20 dakika süre ile ısıtmanın yeterli olduğu belirlenmiştir.

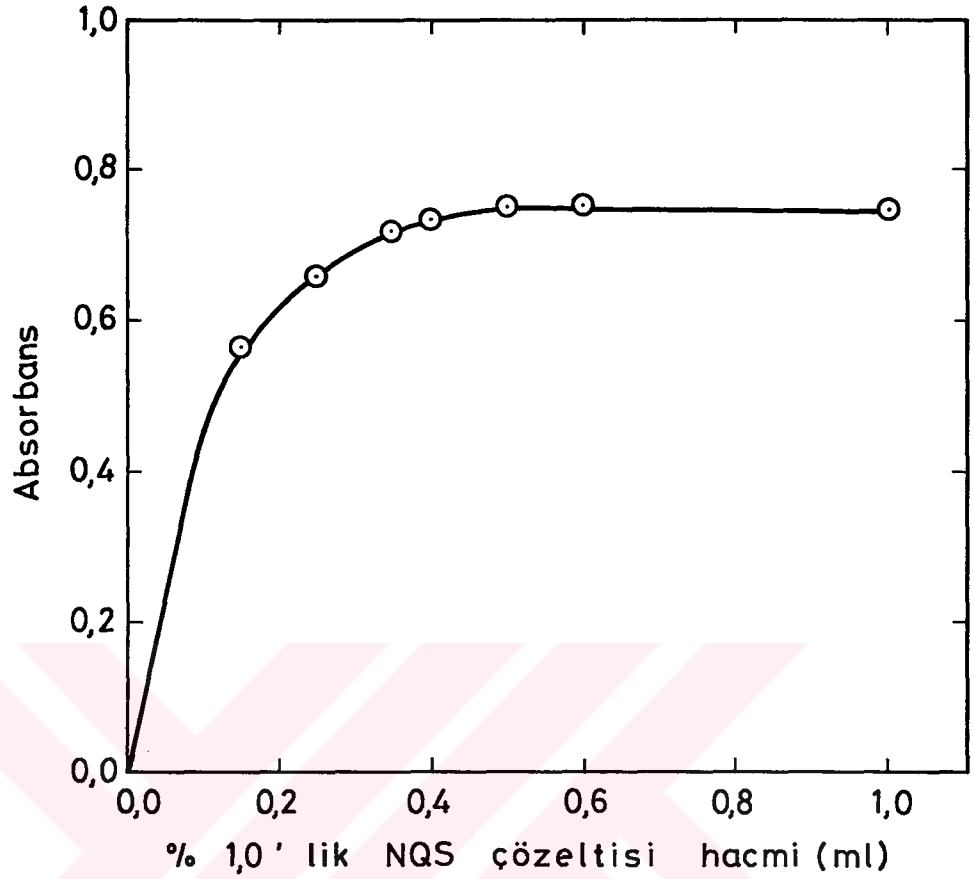
4.1.1.e. Belirteç Miktarı

Amlodipin-NQS türevinin oluşmasında belirteç miktarının saptanması için, belirlenen pH, tampon sistemi, çözücü, sıcaklık ve reaksiyon süresi gibi çalışma şartlarında farklı belirteç miktarları kullanılarak, 300 µg amlodipin besilat ile NQS türevleri oluşturulmuştur. Elde edilen çözeltilerin, belirteç miktarına göre değişen absorbands değerleri cetvel 4.10 da, bu değerler ile oluşturulan grafik ise, şekil 4.3. de gösterilmektedir.

Cetvel 4.10. Amlodipin-NQS türevinin absorbandsı üzerine belirteç miktarının etkisi ($\lambda=494$ nm)

%1'lik NQS çözeltisi hacmi (ml)	0,15	0,25	0,35	0,40	0,50	0,60	1,00
A	0,564	0,658	0,720	0,730	0,750	0,752	0,751





Sekil 4.3. Amlodipin-NQS türevinin oluşması üzerine belirtec miktarının etkisi

Elde edilen verilere dayanılarak, amlodipin-NQS türevinin oluşması için gerekli belirtec miktarı olarak, 0,5 ml % 1,0 'lik NQS çözeltisi hacmi belirlenmiştir. Bu belirtec miktarı, (NQS : Amlodipin besilat) = (36 : 1) mol oranına eşdeğer olmaktadır.

4.1.2. Ölçü Eğrisi

Ölçü eğrisi, amlodipin besilat 'ın organik fazdaki kon-



santrasyonunun (15-75) $\mu\text{g.ml}^{-1}$ olduğu aralıkta hazırlandı. Bu amaçla, bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak, her bir konsantrasyon için bulunan absorbands değerleri, cetvel 4.11. de verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler, cetvel 4.12 de görülmektedir. Ortalama absorbands değerlerinden çizilen ölçü eğrisi (şekil 4.4.) ve bu eğriye ait doğru denklemi, preparattaki amlodipin besilat miktarını tayin etmek için kullanılmıştır.

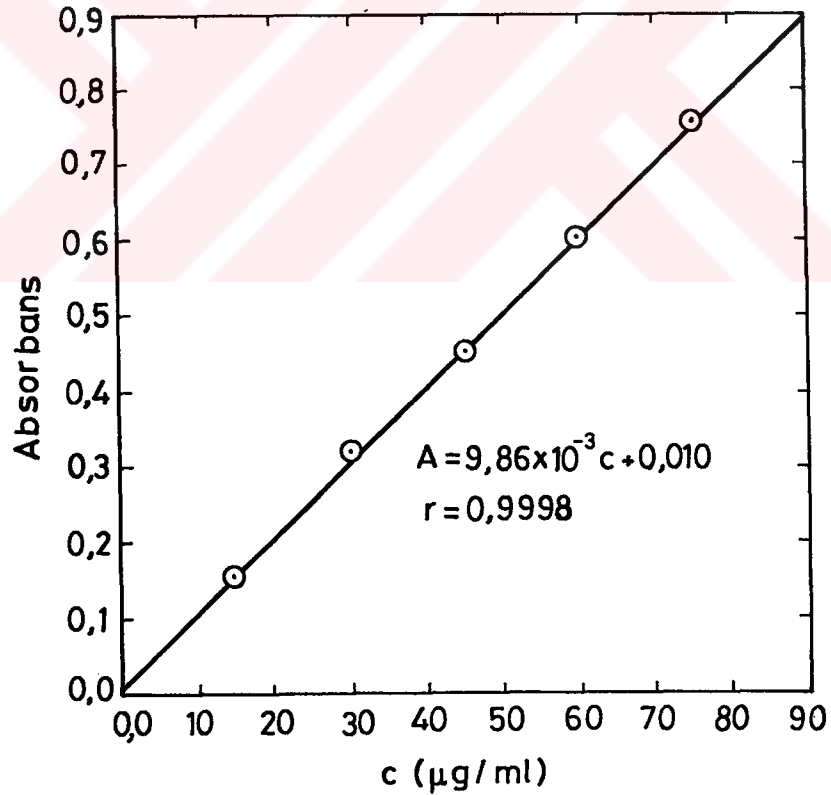
Cetvel 4.11. Amlodipin besilat 'ın spektrofotometrik analizi için hazırlanan ölçü eğrilerinin absorbands değerleri ($\bar{A}$) ve regresyon analizleri ($\lambda=494 \text{ nm}$)

No	c $\mu\text{g.ml}^{-1}$	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	$\bar{A}$	S	%S
1	15	0,148	0,155	0,157	0,157	0,153	0,154	0,004	2,43
2	30	0,317	0,314	0,314	0,303	0,323	0,314	0,007	2,31
3	45	0,445	0,451	0,451	0,452	0,457	0,451	0,004	0,94
4	60	0,590	0,600	0,601	0,602	0,612	0,601	0,008	1,29
5	75	0,745	0,750	0,750	0,753	0,752	0,750	0,003	0,41
$A = 9,86 \times 10^{-3}c + 0,010$ $r = 0,9998$									



Cetvel 4.12. Cetvel 4.11. deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	a	b	r
1	$9,78 \times 10^{-3}$	$8,90 \times 10^{-3}$	0,9992
2	$9,84 \times 10^{-3}$	$11,2 \times 10^{-3}$	0,9998
3	$9,82 \times 10^{-3}$	$12,7 \times 10^{-3}$	0,9998
4	$9,94 \times 10^{-3}$	$6,10 \times 10^{-3}$	0,9999
5	$9,91 \times 10^{-3}$	$13,3 \times 10^{-3}$	0,9994
Ortalama	$9,86 \times 10^{-3}$	$10,3 \times 10^{-3}$	0,9998



Sekil 4.4. Amlodipin besilat 'ın spektrofotometrik tayininde kullanılan ölçü eğrisi ($\lambda=494$ nm)



4.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Ticari preparatlar içinde bulunan amlodipin 'in miktarı, bölüm 3.3.1.3. de anlatıldığı gibi çalışılarak, spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Yeni bir ilaç maddesi olan amlodipin henüz farmakopelerde yer almadığı için, karşılaştırma yöntemi olarak UV-spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bu amaçla aynı tabletler, bölüm 3.3.2. de anlatıldığı gibi ultraviyole spektrofotometrik yöntemle de analiz edildi. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar, cetvel 4.13. de toplu olarak verilmiştir. Cetvel 4.13. de, 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ($\bar{x}$), standart sapma (s), bağıl standart sapma (%S) ve % 95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı [$\bar{x} \pm (t.s/\sqrt{n})$] değerleri yer almaktadır.

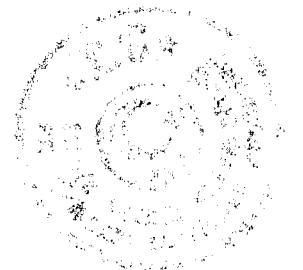
Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçlar, Student (t) testi ile ortalamalar, Fisher (F) testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Cetvel 4.13. de görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve 5 deneme için ilgili tablolarda (Chalmers, R.A. 1972) verilmiş olan değerlerden küçüktür. Bu durumda ilaç maddesinin analizinde, geliştirilen yöntem ile kıyas yöntemi olarak yararlanılan UV spektrofotometrik yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Cetvel 4.13. Vasocard Tabletlerinin^[**] Analizi

İstatistik Parametreler		Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem		UV Spektrofotometrik Yöntem	
		mg/tablet	%	mg/tablet	%
n	1	5,05	101,0	5,04	100,8
	2	5,02	100,4	4,91	98,2
	3	5,17	103,4	5,07	101,4
	4	5,18	103,6	5,00	100,0
	5	5,10	102,0	4,99	99,8
x̄		5,10	102,08	5,00	100,04
S		0,07		0,06	
%S		1,37		1,20	
$\bar{x} \pm \frac{t.s}{\sqrt{n}}$		5,03-5,17		4,94-5,06	
t testi		2,17			
F testi		1,36			
n ₁ = n ₂ = 5					
P = 0,05					
t _{table} = 2,31					
F _{table} = 6,39					

[**] Bir tablet, 5,0 mg amlodipin 'e eşdeğer miktarda amlodipin besilat içermektedir.



4.2. Silazapril 'in Spektrofotometrik Analizi

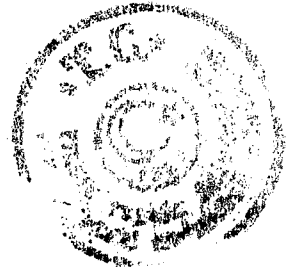
4.2.1. Deney Koşulları

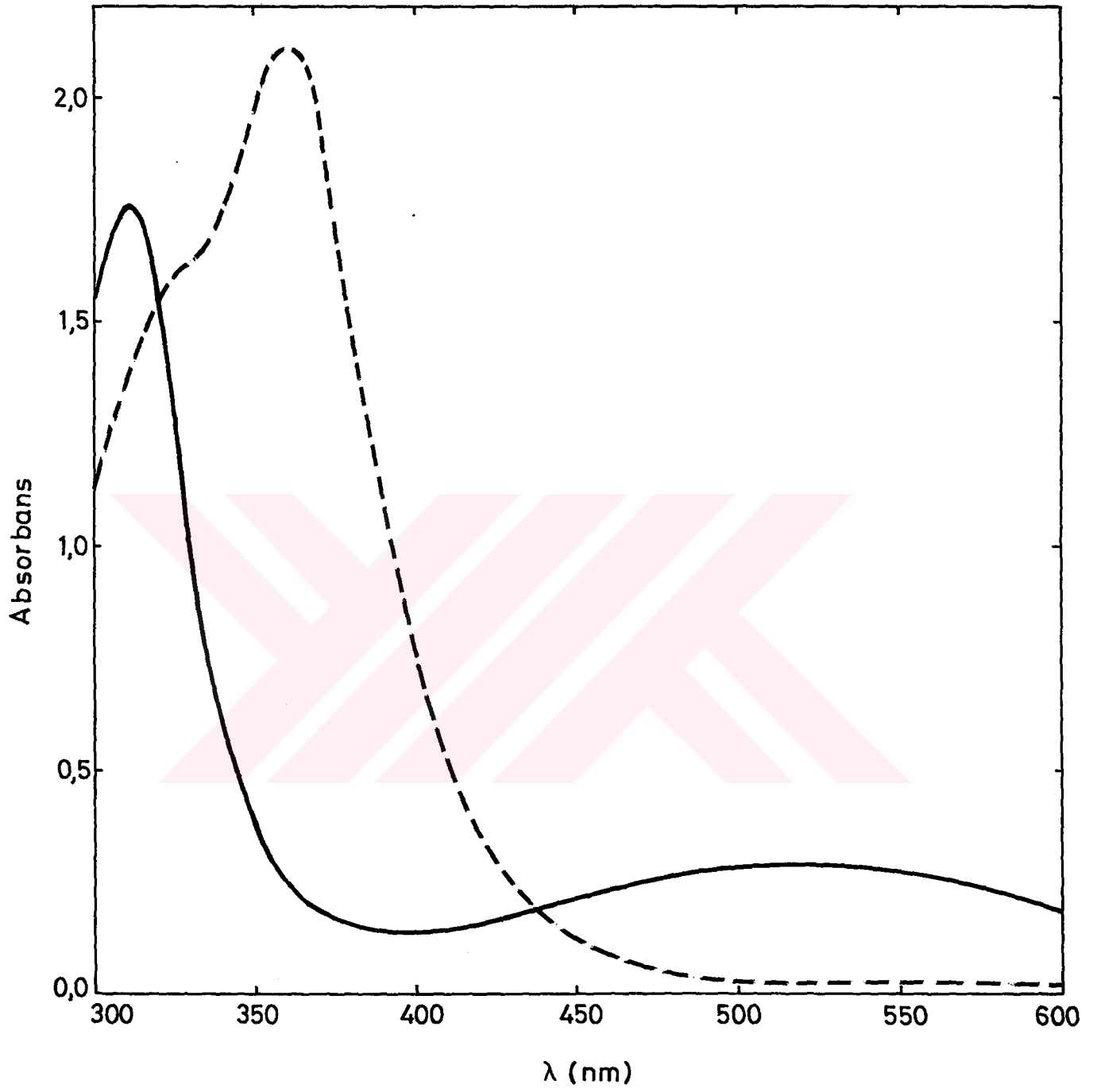
4.2.1.1. Silazapril 'in Demir Hidroksamat Türevi

5 μ mol silazapril ' e eşdeğer miktarda demir hidroksamat türevi oluşturularak, boş deneme çözeltisine karşı spektrumu (şekil 4.5.) alındı ve kıvı kahverenklı türevin λ_{max} 'u, 517 nm olarak belirlendi.

4.2.1.2.a. Disikloheksilkarbodiimid (DCC) Miktarı

5 μ mol silazapril 'e eşdeğer miktarda hazırlanan demir hidroksamatın oluşması için gerekli DCC miktarının belirlenmesinde, bölüm 3.3.3.1.a. da anlatıldığı gibi çalışıldı. Türevin oluşması için reaksiyona giren diğer belirteçlerin miktarları sabit tutularak, değıştirilen DCC miktarının absorbands üzerine olan etkisi incelenmiştir. Cetvel 4.14. de, DCC miktarlarının değıştirilmesiyle oluşturulan renklı türevlerin absorbands değeri, şekil 4.6. da ise, bu değeri ile oluşturulan grafik görölmektedir.





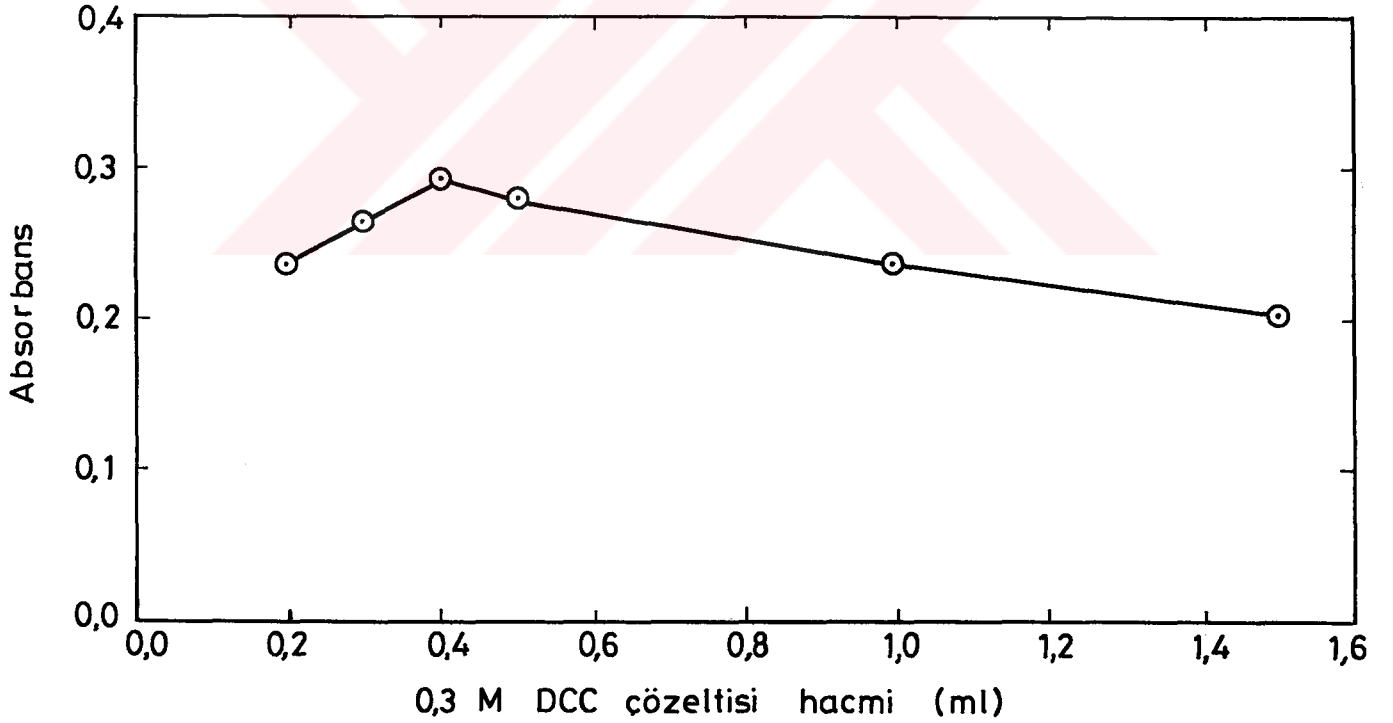
Sekil 4.5. Silazapril 'in demir hidroksamat türevi (—) ve boş deneme çözeltisinin (---) UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları



Cetvel 4.14. Absorbansın, DCC miktarı ile değişmesi
($\lambda=517$ nm)

0,3 M DCC Çözeltisi Hacmi (ml)	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	1,5
A	0,237	0,265	0,293	0,278	0,236	0,202

Elde edilen veriler incelendiğinde, türevin oluşması için gerekli 0,3 M DCC çözeltisi hacminin, 0,4 ml olduğu belirlenmiştir.



Sekil 4.6. DCC miktarının, hidroksamit oluşumu üzerine etkisi



4.2.1.2.b. Hidroksilamin Hidroklorür (HAHC) Miktarı

5 μ mol silazapril 'e eşdeğer miktarda hazırlanan demir hidroksamatin oluşturulmasında, belirlenen DCC miktarı ile Fe (III) perklorat 'ın miktarı sabit tutularak, değiştirilen HAHC miktarlarının türevin oluşması üzerine olan etkisi incelendi. Bu amaçla, bölüm 3.3.3.1.b. deki gibi çalışılarak, değiştirilen HAHC miktarları ile elde edilen absorbands değerleri, cetvel 4.15. de yer almaktadır. Şekil 4.7. de ise, bu değerlerle oluşturulan grafik verilmiştir.

Cetvel 4.15. Absorbansın HAHC miktarı ile değişmesi
($\lambda=517$ nm)

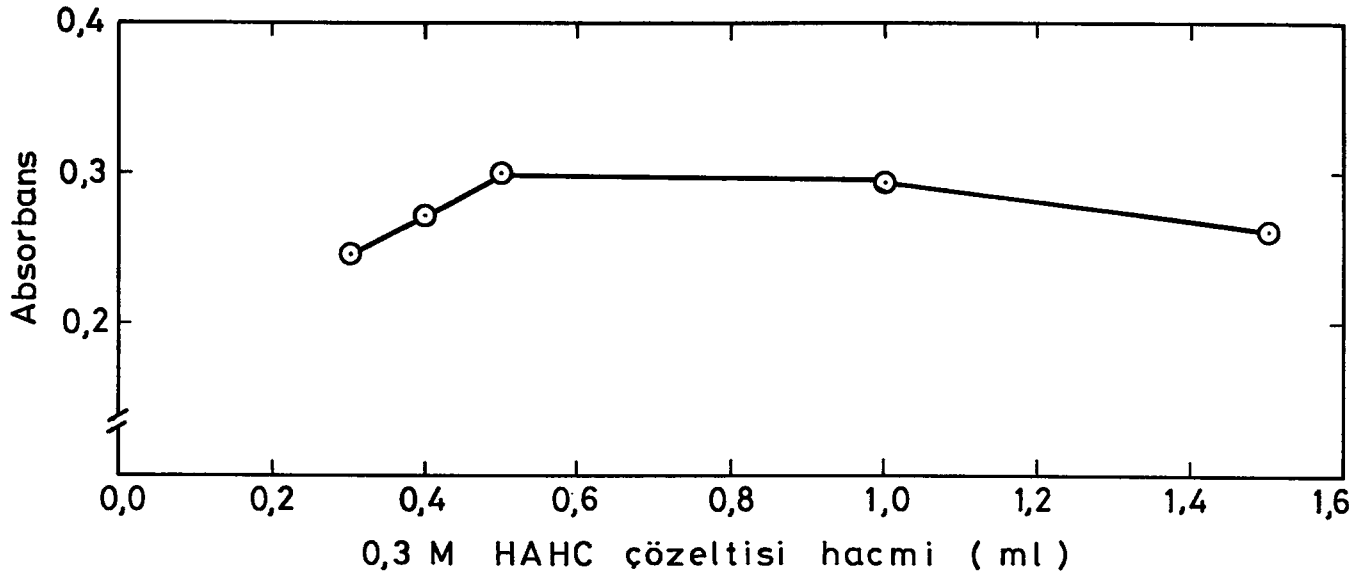
0,3 M HAHC Çözeltisi Hacmi (ml)	0,3	0,4	0,5	1,0	1,5
A	0,246	0,272	0,299	0,294	0,262

Elde edilen sonuçlara göre, 5 μ mol silazapril 'e eşdeğer miktarda demir hidroksamatin oluşması için gerekli 0,3 M HAHC çözeltisinin hacmi, 0,5 ml olarak belirlenmiştir.

4.2.1.2.c. Fe (III) Perklorat Miktarı

Bölüm 3.3.3.1.c. de anlatıldığı gibi çalışılarak, demir (III) perklorat miktarının demir hidroksamatin oluşumu üzerine





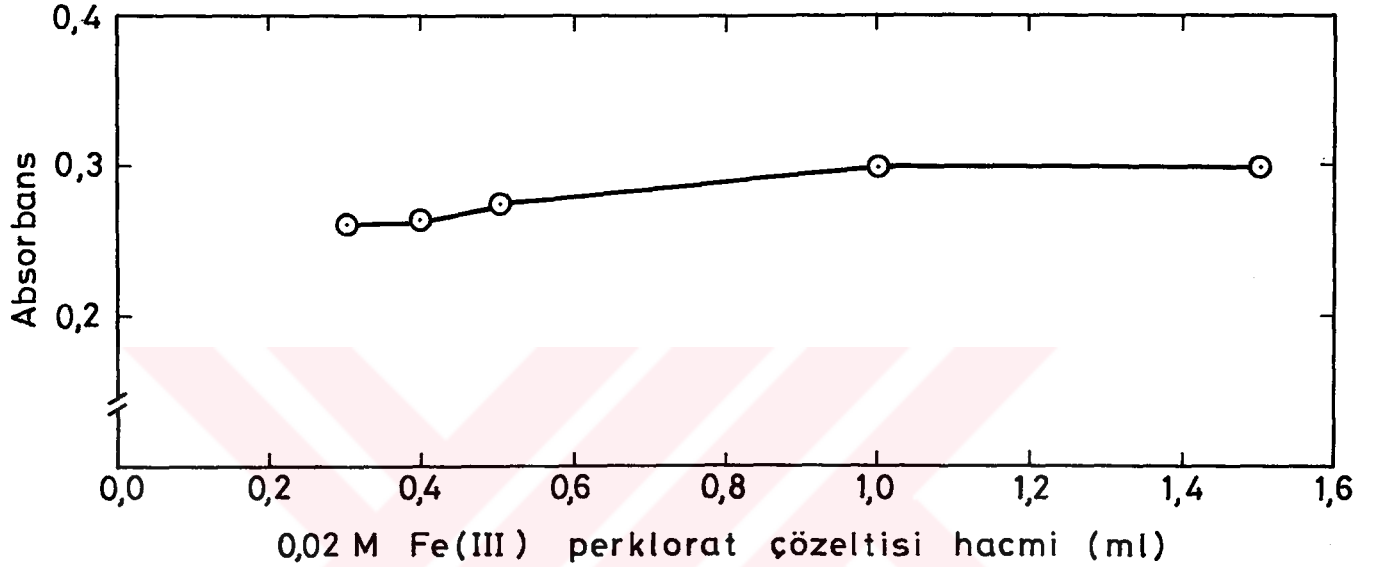
Sekil 4.7. HAHC miktarının, hidroksamat oluşumu üzerine etkisi

olan etkisi incelendi. Bu amaçla, belirlenen DCC ve HAHC miktarları sabit tutularak, değiştirilen Fe (III) perklorat miktarı ile elde edilen absorbanslar ölçülmüştür. Cetvel 4.16 da, değişen Fe (III) perklorat ve karşılıkları olan absorbans değerleri, şekil 4.8 de ise, bu değerlerle oluşturulan grafik gösterilmektedir.

Cetvel 4.16. Absorbansın, Fe (III) perklorat miktarı ile değişmesi ($\lambda=517$ nm)

0,02M Fe(III) perklorat Çözeltisi Hacmi (ml)	0,3	0,4	0,5	1,0	1,5
A	0,260	0,264	0,274	0,299	0,298

Elde edilen verilere göre, 5 μ mol silazapril 'e eşdeğer miktarda demir hidroksamat oluşumu için gerekli 0,02 M Fe (III) perklorat çözeltisi hacmi, 1,0 ml olarak belirlenmiştir.



Sekil 4.8. Fe (III) perklorat miktarının, demir hidroksamat oluşumu üzerine etkisi

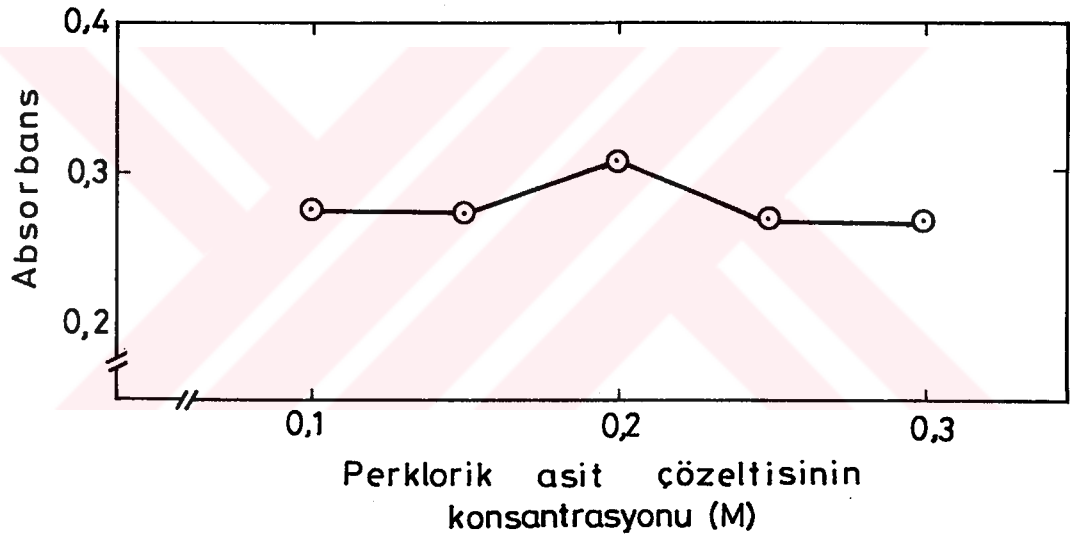
4.2.1.2.d. Perklorik Asit Çözeltisinin Konsantrasyonu

Belirlenen DCC, HAHC ve Fe (III) perklorat miktarları sabit tutulup, ortamda bulunan perklorik asitin konsantrasyonu değiştirilerek bölüm 3.3.3.1.d. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Cetvel 4.17. de değişen perklorik asit konsantrasyonları ile elde edilen çözeltilerin absorbans değerleri, sekil 4.9. da ise bu değerlerle oluşturulan grafik gösterilmektedir.



Cetvel 4.17. Absorbansın, perklorik asit konsantrasyonu ile değişmesi ($\lambda=517$ nm)

HClO ₄ konsantrasyonu (M)	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
A	0,274	0,273	0,307	0,267	0,265



Sekil 4.9. Perklorik asit konsantrasyonunun, demir hidroksamat oluşumu üzerine etkisi

Cetvel 4.17 de görüldüğü gibi, ortamdaki perklorik asit konsantrasyonu 0,2 M olduğunda absorbans maksimum olmaktadır. Bu sebeple, Fe (III) perklorat çözeltisi (0,02 M), 0,2 M perklorik asit çözeltisinde hazırlanmıştır.



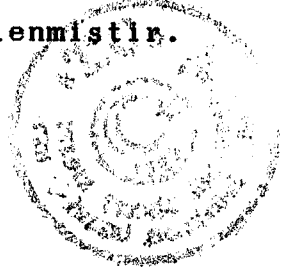
4.2.1.2.e. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

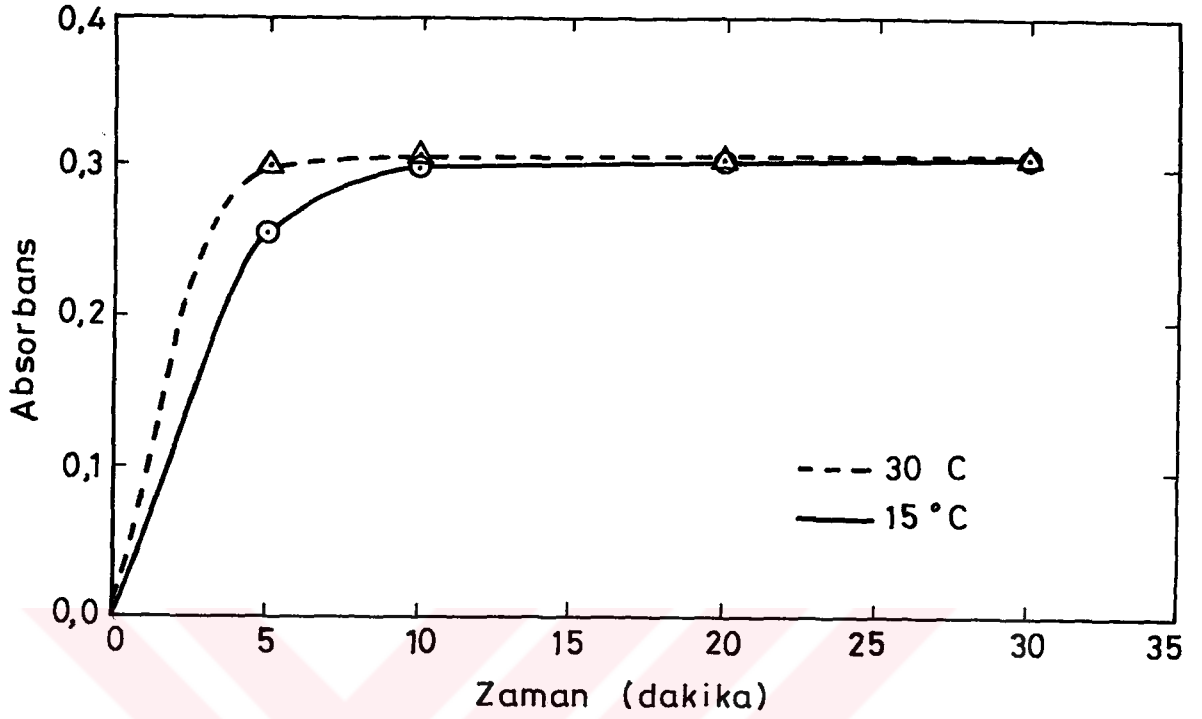
Gerek hidroksamik asit, gerekse demir hidroksamat oluşumu için gerekli belirteç miktarları saptandıktan sonra, bölüm 3.3.3.1.e. de anlatıldığı gibi çalışılarak, hidroksamat oluşumunda sıcaklık ve sürenin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 15 °C ve 30 °C de çalışılarak, belirli sürelerde elde edilen absorbanans değerleri ölçülmüştür. Bu değerler cetvel 4.18. de, bu değerlerle oluşturulan grafik ise şekil 4.10 da gösterilmektedir.

Cetvel 4.18. Hidroksamat oluşumunda sıcaklık ve sürenin etkisi ($\lambda=517$ nm)

Sıcaklık Zaman (dak)	15 °C	30 °C
5	0,256	0,300
10	0,300	0,307
20	0,305	0,308
30	0,308	0,308

Cetvel 4.18. de görüldüğü gibi, oda sıcaklığında da maksimum absorbanansa ulaşılmaktadır. Ancak, reaksiyonun hızlandırılması için biraz ısıtmanın yararı olmaktadır. Bunun için, 30 °C de 10 dakika sürenin uygun olduğu belirlenmiştir.





Şekil 4.10 Hidroksamat oluşumunda sıcaklık ve sürenin etkisi

4.2.1.2.f. Türevin Dayanıklılığı

Silazapril 'in demir hidroksamat türevinin oda sıcaklığındaki dayanıklılığı, yarım saatlik bir süre içinde absorbans ölçülerek incelenmiştir. Cetvel 4.19. da, çözelti oda sıcaklığında bekletildiğinde, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika sonra 517 nm de boş deneme çözeltisine karşı ölçülen absorbans değerleri görülmektedir.



Cetvel 4.19. Silazapril 'in demir hidroksamat türevinin dayanıklılığı

Zaman	Başlangıçta	5'	10'	15'	20'	25'	30'
A	0,236	0,234	0,232	0,228	0,222	0,217	0,213

Cetvel 4.19 da görüldüğü gibi, demir hidroksamat türevinin absorbanı, geçen zamanla birlikte devamlı ve yavaş bir şekilde azalmaktadır. Türevin renginin ilk 10 dakika içinde nispeten kararlı olduğu, daha sonra zamanla açıldığı belirlenmiştir. Bu sebeple, ölçümlerin hemen yapılması uygun olmaktadır.

4.2.2. Ölçü Eğrisi

Ölçü eğrisi, silazapril konsantrasyonunun (60-300) $\mu\text{g.ml}^{-1}$ olduğu aralıkta hazırlandı. Bu amaçla, bölüm 3.3.3.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak, herbir konsantrasyon için bulunan absorban değerleri, Cetvel 4.20. de verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler, cetvel 4.21 de görülmektedir. Ortalama absorban değerlerinden çizilen ölçü eğrisi (şekil 4.11.) ve bu eğriye ait doğru denklemi, preparattaki silazapril miktarını tayin etmek için kullanılmıştır.



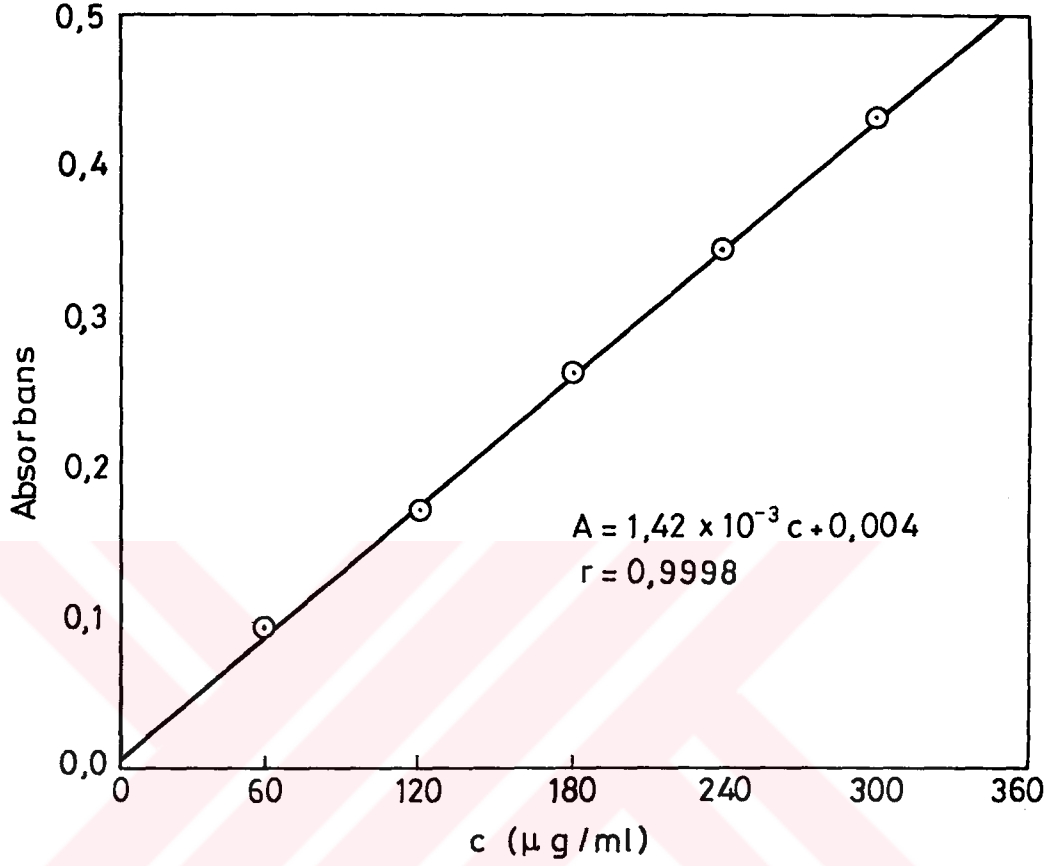
**Cetvel 4.20. Silazapril 'in spektrofotometrik analizi için
hazırlanan ölçü eğrilerinin absorbans değerleri
($\bar{A}$) ve regresyon analizleri ($\lambda=517$ nm)**

No	c $\mu\text{g.ml}^{-1}$	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	$\bar{A}$	S	%S
1	60	0,095	0,090	0,092	0,091	0,093	0,092	0,002	2,09
2	120	0,173	0,172	0,172	0,170	0,168	0,171	0,002	1,17
3	180	0,257	0,264	0,261	0,254	0,264	0,260	0,004	1,70
4	240	0,337	0,348	0,342	0,348	0,338	0,343	0,005	1,54
5	300	0,429	0,432	0,435	0,433	0,433	0,432	0,002	0,51
$A = 1,42 \times 10^{-3} c + 0,004$ $r = 0,9998$									

**Cetvel 4.21. Cetvel 4.20. deki ölçü eğrilerinin regresyon
analizlerine ait parametreler**

	a	b	r
1	$1,39 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-3}$	0,9996
2	$1,43 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3}$	0,9999
3	$1,43 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$	0,9997
4	$1,44 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	0,9996
5	$1,42 \times 10^{-3}$	$4,2 \times 10^{-3}$	0,9991
Ortalama	$1,42 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$	0,9998





Sekil 4.11. Silazapril 'in spektrofotometrik tayininde kullanılan ölçü eğrisi ($\lambda=517$ nm)

4.2.3. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Silazapril içeren tabletlerde bu ilaç maddesinin miktarı, bölüm 3.3.3.3. de anlatıldığı gibi çalışılarak, spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Silazapril, yeni bir ilaç maddesi olduğundan farmakopelerde yer almamıştır. Bu bakımdan



aynı tabletler, elde edilen sonuçların kıyaslanması amacıyla 209 nm de UV-spektrofotometrik yöntemle de analiz edilmiştir. Cetvel 4.22. de her iki yöntemle elde edilen sonuçlar ve 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ($\bar{x}$), standart sapma (s), bağıl standart sapma (%S) ve % 95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı [$\bar{x} \pm (t.s/\sqrt{n})$] değerleri verilmiştir.

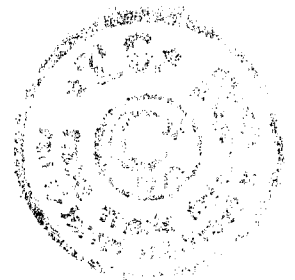
Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçlar, Student (t) testi ile ortalamalar, Fisher (F) testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Cetvel 4.22. de görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve 5 deneme için ilgili tablolarda (Chalmers, R.A. 1972) verilmiş olan değerlerden küçüktür. Bu durumda bu ilaç maddesinin analizinde, geliştirilen yöntem ile kıyas yöntemi olarak yararlanılan UV spektrofotometrik yöntem arasında, gerek doğruluk gerek presizyon yönünden anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır.



Cetvel 4.22. Inhibace Tabletlerinin^[**] Analizi

İstatistik Parametreler		Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem		UV Spektrofotometrik Yöntem	
		mg/tablet	%	mg/tablet	%
n	1	4,96	99,20	5,00	100,00
	2	5,03	100,60	5,06	101,20
	3	5,01	100,20	5,09	101,80
	4	5,13	102,60	5,07	101,40
	5	5,08	101,60	5,06	101,20
$\bar{x}$		5,04	100,84	5,06	101,12
S		0,06		0,03	
%S		1,29		0,66	
$\bar{x} \pm \frac{t.s}{\sqrt{n}}$		4,98-5,10		5,03-5,09	
t testi		0,54			
F testi		3,78			
$n_1 = n_2 = 5$ $P = 0,05$		$t_{tablo} = 2,31$		$F_{tablo} = 6,39$	

[**] Bir tablet, 5,0 mg silazapril içermektedir.



4.3. Hidroklorotiazid-Benazepril Hidroklorür ve Hidroklorotiazid-Silazapril Karışımlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analizi

Hidroklorotiazid, silazapril ve benazepril hidroklorür 'ün ters faz sıvı kromatografisi sisteminde alıkonma hacimlerine mobil fazın, pH ve organik çözücü oranının etkisi incelendi. Daha sonra bu karışımları içeren preparatlar, saptanan en uygun koşullarda sıvı kromatografisi ile analiz edildi.

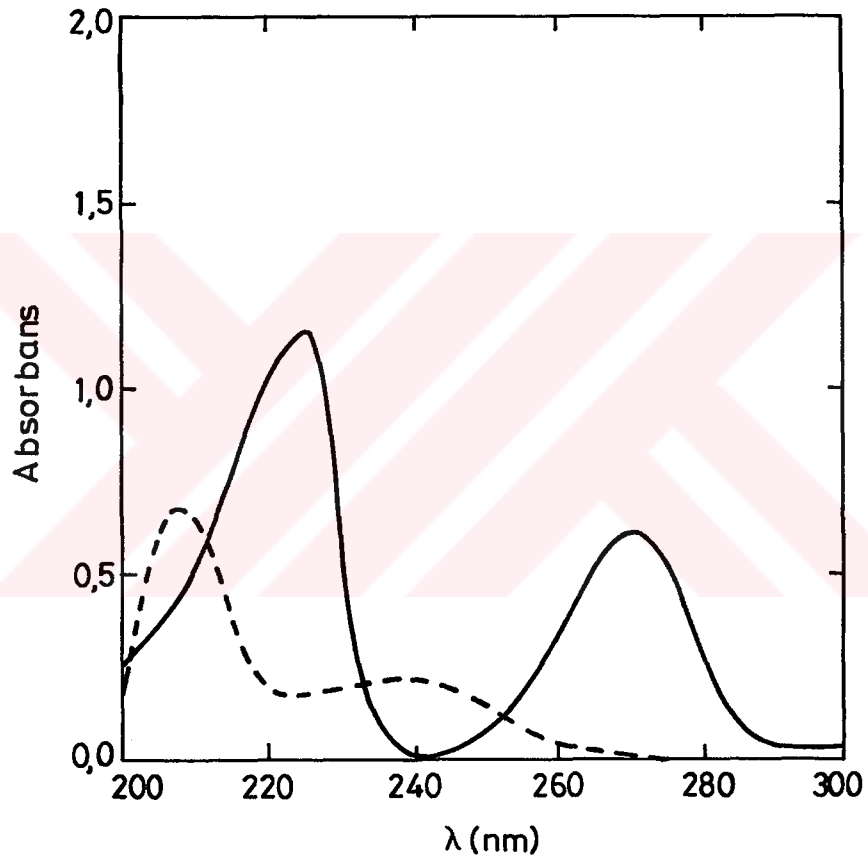
4.3.1. Detektör Dalga Boyu

Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımlarının analizinde detektör dalga boyunun saptanması için bölüm 3.3.5.1. de belirtildiği gibi hidroklorotiazid, silazapril ve benazepril hidroklorür 'ün metanol ve asetonytril içinde hazırlanan çözeltilerinin spektrumları alınmıştır. Hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorür 'ün metanol ve asetonytril içinde üst üste alınan spektrumları, şekil 4.12. ve şekil 4.13. de verilmiştir. Görüldüğü gibi iki çözücü içindeki spektrumlar, hemen hemen aynıdır. Genel olarak benazepril hidroklorür 'ün absorpsiyonu hidroklorotiazid 'e oranla düşüktür. 250 nm den sonraki bölgede benazepril hidroklorür 'ün absorpsiyonu çok zayıftır. Benazepril hidroklorür 'ün spektrumunda, 208,1 nm ve 240 nm de iki adet maksimum bulunmaktadır. 208,1 nm deki absorpti-



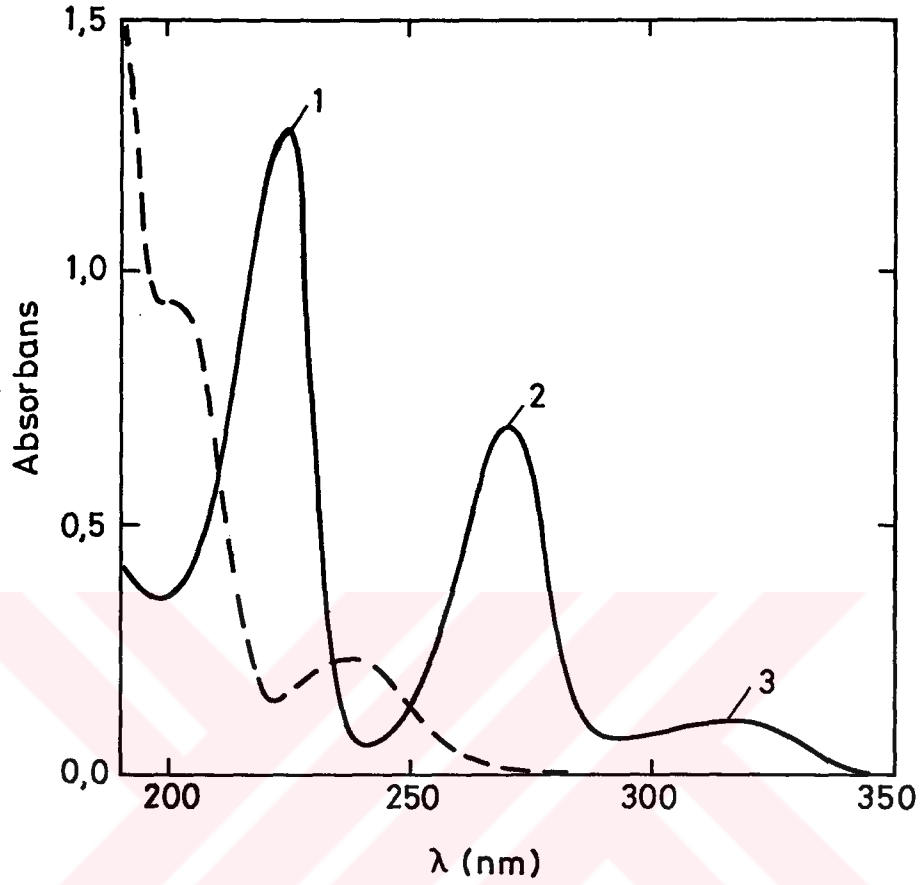
vite, 240 nm dekine oranla daha yüksektir ve ayrıca 240 nm de hidroklorotiazid 'in absorpsiyonu, sıfıra çok yakındır.

Bunlar gözönüne alınarak detektör dalga boyu, 209 nm olarak saptanmıştır.



Sekil 4.12. Hidroklorotiazid (—) ve benazepril hidroklorür 'ün (---) metanol içindeki çözeltilerinin ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$) absorpsiyon spektrumları

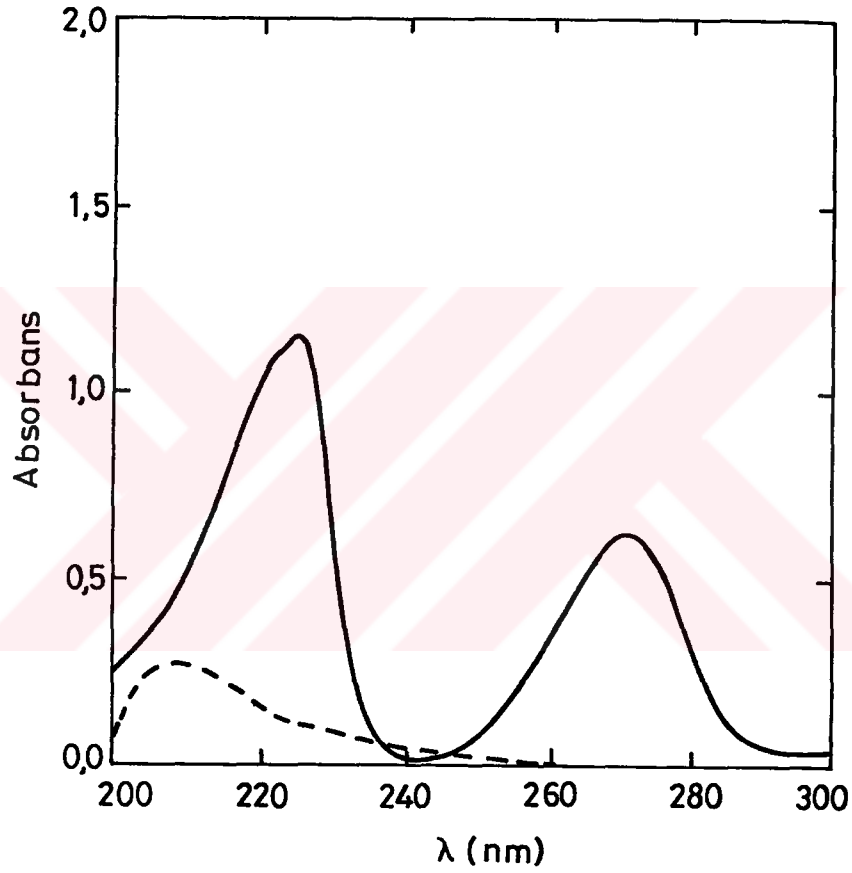




Sekil 4.13. Hidroklorotiazid (—) ve benazepril hidroklorür 'ün (---) asetonitril içindeki çözeltilerinin ($10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) absorpsiyon spektrumları

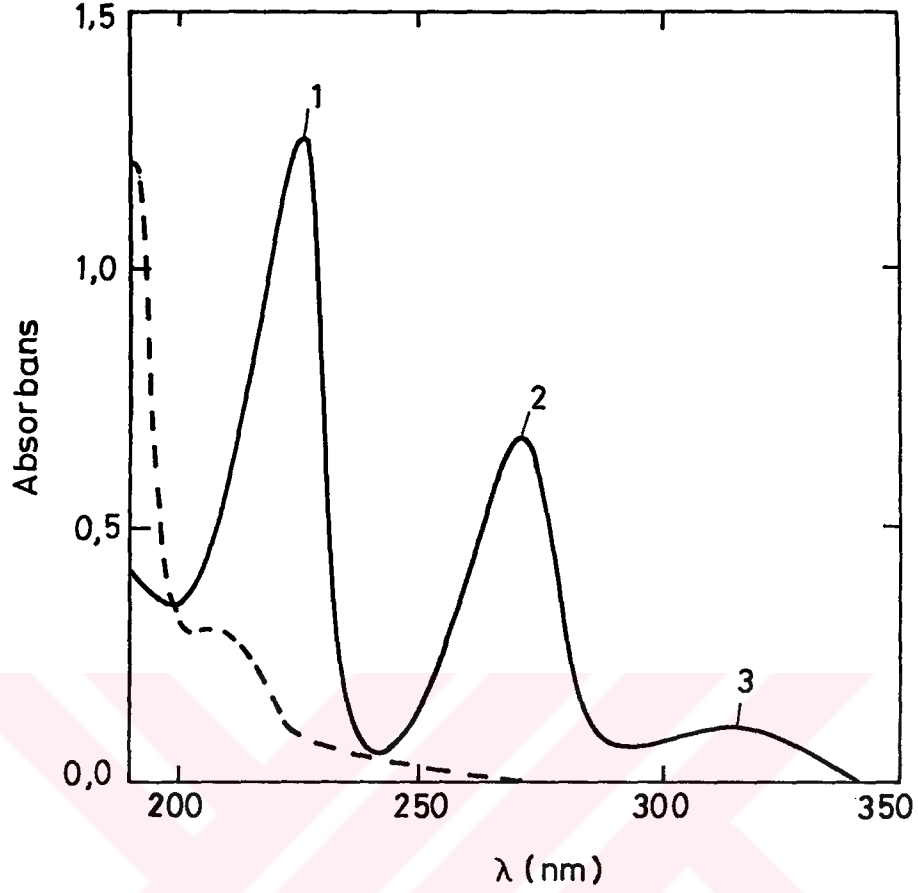
Hidroklorotiazid ve silazapril 'in metanol ve asetonitril içinde üst üste alınan spektrumları, şekil 4.14 ve şekil 4.15. de gösterilmektedir. Her iki çözücüdeki spektrumlarda hidroklorotiazid, 225 nm ve 270 nm de güçlü absorpsiyonlara sahip olan iki adet maksimum içermektedir. Silazapril ise 209 nm de hidroklorotiazid 'e oranla oldukça düşük absorptiviteye sahip olan bir maksimum vermektedir ve absorp-

siyonu, 209 nm nin üzerindeki dalga boylarında giderek azalmaktadır. Bu sebeple detektör dalga boyu, silazapril 'in maksimum absorpsiyon gösterdiği λ_{max} 'u olan 209 nm olarak saptanmıştır.



Sekil 4.14. Hidroklorotiazid (—) ve silazapril 'in (---) metanol içindeki çözeltilerinin ($10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) absorpsiyon spektrumları





Şekil 4.15. Hidroklorotiazid (—) ve silazapril 'in (---) asetonitril içindeki çözeltilerinin ($10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) absorpsiyon spektrumları

4.3.2. pH 'ın Alıkonma Zamanlarına Etkisi

Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımlarının ters faz kolonda ayrılmasında, mobil fazın pH 'ının etkisi incelendi. Bu amaçla mobil faz olarak, bölüm 3.3.5.2. de anlatıldığı gibi metanol ve aseto-

nitrilin pH 3-7 arasında hazırlanan 0,02 M fosfat tamponu çözeltileri ile, (80:20) oranındaki karışımları kullanılmış ve 1,0 ml.dak⁻¹ akış hızında elde edilen kromatogramlar incelenmiştir. Bu kromatogramlardan yararlanılarak, hidro-klorotiazid, benazepril hidroklorür ve silazapril 'in çeşitli pH 'larda kolondaki alıkonma hacimleri belirlenmiştir. Cetvel 4.23 de hidroklorotiazid 'in, mobil faz olarak metanol ve asetonyitrilin çeşitli pH 'larda tampon çözeltileri ile karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri yer almaktadır.

Cetvel 4.23. Hidroklorotiazid 'in alıkonma hacminin pH ile değişmesi

pH	3	4	5	6	7
Alıkonma Hacmi (ml)					
Metanol-Tampon Çözelti (80:20)	2,55	2,55	2,54	2,54	2,52
Asetonitril-Tampon Çözelti (80:20)	2,46	2,47	2,51	2,50	2,44

Cetvel 4.23. de görüldüğü gibi hidroklorotiazid 'in alıkonma hacimlerinde, değişen pH ile birlikte fazla bir değişiklik olmamaktadır. Asetonitril içeren mobil fazların kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri, metanol içeren mobil fazlara oranla biraz daha düşüktür.



Cetvel 4.24. de benazepril hidroklorür 'ün, mobil faz olarak metanol ve asetonitrilin çeşitli pH 'larda tampon çözeltileri ile karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri verilmiştir.

Cetvel 4.24. Benazepril hidroklorür 'ün alıkonma hacminin pH ile değişmesi

pH	3	4	5	6	7
Alıkonma Hacmi (ml)					
Metanol-Tampon Çözelti (80:20)	4,17	4,03	3,37	3,17	2,15
Asetonitril-Tampon Çözelti (80:20)	3,24	3,24	3,00	2,49	1,50

Cetvel 4.24. de görüldüğü gibi, benazepril hidroklorür 'ün alıkonma hacimleri, pH ile birlikte değişmektedir. Metanol içeren mobil fazların kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri, asetonitril içeren mobil fazlara oranla daha yüksektir. Alıkonma hacimleri, mobil fazın pH 'ının artmasıyla birlikte azalmaktadır. Özellikle pH:6 'dan sonra hızlı bir azalma olduğu görülmektedir.

Cetvel 4.25. de silazapril 'in, mobil faz olarak metanol ve asetonitrilin çeşitli pH 'larda tampon çözeltileri ile



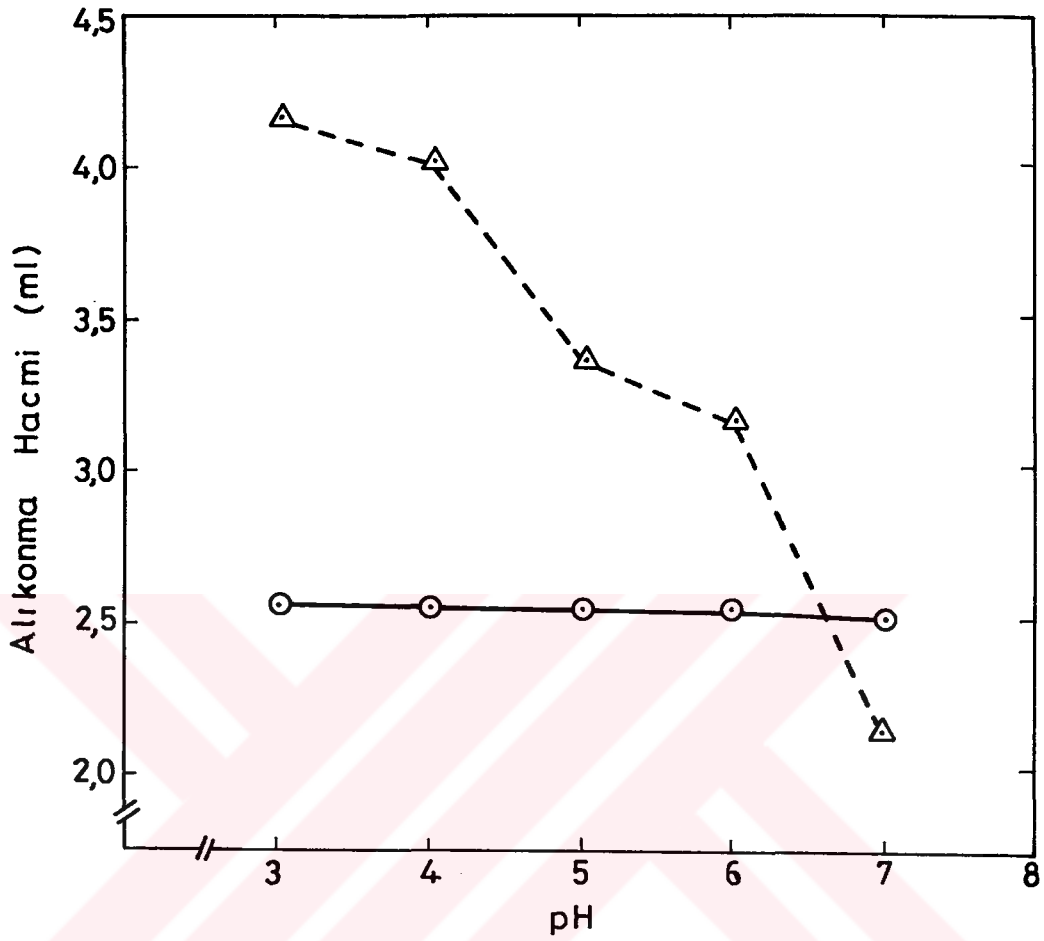
karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri gösterilmektedir.

Cetvel 4.25. Silazapril 'in alıkonma hacminin pH ile değişmesi

pH Alıkonma Hacmi (ml)	3	4	5	6	7
Metanol-Tampon Çözelti (80:20)	4,05	4,09	3,55	3,29	3,16
Asetonitril- Tampon Çözelti (80:20)	3,14	3,24	3,21	2,45	1,50

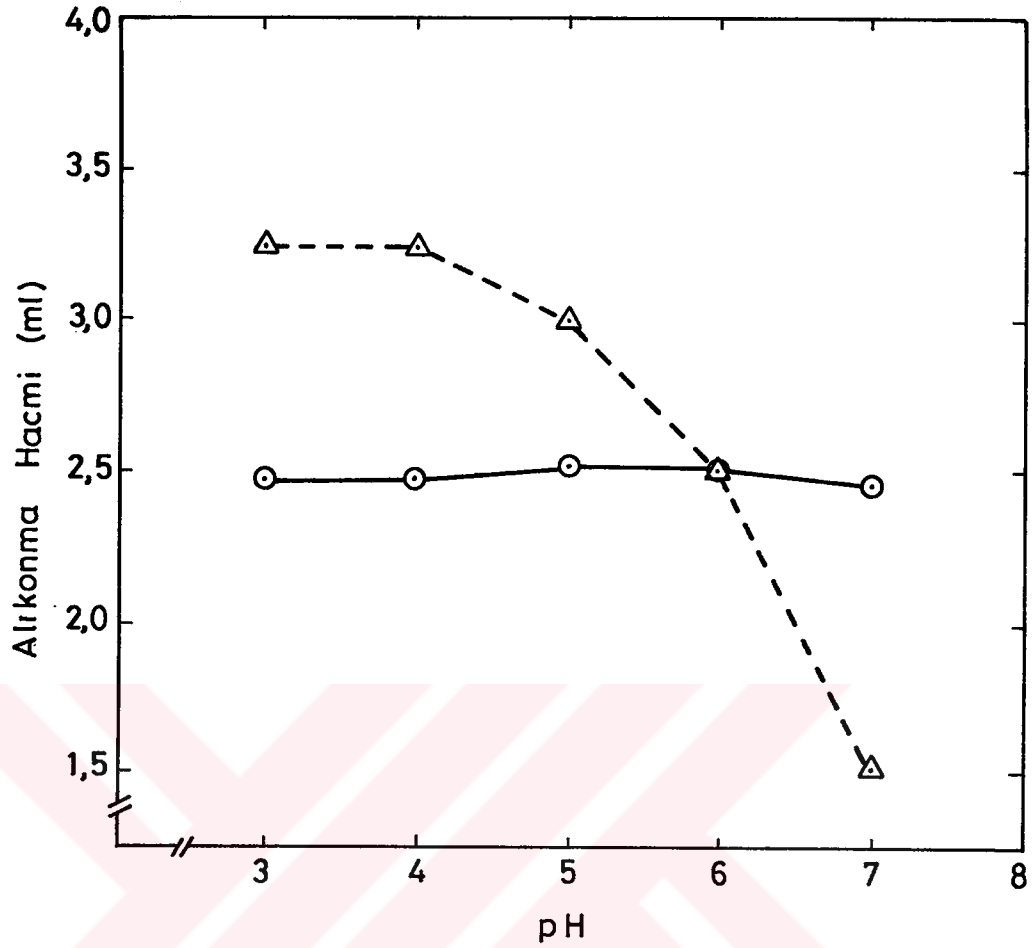
Silazapril 'in, metanol ve asetonitril içeren mobil fazlar kullanıldığında alıkonma hacimlerinde, pH:4 'ten sonra bir azalma olduğu belirlenmiştir. Asetonitril içeren mobil fazlar kullanıldığında özellikle pH:6 'dan sonra hızlı bir azalma olmaktadır. Metanol içeren mobil fazlar kullanıldığında, daha yüksek alıkonma hacimleri elde edilmiştir.

Şekil 4.16. da hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorür 'ün, mobil faz olarak, metanol-fosfat tamponu (80:20) çözeltileri karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile pH arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Sekil 4.16. Hidroklorotiazid (—) ve benazepril hidro-klorür 'ün (---) alıkonma hacimlerinin pH ile değişmesi (Mobil faz: Metanol-tampon çözelti (80:20))

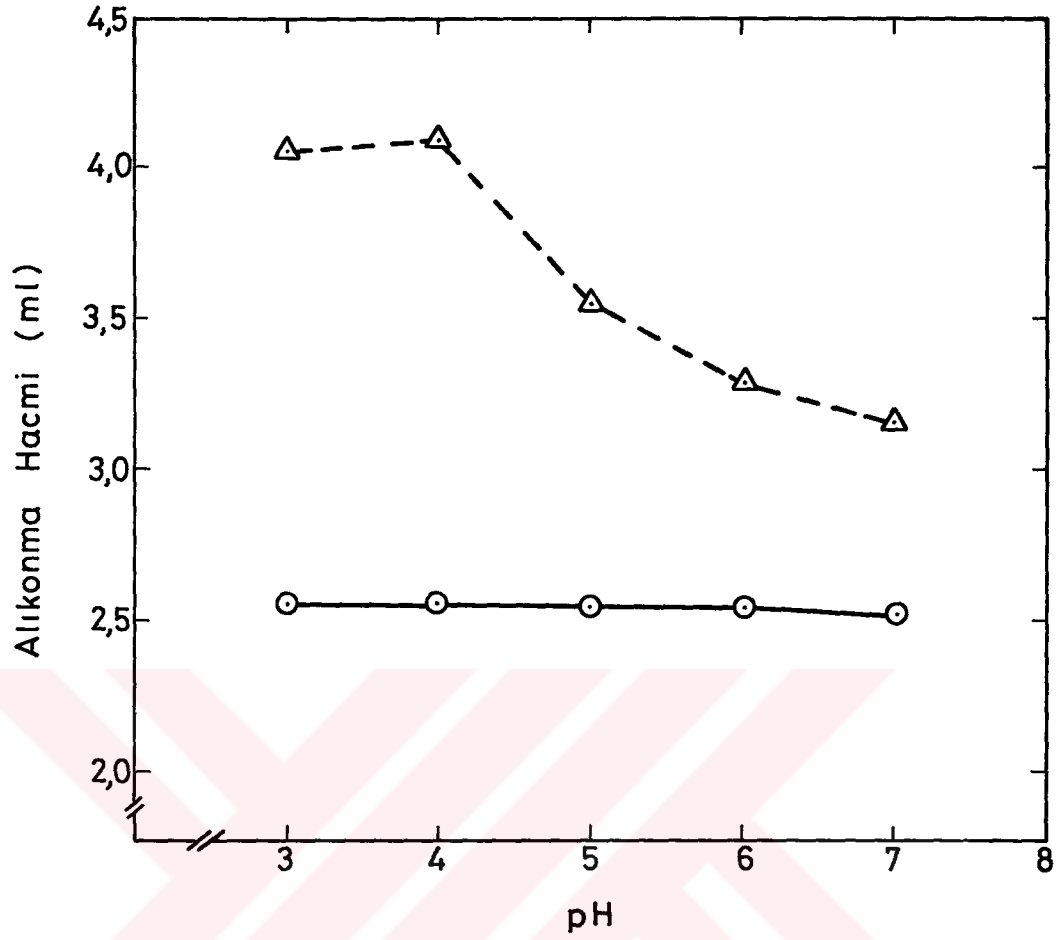
Sekil 4.17. de hidroklorotiazid ve benazepril hidro-klorür 'ün mobil faz olarak, asetinitril-fosfat tamponu (80:20) çözeltileri karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile pH arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Sekil 4.17. Hidroklorotiazid (—) ve benazepril hidroklorür 'ün (---) alıkonma hacimlerinin pH ile değişmesi (Mobil faz: Asetonitril-tampon çözelti (80:20))

Sekil 4.18. de hidroklorotiazid ve silazapril 'in, mobil faz olarak, metanol-fosfat tamponu (80:20) çözeltileri karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile pH arasındaki ilişki gösterilmektedir.

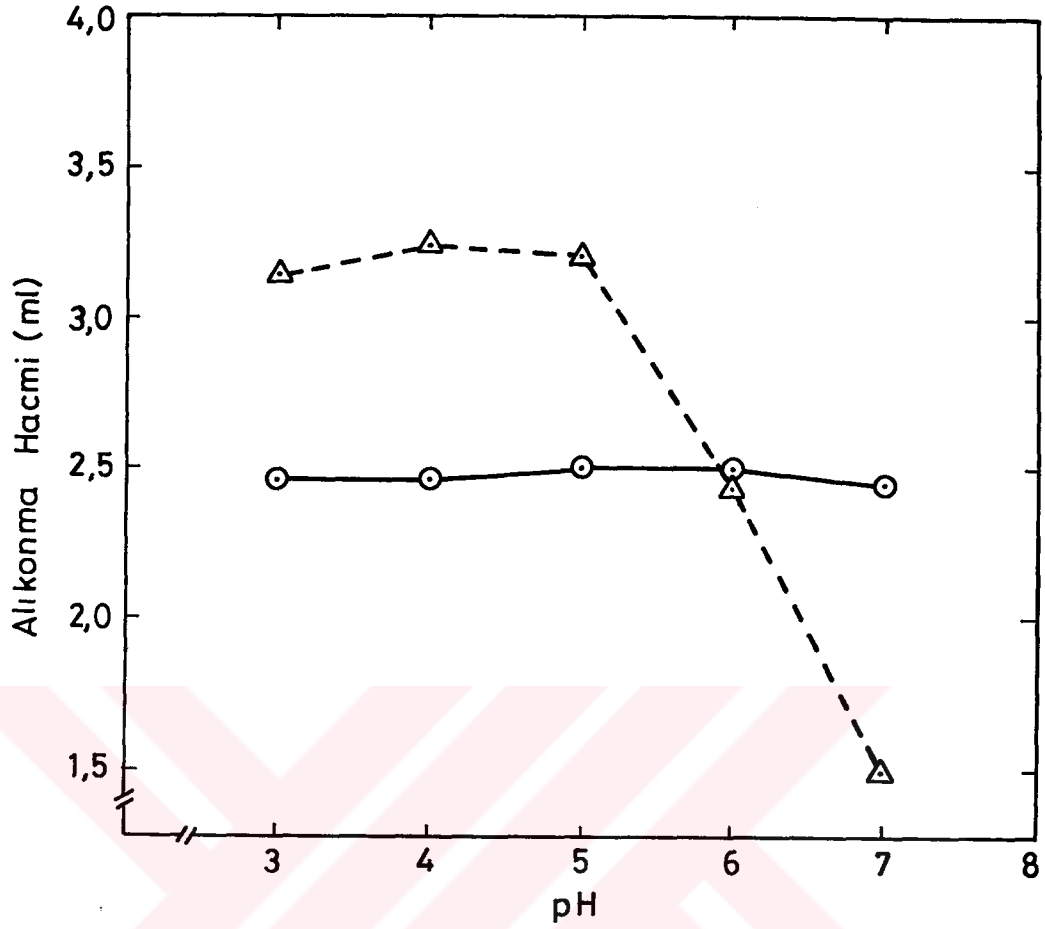




Sekil 4.18. Hidroklorotiazid (—) ve silazapril 'in (---) alıkonma hacimlerinin pH ile değişmesi (Mobil faz: Metanol-tampon çözelti (80:20))

Sekil 4.19. da, hidroklorotiazid ve silazapril 'in, mobil faz olarak asetonitril-fosfat tamponu (80:20) çözeltileri karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile pH arasındaki ilişki gösterilmektedir.





Sekil 4.19. Hidroklorotiazid (—) ve silazapril 'in (---) alıkonma hacimlerinin pH ile değişmesi (Mobil faz: Asetonitril-tampon çözelti (80:20))

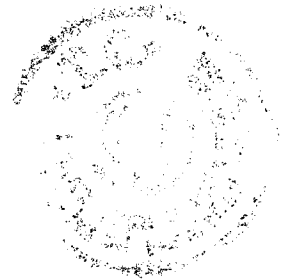
Cetvel ve şekiller üzerinde görüldüğü gibi, hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımlarının analizinde, metanol içeren mobil fazlar ile asetonitril içeren mobil fazlara göre daha iyi bir ayırma sağlanmaktadır. Mobil fazın pH 'ı yönünden bakıldığında pH düştükçe, madde çiftlerinin alıkonma hacimleri arasındaki fark artmaktadır. Nötral ortamda ise hidroklorotiazid 'in

değişmeyen alıkonma hacmine karşı, diğer iki maddenin hacmi azalmakta hatta, şekil 4.18. dışındaki grafiklerde durum tersine dönmektedir.

4.3.3. Mobil Fazdaki Organik Çözücü Oranının Alıkonma Zamanlarına Etkisi

Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril karışımlarının ters faz kolonda ayrılmasında, mobil fazdaki organik çözücü oranı ile ilaç maddelerinin alıkonma hacimleri arasındaki ilişki, bölüm 3.3.5.3. de anlatıldığı gibi pH:4,0 de incelendi. Bu amaçla, metanol veya asetonitrilin 0,02 M pH:4,0 fosfat tamponu çözeltisi ile çeşitli oranlarda karıştırılması ile elde edilen mobil fazlar kullanılmış ve alınan kromatogramların incelenmesiyle, silazapril, benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid 'in mobil fazdaki değişen organik çözücü oranlarına göre kolondaki alıkonma hacimleri belirlenmiştir.

Cetvel 4.26. 'da hidroklorotiazid 'in, mobil faz olarak metanol veya asetonitrilin 0,02 M pH:4,0 fosfat tamponu çözeltisi ile çeşitli oranlarda karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri yer almaktadır.

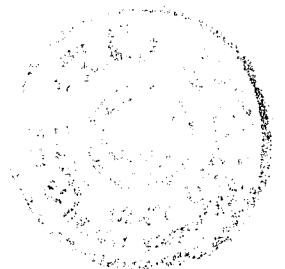


Cetvel 4.26. Hidroklorotiazid 'in alıkonma hacminin mobil faz oranı ile değişmesi (pH:4,0)

Mobil faz oranı % Alıkonma Hacmi (ml)	60	70	80
Metanol-Tampon Çözelti (pH:4,0)	3,02	2,56	2,55
Asetonitril- Tampon Çözelti (pH:4,0)	3,00	2,50	2,47

Cetvel 4.26. da görüldüğü gibi, hidroklorotiazid 'in metanol veya asetonitril içeren mobil fazlar ile elde edilen alıkonma hacimleri, mobil faz oranının değişmesi ile birlikte fazla bir değişiklik göstermemektedir ve birbirlerine çok yakındır. Mobil fazdaki organik çözücü miktarlarının artmasıyla birlikte alıkonma hacimlerinde hafif bir azalma olduğu görülmektedir.

Cetvel 4.27. de benazepril hidroklorür 'ün, mobil faz olarak, metanol veya asetonitrilin 0,02 M pH:4,0 fosfat tamponu çözeltisi ile çeşitli oranlardaki karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri verilmiştir.

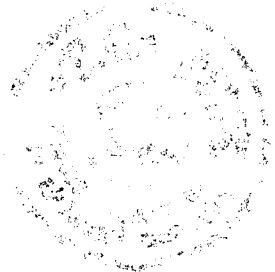


Cetvel 4.27. Benazepril hidroklorür 'ün alıkonma hacminin mobil faz oranı ile değişmesi (pH:4,0)

Mobil faz oranı % Alıkonma Hacmi (ml)	60	70	80
Metanol-Tampon Çözelti (pH:4,0)	12,04	5,34	4,03
Asetonitril-Tampon Çözelti (pH:4,0)	4,26	3,44	3,24

Cetvel 4.27 de görüldüğü gibi, metanol içeren mobil fazlarla elde edilen alıkonma hacimleri, asetonitril içeren mobil fazlara göre yüksektir. Alıkonma hacimleri, mobil fazdaki asetonitril miktarları ile fazla bir değişiklik göstermemektedir. Metanol içeren mobil fazlar kullanıldığında, mobil fazdaki metanol oranının % 60 'a düşürülmesiyle birlikte, benazepril hidroklorür 'ün alıkonma hacminde ani bir artış olmaktadır.

Cetvel 4.28. de silazapril 'in, mobil faz olarak, metanol veya asetonitrilin 0,02 M pH:4,0 fosfat tamponu çözeltisi ile çeşitli oranlardaki karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimlerine yer verilmiştir.

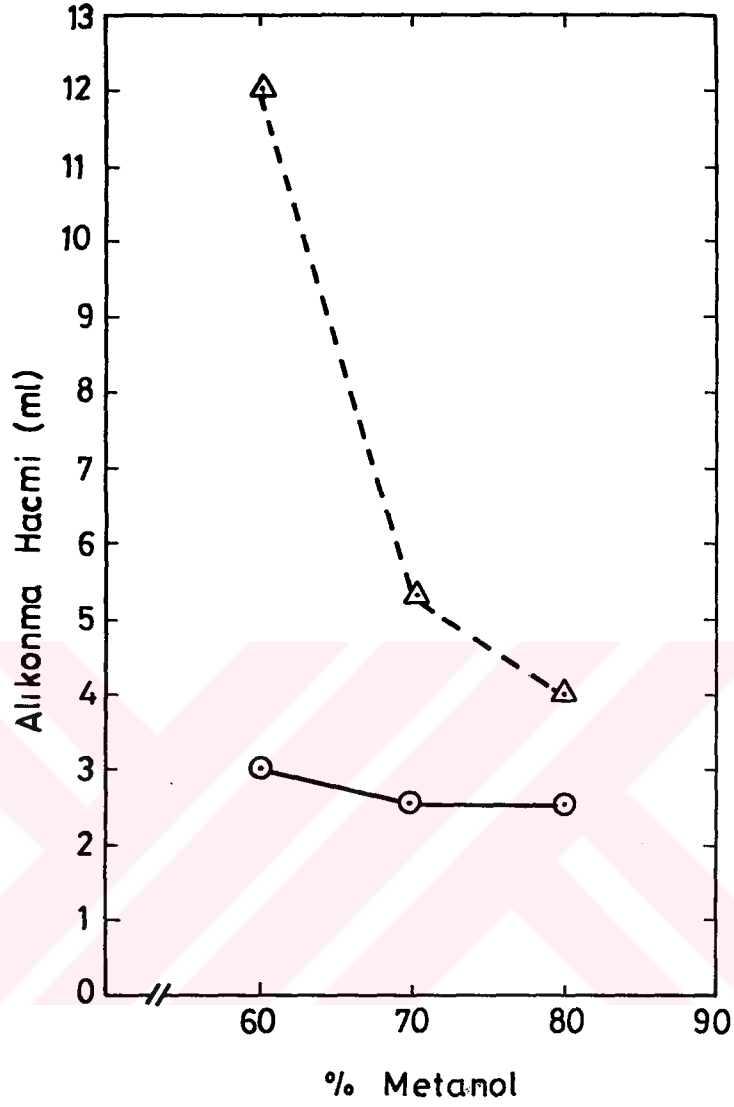


Cetvel 4.28. Silazapril 'in alıkonma hacminin mobil faz oranı ile değişmesi (pH:4,0)

Mobil faz oranı % Alıkonma Hacmi (ml)	60	70	80
Metanol-Tampon Çözelti (pH:4,0)	10,37	5,30	4,09
Asetonitril-Tampon Çözelti (pH:4,0)	4,02	3,46	3,24

Cetvel 4.28. de görüldüğü gibi, metanol içeren mobil fazlar ile elde edilen alıkonma hacimleri, asetonitril içerenlere göre yüksektir. Beklendiği gibi mobil fazdaki organik çözücü miktarlarının azalması ile, alıkonma hacimleri artmaktadır. Silazapril 'in alıkonma hacimleri, mobil fazdaki asetonitril miktarı ile fazla bir değişiklik göstermezken, metanol miktarının azalması ile hızlı bir artış göstermektedir. % 60 Metanol içeren mobil faz kullanıldığında alıkonma hacmi, 10,37 ml olmaktadır. Şekil 4.20 de hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorür 'ün, mobil faz olarak çeşitli oranlarda metanol-fosfat tamponu (pH:4,0) çözeltisi karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile mobil fazdaki organik çözücü oranları arasındaki ilişki gösterilmektedir.





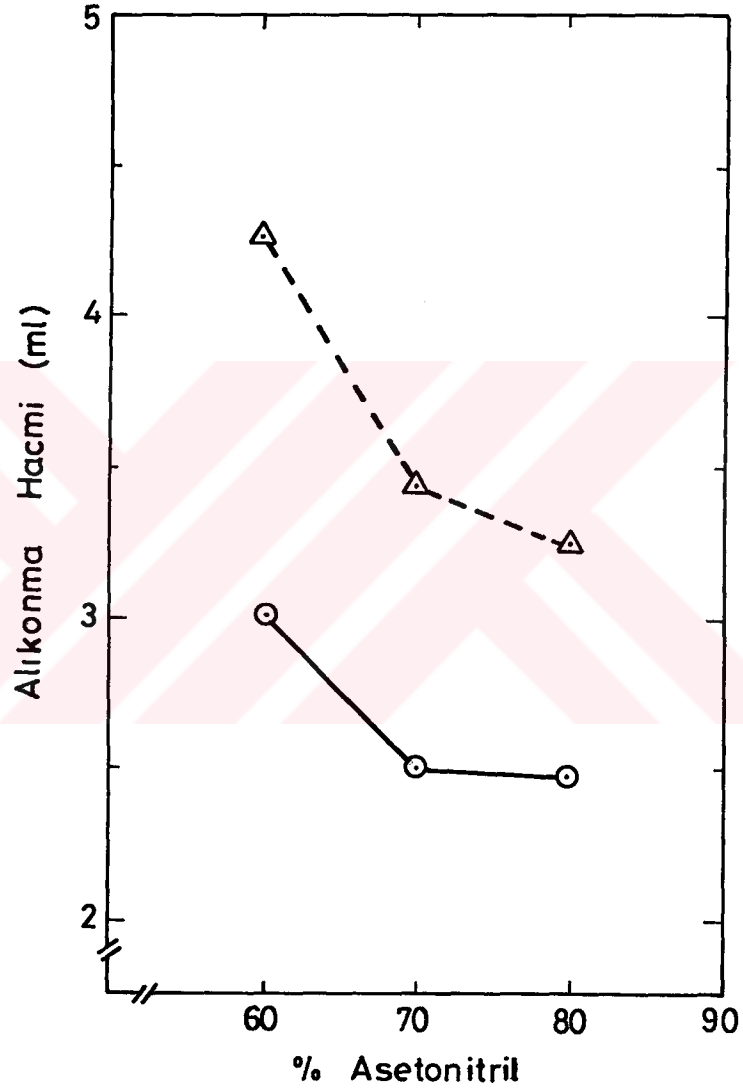
Sekil 4.20. Hidroklorotiazid (—) ve benazepril hidroklorür 'ün (---) alıkonma hacimlerinin metanol oranı ile değişmesi

(Mobil Faz: Metanol-tampon çözelti (pH:4,0))

Sekil 4.21. de hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorür 'ün, mobil faz olarak çeşitli oranlarda asetonyitril-



fosfat tamponu (pH:4,0) çözeltisi karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile mobil fazdaki organik çözücü oranları arasındaki ilişki gösterilmektedir.

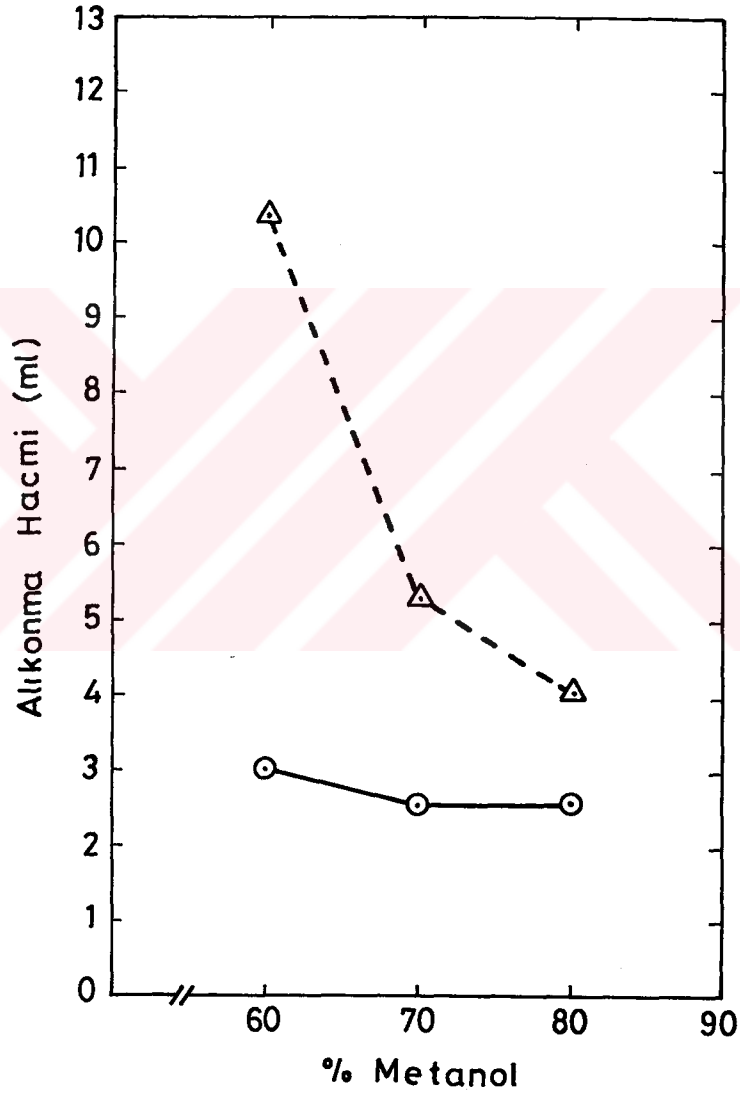


Sekil 4.21. Hidroklorotiazid (—) ve benazepril hidroklorür
'ün (---) alıkonma hacimlerinin asetonitril oranı
ile değişmesi

(Mobil Faz: Asetonitril-tampon çözelti (pH:4,0))



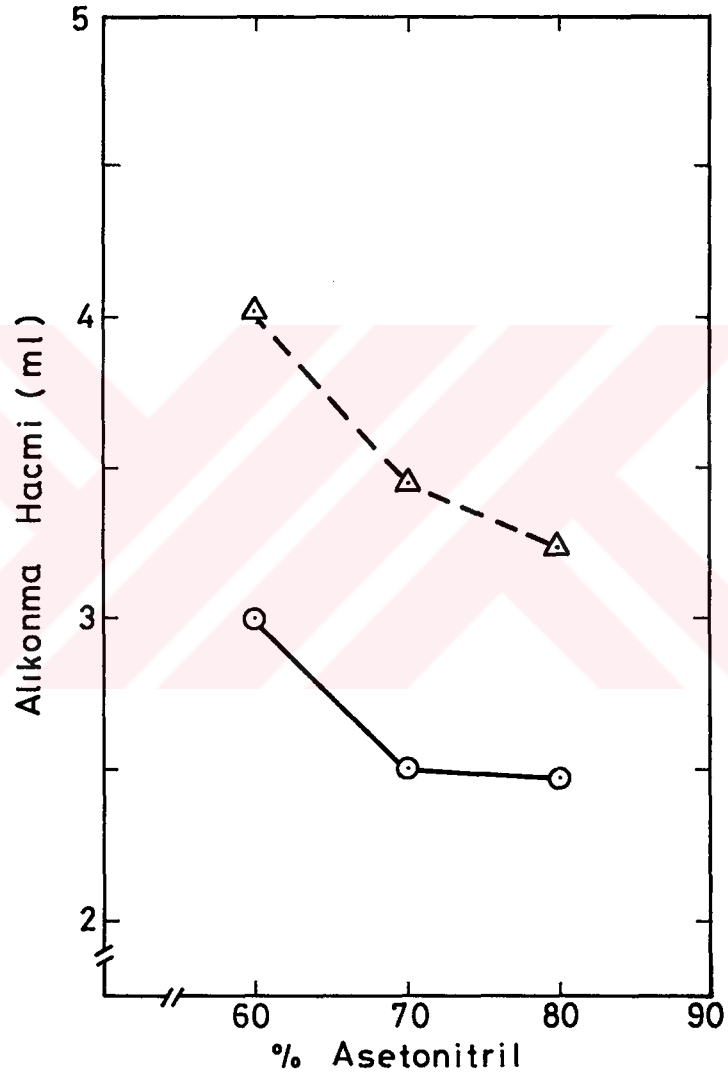
Sekil 4.22. de hidroklorotiazid ve silazapril 'in, mobil faz olarak çeşitli oranlarda metanol-fosfat tamponu (pH:4,0) çözeltisi karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile mobil fazdaki organik çözücü oranları arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Sekil 4.22. Hidroklorotiazid (—) ve silazapril 'in (---) alıkonma hacimlerinin metanol oranı ile değişmesi (Mobil Faz: Metanol-tampon çözelti (pH:4,0))



Şekil 4.23. de hidroklorotiazid ve silazapril 'in, mobil faz olarak çeşitli oranlarda asetronitril-fosfat tamponu (pH:4,0) çözeltisi karışımlarının kullanılmasıyla elde edilen alıkonma hacimleri ile mobil fazdaki organik çözücü oranları arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Şekil 4.23. Hidroklorotiazid (—) ve silazapril 'in (---) alıkonma hacimlerinin asetronitril oranı ile değişmesi

(Mobil Faz: Asetonitril-tampon çözelti (pH:4,0))



Sekillerde görüldüğü gibi, mobil fazdaki organik çözücü oranı azaldığında asetoneitrilde madde çiftlerinin alıkonma hacimlerindeki artma paralel olmakta, buna karşın metanolde, hidroklorotiazid 'de fazla bir değişme olmazken benazepril hidroklorür ve silazapril 'de artış hızlı olmaktadır.

4.3.4. Kantitatif Analiz

Önceki üç bölümde verilen cetvel ve şekillerde görüldüğü gibi, hidroklorotiazid-silazapril ve hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür karışımlarının analizi için asetoneitril-tampon çözelti (pH:4,0) karışımlarından oluşan mobil fazlar yeterince uygun değildir. Çünkü şekil 4.21. ve şekil 4.23. de görüldüğü gibi, incelenen tüm oranlarda her iki karışımı oluşturan ilaç maddelerinin alıkonma hacimleri, birbirlerine oldukça yakındır. Bunun yanı sıra, her iki karışımın analizinde, metanol-tampon çözelti (pH:4,0) karışımlarından oluşan mobil fazlarla çok daha iyi bir ayırma sağlanmaktadır. Şekil 4.20. ve şekil 4.23. de görüldüğü gibi karışımları oluşturan ilaç maddelerinin alıkonma hacimleri, çeşitli mobil faz oranlarında belirgin farklılıklar göstermektedir.

Her iki karışımın analizinde % 60 metanol içeren mobil fazlar kullanıldığında, silazapril ve benazepril hidroklorür 'ün alıkonma hacimleri, 10 dakikayı geçmektedir. % 70 metanol içeren mobil fazlar ile kantitatif analizler için yeterince iyi ayırmalar sağlandığı belirlenmiştir. Bu bakımdan kantita-



tif analiz için, metanol-pH:4,0 fosfat tamponu çözeltisi (70:30) karışımı kullanıldı. Bunun yanısıra, pH:6,0 ve pH:7,0 'de ekonomik olması bakımından daha az metanol 'ün kullanıldığı metanol-fosfat tamponu çözeltisi (60:40) karışımları ile de çalışılabilirdi. Ancak bu pH 'larda silazapril, benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid 'e ait olan piklerde genişleme görülmüştür.

Kantitatif analiz, iç standart tekniği ile gerçekleştirildi. Her iki karışım için en uygun iç standart madde olarak, fenobarbital seçildi.

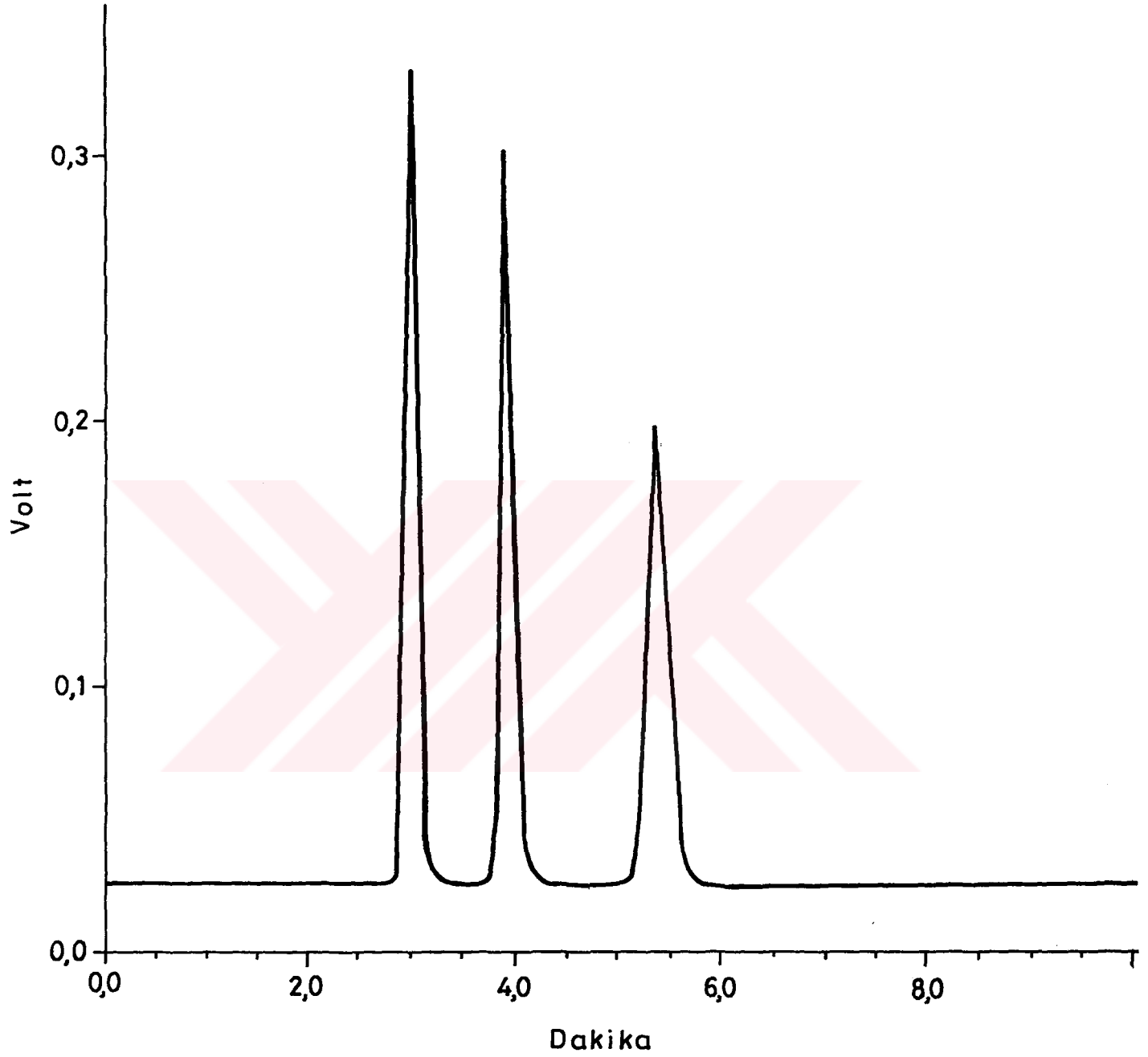
Hidroklorotiazid, fenobarbital, silazapril ve benazepril hidroklorür için elde edilen analitik piklerin alıkonma zamanları sırasıyla, 2,56 ; 3,53 ; 5,30 ve 5,34 dakika olarak belirlendi. 1,0 ml.dak⁻¹ akış hızında (1500 PSI basınçta) çalışılarak, 0,625 µg hidroklorotiazid, fenobarbital, benazepril hidroklorür ve 0,625 µg hidroklorotiazid, fenobarbital, silazapril ile elde edilen kromatogramlar, şekil 4.24. ve şekil 4.25. de verilmiştir.

4.3.4.1. Ölçü Egrileri

4.3.4.1.a. Hidroklorotiazid 'in Ölçü Egrisi

Enjekte edilen hidroklorotiazid miktarı ile hidroklorotiazid ve iç standart madde olan fenobarbital 'in pik alanları oranı arasındaki ilişki, 0,250-0,750 µg aralığında

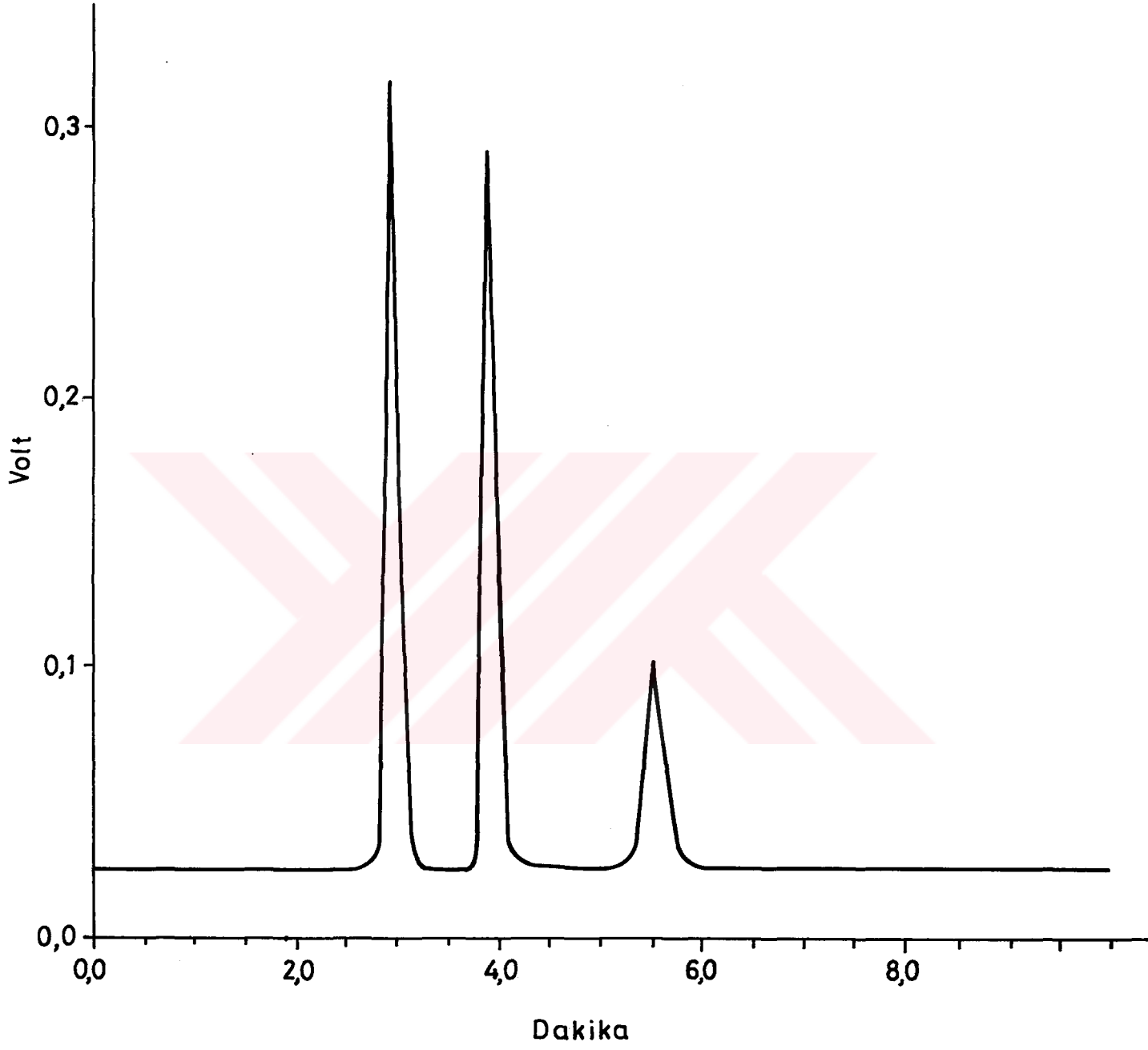




Sekil 4.24. Optimum koşullarda elde edilen kromatogram

(Konsantrasyon : 0,625 µg/25µl hidroklorotiazid,
fenobarbital ve benazepril hidroklorür; A.u.f.s.=0,1)





Sekil 4.25. Optimum koşullarda elde edilen kromatogram

(Konsantrasyon : 0,625 $\mu\text{g}/25\mu\text{l}$ hidroklorotiazid,
fenobarbital ve silazapril; A.u.f.s.=0,1)



incelendi. Bu amaçla, bölüm 3.3.5.4.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak bulunan pik alanları oranı ($\bar{A}$) değerleri, cetvel 4.29. da verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler, cetvel 4.30. da görülmektedir. Ortalama pik alanları oranı değerlerinden çizilen ölçü eğrisi, şekil 4.26. da yer almaktadır. Bu eğriye ait doğru denklemi, analiz örneğindeki hidroklorotiazid miktarını tayin etmek için kullanılmıştır.

Cetvel 4.29. Hidroklorotiazid 'in sıvı kromatografik analizi için hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alanları oranı değerleri ($\bar{A}$) ve regresyon analizi

No	Hidro- kloro- tiazid $\mu\text{g}/25\mu\text{l}$	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	$\bar{A}$	S	%S
1	0,250	0,871	0,885	0,866	0,879	0,894	0,879	0,011	1,264
2	0,375	1,266	1,277	1,295	1,290	1,282	1,282	0,011	0,884
3	0,500	1,694	1,697	1,690	1,682	1,687	1,690	0,006	0,348
4	0,625	2,102	2,104	2,086	2,105	2,113	2,102	0,009	0,469
5	0,750	2,483	2,495	2,486	2,466	2,545	2,495	0,030	1,197
$A = 3,242 c + 0,069$ $r = 0,9999$									$c : \mu\text{g}/25\mu\text{l}$



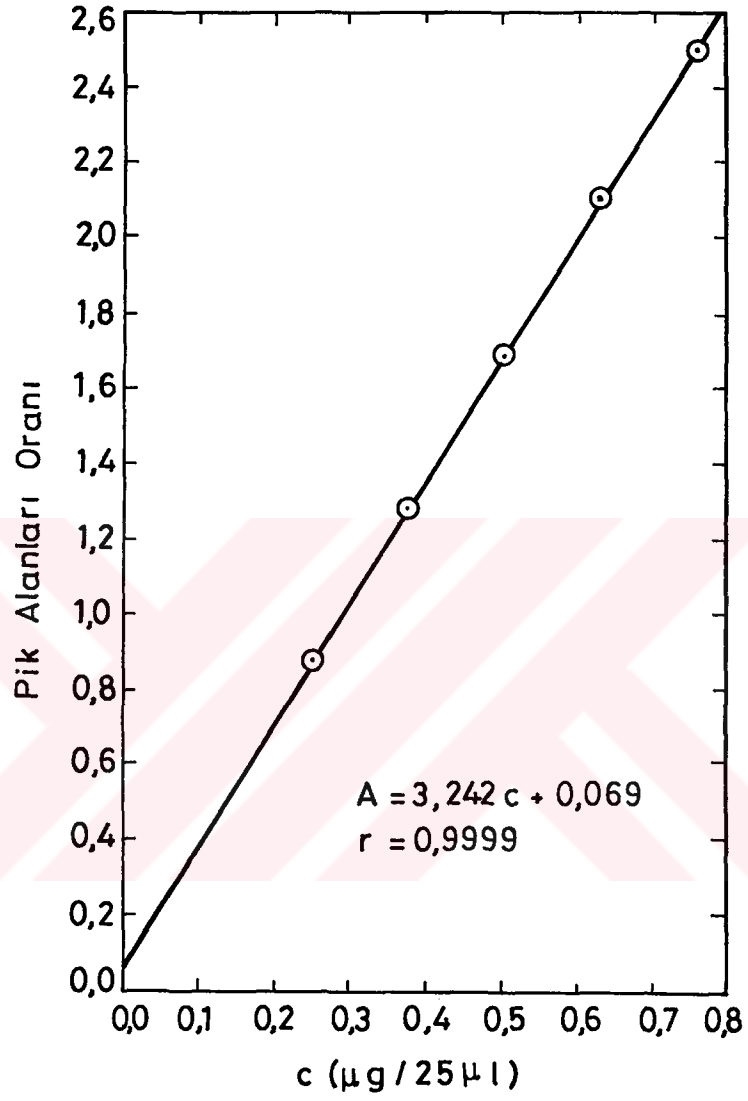
Cetvel 4.30. Cetvel 4.29. daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	a	b	r
1	3,248	0,059	0,9998
2	3,238	0,073	0,9999
3	3,225	0,072	0,9999
4	3,191	0,089	0,9997
5	3,306	0,051	0,9997
Ortalama	3,242	0,069	0,9999

4.3.4.1.b. Benazepril Hidroklorür 'ün Ölçü Eğrisi

Enjekte edilen benazepril hidroklorür miktarı ile benazepril hidroklorür ve iç standart madde olan fenobarbital 'in pik alanları oranı arasındaki ilişki, 0,1250-0,3750 µg aralığında incelendi. Bölüm 3.3.5.4.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak bulunan pik alanı oranları değerleri, cetvel 4.31. de verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler, cetvel 4.32. de görülmektedir. Ortalama pik alanı oranları değerlerinden çizilen ölçü eğrisi, şekil 4.27. de yer almaktadır. Bu eğriye ait doğru denklemi, analiz örneğindeki benazepril hidroklorür miktarını tayin etmek için kullanılmıştır.





Sekil 4.26. Hidroklorotiazid 'in sıvı kromatografik analizi için hazırlanan ölçü eğrisi



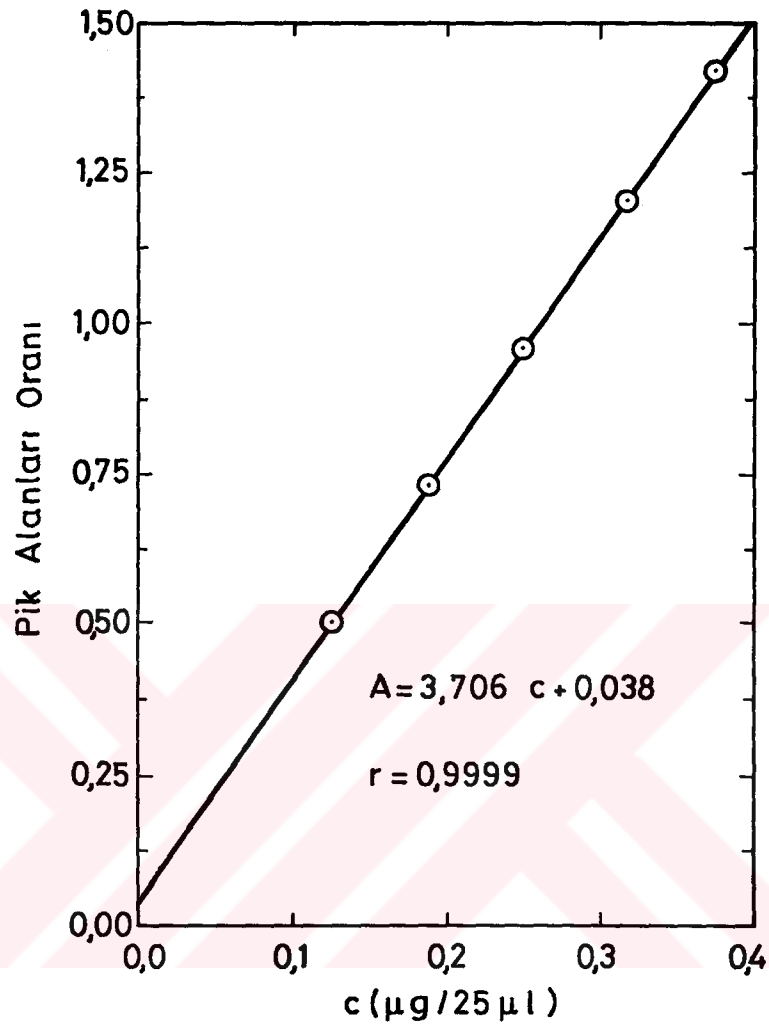
Cetvel 4.31. Benazepril Hidroklorür 'ün sıvı kromatografik analizi için hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alanı oranları değerleri ($\bar{A}$) ve regresyon analizi

No	Bena- zepril HCl $\mu\text{g}/25\mu\text{l}$	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	$\bar{A}$	S	%S
1	0,1250	0,499	0,503	0,517	0,490	0,506	0,503	0,009	1,963
2	0,1875	0,746	0,719	0,740	0,730	0,715	0,730	0,013	1,815
3	0,2500	0,960	0,958	0,974	0,959	0,949	0,960	0,009	0,935
4	0,3125	1,208	1,205	1,198	1,202	1,197	1,202	0,005	0,386
5	0,3750	1,429	1,431	1,425	1,440	1,400	1,425	0,015	1,054
$A = 3,706 c + 0,038$ $r = 0,9999$									$c : \mu\text{g}/25\mu\text{l}$

Cetvel 4.32. Cetvel 4.31. deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	a	b	r
1	3,715	0,040	0,9998
2	3,747	0,026	0,9998
3	3,638	0,061	0,9999
4	3,795	0,015	0,9999
5	3,632	0,045	0,9995
Ortalama	3,706	0,038	0,9999





Şekil 4.27. Benazepril hidroklorür 'ün sıvı kromatografik analizi için hazırlanan ölçü eğrisi

4.3.4.1.c. Silazapril 'in Ölçü Eğrisi

Enjekte edilen silazapril miktarı ile silazapril ve iç standart madde olan fenobarbital 'in pik alanları oranı arasındaki ilişki, 0,1250-0,3750 µg aralığında incelendi. Bu amaçla, bölüm 3.3.5.4.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak bu-



lunan pik alanları oranı değerleri, cetvel 4.33. de verilmiştir. Bu değerlerle oluşturulan ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler, cetvel 4.34. de görülmektedir. Ortalama pik alanları oranı değerlerinden çizilen ölçü eğrisi, şekil 4.28. de yer almaktadır. Bu eğriye ait doğru denklemi, analiz örneğindeki silazapril miktarını tayin etmek için kullanılmıştır.

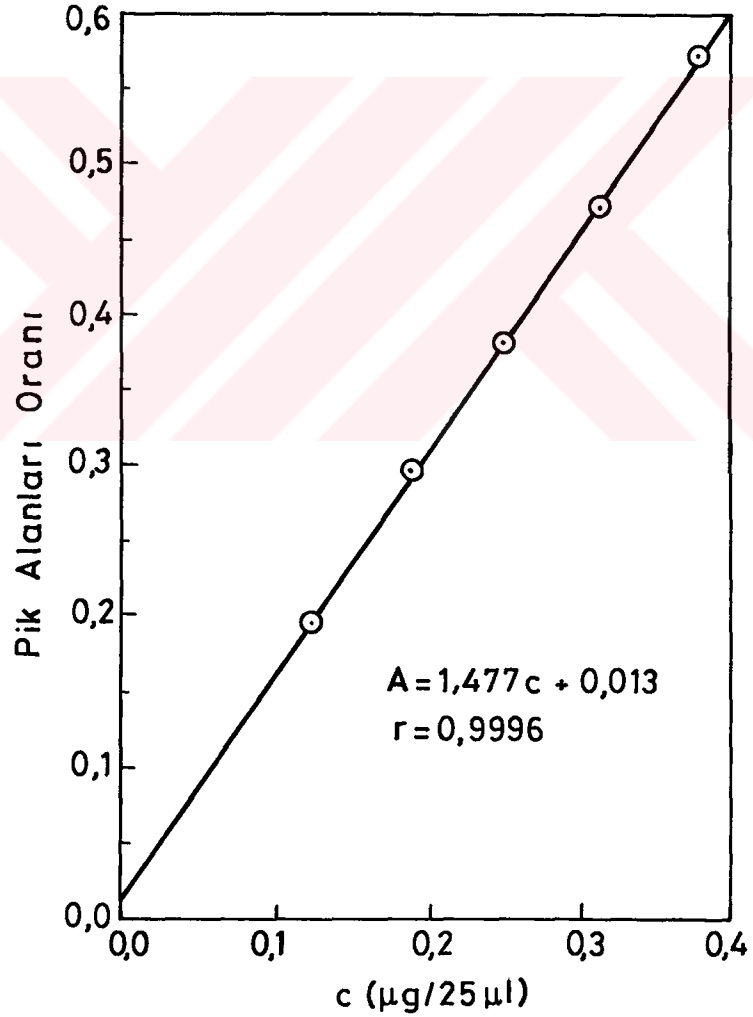
Cetvel 4.33. Silazapril 'in sıvı kromatografik analizi için hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alanları oranı değerleri ($\bar{A}$) ve regresyon analizi

No	Sila- zapril $\mu\text{g}/25\mu\text{l}$	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	$\bar{A}$	S	%S
1	0,1250	0,192	0,197	0,199	0,196	0,201	0,197	0,003	1,721
2	0,1875	0,295	0,299	0,300	0,292	0,289	0,295	0,005	1,572
3	0,2500	0,388	0,381	0,374	0,387	0,370	0,380	0,008	2,080
4	0,3125	0,474	0,469	0,477	0,470	0,460	0,470	0,006	1,371
5	0,3750	0,567	0,564	0,586	0,572	0,566	0,571	0,009	1,557
$A = 1,477 c + 0,013$ $r = 0,9996$									$c : \mu\text{g}/25\mu\text{l}$



Cetvel 4.34. Cetvel 4.33. deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	a	b	r
1	1,486	0,012	0,9995
2	1,446	0,020	0,9995
3	1,522	0,007	0,9981
4	1,488	0,011	0,9996
5	1,442	0,017	0,9988
Ortalama	1,477	0,013	0,9996



Sekil 4.28. Silazapril 'in sıvı kromatografik analizi için hazırlanan ölçü eğrisi



4.3.4.2. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemleri ile Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

Hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid-silazapril 'i birarada içeren ticari preparatlarda, bu ilaç maddelerinin miktarı, bölüm 3.3.5.4.3. de anlatıldığı gibi çalışılarak, sıvı kromatografisi yöntemiyle tayin edildi. Benazepril ve silazapril, yeni bir ilaç maddesi olduklarından henüz farmakopelerde yer almamıştır. Bu bakımdan elde edilen sonuçlar, türev UV-spektrofotometrisi ile elde edilenlerle karşılaştırıldı. Bu amaçla, aynı preparatlar türev spektrofotometrisi yöntemi ile de analiz edildi (Bora, O. 1996). Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar ve 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ($\bar{x}$), standart sapma (s), bağıl standart sapma (%S) ve % 95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı [$\bar{x} \pm (t.s/\sqrt{n})$], değerleri, cetvel 4.35. ve cetvel 4.36. da verilmiştir.

Geliştirilen yöntemler ve kıyas yöntemleriyle elde edilen sonuçlar, Student (t) testi ile ortalamalar, Fisher (F) testi ile presizyonlar yönünden % 95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Cetvel 4.35. ve cetvel 4.36. da görüldüğü gibi hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve 5 deneme için ilgili tablolarda (Chalmers, R.A. 1972) verilmiş olan değerlerden küçüktür. Bu durumda her iki preparat içinde bulunan ilaç maddelerinin analizinde geliştirilen yöntemler



ile kıyas yöntemi olan türev spektrofotometrik yöntemler arasında, gerek doğruluk gerek presizyon yönünden anlamlı bir fark bulunmadığı ortaya çıkmıştır.



Cetvel 4.35. Cibadrex Tabletlerinin^[**] Analizi

İstatistik Parametre-ler		HİDROKLOROTİAZİD				BENAZEPRİL HİDROKLORÜR			
		HPLC Yöntemi		Türev Spektro- fotometrik yöntem		HPLC Yöntemi		Türev Spektro- fotometrik yöntem	
		mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%
n	1	12,58	100,64	12,51	100,08	10,08	100,80	10,04	100,40
	2	12,47	99,76	12,49	99,92	9,94	99,40	9,98	99,80
	3	12,48	99,84	12,45	99,60	9,97	99,70	9,92	99,20
	4	12,49	99,92	12,48	99,84	10,05	100,50	9,95	99,50
	5	12,52	100,16	12,48	99,84	9,96	99,60	9,94	99,40
$\bar{x}$		12,51	100,06	12,48	99,86	10,00	100,00	9,97	99,66
s		0,04		0,02		0,06		0,05	
%S		0,32		0,16		0,60		0,50	
$\bar{x} \pm t.s/\sqrt{n}$		12,47-12,55		12,46-12,50		9,94-10,06		9,92-10,02	
t testi		1,22				0,78			
F testi		4,00				1,72			
n ₁ = n ₂ = 5									
p = 0,05									
t _{tablo} = 2,31									
F _{tablo} = 6,39									

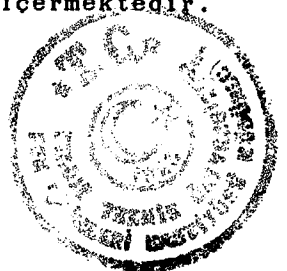
[**] Bir tablet, 12,5 mg hidroklorotiazid ve 10,0 mg benazepril hidroklorür içermektedir.



Cetvel 4.36. Inhibace-Plus Tabletlerinin^[1] Analizi

İstatistik Parametre-ler		HİDROKLOROTİAZİD				SİLAZAPRİL			
		HPLC Yöntemi		Türev Spektro- fotometrik yöntem		HPLC Yöntemi		Türev Spektro- fotometrik yöntem	
		mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%
n	1	12,50	100,00	12,52	100,16	5,00	100,00	4,97	99,40
	2	12,45	99,60	12,50	100,00	4,95	99,00	4,97	99,40
	3	12,52	100,16	12,51	100,08	4,94	98,80	4,96	99,20
	4	12,41	99,28	12,42	99,36	4,92	98,40	4,94	98,80
	5	12,36	98,88	12,52	100,16	4,96	99,20	4,96	99,20
$\bar{x}$		12,45	99,58	12,49	99,95	4,95	99,08	4,96	99,20
s		0,065		0,042		0,029		0,012	
%S		0,48		0,32		0,61		0,20	
$\bar{x} \pm t.s/\sqrt{n}$		12,39-12,51		12,45-12,53		4,92-4,98		4,95-4,97	
t testi		1,03				0,62			
F testi		2,39				5,84			
n ₁ = n ₂ = 5									
p = 0,05									
t _{tablo} = 2,31									
F _{tablo} = 6,39									

[1] Bir tablet, 12,5 mg hidroklorotiazid ve 5,0 mg silazapril içermektedir.



5. TARTIŞMA

Amlodipin 'in analizi için duyarlı bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi amaçlandığında bu maddenin amino grubunun NQS ile kondensasyonu ile renkli türev oluşturulması düşünüldü. NQS ile aminler arasındaki kondensasyon reaksiyonu birçok araştırmaya konu olmuş oldukça bilinen bir reaksiyondur. Reaksiyonun oluşmasında ortamın pH 'ı çok önemlidir. Alifatik aminler durumunda bazik, aromatik aminler durumunda ise asidik ortamda gerçekleşmektedir. Bazı çalışmalarda tamponun cinsinin de etkili olduğu bildirilmiştir. Genellikle bir süre ısıtılması gerekir. Bizim incelemelerimizde de bunlara paralel sonuçlar alınmıştır. pH:10,0 da ve fosfat tamponu ile en yüksek absorbands değeri elde edilmiştir. Reaksiyonun 60 °C ye kadar olan sıcaklıklarda 40 dakikada bile tamamlanmadığı, 70 °C de 20 dakikada en yüksek absorbandsa ulaşıldığı görülmüştür. Gerekli NQS miktarı, mol oranları yönünden (36 kat) diğer araştırmacıların bulgularına oranla yüksek görünmektedir. Reaksiyon ürününün sulu ortamdan ekstraksiyonu için genellikle n-bütanol yada kloroform veya diklorethan gibi



cözücülerle karışımlarının kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada da en iyi sonuç, n-bütanol ile elde edilmiştir. Türevin dayanıklılığı genelde olduğu gibi amlodipin için de iyidir. Konsantrasyon ile absorbands arasındaki ilişki, absorbands değerlerinin 0,150 ile 0,750 arasında olduğu aralıkta incelenmiştir. Bu aralıkta amlodipin besilat konsantrasyonu (15-75) $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dir. Bu değerler biraz yüksek görünmekle birlikte, bunda ilaç maddesinin molekül ağırlığının yüksek olmasının rolünün bulunduğu da düşünülebilir. Geliştirdiğimiz analiz yöntemi, amlodipin için görünür alanda spektrofotometrik analize imkan verecek ilk yöntem olmaktadır. Literatürde amlodipin 'in buna benzer bir yöntemle analizi bulunmamaktadır. Bu bakımdan seçicilik ve duyarlık yönünden bir karşılaştırma olanağı söz konusu olamamaktadır.

Silazapril, ülkemizde kullanılan ACE inhibitörlerinden biridir. Bu grupta kimyasal yapı bakımından birbirine benzeyen benazepril, perindopril, enalapril, fosinopril, lisinopril ve ramipril adlı ilaç maddeleri bulunmaktadır. Bu maddelerin tümünün UV absorpsiyonları, yapıları gereği oldukça düşük dalga boyundadır. Bu yüzden spektrofotometrik analizler için uygun bir türevlendirme reaksiyonu önemlidir. Maddelerin yapılarında bulunan fonksiyonel gruplara bakıldığında, hepsinde bulunan karboksil grubunun bunun için uygun olabileceği ve bu grup için demir (III) hidroksamat reaksiyonunun renklendirme amacıyla incelenmesi düşünülmüştür. Bu çalışmada silazapril örnek olarak seçilmiştir. Demir (III) hidroksamat



türevinin oluşması için silazapril 'in karboksil grubu, önce disikloheksilkarbodiimid varlığında hidroksilamin hidroklorür ile ilgili hidroksamik aside dönüştürülmekte, sonra Fe^{3+} iyonu ile renkli türev oluşmaktadır. Her iki kademe için uygun koşullar incelenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda birinci kademe genellikle (50-70) °C de ısıtılarak gerçekleştirilmiştir. Oysa bizim çalışmalarımızda 30 °C de 10 dakikada maksimum absorbansa ulaşılmıştır. Gerekli disikloheksilkarbodiimid ve hidroksilamin hidroklorür miktarlarının saptanması için çizilen grafiklerde, özellikle disikloheksilkarbodiimid miktarının artmasıyla absorbans bir maksimuma ulaştıktan sonra azalmıştır. Bu görünüm hidroksilamin hidroklorür 'e ait grafikte çok daha az belirgindir. Belirteçlerin fazlasının bu olumsuz etkisine bir açıklama getirilememiş ve çalışmalar maksimum absorbansın elde edildiği miktarlarla yapılmıştır. Bu durumun analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğine olumsuz etkisi olabileceği düşünülebilir, ancak hesaplanan bağıl standart sapma değeri böyle bir şüpheyi haklı çıkarmamıştır. İkinci kademede Fe (III) perklorat miktarının absorbansa etkisi için çizilen grafikte böyle bir durum söz konusu olmamıştır. Birinci reaksiyon aşırı hidroksilamin hidroklorür 'ün tampon etkisi ile pH:4 civarında, ikinci reaksiyon ise asitli ortamda gerçekleşmektedir. Kasai et al., (1975) bunun için en uygun asidin Fe (III) iyonu ile koordinasyon eğiliminin çok az olması nedeniyle perklorik asit olduğunu, hidroklorik asidin kloro kompleksinin oluşması yüzünden, diğerlerinin ise hidroksamatin bozunmasına sebep



olmaları nedeniyle uygun olmadığını bildirmişlerdir. Yine bu araştırmacılar, ortamdaki etanol yüzdesinin yüksek olması gerektiğini, sulu çözeltide Fe^{3+} iyonunun hidroksilamin tarafından indirgendığını ileri sürmüşlerdir. Yaptığımız ön incelemelerden aldığımız sonuçlar, bu görüşler ile uyum sağlamıştır. Reaksiyon koşullarının incelenmesinden sonra saptanan optimum koşullarda konsantrasyon-absorbans ilişkisi duyarlığın biraz düşük olması yüzünden $A = 0,1-0,5$ aralığında incelenmiştir. Duyarlığın düşük olması, geliştirilen bu spektrofotometrik yöntem için bir sakıncadır. Ancak ilaç preparatlarının analizi için bu durumun önemli olmadığı düşünülebilir. Yöntemin diğer bir sakıncası ise türevin dayanıklılığının az olmasıdır. Absorbans ölçümlerinin hemen yapılması gerekmektedir. Yine de bu sakıncalara rağmen bu grup ilaç maddelerinin tümüne uygulanabileceği düşünüldüğünde, yararlı bir analiz yöntemi olduğu görülmektedir.

Günümüzde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, ilaç preparatlarının, özellikle kombine olanların analizinde vazgeçilmez bir analiz yöntemi haline gelmiştir. Farmakopelerde bu yöntemle yapılan analizlerin sayısı süratle artmaktadır. Bu düşünceyle silazapril ve benazepril hidroklorür'ün hidroklorotiazid ile karışımlarını içeren tabletlerin sıvı kromatografik analizi amaçlanmıştır. Öncelikle, ilaç maddelerinin ters faz sistemdeki alıkonma davranışlarına mobil fazın pH 'ının etkisi incelenmiştir. Elde edilen verilerin maddelerin yapısı ile uyum gösterdiği görülmüştür.



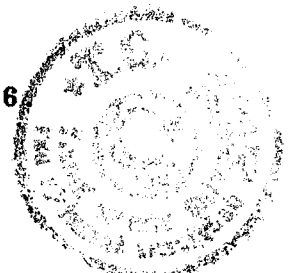
pK_a değerleri 8,6 ve 9,9 olan hidroklorotiazid 'in alıkonma hacmi, pH:3-7 arasında hemen hemen sabit kalmıştır. Karboksil grubu içeren diğer iki madde ise düşük pH larda daha fazla alıkonmuş, pH:4-5 den sonra alıkonma zamanlarında azalma gözlenmiştir. Maddelerin pK_a değerleri ile ilgili bilgi bulunmamakla birlikte, karboksil grubunun ayrışmasına ait pK_a değerinin bu civarda olması muhtemeldir. Elde edilen alıkonma verilerine dayanarak bu iki karışımı içeren tabletlerin kantitatif analizi için optimum koşullar belirlenmiştir.

Amlodipin ve silazapril 'i tek etken madde olarak ve silazapril-hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorür-hidroklorotiazid 'i karışım olarak içeren tabletlerin geliştirilen bu yöntemlerle analizlerinden elde edilen sonuçlar, incelenen ilaç maddelerinin henüz farmakopelerde yer almaması nedeniyle ofisiyel analiz yöntemleri ile karşılaştırılamamıştır. İlk ikisi UV-spektrofotometrik, karışımları içeren tabletlere ait sonuçlar ise UV-türev spektrofotometrisi ile elde edilenler ile karşılaştırılmış ve ortalamalar ve presizyonlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu bakımdan geliştirilmiş olan bu yöntemlerin bu yeni ilaç maddelerinin farmasötik preparatlarda analizi için yararlı seçenekler oluşturabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

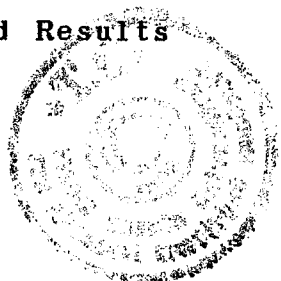
- 1.) Alker, D. ; Cross, P.E. ; Campbell, S.F., 1984, Eur. Pat. Appl. EP 119,050, 55 pp. Ref. C.A., 102, 24492n (1985).
- 2.) Amer, M.M. ; Khattab, F.I. ; Hassan, N.Y.M., 1989, Egypt. J. Pharm. Sci., 30, 207.
- 3.) Auerbach, L., 1978, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 1435.
- 4.) Bachman, W.J. ; Stewart, J.T., 1990, J. Chromatogr. Sci., 28(3), 123. Ref. C.A., 112, 223353z (1990).
- 5.) Backman, L. ; Beermann, B. ; Groschinsky-Grind, M. ; Hallberg, D., 1979, Clinical Pharmacokinetics 4, 63.
- 6.) Baltazar, J. ; Ferreira, B.M.M., 1965, Rev. Port. Farm., 15, 85. Ref. C.A., 63, 17802b (1965).
- 7.) Barary, M.H. ; El-Yazbi, F.A., 1984, Indian J. Pharm. Sci., 46(6), 224.
- 8.) Barbato, F. ; Cappello, B. ; Grumetto, L. ; Morrica, P., 1993 , Farmaco 48(3), 417. Ref. C.A., 119, 85261j (1993).
- 9.) Barbhaiya, R.H. ; Phillips, T.A. ; Welling, P.G., 1981, J. Pharm. Sci., 70(3), 291.
- 10.) Bartos, J. ; Pesez, M., 1974, Talanta 21, 1306



- 11.) Bedair, M. ; Korany, M.A. ; El-Yazbi, F.A., 1986, Sci. Pharm., 54(1), 31.
- 12.) Beermann, B. ; Groschinsky-Grind, M. ; Rosen, A., 1976, Clin. Pharmacol. Ther., 19, 531.
- 13.) Beermann, B. ; Groschinsky-Grind, M. , 1977, Europ. J. Clin. Pharmacol. , 12(4), 297.
- 14.) Beermann, B. ; Groschinsky-Grind, M. , 1978, Europ. J. Clin. Pharmacol. , 13, 385.
- 15.) Beermann, B. ; Groschinsky-Grind, M. , 1979, Br. J. Clin. Pharmacol. , 7, 579.
- 16.) Belal, F. ; Ibrahim, F. ; El-Brashy, A., 1988, Analyst 113(4), 637.
- 17.) Belal, F. ; Rizk, M. ; Ibrahim, F. ; El-Din, M.S., 1986, Talanta 33(2), 170.
- 18.) Belz, G.G. ; Breithaupt, K. ; Erb, K., 1994, J. Cardiovasc. Pharmacol., 24(2), 14. Ref. C.A., 122, 162s (1995).
- 19.) Beresford, A.P. ; Macrae, P.V. ; Alker, D. ; Kobylecki, R.J., 1989, Arzneim.-Forsch./Drug Res., 39(1), 201. Ref. C.A., 110, 185268z (1989).
- 20.) Beresford, A.P. ; Macrae, P.V. ; Stopher, D.A. ; Wood, B.A., 1987, J. Chromatogr., 420(1), 178.
- 21.) Beresford, A.P. ; Mc Gibney, D. ; Humphrey, M.J. ; Macrae, P.V. ; Stopher, D.A., 1988, Xenobiotica 18(2), 245. Ref. C.A., 108, 179517x (1988).
- 22.) Bilgiç, Z. ; Atmaca, S. ; Iskender, G., 1991, Marmara Univ. Eczacılık Derg., 7(1), 1.



- 23.) Bora, O., 1996, Yıldız Teknik Univ., Yüksek Lisans Tezi
- 24.) Bretnall, A.E. ; Clarke, G.S. , 1995, J. Chromatogr., 700(A), 173.
- 25.) Bulut, P. ; Ordu, H., 1984, FABAD Farm. Bilimler Derg., 9(4), 223.
- 26.) Bulut, P. ; Türeli, F. , 1983, Türk Hij. Deneysel Biyol. Derg., 40(2), 206.
- 27.) Burges, R.A. ; Carter, A.J. ; Gardiner, D.G. ; Higgins, A.J., 1985, Br. J. Pharmacol., 85, 281.
- 28.) Burges, R.A. ; Dodd, M.G., 1990, Cardiovasc. Drug Rev., 8(1), 25. Ref. C.A., 117, 116b (1992).
- 29.) Burges, R.A. ; Gardiner, D.G. ; Gwilt, M. ; Higgins, A.J. ; Blackburn, K.J. ; Campbell, S.F. ; Cross, P.E. ; Stubbs, J.K., 1987, J. Cardiovasc. Pharmacol., 9(1), 110. Ref. C.A., 106, 149135n (1987).
- 30.) Campins-Falco, P. ; Bosch-Reig, F. ; Sevillano-Cabeza, A. ; Molins-Lagua, C., 1994, Anal. Chim. Acta 287 (1-2), 41.
- 31.) Campins-Falco, P. ; Herraez- Hernandez, R. ; Sevillano-Cabeza, A. , 1994, Anal. Chem. , 66(2), 244.
- 32.) Campins-Falco, P. ; Sevillano-Cabeza, A. ; Molins-Lagua, C., 1994, Anal. Lett., 27(3), 531. Ref. C.A., 120, 200524g (1994).
- 33.) Carlucci, G. ; Di Giuseppe, E. ; Mazzeo, P., 1993, Int. J. Pharm., 93, 245. Ref. C.A., 119, 125354a (1993).
- 34.) Chalmers, R.A., 1972, Errors, Measurement and Results in Chemical Analysis, London.



- 35.) Chandrashekhar, T.G. ; Rao, P.S.N. ; Smrita, K. ; Vyas, S.K. ; Dutt, C., 1994, J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC, 7(6), 458. Ref. C.A., 122, 89616p (1995).
- 36.) Chen, J. ; Jiao, Z. ; Wang, D., 1983, Yaowu Fenxi Zazhi, 3(6), 357. Ref. C.A., 100, 79365n (1984).
- 37.) Chen, X., 1990, Zhongguo Yaoxue Zazhi 25(9), 543. Ref. C.A., 114, 129267u (1991).
- 38.) Chiang, H.C., 1961, J.Pharm. Sci., 50, 885.
- 39.) Chu, R., 1971, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 54, 603.
- 40.) Cieri, U.R., 1988, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71(3), 515.
- 41.) Cieri, U.R., 1994, J. AOAC Int., 77(5), 1104. Ref. C.A., 121, 263827z (1994).
- 42.) Canay, O., 1992, ilaç indeksi, ilaç sözlüğü, s.73. Boyut Matbaacılık A.Ş. İstanbul.
- 43.) Daniels, S.L. ; Vanderwielen, A.J., 1981, J. Pharm. Sci. 70(2), 211.
- 44.) Danielson, N.D. ; Bartolo, R.G., 1983, Anal. Lett., 16, 343. Ref. C.A., 99, 43629y (1983).
- 45.) De Croo, F. ; Van den Bossche, W. ; De Moerloose, P., 1985, Chromatographia 20(8), 477. Ref. C.A., 103, 183640w (1985).
- 46.) Deleo, A.B. ; Stern, M.J., 1966, J. Pharm. Sci., 55, 173.
- 47.) De Paulis, D. ; Dipietromaria, G., 1960, Boll. Chim. Farm., 99, 15.
- 48.) De Zoeten, E., 1960, Pharm. Weekblad 95, 174.



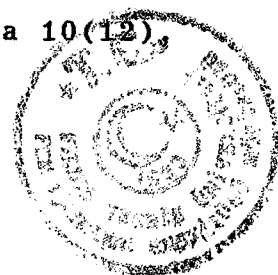
- 49.) Ehrhardt, J.D., 1992, Rapid Commun. Mass Spectrom., 6(5), 349. Ref. C.A., 116, 247812g (1992).
- 50.) El-Sadek, M.A. ; El-Shanawani, A.A. ; El-Adl, S.M., 1993, Zagazig J. Pharm. Sci., 2(2), 139. Ref. C.A., 121, 42881k (1994).
- 51.) Elsayed, M.A.H. ; Nwakanma, C.O., 1979, Pharmazie 34, 251.
- 52.) Erram, S. ; Tipnis, H.P., 1992, Indian Drugs 29(12), 553. Ref. C.A., 117, 220243f (1992).
- 53.) Erram, S. ; Tipnis, H.P., 1992, Indian Drugs 29(11), 484. Ref. C.A., 117, 157758k (1992).
- 54.) Erram, S. ; Tipnis, H.P., 1992, Indian J. Pharm. Sci., 54(6), 245.
- 55.) Erram, S. ; Tipnis, H.P., 1992, Indian Drugs 29(14), 651. Ref. C.A., 118, 27588q (1993).
- 56.) Erram, S.V. ; Tipnis, H.P., 1994, Indian Drugs 31(1), 16. Ref. C.A., 120, 173607c (1994).
- 57.) Erram, S.V. ; Tipnis, H.P., 1994, Indian Drugs 31(2), 65. Ref. C.A., 120, 307625t (1994).
- 58.) Erram, S.V. ; Tipnis, H.P., 1993, Indian Drugs 30(7), 319. Ref. C.A., 119, 167881a (1993).
- 59.) Erram, S.V. ; Tipnis, H.P., 1993, Indian Drugs 30(9), 462. Ref. C.A., 119, 234188v (1993).
- 60.) Erram, S.V. ; Tipnis, H.P., 1992, Indian Drugs 29(14), 639. Ref. C.A., 118, 27587p (1993).
- 61.) Esteve-Romero, J.S. ; Simo-Alfonso, E.F.; Garcia-Alvarez-Coque, M.C. ; Ramis-Ramos, G., 1993, Talanta, 40(11), 1711.



- 62.) Evans, P.C. ; Ffolliott-Powell, F.M. ; Harding, J.E., 1993, Anal. Biochem., 208(2), 334.
- 63.) Fagerlund, C. ; Hartvig, P. ; Lindstroem, B., 1979, J. Chromatogr., 168, 107.
- 64.) Fatmi, A.A. ; Williams, G.V., Sr., 1990, Drug Dev. Ind. Pharm., 16(5), 779. Ref. C.A., 112, 185929g (1990).
- 65.) Faulkner, J.K. ; Mc Gibney, D. ; Chasseaud, L.F. ; Perry, J.L. ; Taylor, I.W., 1986, Br. J. Clin. Pharmacol., 22(1), 21.
- 66.) Fazzari, F.R., 1970, J.Assoc. Off. Anal. Chem., 53, 582.
- 67.) Fazzari, F.R., 1972, J.Assoc. Off. Anal. Chem., 55, 161.
- 68.) Feldmann, E.G., 1959, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 48, 197. Ref. C.A., 53, 11764a (1959).
- 69.) Fett, J.J. ; Hischak, F. ; Love, L.J.C., 1991, Biomed. Chromatogr., 5(1), 14. Ref. C.A., 115, 173946j (1991).
- 70.) Ficarra, P. ; Ficarra, R. ; Tommasini, A. ; Calabro, M.L. ; Fenech, C.G., 1986, Farmaco, Ed. Prat., 41(10), 332. Ref. C.A., 106, 55996s (1987).
- 71.) Filipeva, S.A. ; Petrenko, V.V. ; Strelets, L.N. ; Buryak, V.P., 1989, Farmatsiya 38(6), 67. Ref. C.A., 112, 62764s (1990).
- 72.) Filipeva, S.A. ; Strelets, L.N. ; Petrenko, V.V., 1989, Farmatsiya 38(1), 64. Ref. C.A., 110, 141682a (1989).



- 73.) Florey, K. ; Ed. Deppeler, H.P., 1981, Analytical Profiles of Drug Substances, Academic Press, New York, London, Paris, San Diego, San Fransisco, Sao Paulo, Sidney, Tokyo, Toronto, 10, 405.
- 74.) Folin, O., 1922, J. Biol. Chem., 51, 377. Ref. C.A., 16, 1789 (1922).
- 75.) Frank, H. ; Heinisch, G. ; Rank, W., 1979, Sci. Pharm., 47(2), 135.
- 76.) Franzblau, C. ; Gallop, P.M. ; Seifter, S., 1963, Biopolymers 1,79. Ref. C.A., 59, 4193d (1963).
- 77.) Furman, H.N. ; Morrison, G.H. ; Wagner, A.F., 1950, Anal. Chem., 22, 1561.
- 78.) Groenewegen, H., 1960, Pharm. Weekblad 95, 345.
- 79.) Gutierrez, M.C. ; Gomez-Hens, A. ; Perez-Bendito, D., 1989, J. Pharm. Biomed. Anal., 7(4), 413. Ref. C.A., 111, 84204r (1989).
- 80.) Gürkan, T., 1982, Istanbul Univ. Eczacılık Fak. Mecm., 18, 116.
- 81.) Gürkan, T., 1980, Istanbul Univ. Eczacılık Fak. Mecm., 16, 73.
- 82.) Hakyemez, G., 1988, Acta Pharm. Turc., 30(4), 153.
- 83.) Hashimoto, Y. ; Endo, M. ; Tominaga, K. ; Inuzuka, S. ; Moriyasu, M., 1978, Microchim. Acta 2, 493. Ref. C.A., 90, 43876r (1979).
- 84.) Hentrich, K., 1963, Pharmazie 18, 405.
- 85.) Higuchi, S. ; Shiobara, Y., 1980, Xenobiotica 10(12), 889. Ref. C.A., 95, 162r (1981).



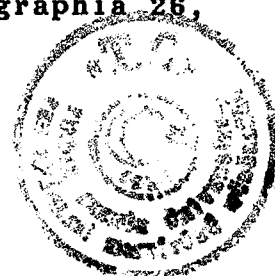
- 86.) Hitscherich, M.E. ; Rydberg, E.M. ; Tsilifonis, D.C. ;
Daly, R.E., 1987, J. Liq. Chromatogr., 10(5), 1011.
Ref. C.A., 107, 84009y (1987).
- 87.) Holeman, J.A. ; Danielson, N.D., 1993, Anal. Chim. Acta
277(1), 55.
- 88.) Hussein, F.T. ; Ismaiel, S.A. ; Gadel-Rub, L.N., 1973,
Pharmazie 28, 322.
- 89.) Iskender, G. ; Orak, F., 1986, Marmara Univ. Eczacılık
Derg., 2(1), 77.
- 90.) Jain, R. ; Jain, C.L., 1992, Indian J. Pharm. Sci.,
54(6), 250.
- 91.) Jain, R. ; Jain, C.L., 1991, Indian Drugs 28(8), 380.
Ref. C.A., 115, 57311z (1991).
- 92.) Josefsson, M. ; Carlsson, B. ; Norlander, B., 1993,
Chromatographia 37(3-4), 129. Ref. C.A., 120, 15007c
(1994).
- 93.) Kaiser, G. ; Ackermann, R. ; Dieterle, W. ; Dubois,
J.P., 1987, J. Chromatogr., 419, 123.
- 94.) Kala, H., 1965, Pharmazie 20, 82.
- 95.) Kala, H., 1961, Pharmazie 16, 297.
- 96.) Kala, H., 1960, Pharmazie 15, 622.
- 97.) Kasai, Y. ; Tanimura, T. ; Tamura, Z., 1975, Anal.
Chem., 47(1), 34.
- 98.) Kayaalp, O., 1990, Tıbbi Farmakoloji, Cilt 2, s.1438.
Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Şirketi, Ankara.
- 99.) Kertesz, P., 1964, Acta Pharm. Hung., 34, 229. Ref.
C.A., 61, 15935h (1964).



- 100.) Kertesz, P., 1963, *Acta Pharm. Hung.*, 33, 150. Ref. C.A., 60, 1540b (1964).
- 101.) Kirschbaum, J. ; Perlman, S., 1984, *J. Pharm. Sci.*, 73(5), 686.
- 102.) Kleemann, A., 1981, *Anal. Prof. Drug Subst.*, Academic Press, New York, London, Paris, San Diego, San Fransisco, Sao Paulo, Sidney, Tokyo, Toronto, 10, 424.
- 103.) Kobayashi, Y. ; Kubo, H. ; Kinoshita, T., 1987, *Anal. Biochem.*, 160(2), 392.
- 104.) Kolusheva, A. ; Nin'o, N., 1963, *Farmatsiya* 13,21. Ref. C.A., 60, 1542b (1964).
- 105.) Korany, M.A. ; Franzky, H.J., 1983, *Sci. Pharm.*, 51(3), 291.
- 106.) La Rotonda, M.I. ; Cozzolino, S. ; Schettino, O., 1980, *Boll.-Soc. Ital. Biol. Sper.*, 56(13), 1399. Ref. C.A., 94, 20503k (1981).
- 107.) Liang, Y. ; Sun, I., 1994, *Fenxi Shiyanshi* 13(3), 57. Ref. C.A., 121, 141860j (1994).
- 108.) Lindstroem, B. ; Molander, M. ; Groschinsky, M., 1975, *J. Chromatogr.*, 114, 459.
- 109.) Lisi, A.M. ; Kazlauskas, R. ; Trout, G.J., 1992, *J. Chromatogr.*, 581(1), 57.
- 110.) Long, Y. ; Feng, J. ; Tong, S., 1993, *Fenxi Huaxue* 21(8), 953. Ref. C.A., 119, 256622j (1993).
- 111.) Lu, M. ; Wu, G. ; Chen, S. ; Ruan, Z., 1983, *Nanjing Yaoxueyuan Xuebao* 1,1. Ref. C.A., 99, 115427f (1983).



- 112.) Lutz, D. ; Ilias, E. ; Jaeger, H., 1985, Glass Capillary Chromatogr. Clin. Med. Pharmacol., 453. Ref. C.A., 102, 142696e (1985).
- 113.) Macek, K. ; Vecerkova, J., 1965, Pharmazie 20, 605.
- 114.) Madgearu, M. ; Beral, H. ; Cuciureanu, E., 1968, Farmacia, 16, 471. Ref. C.A., 70, 6558e (1969).
- 115.) Magalhaes, J.F. ; Piros, M.G., 1971, Rev. Farm. Bioquim., 8, 273. Ref. C.A., 75, 121466p (1971).
- 116.) Mahgoub, H. ; El-Yazbi, F.A. ; Barary, M.H., 1992, Sci. Pharm., 60(4), 239.
- 117.) Malecki, F. ; Staroscik, R., 1982, Anal. Chim. Acta 139, 353.
- 118.) McKinley, W.A., 1981, J. Anal. Toxicol., 5(5), 209. Ref. C.A., 96, 14898t (1982).
- 119.) McLeod, P.J. ; Ogilvie, R.I. ; Ruedy, J., 1970, Clin. Pharmacol. Ther., 11, 733.
- 120.) Mohamed, A.M.I., 1988, Talanta 35(8), 621.
- 121.) Mollica, J.A. ; Rehm, C.R. ; Smith, J.B. ; Govan, H.K., 1971, J. Pharm. Sci., 60, 1380.
- 122.) Moussa, B.A. ; El-Kousy, N.M., 1983 (Pub. 1985), Egypt. J. Pharm. Sci., 24, 21.
- 123.) Moussa, B.A. ; El-Kousy, N.M., 1985, Pharm. Weekbl., Sci. Ed., 7(2), 79.
- 124.) Nakahara, Y. ; Ishigami, A. ; Takeda, Y., 1989, J. Chromatogr., 489(2), 371.
- 125.) Nakahara, Y. ; Takeda, Y., 1988, Chromatographia 26, 363. Ref. C.A., 110, 224883t (1989).



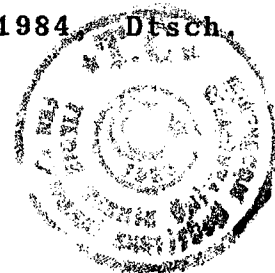
- 126.) Namigohar, F. ; Khorrami, J. ; Soltani, A., 1977, J. Pharm. Belg., 32(2), 162. Ref. C.A., 87,90791g (1977).
- 127.) Nowakowska, Z., 1988, Farm. Pol., 44(9), 521. Ref. C.A., 110, 219198u (1989).
- 128.) Nowakowska, Z., 1989, Farm. Pol., 45(7), 454. Ref. C.A., 113, 218357v (1990).
- 129.) Nowakowska, Z. ; Miscicka, M., 1993, Farm. Pol., 49(3-4), 41. Ref. C.A., 119, 146713g (1993).
- 130.) Osborne, B.G., 1972, J. Chromatogr., 70, 190.
- 131.) Özkırımlı, S. ; Sevingil, M., 1989, Acta Pharm. Turc., 31(2), 77.
- 132.) Panderi, I. ; Parissi-Poulou, M., 1992, Int. J. Pharm., 86(2-3), 99. Ref. C.A., 118, 27584k (1993).
- 133.) Parissi-Poulou, M. ; Reizopoulou, V. ; Koupparis, M. ; Macheras, P., 1989, Int. J. Pharm., 51(2), 169. Ref. C.A., 110, 219217z (1989).
- 134.) Park, S.J. ; Pyo, H.S. ; Kim, Y.J. ; Kim, M. S. ; Park, J., 1990, J. Anal. Toxicol., 14(2), 84. Ref. C.A., 112, 193304q (1990).
- 135.) Patki, R.V. ; Tamhankar, C.P. ; Tipnis, H.P., 1994, Indian Drugs 31(12), 560. Ref. C.A., 122, 170339x (1995).
- 136.) Perez, J.B. ; Danhier, A.C. ; Brieva, J.A., 1967, An. Real Acad. Farm., 33, 233.
- 137.) Pesez, M. ; Bartos, J., 1969, Ann. Pharm. Fr., 27, 161.
- 138.) Pilsbury, V.B. ; Jackson, J.V., 1966, J. Pharm. Pharmacol., 18(11), 713. Ref. C.A., 65, 20683f (1966).



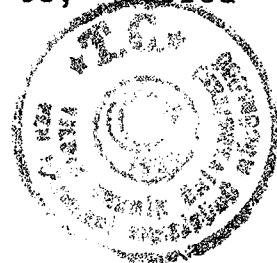
- 139.) Prasad, T.N.V. ; Sastry, B.S. ; Rao, E.V. ; Sastry, C.S.P., 1987, Pharmazie 42(2), 135.
- 140.) Przyborowski, L. ; Pionka, G., 1976, Farmacja Pol., 32(15), 399. Ref. C.A., 85, 149190z (1976).
- 141.) Ramana Rao, G. ; Raghuveer, S. ; Khadgapathi, P., 1985, Indian Drugs 23(1), 39. Ref. C.A., 104, 10731u (1986).
- 142.) Rao, G.R. ; Raghuveer, S. ; Mohan, K.R., 1982, Indian Drugs 19(8), 328. Ref. C.A., 97, 44411s (1982).
- 143.) Rehm, C.R. ; Smith, J.B., 1960, J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed., 49, 396. Ref.C.A., 54, 17800h (1960).
- 144.) Rieko, M ; Yasushi, T. ; Mumio, I. ; Mitsuru, U. ; Masao, S. ; Shouji, T., 1986, Bunseki Kagaku 35(3), 151. Ref. C.A., 105, 12215y (1986).
- 145.) Ruggieri, R., 1960, Boll. Chim. Farm., 99, 20.
- 146.) Ruiz Rodriguez, E. ; Alvarez, S.M. ; Consuegra, M.S., 1973, Rev. Cubana Farm., 7, 3. Ref. C.A., 82, 64595y (1975).
- 147.) Saarinen, M. ; Siren, H. ; Riekkola, M.L., 1993, J. Liq. Chromatogr., 16(18), 4063. Ref. C.A., 120, 94586s (1994).
- 148.) Salama, R.B. ; Ahmed, B.M. ; Omer, A.I.H., 1983, Int. J. Pharm., 17(2-3), 325. Ref. C.A., 100, 109190w (1984).
- 149.) Salama, R.B. ; Omer, A.I.H., 1980, J. Pharm. Sci., 69, 346.
- 150.) Salem, H. ; El-Maamli, M. ; El-Sadek, M. ; Kheir, A.A., 1991, Spectrosc. Lett., 24(3), 451. Ref. C.A., 114, 214555f (1991).



- 151.) Salman, A., 1987, Sci. Pharm., 55(4), 255.
- 152.) Sane, R.T. ; Bhate, V.R. ; Nayak, V.G. ; Ladge, K.D., 1991, Indian Drugs 28(7), 322. Ref. C.A., 115, 15733h (1991).
- 153.) Sane, R.T. ; Gangrade, M.G. ; Bapat, V.V. ; Surve, S.R. ; Chonkar, N.L., 1993, Indian Drugs 30(5), 205. Ref. C.A., 119, 125337x (1993).
- 154.) Sane, R.T. ; Valiyare, G.R. ; Deshmukh, U.M. ; Singh, S.R. ; Sodhi, R., 1992, Indian Drugs 29(12), 558. Ref. C.A., 117, 220244g (1992).
- 155.) Sa'sa, S.I. ; Jalal, I.M. ; Khalil, H.S., 1988, J. Liq. Chromatogr., 11(8), 1673. Ref. C.A., 109, 216094a (1988).
- 156.) Sastry, C.S.P. ; Sailaja, A. ; Rao, T.T., 1992, Mikrochim. Acta 107(1-2), 1. Ref. C.A., 117, 14500J (1992).
- 157.) Sastry, C.S.P. ; Suryanarayana, M.V. ; Tipirneni, A.S.R.P., 1989, Talanta 36(4), 491.
- 158.) Schaefer, M. ; Geissler, H.E. ; Mutschler, E., 1977, J. Chromatogr., 143, 615.
- 159.) Schaefer, M. ; Soergel, F. ; Mutschler, E., 1979 (Pub. 1980), Methods Clin. Pharmacol., Proc. Int. Symp., 296. Ref. C.A., 95, 17843m (1981).
- 160.) Scharpf, F. ; Riedel, K.-D. ; Laufen, H. ; Leitold, M., 1994, J.Chromatogr., B : Biomed. Appl., 655(2), 225.
- 161.) Schnekenburger, J. ; Quade-Henkel, M., 1984, Dtsch. Apoth.-Ztg., 124(23), 1167.



- 162.) Sekine, H. ; Nakahara, Y., 1991, Eisei Kagaku 37(6), 537. Ref. C.A., 116, 145619g (1992).
- 163.) Shanbhag, S.G. ; Thampi, C.S. ; Thampi, P.P., 1991, J. Inst. Chem., 63(6), 223. Ref. C.A., 118, 154713b (1993).
- 164.) Sharp, M.E., 1987, J. Anal. Toxicol., 11(1), 8. Ref. C.A., 106, 131147h (1987).
- 165.) Sheehan, J.C. ; Hess, G.P., 1955, J. Amer. Chem. Soc., 77, 1067. Ref. C.A., 50, 2484b (1956).
- 166.) Sheppard, H. ; Mowles, T.F. ; Plummer, A.J., 1960, J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed., 49, 722. Ref. C.A., 56, 7431c (1962).
- 167.) Sheppard, H. ; Mowles, T.F. ; Bowen, N. ; Renzi, A.A. ; Plummer, A.J., 1960, Toxicol. Appl. Pharmacol., 2, 188. Ref. C.A., 54, 15712d (1960).
- 168.) Shimooka, K. ; Sawada, Y. ; Tatematsu, H., 1989, J. Pharm. Biomed. Anal., 7(11), 1267. Ref. C.A., 112, 111402h (1990).
- 169.) Shinde, V.M. ; Desai, B.S. ; Tendolkar, N.M., 1994, Indian Drugs 31(5), 192. Ref. C.A., 121, 117923m (1994).
- 170.) Shukla, I.C., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. A, 61(1), 5. Ref. C.A., 115, 239878, (1991).
- 171.) Shukla, I.C. ; Ahmad, S. ; Singh, D. ; Srivastava, M.K., 1983, Indian J. Pharm. Sci., 45(6), 249.
- 172.) Slek, T.J. ; Osiewicz, R.J. ; Bath, R.J., 1976, J. Forensic Sci., 21(3), 525. Ref. C.A., 88, 99813u (1978).



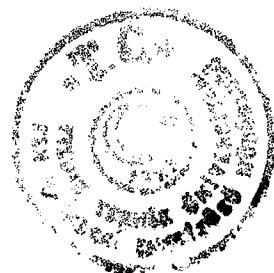
- 173.) Sioufi, A. ; Pommier, F. ; Kaiser, G. ; Dubois, J.P.,
1988, J.Chromatogr., 434(1), 239.
- 174.) Smith, P.J. ; Hermann, T.S., 1968, Anal. Biochem., 22,
134.
- 175.) Sohn, D. ; Simon, J. ; Hanna, M.A. ; Ghali, G. ; Tolba,
R., 1973, J. Chromatogr., 87, 570.
- 176.) Stark, A. ; Wagler, M., 1970, Zbl. Pharm. Pharmakother.
Laboratoriumsdiagn., 109, 921.
- 177.) Steinbach, D. ; Moeller, H., 1978, Pharm. Ztg.,
123(12), 475. Ref. C.A., 88, 197577q (1978).
- 178.) Stewart, J.T. ; Clark, S.S., 1986, J. Pharm. Sci.,
75(4), 413.
- 179.) Suria, D., 1978, Clin. Biochem., 11, 222.
- 180.) Tachibana, M. ; Furusawa, M., 1990, Analyst 115(11),
1495.
- 181.) Tanaka, H. ; Yoneyama, Y. ; Sugawara, M. ; Umeda, I. ;
Ohta, Y., 1987, J. Pharm. Sci., 76(3), 224.
- 182.) Tanimura, T. ; Kasai, Y. ; Tamura, Z., 1972, Chem.
Pharm. Bull., 20(8), 1845. Ref. C.A., 77, 121899y
(1972).
- 183.) Teodorescu, N. ; Petroniu, L. ; Ciogolea, Gh., 1967,
Farmacia 15, 13. Ref. C.A., 66, 98546t (1967).
- 184.) The British Pharmacopoeia, Her Majesty 's Stationary
Office, Cambridge (1973).
- 185.) The British Pharmacopoeia, Her Majesty 's Stationary
Office, Cambridge (1993).
- 186.) The Merck Index, 1989, Merck and Co Inc., Rahway N.J.,
USA.



- 187.) The United States Pharmacopoeia XIX. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville (1975).
- 188.) The United States Pharmacopoeia XXII. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville (1990).
- 189.) Ting, S., 1983, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66(6), 1436.
- 190.) Ting, S., 1984, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(6), 1118.
- 191.) Tsai, F.Y. ; Lui, L.F. ; Chang, B., 1991, J. Pharm. Biomed. Anal., 9, 1069. Ref. C.A., 117, 21565n (1992).
- 192.) Urbanyi, T. ; O'Connell, A., 1972, Anal. Chem., 44, 565.
- 193.) Vachek, J., 1961, Ceskoslov. Farm., 10, 515. Ref. C.A., 56, 7431c (1962).
- 194.) Vandenbosch, C. ; Massart, D.L. ; Lindner, W., 1992, J. Pharm. Biomed. Anal., 10, 895. Ref. C.A., 119, 80378t (1993).
- 195.) Vandenheuvel, W.J.A. ; Gruber, V.F. ; Walker, R.W. ; Wolf, F.J., 1975, J. Pharm. Sci., 64, 1309.
- 196.) Van der Meer, M.J. ; Brown, L.W., 1987, J. Chromatogr., 423, 351.
- 197.) Van Kerchove, C. ; Bontemps, R. ; Schoenmakers, A., 1982, J. Pharm. Pharmacol., 34(7), 420. Ref. C.A., 97, 188377h (1982).
- 198.) Vasyuk, S.A. ; Petrenko, V.V., 1989, Farmatsiya 38(6), 72. Ref. C.A., 112, 62766u (1990).
- 199.) Vire, J.C. ; Patriarche, G.J. ; Christian, G.D., 1979, Fresenius ' Z. Anal. Chem., 299, 197.



- 200.) Walash, M.I. ; El-Brashy, A.M. ; Sultan, M.A. El-R., 1994, *Pharmazie* 49(6), 456.
- 201.) Wallace, J.E. ; Hamilton, H.E. ; Skrdlant, H. ; Burkett, L.L. ; Schwertner, H., 1977, *J. Chromatogr.*, 138, 111.
- 202.) Weclawska, K., 1968, *Gdansk Tow. Nauk. Rozpr. Wyda.* 3, 5, 211. Ref. C.A., 71, 128808c (1969).
- 203.) Weinberger, R. ; Pietrantonio, T., 1983, *Anal. Chim. Acta* 146, 219.
- 204.) Wu, Q. ; Yang, Q. ; Yu, R., 1983, *Nanjing Yaoxueyuan Xuebao* 3, 63. Ref. C.A., 100, 180180y (1984).
- 205.) Xiao, C., 1986, *Yiyao Gongye* 17(5), 231. Ref. C.A., 105, 85270x (1986).
- 206.) Xu, J. ; Yang, Q. ; Dong, S. ; Yu, R., 1982, *Nanjing Yaoxueyuan Xuebao* 20(3), 15. Ref. C.A., 99, 93844k (1983).
- 207.) Xu, J. ; Yang, Q. ; Dong, S. ; Yu, R., 1982, *Nanjing Yaoxueyuan Xuebao* 20(3), 9. Ref. C.A., 99, 93843j (1983).
- 208.) Yamazaki, M. ; Ho, Y. ; Suzuka, T. ; Yaginuma, H. ; Itoh, S. ; Kamada, A. ; Orita, Y. ; Nakahama, H. ; Nakanishi, A.A., 1984, *Chem. Pharm. Bull.*, 32(6), 2387. Ref. C.A., 101, 103481r (1984).
- 209.) Yeung, P.K.F. ; Mosher, S.J. ; Pollak, P.T., 1991, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9(7), 565. Ref. C.A., 116, 75592s (1992).



- 210.) Yoon, C.N. ; Lee, T.H. ; Park, J., 1990, J. Anal. Toxicol., 14(2), 96. Ref. C.A., 112, 193305r (1990).
- 211.) Youssef, A.F. ; El-Shabouri, S.R. ; Mohamed, A.M.I., 1992, Bull. Fac. Sci., 21(1), 53. Ref. C.A., 118, 45893q (1993).
- 212.) Zhu, D., 1987, Yaowu Fenxi Zazhi 7(2), 83. Ref. C.A., 107, 46396q (1987).



ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 7 Mayıs 1962

Doğum Yeri : İstanbul

İlk Öğrenim : Burakreis İlkokulu (1969-1971),
Barbaros İlkokulu (1972-1973),
İstanbul

Orta Öğrenim : Beşiktaş Kız Lisesi (1973-1976),
İstanbul

Lise Öğrenimi : Beşiktaş Kız Lisesi (1976-1979),
İstanbul

Yüksek Öğrenim : İstanbul Üniversitesi, Mühendislik
Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
(1980-1985)

Lisansüstü Öğrenim

Yüksek Lisans : Yıldız Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı,
Analitik Kimya Bilim Dalı (1987-1990)

Doktora : Yıldız Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı,
Analitik Kimya Bilim Dalı (1990-1996)

1986 yılında Organik Kimya A.Ş. de göreve başladım. Burada kısa bir süre çalıştıktan sonra 1 Aralık 1986 'da, ismi 1993 'de Yıldız Teknik Üniversitesi olarak değişen Yıldız Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı 'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Halen bu görevime devam etmekteyim.

**E.Ş. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

