

**FARMASÖTİK PREPARATLARDA LOSARTAN
POTASYUMUN SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEM İLE ANALİZİ**

Elmas MİROĞLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi - 2013

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARMASÖTİK PREPARATLARDA LOSARTAN
POTASYUMUN SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEM İLE ANALİZİ**

Elmas MİROĞLU

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU**

**ERZURUM
2013**

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

**FARMASÖTİK PREPARATLARDA LOSARTAN POTASYUMUN
SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEM İLE ANALİZİ**

Elmas MİROĞLU

Tez Savunma Tarihi : 22.01.2013

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zühal GÜVENALP

Onay

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

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2013**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hipertansiyon.....	3
2.2. Hipertansiyonun Görülme Sıklığı.....	3
2.3. Kan Basıncı ve Hipertansiyonun Sınıflandırılması	4
2.4. Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS).....	5
2.4.1. Anjiyotensin II Reseptör Blokerleri (ARB).....	7
2.5. Losartan Potasyum (LP)	9
2.5.1. LP'nin Farmakolojik Özellikleri.....	10
2.5.2. LP'nin Farmakokinetik Özellikleri.....	11
2.5.3. LP ve Diğer ARB İlaçlarının Karşılaştırılması.....	12
2.5.4. LP İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri	12
2.6. LP Analizi için Analitik Yöntemler.....	13
2.7. Spektroskopik Yöntemler	26
2.7.1. Spektroskopi	26
2.7.2. Elektromanyetik Işımanın (EMI) Genel Özellikleri	27
2.7.3. Elektromanyetik Işımanın Dalga Özelliği	28
2.7.4. Elektromanyetik Işımanın Tanecik Özelliği.....	28

2.7.4.1. Işının Absorpsiyonu.....	28
2.7.5. UV- Görünür Bölgedeki Geçişler	30
2.7.5.1. π , σ ve n Orbitalleri Arasındaki Geçişler.....	30
2.7.6. Lambert-Beer Kanunu	32
2.7.7. UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi.....	34
2.7.7.1. Işın Kaynakları.....	35
2.7.7.2. Monokromatör (Dalga Boyu Seçicileri)	36
2.7.7.3. Numune Kabı.....	36
2.7.7.4. Dedektörler	37
2.7.7.5. UV-Görünür Bölge Cihaz Çeşitleri	38
2.7.7.6. UV-Görünür Bölge Spektroskopisinin Uygulamaları	40
2.8. Sıvı Kromatografi/Kütle Spektroskopisi (LC-MS).....	42
2.9. Kemometri	42
2.9.1. Merkezi Kompozit Dizayn.....	44
2.10. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	49
2.10.1. Yöntem Geliştirme.....	49
2.10.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	49
3. MATERYAL VE METOT.....	54
3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller.....	54
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	54
3.1.2. Alet ve Araçlar.....	54
3.2. Deneyde Kullanılan Yöntemler	55
3.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Şartları	55
3.2.2. LC-MS Yöntem Şartları.....	55
3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	56

3.3.1. LP'nin Standart Stok Çözeltisi	56
3.3.2. 0.05 M KI Standart Çözeltisi	56
3.3.3. 0.003 M KIO ₃ Standart Çözeltisi	57
3.4. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Yöntem	57
3.4.1. LP'nin Losartana (LS) Dönüşüm Reaksiyonu	57
3.4.2. LS'nin Karboksilik Asit Türevine (LCOOH) Dönüşümü ve LCOOH Varlığında İyodürün İyodat ile Oksidasyonu	58
3.4.3. Kinetik Çalışma	59
3.4.4. Önerilen Yöntemin Optimum Koşullarının Belirlenmesi	59
3.4.5. LP'nin Varlığında Oluşan Triiyodür Kompleks İyonunun Maksimum Absorbans Gösterdiği Dalga Boylarının Belirlenmesi	61
3.4.6. LP için Standart Çözeltilerin Hazırlanması	61
3.5. Analitik Yöntemin Geçerlilik Testleri	61
3.6. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	63
4. BULGULAR.....	64
4.1. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Yöntem	64
4.1.1. LP'den LS'nin Oluşumu	64
4.1.2. LS'den LCOOH Oluşumu	65
4.1.3. LCOOH Varlığında İyodürün İyodat ile Oksidasyonu Sonucu Triiyodür Kompleks İyonunun Oluşumu	66
4.2. Kinetik Çalışmalar	67
4.3. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Yöntemin Optimum Koşullarının Merkezi Kompozit Diyazn Yöntemi ile Belirlenmesi	69
4.4. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Geliştirilen Yöntemin Geçerlilik Testleri...	76
4.4.1. Özgünlük (Belirleyicilik)	76

4.4.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı.....	78
4.4.3. Doğruluk/ Kesinlik	79
4.4.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	80
4.4.5. Geri Kazanım.....	80
4.4.6. Stabilitate (Kararlılık).....	81
4.5. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	82
5. TARTIŞMA.....	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	98
KAYNAKLAR	99
EKLER	108
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	108
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	109

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmam süresince bilgi, görüş ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU başta olmak üzere, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde beni yönlendiren, desteğini, yakın ilgisini ve değerli bilgisini esirgemeyen değerli danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'na, çalışmalarım sırasında emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Onur ŞENOL, Sayın Arş. Gör. M. Emrah YAMAN ve Sayın M. Latif GÜNEŞ'e, yardımını ve değerli zamanını esirgemeyip yanımda olan değerli arkadaşım Gülşah AKSOY'a, çalışma süresinde bana her konuda yardımcı olan tüm değerli hocalarıma, deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen kimyager arkadaşlarım Ayşe KİLİÇ ve Farrokh LAFZİ'ye, her zaman ve tüm çalışmam süresince yanımda olan kuzenlerim Derya MİRAL ve Seda DEMİRCAN'a ve hayatımın her aşamasında her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Elmas MİROĞLU

ÖZET

Farmasötik Preparatlarda Losartan Potasyumun Spektrofotometrik Yöntem ile Analizi

Amaç. Losartan potasyumun (LP) karboksilik asit formunun varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonundan yararlanarak LP'nin farmasötik preparatlarda belirlenmesi için yeni bir kinetik UV-Görünür bölge spektrofotometri yönteminin geliştirilmesi ve geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot. Losartana (LS) dönüştürülen LP'nin iyodat ile butil zincirindeki metil grubunun oksidasyona uğraması sonucu LS'nin karboksilik asit türevi oluşturuldu. Oluşan karboksilik asit varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu sarı renkli triiyodür kompleks iyonu meydana getirildi ve 286 nm dalga boyunda UV-Görünür bölge spektrumu alındı. Belirtilen reaksiyonların oluşumu LC-MS yöntemi ile, dengeye gelmesi ve karalılık sürelerinin belirlenmesi kinetik çalışma ile, deney koşulları ise merkezi kompozit dizayn yöntemi ile optimize edildi. Geliştirilen spektrofotometrik yöntemin geçerlilik testleri yapıldı.

Bulgular. Belirtilen reaksiyonların dengeye gelme süresi 10 dakika olarak belirlenmiş olup KIO_3 ve KI miktarları sırası ile 1.961 mL ve 1.953 mL ve sıcaklık $32.3^\circ C$ olarak belirlendi. Yöntemin, 0.9996 korelasyon katsayısı ile 4 ile 30 $\mu g/mL$ derişim aralığında doğrusal olduğu ve LOD ve LOQ değerinin ise sırasıyla 0.61 $\mu g/mL$ ve 1.85 $\mu g/mL$ olduğu tespit edildi. Geliştirilen kinetik spektrofotometrik yöntem ile Cozaar, Eklips, Loxibin, Sarilen ve Sarvas isimli farmasötik preparatlarda yapılan analizlerde %94.9 ile %100.9 arasında sonuçlar elde edildi.

Sonuç. Farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için yeni bir kinetik UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi geliştirilmiş olup yöntemin rutin analizlerde kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: LC-MS, losartan potasyum, merkezi kompozit dizayn yöntemi, spektrofotometri

ABSTRACT

Determination of Losartan Potassium, an anti-hypertensive drug, in Pharmaceutical Preparations with Spectrophotometric Method

Aim. In this study we aimed to develop a new method in order to assess Losartan Potassium (LP) in pharmaceutical products via a new UV-Visible spectrophotometric method based on the oxidation reaction between iodide and iodate in the presence of carboxylic acid form of LP.

Material and Method. Carboxylic acid form of Losartan (LS) was derived by oxidation of methyl group in butyl chain of LP (converted to LS) with iodate. In the presence of carboxylic acid molecule; oxidation of iodide with iodate produced yellow triiodide complex ion and defined at 286 nm in the UV-Visible spectrophotometry. LC-MS method, kinetic studies and central composite design method was used for optimizing reactions, equilibration and determination of stability duration and experimental conditions; respectively. Developed spectrophotometric method was validated.

Results. The equilibration period was calculated as 10 minutes. KIO_3 and KI amount was calculated as 1.961 mL and 1.953 mL respectively; and temperature was measured as 32.3 °C. It was revealed that the method was linear between 4-30 $\mu\text{g/mL}$ variation intervals with correlation coefficient of 0.9996. LOD and LOQ parameters were calculated as 0.61 $\mu\text{g/mL}$ and 1.85 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Pharmaceutical preparations named Cozaar, Eklips, Loxibin, Sarilen and Sarvas were analyzed by the developed kinetic spectrophotometric method and the results ranged between 94.9 % and 100.9 %.

Conclusion. This new kinetic UV-visible spectrophotometric method for assessment of LP in pharmaceutical preparations was resulted as successful. The method can be used in routine analysis.

Key Words: Central composite design method, LC-MS, losartan potassium, spectrophotometry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Amlodipin besilat
ACE	: Anjiyotensin-dönüştürücü enzim
AT	: Atenolol
AD	: Amplodipin
ARB	: Anjiyotensin II reseptör blokerleri
ATO	: Atorvastain
BCP	: Bromocresol mor
BPB	: Bromofenol mavi
BSS	: Bağlı standart sapma
CHF	: Klemastin hidrojen fumarat
CT	: Calmagite
CLS	: Klasik en küçük kareler
DL	: Desloratadin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EMI	: Elektromanyetik ışıma
EMR	: Elektromanyetik radyasyon
ENA	: Enalapril
EXP 3174	: Losartan karboksilik asit (Losartan potasyumun aktif metaboliti)
GC	: Gaz kromatografi
GK	: Geri kazanım
HBB	: Hiyosin butil bromit
HCTZ	: Hidroklorotiazid
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPTLC	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi

LC	: Sıvı kromatografisi
LCOOH	: Losartanın karboksilik asit türevi
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
LP	: Losartan potasyum
LS	: Losartan
MH	: Moxepril HCl
MLR	: Çoklu doğrusal regresyon
MS	: Kütle spektroskopisi
O-II	: Orange-II
OP	: Omeprazol
PCR	: Temel bileşenler regresyon
PSL	: Kısmi en küçük kareler
RAS	: Renin-anjiyotensin sistemi
SER	: Sertalin HCl

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. LP'nin molekül yapısı.....	10
Şekil 2.2. Elektromanyetik spektrumun bölgeleri.....	27
Şekil 2.3. Moleküllerin UV-Görünür bölge spektrumları ve elektronik geçişleri ...	29
Şekil 2.4. Bir organik molekül için enerji-düzey diyagramı	30
Şekil 2.5. Elektronlar arasındaki muhtemel geçişler.....	31
Şekil 2.6. Spektrofotometre cihazının basit bir diyagramı.....	35
Şekil 2.7. Tek ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı	39
Şekil 2.8. Çift ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı	40
Şekil 2.9. Kemometrinin kullanıldığı bilim dalları	43
Şekil 3.1. LP'nin LS'ye dönüşüm reaksiyonu	57
Şekil 3.2. LS'nin karboksilik asit türevine dönüşüm reaksiyonu.....	58
Şekil 3.3. İyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu triiyodür kompleks iyonunun oluşum reaksiyonu	58
Şekil 4.1. LP için LC-MS spektrumu.....	64
Şekil 4.2. LS için LC-MS spektrumu.....	65
Şekil 4.3. LCOOH için LC-MS spektrumu.....	66
Şekil 4.4. Triiyodür kompleks iyonu için LC-MS kromatogramı.....	67
Şekil 4.5. LP'nin degradasyon ürünlerinin varlığında triiyodür kompleks iyonunun absorpsiyonunun zamanla değişimi (λ : 286 nm, 32.3°C)	69
Şekil 4.6. 20 μ g/mL LP'den oluşan degradasyon ürünlerinin varlığında triiyodür kompleks iyon çözeltisinin UV-Görünür bölge spektrumu	70

- Şekil 4.7.** Sıcaklık, KI ve KIO₃ derişimlerinin bir fonksiyonu olarak triiyodür kompleks iyonunun absorbans yüzey cevap eğrileri A) Sıcaklık ve KI derişimi B) KI derişimi ve KIO₃ derişimi C) Sıcaklık ve KIO₃ derişimi 75
- Şekil 4.8.** A) 16 µg/mL derişimde standart LP'nin ve B) LS formuna dönüştürülen LP'nin UV-Görünür bölge spektrumu76
- Şekil 4.9.** LCOOH formuna dönüştürülen LP'nin UV-Görünür bölge spektrumu..77
- Şekil 4.10.** UV-Görünür bölge spektrumu A) Kör çözelti B) LP'den oluşan LCOOH varlığında triiyodür kompleks iyon çözeltisi78
- Şekil 4.11.** Çalışma çözeltilerinin 286 nm'de (A) ve 352 nm'de (B) çizilen ortalama kalibrasyon eğrisi79
- Şekil 4.12.** 20 µg/mL derişimde Cozaar (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu.....83
- Şekil 4.13.** 20 µg/mL derişimde Eklips (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu.....83
- Şekil 4.14.** 20 µg/mL derişimde Loxibin (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu.....84
- Şekil 4.15.** 20 µg/mL derişimde Sarilen (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu.....84
- Şekil 4.16.** 20 µg/mL derişimde Sarvas (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu.....85

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1.	Kan basıncı yüksekliğine bağlı olarak tanı ve sınıflandırma (mm-Hg)...4	
Tablo 2.2.	Merkezi kompozit dizayn tablosu.....47	
Tablo 2.3.	Değişkenler ve çalışma aralığındaki değerlerin kodlanması ile oluşturulan matris48	
Tablo 3.1.	UV-Görünür bölge spektrofotometre şartları55	
Tablo 3.2.	LC-MS yöntem şartları.....56	
Tablo 3.3.	MS parametre değerleri56	
Tablo 3.4.	LP analizi için faktörler ve belirlenen aralıklar60	
Tablo 3.5.	Uygulanan merkezi kompozit dizayn kapsamındaki deneyler60	
Tablo 4.1.	[KIO ₃] ve [KI] sabit tutularak LP'nin farklı derişimlerinde reaksiyon başlangıç hızı68	
Tablo 4.2.	Merkezi kompozit dizayn kapsamında yapılan deney sonucunda bulunan yanıt değerleri71	
Tablo 4.3.	Hesaplamalar sonunda bulunan b değerleri.....71	
Tablo 4.4.	Oluşturulan y denklemleri ve dizayn expert 8 programından yararlanılarak çözülen denklemler.....72	
Tablo 4.5.	Numerik analizde iterasyon yöntemi ile bulunan X ₁ , X ₂ ve X ₃ kod değerleri72	
Tablo 4.6.	LP analizi için bulunan optimum değerler72	
Tablo 4.7.	Teorik ve deneysel absorbans değerleri.....73	
Tablo 4.8.	Çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri78	
Tablo 4.9.	Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....80	

Tablo 4.10. Farmasötik preparatlara katım yapılan LP çözeltilerinin geri kazanım değerleri	81
Tablo 4.11. LP ve LS standart çözeltilerinin stabilitesi	82
Tablo 4.12. LP içeren farmasötik preparatların spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini	85

1. GİRİŞ

Hipertansiyon, kan basıncının devamlı olarak 140/90 mm-Hg değerinin üzerinde olması anlamına gelir. Hipertansiyon dünya çapında oldukça yaygın bir sağlık problemidir ve ülkemizde erişkin her 3 kişiden 1'inde hipertansiyon vardır. Hipertansiyonun yaygınlığının sebebi, hastalığın doğru bir şekilde teşhis edilememesi ve hastaların bilinçsizliği ile birleşerek yetersiz tedavi edilmesidir. Yeni hipertansiyon yönergeleri, hastalarda hedef kan basıncı değerlerine ulaşmak için yaşam tarzının değişikliğine ek olarak ilaç tedavisinin önemini vurgulamaktadır. Hipertansiyon tedavisinde son yıllarda ilaçla tedavide büyük atılımlar olmuş ve bu durum, ilaçların farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda analitik yöntemler ile analiz edilebilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB), vücutta anjiyotensin II hormonunun etkilerini bloke ederek kan basıncını düşüren anti-hipertansif bir ilaç grubudur. Losartan potasyum (LP), ilk tanıtılan ARB grubu ilaçtır ve vücutta renin anjiyotensin sistemine katılıp kan basıncında artışa neden olan Anjiyotensin-II reseptörünü inhibe eder.

UV-Görünür bölge spektroskopisi, ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyonu temel alan spektroskopik bir yöntemdir ve sadelik, çok yönlülük, hız, doğruluk ve maliyet etkinliği açısından ilaç analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. İlaç etkin maddelerinin doğrudan spektrofotometrik analizinde duyarlılık ve seçicilik bazen düşük olabilir. Böyle durumlarda ilacın bir veya daha fazla reaktif ile kompleksi oluşturularak analiz edilebilir. UV-Görünür bölge spektrofotometre ile kantitatif analizlerin yanı sıra kinetik çalışmalar da gerçekleştirilebilmektedir.

Yüksek verimli deneysel çalışmalar, deneysel dizayn ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanır. Deneysel dizayn ve kantitatif değerlendirmeler matematiksel modeller veya tasarımlar ile başarılabılır. Merkezi kompozit dizayn yöntemi deneysel

dizayn yöntemlerindedir. Avrupa birliğinin getirdiği normlar çerçevesinde çevrenin daha az kirlenmesine neden olan daha ekonomik analitik yöntemlerin geliştirilmesinde merkezi kompozit dizayn yöntemi sıkça başvurulan bir yöntem haline gelmiştir.

İlaç analizlerinde analitik yöntem seçimi ve geliştirilmesi yapıldıktan sonra yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğruluk, kesinlik, doğrusallık, seçicilik, spesifiklik ve hassaslık gibi parametreleri içeren geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Analitik yöntemin geçerlilik testleri yapıldıktan sonra belirlenen yöntemin uygulanabilir olduğu, gerçek numunelerde (farmasötik preparatlar ve biyolojik sıvılar) ilaç etkin maddelerin analizi yapılarak gösterilir.

Literatürde, etkin madde olarak seçilen LP'nin farmasötik preparatlarda belirlenmesine yönelik doğrudan veya kompleks oluşumu esasına dayalı spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Ayrıca türev spektrofotometri ve HPLC yöntemleri ile farmasötik preparatlarda LP'nin analizinin yapılabileceğine dair çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. ARB grubu ilaç etkin maddelerinin butil zincirindeki metil grubu iyodat ile oksidasyona uğrayarak karboksilik asit türevi oluşturur. Karboksilik asit türevinin varlığında iyodür iyodat ile oksidasyona uğrar ve sarı renkli triiyodür kompleks iyonu meydana gelir. Bu reaksiyon mekanizması ile LP'nin farmasötik preparatlarda spektrofotometrik olarak belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için LP'nin karboksilik asit formunun varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu triiyodür kompleks iyonunun oluşumu esasına dayanan yeni bir kinetik spektrofotometrik yöntemin geliştirilmesi, deneysel koşulların merkezi kompozit dizayn yöntemi ile optimize edilmesi ve geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon

Kan basıncı, kanı kalpten dokulara taşıyan damarlarda oluşan basınçtır. Tansiyon kısaca kan basıncı olarak tanımlanır. Kan basıncı (veya tansiyon) iki ölçümle ifade edilir. Bunlar; sistolik basınç (büyük tansiyon) ve diastolik basınçtır (küçük tansiyon). Bugün kabul edilen kan basıncı, istirahat halinde 120/80 mm-Hg'dır. Yaş, cinsiyet, ırk, fiziksel durum (istirahat, efor gibi) kan basıncını etkiler. Herhangi bir kişide kan basıncı uyku sırasında düşük, sinirli, heyecanlı iken veya efor sırasında yüksektir. Kan basıncı devamlı olarak 140/90 mm-Hg üzerinde seyrediyorsa hipertansiyondan bahsedilir. Yüksek kan basıncı hipertansiyon olarak adlandırılır. Kan basıncı aynı birey için ve bireyler arasında farklılık gösterir. Bu nedenle bireyin kan basıncı doktor tarafından en az 2 kez yüksek bulunmalıdır. Hipertansiyonun görülme sıklığı yaklaşık olarak %20 olup eğer tedavi edilmezse ciddi oranda beyin, kalp, damar, göz ve böbrek hastalıklarına ve ölümlere neden olur.¹ Hipertansiyon kalp hastalıkları için ana bir risk faktörüdür. Kan basıncı arttıkça miyokard infarktüsü, kalp yetmezliği ve inme olasılığı artar.²

2.2. Hipertansiyonun Görülme Sıklığı

Türkiye'de yapılan çalışmalarda erişkin yaş grubunda hipertansiyonun görülme sıklığı %33 (Türk Kardiyoloji Derneği çalışması) - %35.9 (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği) arasında değişmektedir. Yaş ilerledikçe hipertansiyon görülme sıklığı artar, genelde 30 yaş üzerinde her 6 kişiden, 40 yaş üzerinde ise her 5 kişiden 1 kişi hipertansiftir, 65 yaş üzerinde hipertansiyonun görülme sıklığı yaklaşık %65'dir. Siyahlarda beyazlara göre hipertansiyon gözlenme olasılığı daha fazladır. Hipertansiyon 50 yaşından önce erkeklerde, daha sonra ki yaşlarda kadınlarda sıktır.² Hipertansiyonun dünya genelinde 600 milyon insanda görüldüğü ve her yıl 3 milyon insanın ölümüne

neden olduğu belirtilmektedir.³ Ayrıca ilerleyen zamanlarda nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak hipertansiyon görülme sıklığının artacağı öngörülmektedir.

2.3. Kan Basıncı ve Hipertansiyonun Sınıflandırılması

Erişkinlerde kan basıncı, the Joint National Committee on the Dedection (JNC7), the European Society of Hypertension (ESH) ve the European Society of Cardiology (ESC) kuruluşları tarafından sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.1).²

Tablo 2.1. Kan basıncı yüksekliğine bağlı olarak tanı ve sınıflandırma (mm-Hg)

Kategori	Sistolik Kan Basıncı	Diastolik Kan Basıncı
Optimal	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Yüksek Normal	130-139	85-89
Evre 1 Hipertansiyon	140-159	90-99
Evre 2 Hipertansiyon	160-179	100-109
Evre 3 Hipertansiyon	≥ 180	≥ 110
İzole Sistolik Hipertansiyon	≥ 140	< 90

Hipertansiyon iki sınıfa ayrılır.

1- Esansiyel (primer) hipertansiyon

2- Sekonder hipertansiyon

Hipertansiyon vakalarının yaklaşık %90'ının gerçek nedeni net olarak tanımlanamamaktadır. Bu durum esansiyel hipertansiyon olarak adlandırılır. Hipertansiyon vakalarının %10'unun nedeni bilinir ve sekonder hipertansiyon olarak adlandırılır.

Primer hipertansiyonun başlıca nedenleri, genetik yatkınlık, aşırı tuz tüketimi, obezite, artmış sempatik aktivite, renin-anjiyotensin sisteminin rolü, intraselüler sodyum

ve kalsiyum artışı ve düşük doğum ağırlığıdır. Artıran faktörler ise aşırı alkol alımı, sigara, polisitemi, nonsteroidal antiinflamatuvarlar ve düşük potasyum alımıdır.²

Sekonder hipertansiyonun başlıca nedenleri ise böbrek hastalıkları, ilaçlar (östrojen kontraseptifler, kortikosteroidler, meyanökü, carbenoxelone, sempatomimetikler ve non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar), endokrin rahatsızlıkları (akromegali, Cushing sendromu (hiperkortisizm), primer hiperaldosteronizm, konjenital hiperplazi, feokromositoma, tiroid hastalığı, hiperparatiroidizm), aort koarktasyonu (aorttaki daralma sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır) ve hamileliktir.³

Vücuttaki bir takım fizyolojik mekanizmalar normal kan basıncının sağlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu tip sistemlerin bir rahatsızlığı hipertansiyonun oluşmasına sebep olabilir. Kardiak debi (kalbin bir dakikada periferik sirkülasyona pompaladığı kan miktarıdır) ve periferik direnç (damar iç çeperine yapılan basınç) kan basıncı kontrolü ile direkt olarak ilişkilidir. Kan basıncında etkili olan diğer sistemler;

- Renin-anjiyotensin sistemi (RAS)
- Otonom sinir sistemi
- Endotelin (dolaşım sisteminin tüm yapılarının iç yüzünü örten ince katman), bradikinin peptidleri, artiyal natriüretik peptid (kuvvetli bir damar genişletici hormon), ouabaindir (kalp üzerinde uyarıcı etkiye sahip bir glikozid).⁴

2.4. Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)

Kan basıncı, birçok sayıda karmaşık ve iç içe geçmiş biyolojik sistemlerin kontrolü altındadır. RAS, kan basıncı düzenlenmesinde yer alan bir kaskad oluşturan enzimler zinciridir. Anjiyotensin II, RAS'ın etkin hormonudur. Hipertansiyon vasküler tonusunun, sıvı hacminin ve elektrolit dengesinin düzenlenmesinde önemli rol alır. Anjiyotensin II sentezi, karaciğerde bir alfa₂ globulin olan anjiyotensinojenin üretimi ile başlar. Anjiyotensinojen, böbrekten salgılanan bir enzim olan renin ile parçalanarak

aktif olmayan dekapeptid yapısındaki anjiyotensin I'e dönüşür. Anjiyotensin I ise karboksipeptidaz yapısındaki anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ile RAS'ın etkin molekülü olan oktapeptid yapısındaki anjiyotensin II'ye çevrilir. Anjiyotensin II, AT₁ ve AT₂ olarak adlandırılan iki tip reseptöre bağlanarak etki eder. Anjiyotensin II'nin fizyolojik etkileri çoğunlukla AT₁ üzerinden gerçekleşmektedir.

Bu etkiler vazokonstrüksiyon, aldosteron salınımı, antidiüretik hormon sentezi, sempatik aktivasyon ve böbrek tübüllerinden tuz Emilimi olarak sayılabilir. Tüm bu etkiler, hipertansiyon gelişimine neden olmaktadır. Hipertansiyon gelişiminde en önemli etki, anjiyotensin II'nin arteriyel düz kaslar üzerindeki direkt kontraksiyon etkisidir. Bunlara ek olarak kalp üzerindeki pozitif inotropik etkisi, kan basıncının yükselmesine az da olsa katkıda bulunmaktadır. Anjiyotensin II aynı zamanda endotel hücrelerinde düzensizlik, medial hipertrofi ve bağ dokusunda artışa sebep olarak ateroskleroza neden olur. Anjiyotensin II, kalp kasında miyozitlerde büyümeye, sol ventrikül hipertrofisine ve kalp yetmezliği gelişimine sebep olur. Böbrek yetmezliği gelişimi, glomerüler dolaşım bozuklukları ile anjiyotensin II ilişkisi yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. Anjiyotensin II'nin aktivasyonunun engellenmesi, kan basıncı tedavisinin ötesinde tüm fizyolojik sistemlerin korunması için anahtar hedeflerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Anjiyotensin II'nin kan basıncı kontrolündeki önemi RAS inhibitörlerinin keşfinden sonra daha iyi anlaşılmıştır. RAS'ı bloke etmek için kullanılan inhibitörler üç başlık altında toplanmaktadır. Bunlar;

1. Renin inhibitörleri,
2. ACE inhibitörleri,
3. Anjiyotensin II reseptör blokerleri (antagonistleri) (ARB) olarak sıralanır.

Anjiyotensin II'nin oluşumunun engellenmesi için substrata yüksek oranda spesifik bir aspartik proteaz olan reninin inhibisyonu ilk akla gelebilecek yoldur. Oral olarak kullanılan renin inhibitörlerinin biyoyararlanımındaki düşüklük ve üretimindeki yüksek maliyet kullanımını güçleştirmektedir. ACE inhibitörleri, anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü engeller. ACE aynı zamanda bir kininaz olarak rol oynamakta ve bradikinin benzeri kininlerin yıkımını sağlamaktadır. ACE inhibitörlerinin kullanımı ile kinin serum düzeyleri yükselmektedir. Kininler vazodilatasyon yaparak kan basıncının düşmesine yardımcı olur. Fakat kinin düzeylerinin artması, alerjik reaksiyonların oluşumuna ve ölümcül anjiyoödem tablosunun gelişimine neden olabilir.

2.4.1. Anjiyotensin II Reseptör Blokerleri (ARB)

AT₁ reseptör antagonistleri, AT₁ antagonistleri, sartanlar veya ARB olarak adlandırılmaktadır. Hipertansiyon tedavisinde henüz ACE inhibitörleri kullanıma girmeden önce ARB olan saralasinin kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir. 1990'lı yıllarda anjiyotensin II'nin iki esas reseptörü olduğu bulunmuştur. Tip I (AT₁) reseptör subtipi anjiyotensin II'nin fizyolojik etkilerinin büyük çoğunluğunu gerçekleştirdiği reseptördür. Bu reseptörlerin sinyal mekanizmalarında ve fonksiyonlarında farklılık vardır. Hücre çoğalması ve kan basıncı üzerine etkileri birbirleri ile zıt etkiler taşımaktadır. Bu etkiler göz önüne alınarak hipertansiyon tedavisinde seçici AT₁ reseptör antagonistleri geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. ARB'ler ACE inhibitörleri ile karşılaştırıldığında RAS'ın blokajında daha etkin ve özgün olarak düşünülmektedir. Son yıllarda anjiyotensin II sentezinin ACE dışı bazı enzimlerle de olduğu gösterilmiştir. ACE dışı enzimlerle anjiyotensin II sentezi, normal fizyolojik koşullarda tartışmalı olmakla birlikte, ilaç tedavisi esnasında ve nefrektomi sonrasında ön plana çıkmaktadır. Cathepsin G, tonin ve doku plazminojen aktivatörü

anjiyotensinojeni anjiyotensin II'ye direkt olarak dönüştürmektedir. Cathepsin G tonin, kimaz ve kimostatin hassas anjiyotensin II oluşturan enzimler aynı zamanda anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü sağlamaktadır. ACE inhibitörleri ile anjiyotensin II'nin sentezi ve etkileri tam olarak engellenememektedir. Bu nedenlerle ARB kullanımı ile reseptörler tam bloke edildiğinden ACE inhibitörleri kullanımına göre anjiyotensin II'nin daha etkin engelleneceği öne sürülmektedir. ARB'ler, ACE inhibitörlerine benzer şekilde anjiyotensin II'nin vazokonstrüktör etkisini azaltarak periferik vasküler direnci düşürür. Bu hipotansif etki kardiyak atım hacminde, kalp hızında ve glomerüler filtrasyon hızında azalmaya yol açmaz. Anjiyotensin II'nin doku düzeyinde reseptörlere bağlanmasının engellenmesi vazodilatasyon etkinin ötesinde diğer kardiyovasküler ve renal etkilerin ortaya çıkmasını sağlar. Bu etkiler;

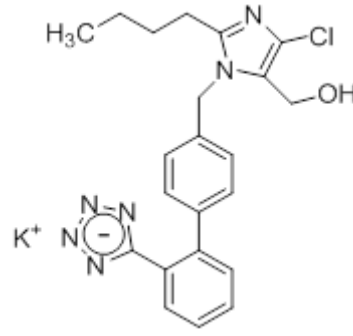
1. Böbrek kan akımında artış, aldosteron düzeyinde düşmeye bağlı natriürezis,
2. Direkt etki ile tübüler sodyum emiliminde azalma,
3. Nitrik oksite bağlı endotel fonksiyonlarında iyileşme,
4. Vasküler hipertrofide gerileme,
5. Sempatik sinir sistemi aktivasyonunda ve presinaptik noradrenalin salınımında azalma,
6. Noradrenalin veya anjiyotensin II'nin postjunctional kan basıncını artırıcı etkisinde inhibisyon,
7. Santral anjiyotensin II'ye bağlı sempatik uyarı artışında inhibisyon ve vazopressin salınımında azalma,
8. Santral baroreseptörlerde inhibisyon,
9. Santral sinir sistemi noradrenalin sentezinde azalma,
10. Susama merkezinde inhibisyon,
11. RAS'a bağlı endotelin 1 aktivasyonunda inhibisyon olarak sayılabilir.

ARB'lerin antihipertansif etkisi, RAS sisteminin aktivasyonuna bağlıdır. ARB'ler, AT₁ reseptörüne anjiyotensin II'nin bağlanmasını engellediğinden, bu molekül zıt etkilere neden olan AT₂ reseptörlerine yönelir. Sonuç olarak, AT₂ reseptörlerinin uyarılması vazodilatasyonun artmasına neden olacaktır. ARB'ler aynı zamanda anjiyotensin I-VII, AII, AIII ve AIV benzeri serum anjiyotensin peptidlerinin artmasına neden olmaktadır. Bu peptidler bağlandıkları reseptörlerle uyumlu olarak vazokonstrüksiyonu, böbrek kan akımını ve vasküler hipertrofiyi etkilemektedir.

ARB'ler, peptid ve peptid olmayan yapıları, metabolizmaları ve potansiyel etkileri farklılık gösteren analoglardır. Günümüzde klinik kullanımda olan yedi tür ARB bulunmaktadır. Oral olarak biyoyararlanımı olan ilk ARB, losartandır (LS). Birçok diğer ARB LS'den üretilmiştir. ARB'ler; moleküler yapılarına göre bifenil tetrazol türevleri (kandesartan sileksetil, eprosartan, irbesartan, LP, olmesartan medoksomil), nonbifenil tetrazol türevleri (telmisartan) ve nonheterosiklik türevler (valsartan) olarak kategorize edilebilir. ARB'ler aynı zamanda AII'yi antagonize etme yeteneklerine göre kompetif (LS, eprosartan) ve nonkompetif (kandesartan, sileksetil, irbesartan, valsartan, telmisartan, olmesartan) olarak sınıflandırılır.⁵

2.5. Losartan Potasyum (LP)

LP, [(2-bütül-4-kloro-1-{[2-(1H-tetrazol-5-il) bifenil-4-il] metil}-1H-imidazol-5-il) metanol monopotasyum] yapısında olup 461.00 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Kapalı formülü ise C₂₂H₂₃ClKN₆O şeklindedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. LP'nin molekül yapısı

LP, beyaz veya kirli beyaz-grimsi renkte, kristal yapıda bir tuzdur.⁴ Suda ve alkoldeki çözünürlüğü yüksektir, organik çözücülerdeki çözünürlüğü genellikle çok azdır.⁶ Erime noktası 183.5 – 184.5°C aralığında olup pH değeri 7.0-8.5 aralığındadır.

2.5.1. LP'nin Farmakolojik Özellikleri

LP, ilk tanımlanan ARB grubu ilaçtır ve bir dizi 1-benzilimidazol-5-asetik asit serilerinden elde edilmiştir. Hipertansiyon tedavisinde LP'nin etkinliği ve güvenilirliğinin incelendiği bir çalışmada, tedavinin ilk birkaç haftasında kan basıncını azalttığı gösterilmiştir. LP'nin günde bir kez 50-150 mg dozajı ile sistolik basınç için 5.5-10.5 mm-Hg, diastolik basınç için 3.5-7.5 mm-Hg kan basıncı azalması elde edilir.^{7,8} Tek ve çoklu doz çalışmaları sağlıklı gönüllülerde yapılmış ve bu çalışmalarda LP'nin AT₂ reseptörlerini inhibe ettikleri kanıtlanmıştır. LP için başlangıç dozu 50 mg'dır. Bu doz için aktivite süresi 24 saattir. Beklenen antihipertansif etki görülmez ise günde iki doz kullanılabilir.⁹ Yapılan bir çalışmada, LP'nin günde bir kez 100 mg'lık doz kullanımı günde iki kez 50 mg'lık doz kullanımı ile karşılaştırılmış ve her iki dozaj şeklinde aynı antihipertansif etki gösterdiği tespit edilmiştir.¹⁰ Hipertansif hastalarda yapılan bir tekrarlayan doz (7 gün boyunca) çalışmasında ise, LP'nin yedinci günde antihipertansif etkisinin ilk güne göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle tek

doz yerine LP'nin çoklu dozlar halinde uygulanmasının daha yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.¹¹ Ayrıca hidroklorotiazid (HCTZ) ilavesinin LS'nin antihipertansif etkisini arttırdığı belirtilmektedir. 12.5 mg HCTZ ve 50 mg LP içeren kombinasyonlar mevcuttur. Bazı araştırmacılar düşük dozda LP kullanımının LP'nin yan etkilerini azalttığını belirtmişlerdir. Bu yüzden dozaj artırılması yerine HCTZ ile kombinasyonunun kullanılmasını önermektedirler. Dozaj günde maksimum bir veya iki kez olmalıdır.¹²

Yapılan çift-kör çalışmalarında da LP'nin kan basıncını düşürmede iyi tolere edilebildiği ve enalapril ve nifedipin kadar etkili olduğu gösterilmektedir.^{7,8} LP'nin aktif metaboliti EXP 3174'tür. LP ile karşılaştırıldığında, aktif metaboliti (EXP 3174) daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir ve plazma derişimine bağlı olarak daha uzun antihipertansif etki gösterir.¹³

ARB grubu ilaçlar iyi bir tolerebilite ve güvenlik profiline sahip olup yan etkileri tedavinin kesilmesini gerektirmeyecek şekilde hafif ve geçici niteliktedir. Klinik çalışmalarda, ARB ile tedavi edilen hastalarda en sık görülen yan etkiler baş dönmesi, baş ağrısı, üst solunum yolu enfeksiyonu, öksürük ve gastrointestinal bozukluklardır. Plasebo alan hastalarda da bu etkiler aynı oranda gözlenmiştir.¹⁴

2.5.2. LP'nin Farmakokinetik Özellikleri

LP kolayca emilir ve sitokrom P-450 sistemi aracılığı ile aktif metaboliti olan EXP 3174'e dönüştürülür. LP'nin emilimi gıdalar tarafından etkilenmez. Maksimum derişime ulaşma süresi LP için 1 saat iken EXP 3174 için 3.5 saattir. Maksimum plazma derişimi yaklaşık olarak eşit olduğu halde, derişim-zaman eğrisinin altında kalan alan, EXP-3174'de LP'ye göre dört kat daha fazladır.^{7,15,16} Ortalama eliminasyon yarı ömürleri ise LP ve EXP 3174 için sırasıyla 2.1 ve 6.3 saattir ve akut veya kronik dozajın

24 saat sonrasında sadece EXP 3174 hala plazmada saptanabilir. LP safra kesesi yoluyla ve %4'lük kısmı değişime uğramadan idrar yoluyla vücuttan atılır.¹⁵

2.5.3. LP ve Diğer ARB İlaçların Karşılaştırılması

ARB grubu ilaçlar ve LP arasındaki karşılaştırmalar bazı anlamlı farklılıklar gösterse de meta-analiz sonuçları bu farklılıkların klinik ve istatistiksel açıdan önemli olmadığını ortaya koymaktadır.^{17,18} ARB grubu ilaçlardan LP, valsartan ve irbesartan ile yapılmış olan klinik çalışmalardan elde edilen veriler, bu ajanlar arasında antihipertansif etki açısından önemli örtüşmelerin olduğunu göstermektedir.¹⁷ Tavsiye edilen dozlarında, her üç ajan da sistolik kan basıncını 16.1 - 20.6 mm-Hg ve diastolik kan basıncını 9.9-13.6 mm-Hg arasında düşürmektedir ve doz miktarı izin verilen ölçülerde arttırıldığında bütün ARB'lerin basınç düşürücü etkilerinin yaklaşık olarak %5 oranında arttığı gözlenmektedir.¹⁷ LP, valsartan ve irbesartanın AT₁ reseptör blokajının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada irbesartanın 150 mg'lık tek dozunun AT₁ reseptörleri üzerinde LP ve valsartana göre daha büyük ve daha uzun ömürlü bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur.¹⁹

2.5.4. LP İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri

1. Cozaar 100 mg, Cozaar 50 mg - Merck Sharp & Dohme İlaç Sanayi
2. Eklips 100 mg, Eklips 50 mg - Sanovel İlaç Sanayi
3. Fellow 100 mg, Fellow 50 mg - Munir Sahin İlaç Sanayi
4. Hilos 100 mg, Hilos 50 mg –Nobel İlaç Sanayi
5. Losartil 100 mg, Losartil 50 mg - Drogsan İlaç Sanayi
6. Loxibin 100 mg, Loxibin 100 mg - Biofarma İlaç Sanayi
7. Sarilen 100 mg, Sarilen 50 mg - Ali Raif İlaç Sanayi
8. Sarvas 100 mg, Sarvas 50 mg - Zentiva İlaç Sanayi

2.6. LP Analizi için Analitik Yöntemler

Zhao ve ark.²⁰ bozundurmaya uğramış (40°C, %75 nem oranı, 3 yıl) LP tabletlerini LC-MS ve LC-MS/MS yöntemleri ile analiz etmişler ve bu şartlar altında LP'nin bozunmasını ve oluşan yeni moleküllerin kimyasal yapılarını incelemişlerdir. Hem LC-MS hemde LC-MS/MS yöntemi için tabletler asetonitril:metanol (1:1, h/h) içerisinde çözülerek çözeltileri hazırlanmış ve LP'nin dimerik türevleri ve aldehit olan üç adet eser miktarda bozunma ürünü tespit edilmiştir. Bozunma ürünleri özgün maddelerin tandem kütle spektrumları ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır.

Carlucci ve ark.²¹ HPLC yöntemi ile tabletlerde LP ve HCTZ analizine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Kromatografik ayırım asetonitril ve fosfat tamponu çözeltisi (pH 4.0; 0.1 M) (35:65, h/h) kullanılarak C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. LP için 3.0-7.0 µg/mL ve HCTZ için 0.5-2.0 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu tespit edilmiştir. LP ve HCTZ için LOQ değerleri sırasıyla 0.08 µg/mL ve 0.05 µg/mL olarak belirlenmiştir. İç standart olarak furprofenin kullanılmış olup LP, HCTZ ve iç standartın alıkonma zamanları sırasıyla 1.8 dak, 4.3 dak ve 7.2 dak olarak belirlenmiş ve kromatogramlarda herhangi bir interfere pike rastlanmadığı belirtilmiştir. Yöntemin kesinliğinin LP için 0.03-3.0% ve HCTZ için %0.3-3.8 aralığında değiştiği görülmüştür. Elde edilen verilere dayanarak yöntemin LP ve HCTZ içeren farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ analizi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Erk²² farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ'in birlikte belirlenmesi için HPLC ve spektrofotometri yöntemlerini geliştirmiştir. HPLC yöntemi ile kromatografik ayırım, C18 ters faz kolonunda sodyum dihidrojen fostat (pH 5.5), metanol ve asetonitril'den (8:2:1, h/h/h) oluşan hareketli faz kullanılarak yapılmış, 265 nm dalga boyunda ölçümler alınmış ve yöntemin 1-30 µg/mL LP ve 2-20 µg/mL HCTZ derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Sırasıyla 238.3 nm ve 230.4 nm dalga

boylarında birbirlerinin birinci türev spektrum oranlarına katkılarının olmadığı belirtilmiş ve 238.3 nm dalga boyunda LP'nin ikili karışım içinde analiz edilebileceği gösterilmiştir. Yöntemin LP ve HCTZ için sırasıyla 10-50 µg/mL ve 2-30 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve 0.64 µg/mL ve 0.088 µg/mL gözlenebilme sınırına sahip olduğu bildirilmiştir.

Çagigal ve ark.²³ insan idrarında anjiyotensin II reseptör blokerleri olan LP ve valsartanın spektrofotometrik analizi için en uygun pH, çözücü, sıcaklık ve slit aralığını belirlemek için fraksiyonel faktöriyel ve merkezi kompozit tasarım deneysel dizayn metodolojileri geliştirmişlerdir. Deneysel dizayn ile optimum koşullar ve maksimum floresans şiddeti belirlenmiş olup yöntemin sağlamlığı yapılan deneyler ile doğrulanmıştır. LP ve valsartanın asetonitril-0.05 M fosfat tampon (pH 2) (5:95 h/h) çözücü karışımında 20 ± 5 °C'de ve 5 nm slit aralığında, 247 nm uyarma ve 387 nm emisyon dalga boylarında en yüksek floresans şiddette sahip spektrumlar elde edilmiştir. İlaç içermeyen idrar örnekleri 20-50 yaş aralığında sağlıklı bireylerden, ilaç içeren örnekler ise tedavi altındaki hipertansiyon hastalarından alınmış olup elde edilen idrar örnekleri C18 kartuşlarının kullanıldığı katı faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve belirlenen optimum deney koşullarında analiz edilmiştir. Geliştirilen spektrofotometrik yöntemin %8 bağıl hata ile doğru, %8 varyasyon ile kesin 0.5 µg/mL derişim ile hassas olduğu belirlenmiştir.

Shah ve ark.²⁴ farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ'nin birlikte belirlenmesi için birinci türev spektroskopisi ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemlerini geliştirmişlerdir. Birinci türev spektrofotometri yöntemi ile LP ve HCTZ'nin standart çalışma çözeltileri suda hazırlanmıştır. Sırasıyla 271.6 nm ve 335.4 nm dalga boylarında LP ve HCTZ'nin ikili karışım içinde analiz edilebileceğini göstermişlerdir. Yöntemin LP ve HCTZ için sırasıyla 0.9998 ve 0.9997 korelasyon

katsayısı ile 30-70 µg/mL ve 7.5-17.5 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu bildirilmiştir. HPTLC yöntemi ile kromatografik ayırım, silikajel G60 F-254 TLC plakasında kloroform, metanol, aseton ve formik asit (7.5: 1.5: 0.5: 0.03, h/h/h/h) hareketli fazı karışımı kullanılarak başarılmıştır. Sırasıyla LP ve HCTZ için 0.61±0.02 ve 0.41±0.02 Rf değerlerine sahip olduğu belirlenmiş ve 254 nm dalga boyunda miktar analizleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemin LP ve HCTZ için sırasıyla 0.9944 ve 0.9979 korelasyon katsayısı ile 400-1200 ng/spot ve 100-300 ng/spot derişim aralığında doğrusal olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen her iki yöntemin geçerlilik testleri yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Ozkan²⁵ tabletlerde ve insan plazmasında LP ve HCTZ'nin birlikte belirlenmesi için bir RP-HPLC yöntemi geliştirmiştir. C18 ters faz kolon, 0.01 M KH₂PO₄: asetonitril (65:35, h/h; pH 3.1) hareketli faz karışımı ve 232 nm dalga boyu çalışma parametreleri kullanılarak kromatografik ayırımı gerçekleştirilmiş ve yöntemin doğrusallığı LP ve HCTZ için sırasıyla 25-10000 ng/mL ve 50-10000 ng/mL derişim aralığında elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri ise LP için 1.02 ng/mL ve 3.39 ng/mL, HCTZ için 4.49 ng/mL ve 14.96 ng/mL olarak bulunmuştur. Plazmadan LP ve HCTZ, asetonitril kullanılarak ekstrakte edilmiş ve geri kazanımın her iki analit için de %97.7'den büyük olduğu tespit edilmiştir.

Hertzog ve ark.²⁶ tabletlerde LP'nin belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. C8 kolon, 1.0 mL/dk akış hızı, 20 µL enjeksiyon hacmi, 20 mM fosfat tamponu (pH 7) ve asetonitril hareketli faz karışımı, gradiyent elüsyon ve 280 nm dalga boyu çalışma parametreleri kullanılarak kromatografik ayırım sağlanmıştır. Doğruluk, doğrusallık, geri kazanım ve hassasiyet gibi parametreler kullanılarak geliştirilen yöntemin geçerlilik testleri yapılmıştır.

Prabhakar ve ark.²⁷ ilaç ve sentetik karışım halindeki katı dozaj formlarında LP'nin belirlenmesi için iki farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Her iki yöntem de asidik ortamda (pH 1.2) gerçekleştirilmiş olup bu ortamda calmagite (CT) ve orange-II'nin (O-II) LP ile sırasıyla turuncu-kırmızı ve turuncu renkte iyon çifti kompleksleri oluşturulmuş ve oluşan kompleksler kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Optimum şartlarda, oluşan komplekslerin 491 nm (CT) ve 486 nm'de (O-II) maksimum absorbans gösterdiğini, 5 dakika stabil kaldığını ve 1.74×10^3 L/mol.cm ve 1.75×10^3 L/mol.cm molar absorptivitelere sahip olduğu tespit edilmiş ve ayrıca çalışmada, LP'nin kompleks bileşikleri için pH değerinin spektrofotometrik ölçümlerde son derece önemli olduğu belirtilmiştir. pH 1.2-10 aralığında yapılan çalışmada, pH 1.2-3 aralığında absorbansın yükseldiği, pH 4-10 aralığında ise hiç absorbans göstermediği tespit edilmiştir. Geliştirilen her iki yöntemin 10-100 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Shankar ve ark.²⁸ kombine dozaj formundaki farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ'yi birlikte belirlemek için iki farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen birinci yöntemde 206.6 nm ve 270.6 nm dalga boylarında ölçümler gerçekleştirilmiş ve analitlerin birlikte belirlenebilmesi için denklemler oluşturulmuştur. İkinci yöntemde ise LP için 206.6 nm ve 261.4 nm dalga boylarında ölçümler alınmış ve elde edilen absorbans değerlerinin farkları alınarak; HCTZ için ise 270.6 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri kullanılarak analitler belirlenmiştir.

Lastra ve ark.²⁹ farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için birinci türev spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. LP'nin birinci türev spektrumunda 234 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilmiş olup 0.9938 korelasyon katsayısı ile 4-6 mg/L derişim aralığında yöntemin doğrusal ve geri kazanımının %100.79±1.1 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca pH 2-9 değerleri arasında hazırlanan tampon çözelti ile pH'ın

birinci türev değerine olan etkisi araştırılmış ve birinci türev değerini önemli ölçüde değiştirmedığı için pH değerinin sabitlenmesine gerek olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sankar ve ark.³⁰ farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için LP'nin asidik ve bazik boyalar ile reaksiyona sokularak renkli kompleks oluşumu esasına dayanan dört farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerin ilk ikisinde sırasıyla pH 3.5 ve pH 1.5 olan asidik ortamda wool fast mavisi ve bromoksresol yeşilden oluşan asit boya ile diğer iki yöntemde ise pH 9.8 olan bazik ortamda safranin O ve metilen mavisinden oluşan bazik boyalar ile LP'nin renkli kompleksleri oluşturulmuş ve oluşan kompleksler kloroform ile ekstrakte edilmiştir.

Ansari ve ark.³¹ tabletlerde LP'nin belirlenmesi için birinci türev spektrofotometri ve HPLC yöntemleri geliştirmişler ve doğrusallık, seçicilik, geri kazanım, kesinlik, doğruluk ve hassasiyet parametreleri ile spektroskopik yöntemin geçerlilik testlerini gerçekleştirmişlerdir. Birinci türev spektrumunda 232.5 nm dalga boyunda, HPLC kromatogramında 254 nm dalga boyunda ölçümler alınmış olup her iki yöntemin de 2-50 µg/L derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. HPLC yönteminde, ODS-1 kolonu, asetonitril fosforik asit (pH 3) (60:40 h/h) hareketli faz karışımı ve 1 mL/dak akış hızı çalışma parametreleri kullanılmıştır. Yöntemin %2.1 ve %2.9' a (%CV) sahip bir kesinlik ve %98 geri kazanıma sahip olduğu gösterilmiş ve LP çözeltilerinin 1 ay boyunca stabil kaldığı tespit edilmiştir. Geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem ile tabletlerde yapılan analizlerde %85-%115 aralığında sonuçlar elde edilmiştir.

Rahman ve ark.³² farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için bir kinetik spektrofotometrik yöntem geliştirmişler ve geçerlilik testlerini gerçekleştirmişlerdir. Yöntemin oda sıcaklığında (25°C) LP'nin bazik potasyum permanganat ile oksidasyonuna dayalı olduğu belirtilmiş olup reaksiyon 603 nm dalga boyunda yapılan

ölçümler ile takip edilmiştir. Başlangıç zamanı, sabitlenmiş zaman (12 dakika) ve denge zamanı (90 dakika) yöntemlerini kullanarak absorbands değişimini ölçmek suretiyle 7.5-60.0 µg/mL derişim aralığında kalibrasyon grafikleri elde edilmiş ve yöntemlerin doğrusal olduğu belirlenmiştir. Belirtilen yöntemlerin gözlenebilme sınırları sırasıyla 0.71 µg/mL, 0.21 µg/mL ve 0.19 µg/mL olarak bulunmuştur. Optimum koşullar altında LP'nin oksidasyon tepkimesinin aktiflenme enerjisi ve entalpi (ΔH), entropi (ΔS) ve gibbs (ΔG) değişimi belirlenmiş olup sırasıyla 87.34 KJ/mol, 84.86 KJ/mol, 50.96 KJ/mol ve -15.10 KJ/mol olarak tespit edilmiştir.

Rahman ve ark.³³ farmasötik preparatlarda irbesartanı belirlemek için yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemin 30 ± 1 °C'de sulu ortamda sarı renkli triiyodür kompleks iyonlarının oluşması için potasyum iyodür (KI) ve potasyum iyodat (KIO_3) karışımıyla karboksilik asit grubunun reaksiyonuna dayalı olduğunu belirtmişlerdir. Oluşan triiyodür kompleks iyonunun 286 nm ve 352 nm dalga boylarında maksimum absorbands gösterdiği bildirilmiş ve 352 nm'de ölçülen absorbands değerlerini kullanarak başlangıç hızı ve sabit zaman yöntemleri olmak üzere iki yöntem geliştirmişlerdir. Belirtilen yöntemlerin sırasıyla 10.0-60.0 µg/mL ve 7.5-60.0 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, LOD ve LOQ değerlerinin ise sırasıyla 0.21 µg/mL ve 2.40 µg/mL olduğu belirlenmiştir.

Bonfilio ve ark.³⁴ farmasötik kapsülde LP analizi için bir UV dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada en uygun analiz koşullarını belirlemek amacıyla Doehlert dizaynı yöntemi (analiz sonuçlarını etkileyen faktörlerin belirli ölçülerde değiştirilmesi sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi ile en uygun koşulların hesaplandığı matematiksel bir yöntem) kullanılmıştır. Değişken faktörler olarak çözeltinin pH'ı (2.0, 3.25, 4.5, 5.75, 6.2 ve 7.0) ve fosfat tamponunun mobil faz içerisindeki oranı (%60, %65 ve %70) seçilmiştir. Optimum kromatografik ayırım,

potasyum fosfat tamponu (pH 6.2; 58 mmol/L) ve asetonitril (65:35, h/h) hareketli faz karışımı kullanılarak 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. Yöntemin 0.998 korelasyon katsayısı ile 30-70 mg/L derişim aralığında doğrusal olduğu ve üç farklı farmasötik preparat için geri kazanımın %95'den büyük olduğu belirlenmiştir.

Patil ve ark.³⁵ tablet dozaj formundaki farmasötik preparatlarda LP ve amlodipinin (AD) birlikte belirlenmesi için iki farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Birinci spektrofotometrik yöntem ile LP ve AD'nin standart çalışma çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. Sırasıyla 208 nm ve 237.5 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri ile LP ve AD'nin ikili karışım içinde analiz edilebilmesi için eşitlikler oluşturulmuş ve çözümleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemin her iki analit için 2-20 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve sırasıyla %102.93 ve %101.02 geri kazanım değerleri ile doğru olduğu bildirilmiştir. İkinci yöntemde ise karışım halinde bulunan analitlerin 242.5 nm ve 237.5 nm dalga boylarında (iso-absortif nokta) absorbansları ölçülmüş ve elde edilen değerlerin Q değer analizleri yapılmıştır. Q değer analiz yönteminde her iki analit için 2-20 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve sırasıyla %99.95 ve %99.33 geri kazanım değerleri ile doğru olduğu bildirilmiştir.

Rathee ve ark.³⁶ tablet dozaj formlardaki farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ'nin birlikte belirlenmesi için iki farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Her iki yöntemde de LP ve HCTZ'nin standart çalışma çözeltileri 0.01 N HCl çözeltilisinde hazırlanmıştır. Vierodt's yöntemi olarak adlandırılan birinci spektrofotometrik yöntemde LP ve HCTZ'nin sırasıyla 227.4 nm ve 270.4 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri ile LP ve HCTZ'nin ikili karışım içinde analiz edilebilmesi için eşitlikler oluşturulmuş ve çözümleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemin belirtilen analitler için sırasıyla 2.02-22.22 µg/mL ve 3.03-27.27 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve gün içi ve günler arası yapılan deneyler ile sırasıyla 0.566-1.31

ve 0.608-1.35 aralığında bulunan BSS değeri ile kesin olduğu tespit edilmiştir. Q-analiz veya Q-absorbans yöntemi olarak adlandırılan ikinci yöntemde ise karışım halinde bulunan analitlerin 256.4 nm ve 270.4 nm dalga boylarında absorbansları ölçülmüş ve elde edilen değerlerin Q değer analizleri yapılmıştır. Yöntemin belirtilen analitler için sırasıyla 5.05-50.50 µg/mL ve 3.03-27.27 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve yine gün içi ve günler arası yapılan deneyler ile sırasıyla 0.561-1.30 ve 0.602- 1.33 aralığında bulunan BSS değeri ile kesin olduğu tespit edilmiştir.

Bari ve ark.³⁷ farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ ile kombine dozaj formunda bulunan atenolölü (AT) belirlemek için UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Belirtilen analitlerin ikili karışımlarının çalışma çözeltileri metanol ve su çözücü karışımında hazırlanmış olup AT ve HCTZ için 224.20 nm ve 271.60 nm ve AT ve LP için 251.60 nm ve 224.20 nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri ile eşitlikler oluşturulmuş ve çözümleri gerçekleştirilmiştir. LP için 5-30 µg/mL ($r=0.9991$), HCTZ için 2-14 µg/mL ($r=0.9993$) ve AT için 2-12 µg/mL ($r=0.9995$) derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Kolsure ve ark.³⁸ kombine dozaj formundaki farmasötik preparatlarda atorvastain (ATO) ve LP'nin birlikte belirlenebilmesi için türev spektrumlarının oranına dayalı birinci türev spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. LP ve ATO için sırasıyla 237.2 nm ve 233.6 nm dalga boylarında birinci türev spektrumlarının oranı alınmış olup ATO için 4-12 µg/mL ve LP için 10-30 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen yöntem ile ticari formülasyonlardaki %safılık derecesi belirlenmiş ve bu değer LP için $\%98.91 \pm 0.51$ ve ATO için $\%98.56 \pm 0.27$ olarak tespit edilmiştir. Doğrusallık, kesinlik ve doğruluk parametreleri ile yöntemin geçerlilik testleri gerçekleştirilmiş olup farmasötik preparatlardan geri kazanım değerlerinin LP için $\%98.58 - 99.69$ ve ATO için $\%98.89-99.60$ aralığında olduğu belirtilmiştir.

Naqavalli ve ark.³⁹ standart ve farmasötik preparatlarda LP, amlodipin besilat ve HCTZ'nin birlikte belirlenmesi için klasik en küçük kareler (CLS), çoklu doğrusal regresyon (MLR), temel bileşenler regresyon (PCR) ve kısmi en küçük kareler (PLS) kemometrik yöntemlerini kullanarak dört farklı spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Her bir yöntem için 230.5-350.4 nm ($\Delta\lambda = 0.1$ nm) dalga boyu aralığında belirtilen analitlerin absorpsiyon spektrumu alınmış ve derişim veri matrisine karşı ölçülen absorbans veri matrisi kullanılarak kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Yöntemlerin doğrusallığı LP, amlodipin besilat ve HCTZ için sırasıyla 8-40 µg/mL, 1-5 µg/mL ve 3-15 µg/mL derişim aralığında belirlenmiştir.

Bonfilio ve ark.⁴⁰ 50 mg LP içeren farmasötik kapsüllerde LP'nin analizi için UV-Görünür bölge ve birinci türev spektrofotometri yöntemleri geliştirmişler ve geliştirdikleri yöntemlerin geçerlilik testlerini gerçekleştirmişlerdir. Her iki yöntemin çalışma çözeltileri su ile hazırlanmıştır. UV-Görünür bölge absorbans spektrumunda 205 nm dalga boyunda ve birinci türev spektrumunda 234 nm dalga boyunda ölçümler alınmış olup sırasıyla yöntemlerin 0.9999 korelasyon katsayıları ile 3-7 mg/L ve 6-10 mg/L derişim aralıklarında doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Latheeshjlal ve ark.⁴¹ farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için fosfat tamponu ile oluşturulan asidik ortamda (pH 3- pH 4), bromotimol mavisi ile reaksiyona sokularak 620 nm dalga boyunda renkli kompleks oluşumu esasına dayanan bir kinetik spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bromotimol mavisi ile LP çözeltilisinin renginin sarımsı-turuncudan yeşile dönüştüğü anda reaksiyonun tamamlandığı belirtilmiş ve yöntemin 5-25 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yöntemin tekrarlanabilirlik ve yenilenebilirliğini sağlamak için geri kazanım çalışmaları yapılmış ve geri kazanımın farklı formülasyonlar için %96.82 ile %100.08 arasında değiştiği belirtilmiştir.

Wankhede ve ark.⁴² kombine dozaj formundaki farmasötik preparatlarda amlodipin besilat (AB), LP ve HCTZ'nin birlikte belirlenmesi için iki farklı spektrofotometri ve HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen birinci spektrofotometri yöntemde AB, LP ve HCTZ için sırasıyla 236.5 nm, 254 nm ve 271 nm dalga boylarında ölçümler gerçekleştirilmiş ve analitlerin birlikte belirlenebilmesi için denklemler oluşturulmuştur. İkinci spektrofotometri yöntemde ise AB, LP ve HCTZ için sırasıyla 231.5-241.5 nm, 249-259 nm ve 266-276 nm dalga boyları aralığında pik alanları belirlenmiş ve elde edilen değerler ile analitlerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntemde de AB, LP ve HCTZ'nin sırasıyla 5-25 µg/mL, 10-50 µg/mL ve 5-25 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. HPLC yöntemi ile kromatografik ayırım, C18 ters faz kolonunda 0.025 M fosfat tamponu (pH 3.7) ve asetonitril (57:43, h/h) hareketli faz karışımı kullanılarak başarılmıştır. UV esaslı dedektörde belirtilen analitler 232 nm dalga boyunda belirlenmiş ve AB, LP ve HCTZ için sırasıyla 2-14 µg/mL, 20-140 µg/mL ve 5-40 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Shah ve ark.⁴³ farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ'nin birlikte belirlenmesi için birinci türev spektroskopisi ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemlerini geliştirmişlerdir. Birinci türev spektrofotometri yönteminde LP ve HCTZ'nin standart çalışma çözeltilerini suda hazırlamışlar ve sırasıyla 271.6 nm ve 335.4 nm dalga boylarında LP ve HCTZ'nin ikili karışım içinde analiz edilebileceğini göstermişlerdir. Yöntemin LP ve HCTZ için sırasıyla 0.9998 ve 0.9997 korelasyon katsayısı ile 30-70 µg/mL ve 7.5-17.5 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu bildirilmiştir. HPTLC yöntemi ile kromatografik ayırım, silikajel G60 F-254 TLC plakasında kloroform, metanol, aseton ve formik asit (7.5: 1.5: 0.5: 0.03, h/h/h/h) hareketli fazı karışımı kullanılarak başarılmıştır. Sırasıyla LP ve HCTZ'nin 0.61 ± 0.02

ve 0.41 ± 0.02 Rf değerlerine sahip olduğu belirlenmiş ve 254 nm dalga boyunda miktar analizleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemin LP ve HCTZ için sırasıyla 0.9944 ve 0.9979 korelasyon katsayısı ile 400-1200 ng/spot ve 100-300 ng/spot derişim aralığında doğrusal olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen her iki yöntemin geçerlilik testleri yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

El-Shiekh ve ark.⁴⁴ farmasötik preparatlarda hiyosin butil bromit (HBB), sertalin HCI (SER) ve LP'nin birlikte belirlenebilmesi için iki farklı spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Birinci yöntemde analitler kobalt(II)-tiyo siyonat ile reaksiyona sokularak iyon çifti kompleksleri oluşturulmuş ve sırasıyla 625 nm, 627 nm ve 630 nm dalga boylarında spektrumları alınmıştır. İkinci yöntemde analitler molibdenum(V)-tiyosiyonat ile reaksiyona sokularak iyon çifti kompleksleri oluşturulmuş ve sırasıyla 478 nm, 465 nm ve 468 nm dalga boylarında spektrumları alınmıştır. HBB, SER ve LP'nin her iki reaktif ile de sırasıyla mavi, turuncu ve kırmızı renkli kompleksler oluşturduğu belirtilmiştir. Birinci ve ikinci yöntemin her üç analit için sırasıyla 20–400 µg/mL ve 5-50 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Rao ve ark.⁴⁵ katı dozaj formundaki farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için ikinci türev spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. İkinci türev spektrumunda analitin ekşiyanlardan ayrıldığı belirtilmiş olup 234 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır. Yöntemin, 0.9989 korelasyon katsayısı ile 8-22 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve LOD ve LOQ değerinin ise sırasıyla 9.7 µg/mL ve 2.97 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem ile tablette yapılan analizlerde %100-%101 aralığında sonuçlar elde edilmiştir.

Abd El-Hay ve ark.⁴⁶ farmasötik preparatlarda klemastin hidrojen fumarat (CHF), desloratadin (DL), LP ve moxepiril HCI (MH)'in eozin ile kompleks oluşturması temeline dayalı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Optimum koşullar

belirlendikten sonra LP ve MH ile oluşan komplekslerin 540 nm'de, CHF ve DL ile oluşan komplekslerin sırasıyla 552 nm ve 549 nm'de maksimum absorbanans gösterdiği tespit edilmiştir. Yöntemin 1.25–11.25 µg/mL, 0.31–2.81 µg/mL, 2.5–20 µg/mL ve 1.25–15 µg/mL derişim aralıklarında sırasıyla CHF, DL, LP ve MH için doğrusal olduğu ve belirtilen analitler için LOQ değerlerinin sırasıyla 2.39 µg/mL, 3 µg/mL, 2.73 µg/mL ve 2.51 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ilaçlarda geri kazanımının oldukça yüksek olduğu (%99) belirtilmiştir.

El-Shaboury ve ark.⁴⁷ farmasötik preparatlarda LP, irbesartan, valsartan ve kandesartanın spektrofotometri yöntemi ile belirlenmesi için en uygun pH, çözücü ve sıcaklık koşullarını araştırmışlardır. 10 mg LP standart çalışma çözeltileri değişik polaritelere sahip çözücülerde (su, asetonitril, etanol, metanol ve propan-2-ol), değişik asit çözeltilerinde (HCl, sitrik asit, asetik asit, sülfürik asit, nitrik asit, okzalik asit ve fosforik asit), farklı pH değerlerinde ve farklı sıcaklıklarda ölçülerek en yüksek floresans şiddeti veren optimum koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, LP analizinde kullanılan çözücünün polaritesi arttıkça ölçüm hassasiyeti artmış ve en uygun çözücünün su olduğu tespit edilmiştir. Tampon çözelti içerisindeki asit derişiminin (0.1 M – 1 M) etkili olmadığı gözlenmiştir. Kullanılan asit çözeltileri arasında sitrik asit çözeltisinin en ideal asit olduğu belirlenmiştir ve 0.1 M sitrik asit çözeltisi ile pH 2-7 arasında yapılan denemelerde pH 2-2.5 arasında floresans hassasiyetin %10 civarında arttığı ve daha sonra pH 7 değerine kadar kademeli olarak azaldığı gözlemlenmiştir. 0.9982-0.9991 arasında değişen korelasyon katsayısı ile 0.006-1.7 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Thomas ve ark.⁴⁸ katı dozaj formlardaki ilaçlarda enalapril (ENA) ve LP'nin birlikte belirlenmesi için spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler geliştirmişlerdir. Spektrofotometri yöntemi ile ENA ve LP sırasıyla 222 nm ve 250 nm dalga boylarında

analiz edilmiştir. Ters faz HPLC yöntemi ile kromatografik ayırım, metanol, su ve asetonitril (45:35:20, h/h/h) hareketli fazı karışımı kullanılarak başarılmıştır.

Subbarao ve ark.⁴⁹ tablet dozaj formundaki farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. LP'nin çalışma çözeltileri suda hazırlanmış olup LP'nin 205 nm'de maksimum absorbans gösterdiği belirlenmiştir. Yöntemin 0.995 korelasyon katsayısı ile 1-5 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, %0.73'den küçük bağıl standart sapma (BSS) değeri ile kesin olduğu ve 2.0'den küçük bağıl hata (BH) değeri ile doğru olduğu gösterilmiştir.

Tsvetkova ve ark.⁵⁰ farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi geliştirmişler ve doğrusallık, kesinlik ve doğruluk parametreleri ile spektroskopik yöntemin geçerlilik testlerini yapmışlardır. LP'nin farmasötik preparatlardan mutlak geri kazanımın %99.52'den büyük olduğu ve yöntemin 0.991 korelasyon katsayısı ile 3.10^{-4} - $6.75.10^{-4}$ g/µL derişim aralığında iyi bir doğrusallık gösterdiği belirtilmiştir. Geliştirilen yöntem ile 40 mg, 50 mg ve 62.5 mg LP içerecek şekilde hazırlanan tabletlerde miktar analizi yapılmış ve sırasıyla 39.53 - 40.35 mg, 49.42-50.4 mg ve 61.08 - 66.45 mg aralığında değerler elde edilmiştir.

Pranshu ve ark.⁵¹ farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenebilmesi için bir spektrofotometri yöntemi geliştirmişler ve doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve hassasiyet parametrelerini kullanarak yöntemin geçerlilik testlerini gerçekleştirmişlerdir. Yöntemde, çözücü olarak distile su kullanılmış olup LP'nin maksimum absorbans gösterdiği 237 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yöntemin gün içi ve gün arası kesinliği %3.35'den küçük değerler ile kabul edilebilir kesinliğe sahip olduğu; 2-20 µg/mL derişim aralığında iyi bir doğrusallık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.9 µg/mL ve 2.75 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Ahmed ve ark.⁵² tek bileşenli dozaj formundaki farmasötik preparatlarda LP ve omeprazolun (OP) belirlenmesi için üç farklı UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Her üç yöntemde asidik ortamda (pH 3) gerçekleştirilmiş olup bu ortamda belirtilen analitlerin bromocresol mor (BCP) ve bromofenol mavi (BPB) ile iyon çifti kompleksleri oluşturulmuş ve oluşan kompleksler kloroform ile ekstrakte edilmiştir. 5 mL BCP veya BPB reaktifi ve 5 mL ftalat asit tamponu (pH 3) kullanılarak optimum kompleks oluşumu sağlanmış ve optimum şartlarda, oluşan komplekslerin 430 nm (BCP) ve 400 nm'de (BPB) maksimum absorptivite gösterdiği ve 2.604×10^3 L/mol.cm (LP-BCP), 6393.7 L/mol.cm (OP-BPB) ve 4929.87 L/mol.cm (OP-BPB) molar absorptivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. LP'nin BCP ile kompleks oluşumuna dayalı yönteminin 10-30 µg/mL derişim aralığında, OP'nin BPB ve BCP ile kompleks oluşumuna dayalı yöntemlerinin ise 10-80 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Ayrıca belirtilen komplekslerin mutlak geri kazanımlarının %98 ile %100 aralığında olduğu tespit edilmiştir.

2.7. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. Bu yöntemler; inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca molekül yapılarının aydınlatılması alanında da en sık başvuru alan yöntemlerdir.⁵³

2.7.1. Spektroskopi

Spektroskopi, madde ile ışığın veya elektromanyetik radyasyonun etkileşimini inceleyen bir bilim dalıdır. Bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorblanan veya yayılan elektromanyetik ışımının, ölçülmesi ve yorumlanmasına spektroskopi denir.⁵⁴ Atom, molekül veya

iyonun elektromanyetik ışınla etkileşimi sonucu dönme, titreşim ve elektronik enerji seviyelerinde değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur.⁵⁵

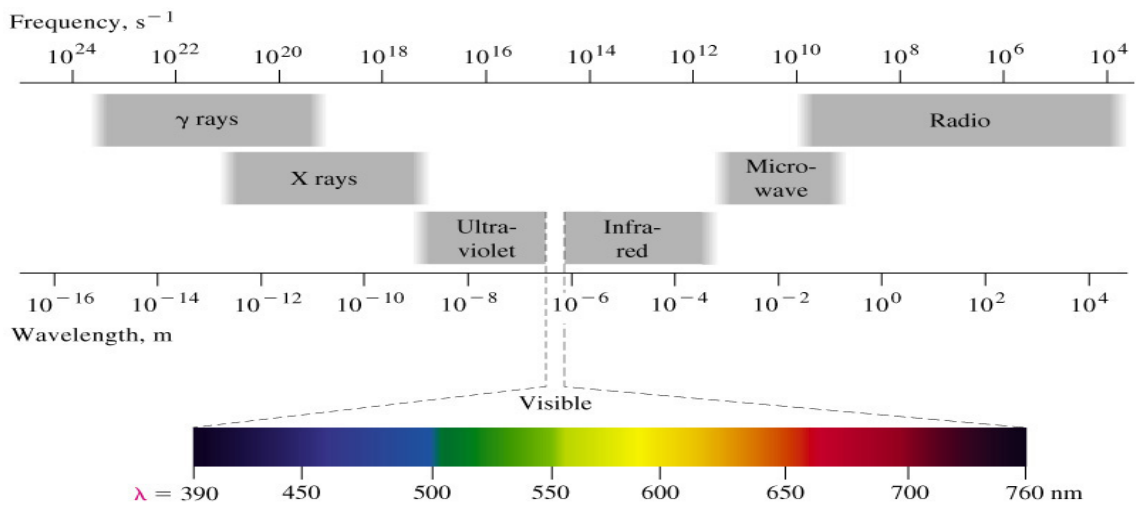
Spektrokimyasal yöntemler, inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde yaygın kullanımlarının yanı sıra, molekül yapılarının aydınlatılması alanında da en sık başvurulan yöntemlerdir.^{54,55}

2.7.2. Elektromanyetik Işımanın (EMI) Genel Özellikleri

EMI veya elektromanyetik radyasyon (EMR) uzayda çok büyük bir hızla hareket eden ve değişik formlar alabilen bir enerji türüdür. EMI iki karaktere sahiptir. Bunlar, dalga ve tanecik (foton) karakteridir. Dalga ve tanecik karakteri birbirini tamamlayan unsurlardır.

Elektromanyetik ışınla, hem elektrik alan vektörü hem de magnetik alan vektörüne sahiptir. Bu iki alan sinüsoidaldır ve ışının yayılma yönüne ve birbirlerine diktir. Bir ışının maddeyle ilişkisi, bu iki alan vektörü ile olur.⁵⁴

Elektromanyetik spektrum, çok geniş bir dalga boyu ve frekans (dolayısıyla enerji) aralığını içine almaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Elektromanyetik spektrumun bölgeleri

2.7.3. Elektromanyetik Işımanın Dalga Özelliği

EMI'nin dalga boyu, ışının periyodu, ışının frekansı, ışının hızı, ışının dalga sayısı, dalgaların çakışması, ışının kırınımı (difraksiyon), ışının kırılması ve yansımaları, ışının saçılması ve ışının polarizasyonu EMI'nin dalga özelliği ile açıklanan olaylardır.

2.7.4. Elektromanyetik Işımanın Tanecik Özelliği

Fotoelektrik olay, kimyasal türlerin enerji durumları, ışının emisyonu, ışının absorpsiyonu ve durulma süreçleri EMI'nin tanecik özelliği ile açıklanan olaylardır.

2.7.4.1. Işının Absorpsiyonu

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam veya şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması denir.⁵⁶

Absorpsiyon ile ışının enerjisi, maddenin iyon, atom veya moleküllerine aktarılır. Işın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış olur. Uyarılmış bir atom veya molekül 10^{-8} saniye kadar yaşayabilir ve sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları atomik absorpsiyon ve moleküler absorpsiyon olmak üzere ikiye ayrılır.

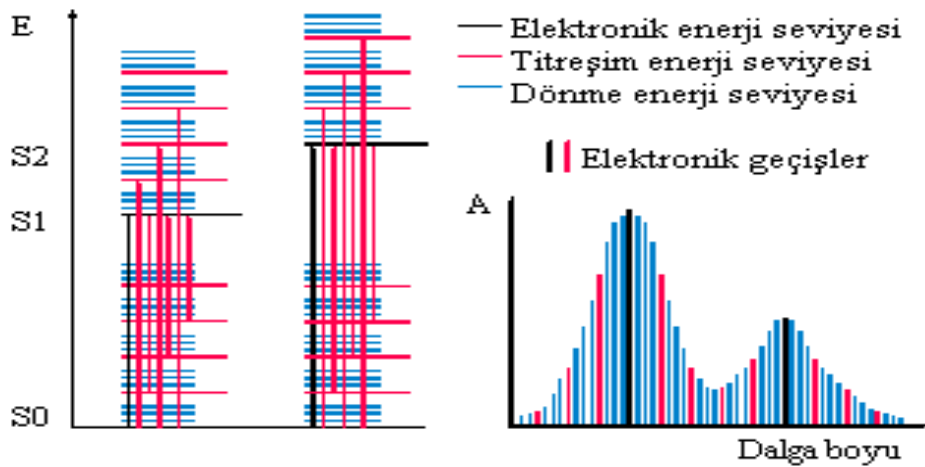
1. Atomik Absorpsiyon: Atomik absorpsiyonda uyarılma, yalnızca atomda bir veya birden çok elektronun üst enerji düzeylerine yükseltildiği elektronik bir süreçle meydana gelir. Işının atomlar tarafından absorplanmasında sadece elektronik geçişler vardır. UV ve görünür bölge ışını yalnızca en dıştaki veya bağ yapan elektronlarda geçişlere neden olabilecek yeterlikte enerjiye sahiptir.⁵⁷

2. Moleküler Absorpsiyon: Molekülün düşük enerjili atomik ve moleküler orbitallerinin, UV, görünür bölge ve infrared ışınları ile daha yüksek enerjili orbitallere

çıkarılması sonucunda gerçekleşir. Çok atomlu moleküllerin absorpsiyon spektrumları, atom spektrumlarına göre oldukça karmaşıktır. Çünkü bu moleküllerdeki enerji düzeylerinin sayısı, sadece atomların enerji düzeyi sayılarına göre çok daha fazladır. Moleküller, ışınla uyarıldıklarında gerçekleşen kuantlaşmış üç tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir (Şekil 2.3).

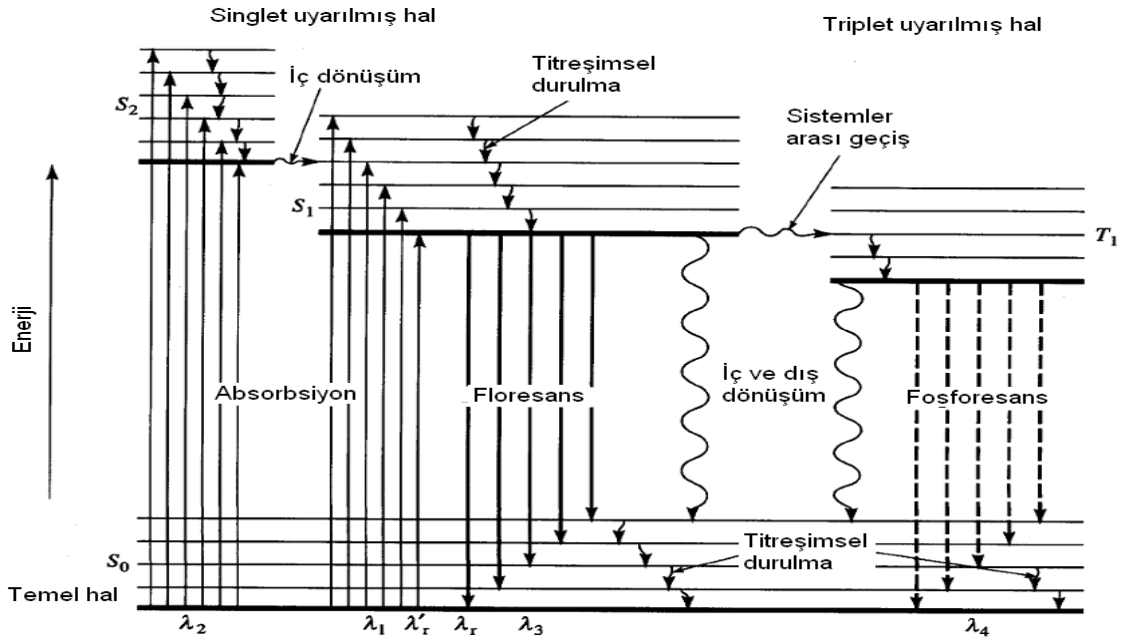
$$E_{\text{Toplam}} = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

Bu enerjiler arasındaki büyüklük sırası; $E_{\text{elektronik}} > E_{\text{titreşim}} > E_{\text{dönme}}$ şeklindedir. Burada “ $E_{\text{elektronik}}$ ”, molekülde bağ yapan birkaç elektrona ait enerji düzeyinden kaynaklanan elektronik enerjidir (200-800 nm). “ $E_{\text{titreşim}}$ ”, moleküler türlerde çok sayıda bulunan atomlararası titreşimlerin toplam enerjisini gösterir. Genel olarak bir moleküldeki kuantlaşmış titreşim enerji düzeylerinin sayısı, elektronik düzey sayısından çok daha fazladır (1000-15000 nm IR). “ $E_{\text{dönme}}$ ” ise, molekül içindeki çeşitli dönme hallerinden oluşan enerjidir; dönme enerji düzeylerinin sayısı da titreşim enerji düzey sayısından çok daha fazladır (10000-100000 nm IR).^{54,56}



Şekil 2.3. Moleküllerin UV-Görünür bölge spektrumları ve elektronik geçişleri

Işın absorpsiyonu ile uyarılmış bir atom veya molekülün uyarılmış ömrü kısadır. Temel hale dönüş ışımalı ve/veya ışısız geçişlerle olur. Işısız geçişler; iç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve titreşimsel durulmadır. Işımalı geçişler; floresans ve fosforesanstır (Şekil 2.4).^{54,56}



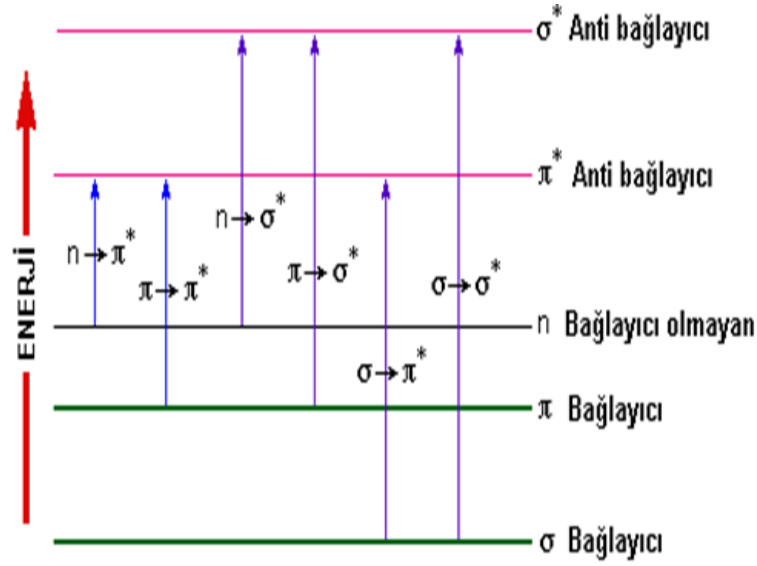
Şekil 2.4. Bir organik molekül için enerji-düzey diyagramı

2.7.5. UV- Görünür Bölgedeki Geçişler

- 1- π , σ ve n orbitalleri arasındaki geçişler (organik moleküllerde)
- 2-d ve f orbitalleri arasındaki geçişler (koordinasyon komplekslerinde)
- 3-Yük aktarım geçişleri (organik moleküller ve komplekslerde)

2.7.5.1. π , σ ve n Orbitalleri Arasındaki Geçişler

π , σ ve n orbitalleri arasındaki muhtemel geçişler Şekil 2.5'de gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Elektronlar arasındaki muhtemel geçişler

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ Geçişleri: Doymuş bileşikler de gerçekleşir. Bir molekülde σ bağ orbitalindeki bir elektron, vakum UV bölgesindeki bir ışını absorplayarak antibağ orbitaline uyarılır, bu durumda $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişi meydana gelmiş olur. Diğer elektronik geçişlere kıyasla $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişleri için gereken enerji oldukça yüksektir.

$n \rightarrow \sigma^*$ Geçişleri: Bu geçişler ortaklanmamış elektron çiftleri içeren bileşiklerde (bağ yapmayan orbitalde bulunan elektronlar) gözlenir. Genelde bu geçişler $\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişlerinden daha az enerji gerektirir ve absorpsiyon piklerinin çoğu 150-250 nm aralığındaki bölgede yer alır.

$\pi \rightarrow \pi^*$ Geçişleri: Doymamış bileşikler de gerçekleşir. 200-700 nm arasındaki geçişlerdir. Moleküler UV spektroskopisinde en çok gözlenen ve en kullanışlı geçiştir.

$n \rightarrow \pi^*$ Geçişleri: Doymamış ve heteroatom içeren bileşikler de gerçekleşir. 200-700 nm arasındaki geçişlerdir. Moleküler UV spektroskopisinde yine en çok gözlenen ve en kullanışlı geçiştir.

2.7.6. Lambert-Beer Kanunu

Beer Kanunu: Beer'e göre (1852), aynı derinlikte bir çözültiden geçen ve çözülti tarafından absorplanan monokromatik bir ışın demetinin şiddeti çözültinin derişimi ile logaritmik veya üstel olarak azalır. Buna göre;

$$I = I_0 e^{-ac}$$

şeklinde gösterilir. Eşitlikte I_0 ; gelen ışın demetinin şiddeti, I ; çözültiden çıkan ışın demetinin şiddeti, a ; çözültinin türüne ve monokromatik ışının dalga boyuna bağlı bir sabit, c ise çözültinin derişimidir.

Lambert Kanunu: Lambert' e göre (1760), bir çözültiden geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti, çözültinin derinliğiyle (çözülti içinde aldığı yolla) logaritmik veya üstel olarak azalır. Buna göre;

$$I = I_0 e^{-ab}$$

şeklinde gösterilir. Eşitlikte I_0 ; gelen ışın demetinin şiddeti, I ; çözültiden çıkan ışın demetinin şiddeti, a ; çözültinin türüne ve monokromatik ışının dalga boyuna bağlı bir sabit, b ise çözültinin derişimidir.

Lambert – Beer Kanunu: Yukarıda izah edilen iki kanun birleştirilirse, bir çözültiden geçen monokromatik ışının şiddeti, çözültinin derinliği (ışının çözülti içinde aldığı yol) ve derişimi ile logaritmik ve üstel olarak azalır. Buna göre;

$$I = I_0 10^{-abc}$$

şeklinde gösterilir. Bu eşitliğe “Lambert-Beer kanunu” denir. Eşitlikte I_0 gelen ışın demetinin şiddeti, I çözültiden çıkan ışın demetinin şiddeti, b çözültinin kalınlığı, c ise çözültinin derişimidir. Eşitliğin eksi logaritması alınırsa;

$$\text{Log}I_0/I = abc$$

olur. Eşitlikte $\text{log } I_0/I$ absorbans olarak adlandırılır ve A ile gösterilir. Buna göre;

$$\text{Log}I_0/I = A = abc$$

A ile c arasında bu basit doğrusal ilişkidenden analitik uygulamalarda yararlanır. Eşitlikte derişim c , gr/L, örnek kabının kalınlığı b ise cm birimindedir. Buradaki orantı katsayısı a 'ya absorpsiyon katsayısı veya absorbtivite denir ve birimi L/gr cm'dir. Eğer derişim mol/L cinsinden ise, a yerine ϵ yazılır ve ϵ 'a molar absorpsiyon katsayısı veya molar absorbtivite adı verilir. Birimi L/mol cm' dir ve eşitlik;

$$A = \epsilon bc$$

şeklinde gösterilir.

Bu bağıntıda A değeri c ye karşı grafiğe geçirilirse orijinden geçen ve eğimi ϵb olan bir doğru elde edilir. Ancak her zaman muntazam bir doğru elde edilemez. Bu durum Lambert-Beer kanunundan sapmalarla açıklanabilir. Lambert-Beer kanunundan sapmaların sebepleri üç madde altında toplanabilir. Bunlar gerçek sapmalar, cihazdan kaynaklanan sapmalar ve kimyasal sapmalardır.

Ölçme yapılırken I_0 ve I şiddetleri ayrı ayrı ölçülmez. Bunun yerine söz konusu dalga boyundaki çözelti ve saf çözücünden geçen ışın demeti şiddetleri ölçülür. Saf çözücünden geçen ışın demetinin şiddeti I_0 olarak kabul edilir. Buna göre;

$$A = \log I_0 / I = \log(I_{0\text{çözücü}}) / (I_{\text{çözelti}})$$

eşitliği yazılır. Bir ışın demetinin çözücünden geçen kısmının çözücünden geçen kısmına oranına “geçirgenlik” denir ve T ile gösterilir.

$$T = I / I_0$$

Bu iki eşitlikten;

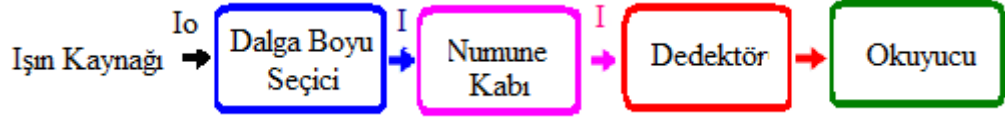
$$A = - \log T$$

şeklinde bir bağıntı yazılabilir.⁵²

2.7.7. UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi

Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir. Ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyon, genel olarak bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. UV-görünür bölge spektrofotometre cihazları 200-900 nm arasında çalışır. N_2 ve O_2 molekülleri, 160 ve 200 nm’ de absorpsiyon yaptıkları için 200 nm altındaki dalga boylarında vakumlu spektrofotometre cihazları kullanılır.⁵⁸ Spektrofotometre cihazı (Şekil 2.6) aşağıdaki kısımlardan oluşmuştur.

- 1- Işın Kaynağı
- 2- Dalga Boyu Seçici (Monokromatör / Filtreler)
- 3- Numune Kabı
- 4- Dedektörler
- 5- Okuyucu (Sinyal işlemcisi)



Şekil 2.6. Spektrofotometre cihazının basit bir diyagramı

2.7.7.1. Işın Kaynakları

Moleküler absorpsiyon ölçümlerinde; oldukça geniş bir dalga boyu aralığında, gücü ani olarak değişmeyen sürekli ışın kaynağı tercih edilir. UV ve görünür bölgede döteryum (D₂), tungsten (W), hidrojen (H₂) ve ksenon (Xe) gibi sürekli ışın kaynakları kullanılır.

Ultraviyole bölgede en çok kullanılan lambalar, hidrojen veya döteryum elektriksel boşalım lambalarıdır. Düşük basınçta (5 mm-Hg) hidrojen veya döteryum gazı içeren bu lambalarda 40 voltluk doğru akım uygulanarak elektriksel boşalım elde edilir ve 180 nm ile 380 nm arasında ışın yayılır. Daha pahalı ve daha uzun ömürlü olan döteryum lambasının yaydığı ışığın şiddeti hidrojen lambasına göre çok daha fazladır

Tungsten flaman lambası görünür ve yakın IR bölgede ışın yayar. Elektrik akımı ile ısıtılan tungstenden yayılan bu ışın, siyah cisim ışıması olup, 320 nm ile 3000 nm arasındaki bölgeyi kapsar. 3000 K de çalışan bir tungsten lambasının yaydığı enerjinin ancak %15'i görünür bölgededir. Tungsten lambasının içinde bir miktar iyot veya brom

buharı bulunursa lambanın ömrü artar ve bu lamba tungsten-halojen lambası olarak adlandırılır.

UV ve görünür bölgenin tümünde (150 nm-700 nm) kullanılacak bir başka şiddetli ve sürekli ışın kaynağı, ksenon (Xe) ark lambasıdır. Bundan başka civa buhar lambası da her iki bölgede ışın yapabilen bir ışın kaynağıdır. Ksenon ve civa lambaları, daha çok luminesans spektroskopisi yönteminde ışın kaynağı olarak kullanılırlar.

2.7.7.2. Monokromatör (Dalga Boyu Seçicileri)

Absorbansın ölçülmesi sırasında, ışın kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda ışın seçilerek örneğe gönderilir. Polikromatik ışıktan monokromatik ışın elde edilmesini gerçekleştiren düzeneğe 'monokromatör' adı verilir. Monokromatör olarak prizmalar veya optik ağ adını alan parçalar kullanılır.

Prizmalarda dalga boyunun seçilmesi, farklı dalga boylarındaki ışığın prizmaya girişte ve çıkışta farklı miktarlarda kırılması ilkesine dayanır. Prizma ışın kaynağına göre döndürülerek çeşitli dalga boyu değerlerine sahip ışığın bir aralıktan geçerek madde ile etkileşmesi sağlanır. Cornu tipi prizmalarda, prizma içinde kırılmaya uğrayan ışın, prizmanın öteki yüzünden çıkarak çeşitli dalga boylarına dağılır. Littrow prizmasında ise prizmanın bir yüzü Al ayna ile kaplıdır ve prizmaya giren ışın, aynı yüzden ve çeşitli dalga boylarına ayrılarak prizmayı terk eder.⁵⁸

2.7.7.3. Numune Kabı

Numune kabı veya hücreleri, çalışılan spektrum bölgesinde ışını geçiren maddelerden yapılmalıdır. Soft veya borosilikat cam, plastik ve kuartz küvetler kullanılır. Plastik küvetler sadece görünür bölgede kullanılır (350-780 nm). Soft camlar asidik çözeltiler ve borosilikat camlar kuvvetli alkali çözeltiler için uygundur. Cam küvetler görünür bölge ve yakın IR bölgesinde kullanılır (350-2000 nm). Kuartz

küvetler 350 nm ile 3 nm arasında yer alan bölgede kullanılır. Uygulama yapılırken küvetlerin yüzeylerindeki parmak izleri, yağ ve diğer safsızlıklar hücrelerin geçirgenliğini önemli ölçüde etkiler.

2.7.7.4. Dedektörler

Işın kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla spektrofotometrelerde kullanılan bileşene 'dedektör' adı verilir. Bir dedektörün ışığa karşı duyarlı olması, ışın şiddeti ile doğru orantılı bir sinyal üretmesi, üzerine düşen ışığa cevap vermesi, sinyal üretme süresinin kısa olması, kararlı olması ve üretilen elektriksel sinyalin yardımcı devrelerle çoğaltılabilmesi istenir. Ultraviyole ve görünür bölgede kullanılabilen üç tür dedektör vardır. Bunlar;

- 1- Fotovoltatik dedektörler
- 2- Fototüpler
- 3- Foto çoğaltıcı tüplerdir.

Fotovoltatik dedektörlerde, ışın absorpsiyonu ile iletkenlik bandına çıkarılan elektronlar, ışın şiddeti ile orantılı bir elektrik akımı oluşturur. Fototüp adını alan ikinci tür dedektörlerde ise alkali metal oksit filmlerden yapılmış fotokatotlar üzerine düşen fotonlar bu yüzeyden elektron koparır ve elektronlar bir anotta toplanarak elektrik akımına çevrilir. Fotoçoğaltıcı tüp olarak adlandırılan üçüncü tür dedektörlerde ise, fotokatot yüzeyinden foton çarpması ile fırlatılan elektronlar dinot denilen yüzeylere doğru elektriksel alanda hızlandırılır ve dinoda çarpan her bir elektron, dinot yüzeyinden 3-5 elektron daha koparır. Böylece sayıları giderek artan elektronlar en sonunda bir anotta toplanarak elektrik akımına çevrilir.⁵⁹

2.7.7.5. UV-Görünür Bölge Cihaz Çeşitleri

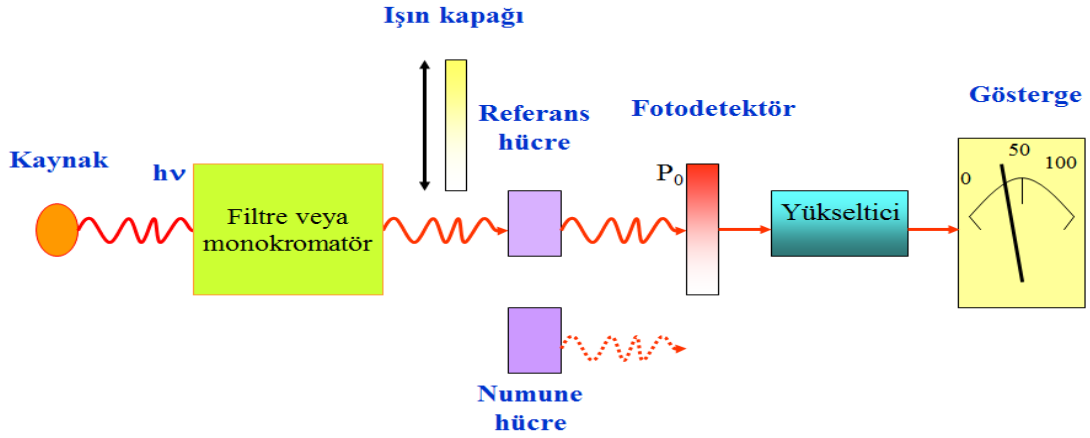
Cihazlar fotometreler ve spektrofotometreler olmak üzere iki ana sınıfta toplanırlar.

1) Fotometreler: Dalga boyunu seçmek için filtrelerin kullanıldığı basit cihazlardır. Sadece tek bir dalga boyunu dedekte edebilirler. Görünür bölge fotometreleri, UV fotometreleri ve probe tip fotometreler olmak üzere 3'e ayrılırlar.

2) Spektrofotometreler: UV bölgede yaklaşık 180-200 nm'den başlayan ve görünür bölgenin tamamını yani 800 nm civarına kadar tarayabilen monokromatör veya dispersif elemanlara sahip olan ve dalga boyu taraması yapabilen organik, inorganik ve biyokimyasal türlerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılabilen cihazlara spektrofotometre denir. Fotometrelere göre daha pahalıdırlar ve çok kompleks optik sisteme sahiptirler. Spektrofotometre cihazları ikiye ayrılır.

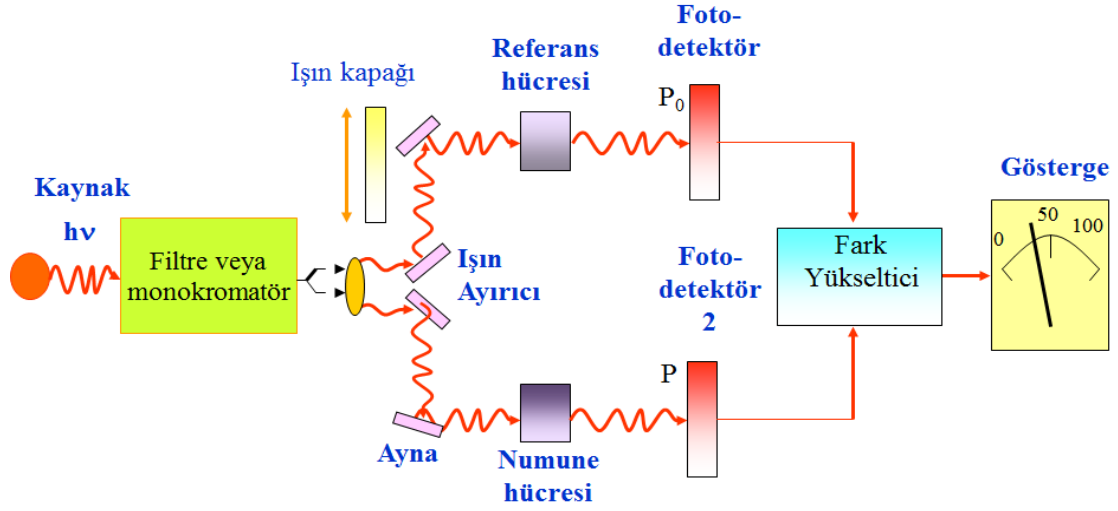
1. Tek ışın yollu spektrofotometre
2. Çift ışın yollu spektrofotometre

1. Tek Işın Yollu Spektrofotometreler: Tek ışın yollu spektrofotometreler Şekil 2.7'de gösterildiği gibi ışın kaynağı, dalga boyu seçici, filtre veya monokromatör, ışın yoluna konacak eşlenik iki hücre, dedektör, yükseltici ve bir gösterge aletinden oluşur. Absorpsiyon ve % geçirgenlik okumak için önce numune bölmesine referans madde konularak alet ve referans hücreye göre cihaz sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi konur ve ölçüm yapılır (Şekil 2.7).⁵⁸



Şekil 2.7. Tek ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı

2. Çift Işın Yollu Spektrofotometreler: Çift ışın yollu cihazlar, tek ışın yollu cihazlara benzer fakat bu cihazlarda bulunan ışın bölücü denilen V- şeklinde bir ayna ile uzayda birbirinden ayrı iki ayrı ışın oluşturur. Işınlardan biri referans hücreden diğeri ise numune hücrelerinden geçer. İkisi de eşlenik dedektöre ulaşır (Şekil 2.8). Çift ışınlı cihazların ışın kaynağındaki bütün dalgalanmaları giderebilme, kaçak ışınları ve saçılan ışınlardan gelen sapmaları minimize etme ve yükselticideki kaymalardan etkilenmeme gibi üstünlükleri vardır.⁵⁸



Şekil 2.8. Çift ışın yollu spektrofotometrenin şematik yapısı

2.7.7.6. UV-Görünür Bölge Spektroskopisinin Uygulamaları

Bu yöntemin başlıca uygulama alanları;

1. Kalitatif analiz
2. Kantitatif analiz
3. Fotometrik titrasyon
4. Molekül ağırlığı tayini
5. Asit Baz denge sabitlerinin bulunması
6. Kompleks formüllerin ve kompleks oluşum sabitlerinin bulunması

1. Kalitatif Analiz: Analizi yapılacak olan bilinmeyen madde saflaştırıldıktan sonra uygun bir çözücüde çözülerek spektrumu alınır. Bu spektrum bilinen bileşiklerin aynı koşullarda çekilmiş spektrumları ile karşılaştırılarak bilinmeyen maddenin ne olduğu bulunur. Bu yöntem nitel analiz için çok uygun bir yöntem değildir. Çünkü moleküllerin absorpsiyon bantları oldukça geniştir ve bazı kromoforların absorpsiyon bantları birbiri ile örtüşebilir.

2. Kantitatif Analiz: Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorbands yaptığı dalga boyu belirlenir. Belirlenen dalga boyunda artan derişimlerde hazırlanan bir seri çözeltinin spektrumları alınır ve absorbandsları okunur. Derişime karşı absorbands grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla tespit edilir.⁵⁹

3. Fotometrik Titrasyon: Asit-baz, kompleksometrik, çöktürme ve indirgenme-yükseltgenme titrasyonlarında eşdeğerlik noktasını bulmak için kullanılır. Numunenin, titrantın yada ürünün absorpsiyon yaptığı dalga boyu seçilir. Titrasyon grafiğinin şekli, ölçümlerin yapıldığı dalga boyunda çözeltide bulunan türlerin hangisinin ışığı absorpladığına bağlıdır.

4. Molekül Ağırlığı Tayini: Derişimi bilinen bir çözeltinin absorpsiyonu ölçülür. Molar absorblama katsayısı bulunur. Derişimi bilinmeyen maddeninde aynı çözücü içerisinde absorbandsı alınır ve aşağıdaki formüllerde yerine konarak molekül kütleleri bulunur.

$$A = \epsilon l g / M a \quad b = 1 \text{ cm}$$

5. Asit-Baz Denge Sabitinin Bulunması: Spektrofotometrik yöntem ile asit baz denge sabitinin tayini, pH değerleri ya bilinen ya da ölçülen absorbands yapmayan tampon çözeltilerin bir serisinde iyonlaşan türlere karşı moleküler türlerin (nötral moleküller) oranının tam olarak belirlenmesine dayanır.

6. Kompleks Formüllerin ve Kompleks Oluşum Sabitlerinin Bulunması: Kompleks formülünün bulmak için mol oranı, eğim ve jop (devamlı değişmeler) yöntemleri olmak üzere üç yöntem uygulanır.

2.8. Sıvı Kromatografi/Kütle Spektroskopisi (LC-MS)

Kütle spektroskopisi bir bileşiğin iyonlaştırılması, oluşan iyonların kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılması ve parçalanma sonucu oluşan her bir iyonik parçanın spektrumlarının bağlı çokluklarına göre çizilmesi esasına dayanır. Kütle spektroskopisi gaz fazındaki bir bileşiğin incelenmesi sonucu yapısı veya teşhisi hakkında bilgi vermesine rağmen karışım halindeki bileşiklerin analizi üst üste çakışan spektrumlar nedeniyle yeterli bilgi veremeyip, yanılgılara sebep olabilmektedir. Bu nedenle sıvı kromatografi/kütle spektroskopisi (LC-MS) ve gaz kromatografi/kütle spektroskopisi (GC-MS) kullanıma girmiştir. Bu sayede karışımların ayrımı yapılarak kütle spektroskopisine verilmesi sağlanmıştır. İlaçlar ve metabolitleri, peptidler, proteinler, nükleik asitler, oligosakkaritler gibi makro moleküller ve endojen yapıdaki bileşiklerin gaz fazına geçmedeki sorunlarından dolayı bu bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde LC-MS kullanılmaktadır.

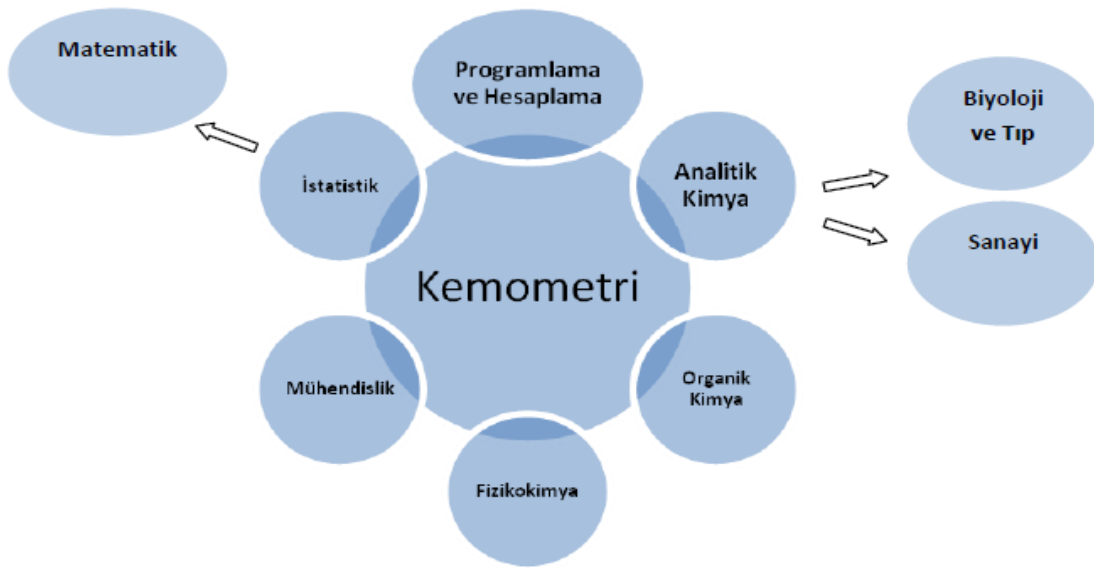
Kütle spektroskopisinde çözücü ile karışmış halde gelen bileşik iyonlaşma bölümüne geçerken çözücünün büyük bir kısmı inert bir gaz (azot, helyum) ile aerosol halinde püskürtülmesi sonucu buharlaşmakta ve kurutma işlemi ile çözücü ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Çözücünün buharlaştırılması ve bileşiğin iyonlaştırılması termosprey (thermospray), elektrosprey iyonizasyon (electrospray ionization), atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (atmospheric pressure chemical ionization) ve dinamik hızlı atom bombardımanı gibi yöntemler kullanılarak yapılmaktadır.⁶⁰

2.9. Kemometri

Kemometri; gelişen bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik gibi alanların birlikte kullanımıyla kimya alanında, özellikle analitik kimyada kompleks sistemlerin çözümü için oluşturulan, kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya bilim dalıdır. Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme,

deneysel tasarım, modelleme, kalibrasyon, optimizasyon, yapı tanıma, sınıflandırma, yapay akıl yöntemleri, resim işleme, bilgi ve sistem kuramı gibi kavram ve uygulama konularından oluşmaktadır.⁶¹ Kemometrinin kullanıldığı bilim dalları Şekil 2.9'da verilmektedir.

Kemometri, kimya ve özellikle analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunar.⁶¹ Analitik kimya, modern analitik enstrümantal yöntemlerle oluşturulan veriler sayesinde kemometrik yöntemlerin uygulanmasının gelişmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur.⁶²



Şekil 2.9. Kemometrinin kullanıldığı bilim dalları

Kemometrik yöntemler, kimyasal verilere etki eden parametreleri, bu parametrelerin etkisinin ne ölçüde olduğunu ve parametreler arasındaki etkileşim miktarlarını belirlemek amacı ile geliştirilmiştir.⁶² Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap

makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB gibi paket programlar kullanılmaktadır.⁶³

2.9.1. Merkezi Kompozit Dizayn

Bir analiz için deneysel dizayn oluşturulması sırasında sıklıkla kullanılan faktör, yanıt ve seviye gibi bazı terimler vardır. Deneyin sonucunu etkileyen değişkenler faktör olarak adlandırılır. Elde edilen sonuç yanıt ve faktörlerin aldığı değerlerde seviye olarak adlandırılır. Sıcaklık, pH, derişim gibi değişkenler kontrol edilebilen faktörlerdir.⁶³ Deneyi yapan kişilerden kaynaklı farklılıklar gibi kontrol edilemeyen faktörlerde olabilmektedir ve deneyin dizaynında kontrol edilemeyen faktör etkilerinin en aza indirilmesi de önemli bir basamaktır. Kontrol edilemeyen faktörlerin dikkate alınabilmesi için randomizasyon (randomization) tekniği kullanılabilir ve böylece konu dışı değişkenlere karşı önlem alınmış olur.⁶³

Deneysel dizaynın kimyasal verilere uygulanma sebepleri; deneysel sonucu etkileyen en önemli faktörlerin neler olduğu, incelenmesi ve optimize edilmesi gereken faktörlerin hangileri olduğu sorularına yanıt bulmak ve zaman ve maliyet tasarrufu yapmaktır.

En basit ve en popüler faktöriyel dizaynlardan biri iki seviyeli full faktöriyel dizayndır ve 2^k ile gösterilir; burada 2 seviye sayısını, k ise faktör sayısını belirtmektedir. 2^k 'da yapılacak deney sayısını vermektedir. Full faktöriyel dizayn 3 seviyeli olarak da yapılabilir ve deney sayısı 3^k formülüyle belirlenir. Deneysel dizayn tablosu kodlanmış değerlere göre oluşturulur ve 2 seviyeli dizaynlarda; minimum seviye (-), maksimum seviye (+) olarak gösterilir. Faktör sayısı küçük olduğu sürece full faktöriyel dizayn uygulanabilir ancak faktör sayısı arttıkça deney sayısı artacak ve zamandan tasarruf edilemeyecektir. İki seviyeli full faktöriyel dizaynda 7 faktör için

128, 10 faktör için 1024 deney yapılması gerekmektedir. Bu noktada deney sayısının azaltılabileceği fraksiyonel faktöriyel dizayn tercih edilebilir. Fraksiyonel faktöriyel dizaynda deney sayısı azaltılırken bazı faktörler arası etkileşimler incelenememektedir. Bir başka kemometrik yöntem de Placket Burman dizayndır. Placket Burman dizaynla her bir faktörün sonuç üzerine etkileri incelenirken, faktörler arası etkileşimler dikkate alınmamaktadır

Bahsedilen faktöriyel dizaynlar ile her bir faktörün etkileri genel olarak incelenmekte fakat faktörlerin optimum koşulları bulunmamaktadır. Her bir faktörün optimum koşulları bulunmak istendiğinde, yaygın olarak merkezi kompozit dizayn yöntemi uygulanır.⁶³ Merkezi kompozit dizayn 3, 4 yada 5 seviyeli yapılmaktadır.

Merkezi kompozit dizayn, full faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel ve star dizaynın kombinasyonu şeklindedir. Deney sayısı aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 1 \quad (\text{k: faktör sayısı})$$

2^k , full faktöriyel ya da fraksiyonel faktöriyel dizayndaki deney sayısını, $2k$ star dizayn deney sayısını ve 1'de orta seviyedeki deney sayısını belirtmektedir. Merkezi kompozit dizayn yöntemiyle:

1. Faktörlerin etkisi incelenebilir,
2. Faktörler arasındaki etkileşim incelenebilir,
3. Tekrarlanan deneyler ile deneysel hatanın olup olmadığının anlaşılabilir,
4. Her bir faktörün parabolik etkileri incelenebilir ve optimum koşullar bulunur.

Merkezi kompozit dizaynda, deneysel hataların saptanabilmesi için, orta seviyede 5 tekrar deneyi yapılır ve 3 faktör için deney sayısı 15'den 20'ye; 4 faktör için

25'den 30'a çıkmaktadır. Deneysel dizayn tablosu oluşturulurken kodlanmış değerler kullanılır; 2^k'daki seviyeler (-1) ve (+1), 2 k'dakiler ±α ve 1'deki seviye (0) olarak alınır. Merkezi kompozit dizaynda star noktalar (k) dairesel ve ortagonal olmak üzere iki şekilde hesaplanabilir.⁶³ 3 faktör için star değerleri aşağıdaki gibidir;

Dairesel dizaynda; $\alpha = \pm 1.682$

Ortagonal dizaynda; $\alpha = \pm 1.732$

Star değerleri çalışma aralığındaki alt ve üst sınırları belirtir ve star seviyelerinde faktörlerin aldığı değerler aşağıdaki eşitlikle hesaplanır:

$$\alpha = \pm \frac{1}{2^k}$$

Star seviyelerinin aldığı değerler aşağıdaki eşitlikle hesaplanır:

$$\alpha = \pm \frac{X - \text{orta değer}}{\text{Orta değer ile en yakın değer arasındakı fark}}$$

Genellikle incelenilen faktör değerleri arasındaki fark eşittir. Bu sebepten orta değer ile en yakın değer arasındaki fark, aralık boyutu olarak da düşünülebilir. Faktör değerlerinden star seviye değerleri elde edilir ve merkezi kompozit dizayn tablosu oluşturulur.

Tablo 2.2'de üç seviyeli merkezi kompozit dizayn tablosu verilmiştir. Verilen seviye değerleri, faktör değerleri arasındaki farkın eşit olduğu değerler için geçerlidir.

Tablo 2.2. Merkezi Kompozit Dizayn tablosu

Deney	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	-1.682	0	0
11	+1.682	0	0
12	0	-1.682	0
13	0	+1.682	0
14	0	0	-1.682
15	0	0	+1.682
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Merkezi kompozit dizayn yönteminde her bir deney için değiştirilecek parametrelerin tespitinde matematiksel matris oluşturulur. Değişkenler ve çalışma aralığındaki değerlerin kodlanması ile bir matris oluşturulur.

Matrisin oluşturulmasından sonra bilgisayar yardımı ile;

1. Tablo 2.2’de verilen matrisin türevi alınır, (X’)
2. Matrisin türevi ile kendisi çarpılır, (X * X’)
3. (X * X’) matrissinin tersi alınır, (X * X’)⁻¹
4. Denemeler sonunda elde edilen yanıt değerleri ile (X * X’)⁻¹ * X’ çarpılması sonucu bulunan değerler b değerleri olarak kodlanır, [b = (X * X’)⁻¹ * X’ * y]

5. b değerlerinin belirlenmesinden sonra aşağıdaki denklem oluşturulur;

$$y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22} + b_{33}X_{32} + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

6. Düzenlenen denklemin X_1 , X_2 ve X_3 'e göre türevleri alınır ve yeni denklemler elde edilir, bu denklemler sıfıra eşitlenerek çözüldüğünde X_1 , X_2 ve X_3 'ün kod değerleri bulunur,

7. Elde edilen kodların gerçek değerlere dönüştürülmesiyle seçilen faktörlerin optimum koşulları belirlenmiş olur.

Tablo 2.3. Değişkenler ve çalışma aralığındaki değerlerin kodlanmasıyla oluşturulan matris

Deney	X_1	X_2	X_3	X_{11}	X_{22}	X_{33}	X_{12}	X_{13}	X_{23}	X_{123}
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
5	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	+1
6	+1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
7	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
8	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
9	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
10	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	-1.682	0	0	2.829	0	0	0	0	0	0
13	+1.682	0	0	2.829	0	0	0	0	0	0
14	0	-1.682	0	0	2.829	0	0	0	0	0
15	0	+1.682	0	0	2.829	0	0	0	0	0
16	0	0	-1.682	0	0	2.829	0	0	0	0
17	0	0	+1.682	0	0	2.829	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.10. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Analitik kimyada, uygun zamanda, doğru ve güvenilir veri sağlamak çok önemlidir. Analitiksel verinin niteliği, yöntem geliştirme ve geçerlilik testleri, prosesinin kalitesi üzerinde direk bir etkiye sahiptir. Yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinde ilk adım, yöntem için kabul edilebilir şartlar olan minimum kriterler belirlemektir.

2.10.1. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme basamakları aşağıda belirtilmektedir.

1. Yöntemin amacını, kapsamını ve uygulaması tanımlanmalıdır.
2. Yöntemin performans parametreleri ve kabul kriterleri tanımlanmalıdır.
3. Cihazın performans karakterleri tanımlanmalıdır.
4. Çalışılan materyaller nitelenmelidir.
5. Son olarak yöntem geliştirilip belgelenmelidir.

2.10.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Yöntem problemleri, geçerlilik testlerinin tamamını yapmakla minimize edilebilir. Geçerlilik testi, bir analitik uygulamada, bir analiz yönteminin performans özelliklerinin, tasarlanmış amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür.

Analitik alanda farklı amaçlara göre düzenlenen kurallar dünyanın farklı bölgeleri ve farklı amaçlara göre farklılıklar göstermektedir. Yöntem geçerlilik testleri için kurallar oluşturan grupların bazıları ICH (The international Conference on Harmonization), GLP (Good Laboratory Practice), GMP (Good Manufacturing Practice), FDA (Food and Drug administration) ve USP Farmakope XXIV'dir. Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler;

1. Belirleyicilik/ Seçicilik (Specificity/ Selectivity)
2. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)
3. Doğruluk (Accuracy)
4. Kesinlik (Precision)
 - 1) Tekraralabilirlik (Repeatability)
 - 2) Arakesinlik (Intermediate Precision)
 - 3) Yenilenebilirlik (Reproducibility)
5. Duyarlılık Limiti (Sensitivity)
 - 1) Gözlenebilme Sınırı (Teşhis Limiti) (LOD)
 - 2) Tayin Alt Sınırı (Miktar Tayin Limiti) (LOQ)
6. Geri kazanım (Recovery)
7. Sağlamlık /Dayanıklılık (Robustness/ Ruggedness)
8. Örneklerin Kararlılığı, Stabilitate (Stability)

1. Belirleyicilik/ Seçicilik (Specificity/ Selectivity): FDA rehberine göre, özgünlük/seçicilik, örnek içinde bütün komponentlerin varlığında analitin cevabını doğru bir şekilde ölçmektir. ICH rehberine göre, özgünlük tek bir analit için cevabı sağlayan yöntem için, seçicilik ise birden fazla analit için cevabı sağlayan yöntem için kullanılır.

2. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range): En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisinin analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir

ölçüsüdür. Çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği analit derişim genişliğidir.

3. Doğruluk (Accuracy): Doğruluk, deneysel olarak belirlenmiş değerin, kabul edilebilir değere veya gerçek değere olan yakınlığıdır. Bağlı hata (BH) ya da mutlak hata (MH) ile verilir. Yöntemin doğruluğu üç yolla gösterilebilir. Bunlar;

1. Bilinen derişimlere sahip bir seri örneğin analiz sonucunun gerçek değerle karşılaştırılması ile gösterebilir.

2. Sonuçların daha önce belirlenen doğru bir yöntemle alınmış sonuçlarla karşılaştırması ile gösterilebilir.

3. Hedef derişim üzerinde üç düzeyde üç deney yapılarak katım yapılmış numune üzerinde çalışılarak gösterilebilir.

4. Kesinlik (Precision): Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir⁶⁴. Bağlı standart sapma (%BSS) veya varyasyon katsayısı (%VK) ile verilir. Kesinlik üç basamak olarak düşünülmektedir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability): Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığında tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Gün içi kesinlik olarak da adlandırılır.

Ara kesinlik (Intermediate precision): Aynı çalışma şartlarında laboratuvarlar arasındaki farkların (gün değişikliği, analizeci değişikliği, cihaz değişikliği gibi) kesinlik değerlerinin göstergesidir. Günlerarası kesinlik, gün değişkenliği kullanılarak yapılan ara kesinlik çalışmasıdır ve aynı çalışma şartlarında numunelerin farklı günler (en az üç gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az n=6) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsü olarak tanımlanır.

Yenilenebilirlik (Reproducibility): Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (laboratuvarlar arasında yapılan işbirlikli çalışmalar, yöntem standardizasyonu gibi).

5. Duyarlılık Limiti (Sensitivity): Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür. Duyarlılık limiti iki basamak olarak düşünölmektedir.

Gözlenebilme Sınırı (Teşhis Limiti) (LOD): Analitin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük miktardır.⁶⁴ Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer değildir. Tipik olarak LOD pik boyunun güröltü oranına 3 olduğu veya bağıl standart sapma değerinin %20'den küçük olduğu derişimdir. Ayrıca LOD aşığıdaki formöl ile hesaplanabilir.

$$LOD = 3.3 \sigma/S$$

σ : kalibrasyon eğrisinin kaymasının standart sapması,

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

Tayin Alt Sınırı (Miktar Tayin Limiti) (LOQ): Analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük derişimidir⁶⁴. Analitin bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçölür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Tayin alt sınırı değeri, pik yüksekliğinin güröltü yüksekliğine oranın 10 olduğu veya bağıl standart sapma değerinin %10'dan küçük olduğu derişimdir. Ayrıca LOQ aşığıdaki formöl ile hesaplanabilir.

$$LOQ = 10 \sigma/S$$

σ : kalibrasyon eğrisinin kaymasının standart sapması,

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

6. Geri kazanım (Recovery): Kimyasal ölçümlerde gerçek değerin ölçülmesi uygulanan yöntemle bağımlı olarak değişim gösterir. Deneysel işlemler esnasında çeşitli nedenlerle bir kayıp oluşur. Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak gerekir. Kayıp miktarı yöntemin geri kazanım oranı olarak ifade edilir. Analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranına geri kazanım denir.

7. Sağlamlık/Tutarlılık (Robustness/Ruggedness): Sağlamlık testleri operasyonel göstergelerin analiz sonuçları üzerindeki etkilerini ölçer. Çeşitli şartlar altında yöntemin analitik sonuçlarının kabul edilebilir doğruluk ve kesinliğini saptama kabiliyeti olarak da tanımlanabilir. Sağlamlık, yöntemin bir veya birden daha fazla göstergesi değiştirildiğinde tekrar geçerlilik testlerine ihtiyacı olup olmadığına karar verilmesini sağlar. Bir yöntemin tutarlılığı ise, farklı deney koşullarında, farklı alet, farklı analizci, farklı laboratuvar, farklı reaktifler, farklı deney sıcaklığı ve farklı günlerde gerçekleştirilmesi ile elde edilen bulguların tekrarlanabilme derecesidir.

8. Örneklerin Kararlılığı, Stabillite (Stability): Yöntem geliştirirken saklanan örneklerde analiz süresince analitin stabil kaldığından emin olmak için stabillite testlerinin yapılması gerekir. Normal laboratuvar şartlarında nem, sıcaklık, ışık ve hava gibi etkilere saf analit ve/veya analit çözeltisinin stabillitesi yayınlanmış literatürlerle ve laboratuvar testleri ile incelenmelidir. Stabillite deneylerinde kullanılan şartlar çalışma esnasında kullanılan numunelendirme ve analizdeki bütün şartları içermelidir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler

LP standart kimyasal maddesi Sigma-Aldrich'den (China) temin edildi. Deneylerde çözeltilerin hazırlanması amacıyla kullanılan saf su Milli-Q saflıkta olup EASY püre RF cihazı kullanılarak elde edildi.

Kimyasal çözücü olarak HPLC saflıkta metanol (Merck, Germany) ve analitik saflıkta dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, France), etil asetat (Riedel-de Haen, Germany), hidroklorik asit (Merck, Germany) ve formik asit (Riedel-de Haen, Germany) kullanıldı.

LP içeren, Cozaar, Eklips, Loxibin, Sarilen ve Sarvas isimli ticari farmasötik preparatlar eczanelerden temin edildi.

3.1.2. Alet ve Araçlar

Moleküler absorpsiyon ölçümleri ve kinetik çalışmalar için Thermo Scientific marka Multiscan GO 51119300 model UV-Görünür bölge spektrofotometre (band aralığı 1.0 nm), lenovo model bilgisayar ve standart 96 Well UV kuvarz mikroyapı (Hellma, 370 µL) kullanıldı.

Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (LC/MS-APCI-ES) analizleri Agilent 1200 Serisi HPLC ve Agilent MSD cihazında yapıldı.

İstenilen hacimlerde çözücü ve çözelti aktarımı için Eppendorf Research serisi 100-1000 ve 1000-5000 µL otomatik pipetler kullanıldı.

Ayrıca çalışmada santrifüj (Hettich, RPM x 100), terazi (Metler Toledo Ad 104-5), karıştırıcı vorteks (IKA), etüv (Memmert), azot evaporatör (N-Evap 111) ve ultrasonik banyo (Elma LC30) cihazları kullanıldı.

Kullanılan bütün alet ve araçlar Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvar'ından temin edildi.

3.2. Deneyde Kullanılan Yöntemler

3.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Şartları

UV-Görünür bölge spektrofotometrenin yöntem şartları Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. UV-Görünür bölge spektrofotometre şartları

Yöntem Şartları	LP
Data modu	Absorbans
Start Lamba (nm)	230
Stop Lamba (nm)	500
Tarama Hızı	hızlı
Bant Genişliği	1 nm
Dalga Boyları (nm)	286 ve 352
Mikroplaka Sıcaklığı (°C)	32.3
Çalışma protokolü	0-0.03 dakika 286 ve 352 nm'de abasorbans ölçümü 0.03-10 dakika karıştırma 10- 10.03 dakika 286 ve 352 nm'de absorbans ölçümü 10- 10.03 dakika 230-500 nm aralığında scan tarama

3.2.2. LC-MS Yöntem Şartları

LC-MS yöntem şartları Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de verildi.

Tablo 3.2. LC-MS yöntem şartları

Yöntem Şartları	
Dedektör	Kütle Spektroskopisi (MS)
Hareketli Faz	Metanol: %0.1 Formik asit (10:90, h/h)
Kolon Akış Hızı	1mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
MS parametreleri	SCAN ve negatif iyon modunda atmosfer basıncında elektrosprey iyonlaşma (API-ES-)
Kullanılan m/z değerleri	LP; 421.1; Losartan; 422.1, Losartan'ın karboksilik Asit Türevi;451.9

Tablo 3.3. MS parametre değerleri

Azot Gazı Akış Hızı	11L/dak.
Nebulizer Basıncı	50 psi
Azot Gazı Sıcaklığı	300°C
Vaporizör Sıcaklığı	250°C
Kapiler Voltaj	4000 V
Corona Akımı	4.0µA
Charging Voltaj	2000 V

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. LP'nin Standart Stok Çözeltisi

LP standart stok çözeltisi için 20 mg LP tartıldı ve 10 mL'lik balon jöjeye koyuldu. Bir miktar metanol ile madde çözülüp 10 mL'ye metanol ile tamamlandı. Vorteks ile 30 sn karıştırıldı ve hazırlanan çözelti 4°C'de saklandı.

3.3.2. 0.05 M KI Standart Çözeltisi

KI standart için 415 mg KI tartıldı ve 50 mL'lik balon jöjeye koyuldu. Bir miktar deiyonize su ile madde çözülüp 50 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı ve

vorteks ile 30 sn karıştırıldı. KI çözeltisi her analiz öncesi tekrar taze bir şekilde hazırlandı.

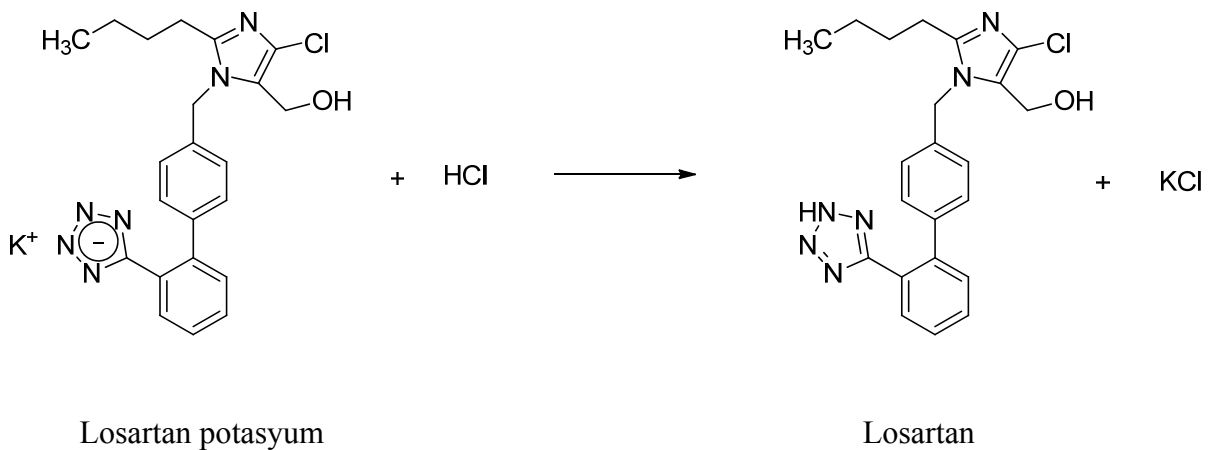
3.3.3. 0.003 M KIO₃ Standart Çözeltisi

KIO₃ standart için 32.1 mg KIO₃ tartıldı ve 50 mL'lik balon jöjeye koyuldu. Bir miktar deiyonize su ile madde çözülüp 50 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı ve vorteks ile 30 sn karıştırıldı. KIO₃ çözeltisi her analiz öncesi tekrar taze bir şekilde hazırlandı.

3.4. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Yöntem

Yöntem, LS'ye dönüştürülen LP'nin (Şekil 3.1) iyodat ile butil zincirindeki metil grubunun oksidasyona uğraması sonucu LS'nin karboksilik asit türevinin oluşumu (Şekil 3.2) ve oluşan karboksilik asit varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu sarı renkli triiyodür kompleks iyonunun meydana gelmesi (Şekil 3.3) temeline dayanmaktadır.³³

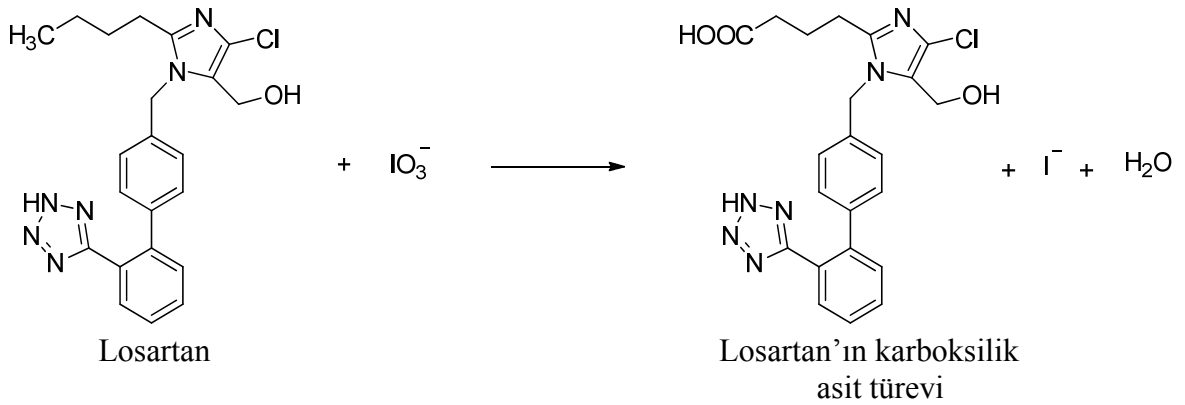
3.4.1. LP'nin Losartana (LS) Dönüşüm Reaksiyonu



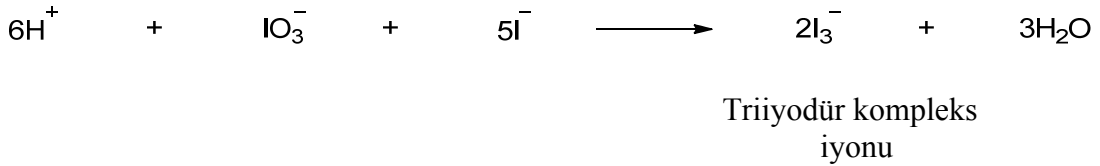
Şekil 3.1. LP'nin LS'ye dönüşüm reaksiyonu

Şekil 3.1’de gösterilen reaksiyonda görüldüğü gibi asidik ortamda LP, LS’ye dönüşmektedir. Bu reaksiyondan hareketle kalibrasyon eğrisinde kullanılan tüm derişimler için hazırlanan 0.5 mL LP çözeltisine 0.75 mL 1 M HCl çözeltisi eklendi ve 10 sn vorteksledi. Daha sonra 2.5 mL etil asetat ilave edildi. Ağzı kapatılarak 5 dakika vorteksledi. 3000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Ekstraksiyon işlemi tekrarlandı. Üst süpernatant kısımları alınarak birleştirildi ve oda sıcaklığında azot gazı altında kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı 5 mL DMSO ile çözüldü.

3.4.2. LS’nin Karboksilik Asit Türevine (LCOOH) Dönüşümü ve LCOOH Varlığında İyodürün İyodat ile Oksidasyonu



Şekil 3.2. LS’nin karboksilik asit türevine dönüşüm reaksiyonu



Şekil 3.3. İyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu triiyodür kompleks iyonunun oluşum reaksiyonu

Yukarıdaki reaksiyonlardan (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) hareketle kalibrasyon eğrisinde kullanılan tüm derişimler için Bölüm 3.4.1’de belirtildiği gibi hazırlanan 0.4 mL LP çözeltisine 1.961 mL 0.003 M KIO_3 ve 1.953 mL 0.05 M KI çözeltileri eklendi. Elde edilen çözelti deiyonize su ile 5 mL’ye tamamlandı ve mikropalakaya alınarak Tablo 3.1’de belirtilen deney protokolüne göre UV-Görünür bölge spektrumları LP katımı yapılmamış köre karşı alındı.

3.4.3. Kinetik Çalışma

Belirtilen reaksiyonun gerçekleşmesi, dengeye gelme ve kararlı kalma süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada reaksiyon için gerekli kimyasalların eklendiği ve LP’nin son derişiminin 16 $\mu\text{g/mL}$ olduğu bir karışım kullanıldı. Bu çözeltinin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunda 10 dakika süre ile 1 dakika da bir absorbans sinyali ölçülerek kinetik değişimler izlendi ve KIO_3 ve KI derişimleri yüksek tutularak sadece LP derişimine bağlı pseudo bir reaksiyona başvurularak reaksiyon hızı hesaplandı. Çalışmada belirlenen bekleme süreleri bundan sonra yapılacak çalışmalarda belirtilen reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli zaman olarak temel alındı.

3.4.4. Önerilen Yöntemin Optimum Koşullarının Belirlenmesi

İyonik formdaki LP’nin HCl ile asitlendirilerek LS formuna dönüştürülmesi, oluşan LS’nin iyodat ile oksidasyonu sonucu karboksilik asit türevinin oluşturulması ve daha sonra bu asit formunun varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu sarı renkli triiyodür kompleks iyonunun meydana gelmesi sağlandı. Belirtilen reaksiyonların gerçekleştirilebilmesinde etkili olan KIO_3 miktarı (derişimi), KI miktarı (derişimi) ve sıcaklığın uygun değerlerinin belirlenmesi amacıyla kemometrik dizayn yöntemlerinden biri olan merkezi kompozit dizayn yöntemi uygulandı. Merkezi kompozit dizaynın kimyasal verilere uygulanmasıyla ilgili ayrıntılı bilgi Bölüm 2’de yer almaktadır. Belirtilen kemometrik dizayn için gerekli faktörler ve belirlenen aralıklar Tablo 3.4’de verildi.

Tablo 3.4. LP analizi için faktörler ve belirlenen aralıklar

X₁ (1. faktör)	0.05 M KI miktarı	0.6	1.3	2.0
X₂ (2. Faktör)	0.003M KIO ₃ miktarı	0.8	1.7	2.6
X₃ (3. faktör)	Sıcaklık	30	35	40

Tablo 3.5’de çalışma şartları verilen 20 deney yapıldı ve her bir deneme için maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunda absorpsiyonları belirlendi. Bulunan absorpsiyon değerlerini kullanarak Tablo 4.4’de verilen denklemler elde edildi. Bu denklemler nümerik analizde dizayn-expert 8 yazılımı kullanılarak iterasyon yöntemi ile çözüldü ve her bir faktör için optimum değerler hesaplandı.

Tablo 3.5. Uygulanan merkezi kompozit dizayn kapsamındaki deneyler

Deney	X₁	X₂	X₃	X₁	X₂	X₃
1	-1	-1	-1	0.6	0.8	30
2	+1	-1	-1	2	0.8	30
3	-1	+1	-1	0.6	2.6	30
4	+1	+1	-1	2	2.6	30
5	-1	-1	+1	0.6	0.8	40
6	+1	-1	+1	2	0.8	40
7	-1	+1	+1	0.6	2.6	40
8	+1	+1	+1	2	2.6	40
9	0	0	0	1.3	1.7	35
10	-1.682	0	0	0.122	1.7	35
11	+1.682	0	0	2.477	1.7	35
12	0	-1.682	0	1.3	0.186	35
13	0	+1.682	0	1.3	3.213	35
14	0	0	-1.682	1.3	1.7	26.591
15	0	0	+1.682	1.3	1.7	43.409
16	0	0	0	1.3	1.7	35
17	0	0	0	1.3	1.7	35
18	0	0	0	1.3	1.7	35
19	0	0	0	1.3	1.7	35
20	0	0	0	1.3	1.7	35

3.4.5. LP'nin Varlığında Oluşan Triiyodür Kompleks İyonunun Maksimum Absorbans Gösterdiği Dalga Boylarının Belirlenmesi

Bunun için etkin maddenin son derişimi 16 µg/mL derişimde olacak şekilde çözeltileri hazırlandı ve deneysel dizayn ile belirlenen optimum koşullarda LP'nin degradasyon ürünlerinin varlığında (LCOOH) iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu triiyodür kompleks iyonunun oluşumu sağlandı. Oluşan triiyodür kompleks iyonunun UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi ile analizini yapabilmek amacıyla ilk önce reaksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli olan süre, yapılan kinetik çalışma ile belirlendi. Daha sonra belirlenen sürede yapılan analizlerde, absorbans piklerinin net bir şekilde gözleendiği ve absorbansın en yüksek olduğu dalga boyları göz önüne alınarak maksimum dalga boyu (λ_{max}) belirlendi.

3.4.6. LP için Standart Çözeltilerin Hazırlanması

LP'nin son derişimi 4-30 µg/mL aralığında (çalışma çözeltileri) ve 6, 12 ve 24 µg/mL (kalite kontrol çözeltileri) olacak şekilde Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan LS çözeltilerinin üzerine sabit miktarlarda 0.003M KIO₃ ve 0.05 M KI çözeltileri eklendi ve deiyonize su ile 5 mL'ye tamamlandı. Çalışma çözeltileri günlük taze olarak hazırlandı.

3.5. Analitik Yöntemin Geçerlilik Testleri

Belirleyicilik (Seçicilik): LP'nin degradasyon ürünlerinin varlığında triiyodür kompleks iyonunu oluşturmak üzere iyodürün iyodat ile reaksiyonu sırasında eklenen KIO₃ ve KI çözeltilerinin, kullanılan çözücülerin (su ve DMSO) ve kör çözeltilinin triiyodür kompleks iyonunun absorbansı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olup olmadığı saptandı. Ayrıca gerçekleşen reaksiyonlar esnasında oluşan bileşiklerin karakterizasyonu LC-MS yöntemi kullanılarak yapıldı.

Doğrusallık/Çalışma Aralığı: LP'nin son derişimi 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 12 µg/mL, 16 µg/mL, 20 µg/mL, 24 µg/mL ve 30 µg/mL olacak şekilde Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntemler ile çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çalışma çözeltilerinin derişimlerine karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle $y=ax+b$ regresyon eşitliğine sahip kalibrasyon eğrileri türetildi. Korelasyon katsayısı, regresyon eğrisindeki kaymanın ve eğimin standart sapması hesaplandı.

Doğruluk/ Kesinlik: LP'nin son derişimi 6 µg/mL, 12 µg/mL ve 24 µg/mL (kalite kontrol çözeltileri) olacak şekilde Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntemler ile çalışma çözeltileri gün içi analizleri için 6'şar adet hazırlandı ve aynı gün UV-Görünür bölge spektrumları alındı. Günler arası analizleri için ise 2'şer kere hazırlandı ve 3 gün boyunca UV-Görünür bölge spektrumları alındı. Elde edilen analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk ve kesinlik sırasıyla bağıl hata (BH) ve bağıl standart sapma (BSS) ile verildi ve aşağıdaki eşitliklere göre hesaplandı.

$$BH = [(bulunan-eklenen/eklenen) \times 100]$$

$$\%BSS = [standart\ sapma/ortalama \times 100]$$

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

LOD ve LOQ aşağıdaki eşitliklere göre hesaplandı.

$$LOD = 3.3 \sigma/S \text{ ve } LOQ = 10 \sigma/S$$

σ : kalibrasyon eğrisinin kaymasının standart sapması,

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi

Geri Kazanım: Farmasötik preparatlarda geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Son derişimi 6 µg/mL, 12 µg/mL ve 24 µg/mL olacak şekilde LP çözeltileri farmasötik preparatlara eklendi. Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2’de belirtilen yöntemler ile reaksiyonlar gerçekleştirildi ve UV-Görünür bölge spektrumları alındı. % Geri kazanım (%GK) aşağıdaki eşitliklere göre hesaplandı.

$$\%GK = [(bulunan/eklenen) \times 100]$$

Stabilite: Metanol ile hazırlanan LP’nin, DMSO ile hazırlanan LS’nin stabilitesini belirlemek amacı ile 16 µg/mL derişimde LP çözeltileri ve 16 µg/mL derişimde hazırlanan LS çözeltileri oda sıcaklığında 6 , 12 ve 24 saat bekletildi ve UV-Görünür bölge spektrumları alınarak absorbansları ölçüldü. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen çözeltilerin absorbansları ile kıyaslanarak sonuçlar %GK olarak verildi.

3.6. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

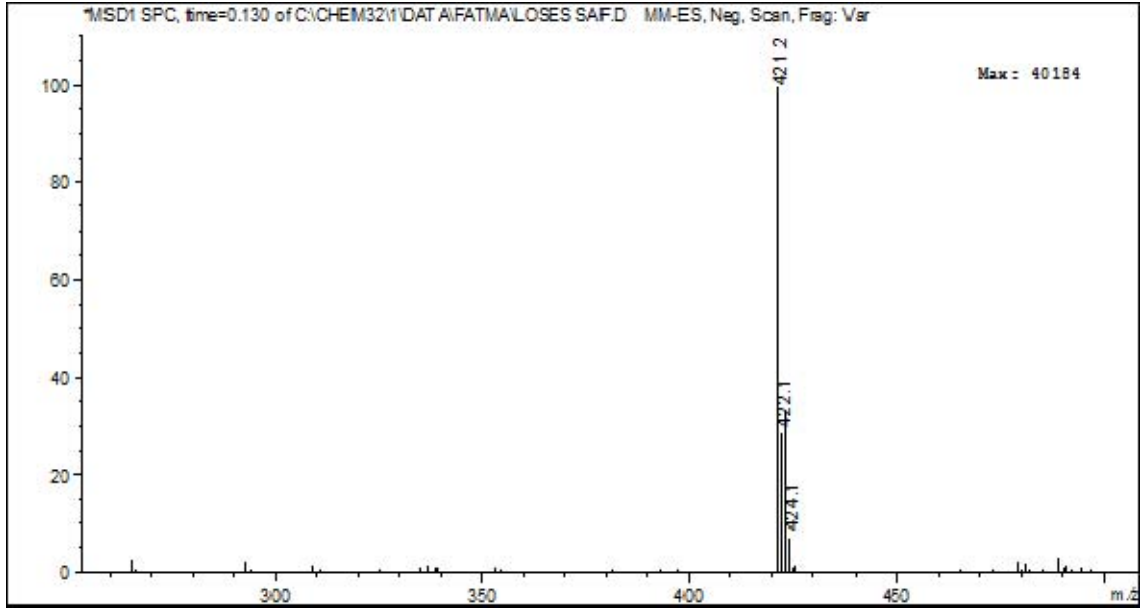
LP içeren tablet formundaki beş adet ticari farmasötik preparattan (Cozaar[®] 50 mg, Eklips[®] 50 mg, Loxibin[®] 50 mg, Sarilen[®] 50 mg ve Sarvas[®] 50 mg) her biri için 10 adet tablet alınıp tartılarak ortalamaları alındı. Tabletler havanda ezilerek toz haline getirildikten sonra her biri için yaklaşık 1 tablet miktarı (50 mg LP) alınarak 40 mL metanol eklendi. 15 dakika boyunca sonike edildi ve oda sıcaklığında soğutuldu. Hacim 50 mL’ye tamamlandı. Elde edilen çözelti süzülerek sırasıyla Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2’de belirtilen yöntemler ile ilgili reaksiyonlar gerçekleştirildi ve UV-Görünür bölge spektrumları alındı.

4. BULGULAR

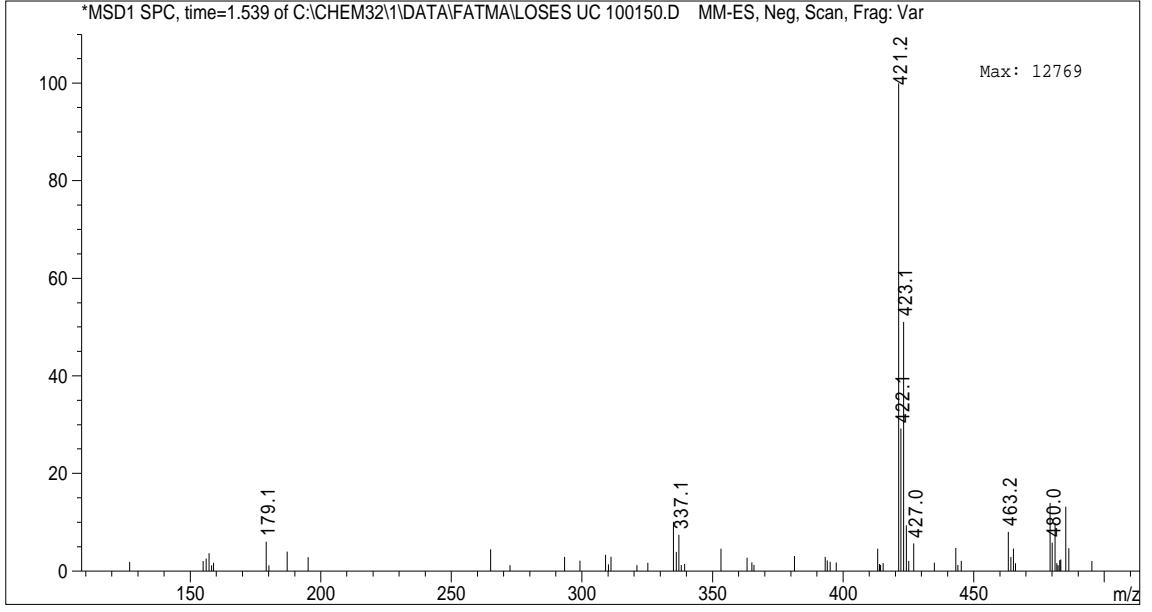
4.1. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Yöntem

4.1.1. LP'den LS'nin Oluşumu

Şekil 3.1'de gösterilen reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için Bölüm 3.4.1'de belirtilen yöntem ile 0.5 mL 16 µg/mL LP çözeltisine 0.75 mL 1 M HCl çözeltisi eklendi ve etil asetat ile ekstrakte edildi (verim: %99.8±1.254, n=6). LP ve elde edilen LS metanolde çözüldü ve LC-MS analizi yapıldı. LC-MS analizi sonucu LP ve LS için elde edilen değerler sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmektedir. [LP]⁻ 421.2 m/z; [LS]⁻ 422.1 m/z.



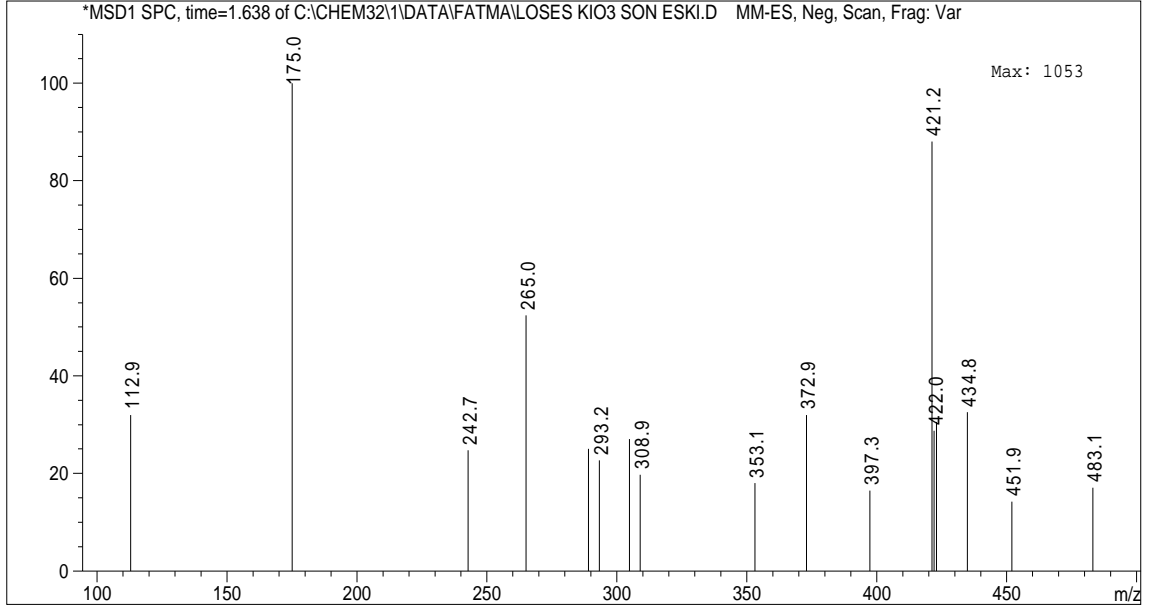
Şekil 4.1. LP için LC-MS spektrumu



Şekil 4.2. LS için LC-MS spektrumu

4.1.2. LS'den LCOOH oluşumu

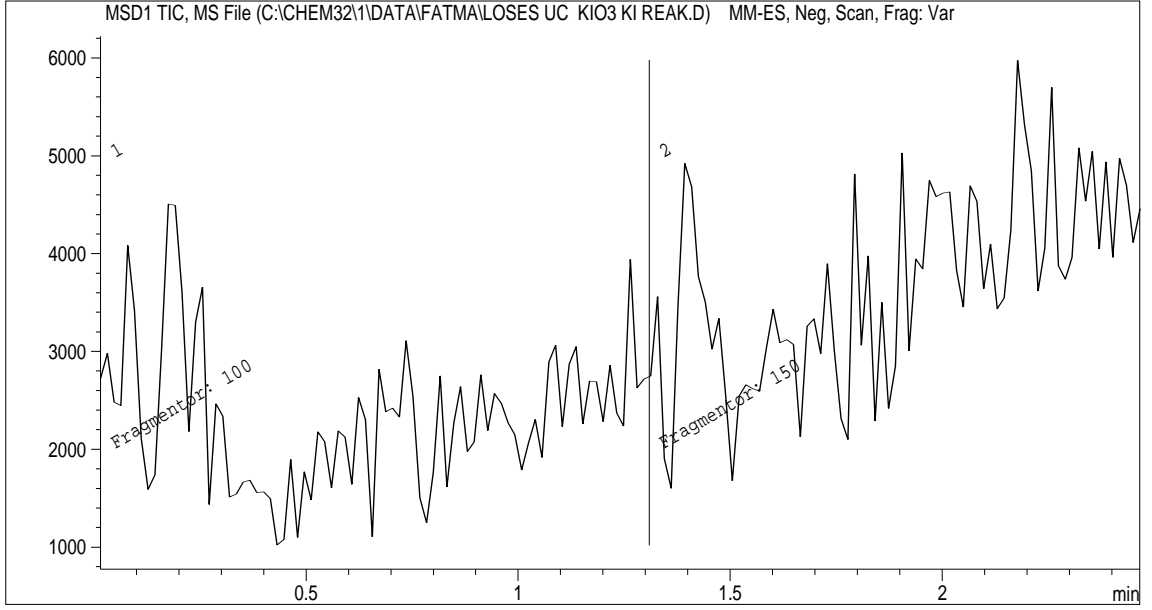
Şekil 3.2'de gösterilen reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntem ile 0.4 mL elde edilen LS çözeltisine 1.961 mL 0.003M KIO_3 çözeltisi eklendi. Hacmi deiyonize su ile 5 mL'ye tamamlandı ve LC-MS analizi yapıldı. LC-MS analizi sonucu LCOOH için elde edilen değerler Şekil 4.3'de gösterilmektedir. $[LCOOH]^-$ 451.9 m/z.



Şekil 4.3. LCOOH için LC-MS spektrumu

4.1.3. LCOOH Varlığında İyodürün İyodat ile Oksidasyonu Sonucu Triiyodür Kompleks İyonunun Oluşumu

Şekil 3.3'de gösterilen reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için Bölüm 3.4.1'de belirtilen yöntem ile 0.4 mL elde edilen LS çözeltisine 1.961 mL 0.003M KIO₃ ve 1.953 mL 0.05 M KI çözeltisi eklendi. Hacmi deiyonize su ile 5 mL'ye tamamlandı ve LC-MS analizi yapıldı. LC-MS analizi sonucu pik gözlenmedi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Triiyodür kompleks iyonu için LC-MS kromatogramı

4.2. Kinetik Çalışmalar

4-30 µg/mL LP'nin degradasyon ürünlerinin varlığında triiyodür kompleks iyonunu oluşturmak üzere gerçekleştirilen reaksiyonlarının, dengeye gelmesi ve kararlılık sürelerinin belirlenmesi amacıyla tespit edilen uygun dalga boyunda kinetik çalışmalar yapılmıştır. Zaman ile absorbans sinyallerinin değişimi Şekil 4.5'de verilmektedir.

Şekil 3.3'de verilen reaksiyon için hız denklemleri aşağıdaki gibi yazılır.

$$\text{Reaksiyon hızı} = k [C]^n [\text{KIO}_3]^m [\text{KI}]^l$$

$$\text{KIO}_3 \geq 0.00117 \text{ ve KI} \geq 0.0195 \text{ ve } 305.3 \text{ K 'de}$$

$$\text{Reaksiyon hızı} = k [C]^n \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

k; yalancı (pseudo) reaksiyon sabiti, C; LP'nin derişimi, n ise reaksiyonun derecesidir. Eşitlik logaritmik forma dönüştürülürse;

$$\text{Log (Reaksiyon hızı)} = \log k + n \log C$$

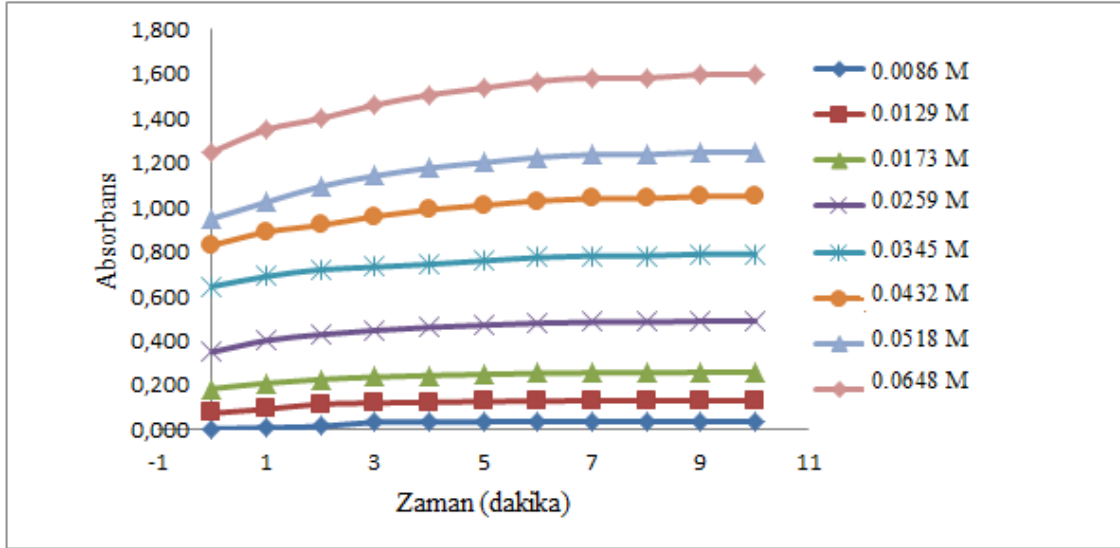
Başlangıç reaksiyon hızı, reaksiyonun ilk 10 dakikası boyunca absorban (286 nm)-zaman eğrisinin eğimi ölçülerek belirlendi (Tablo 4.1). LogC'ye karşı Log (reaksiyon hızı) değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi. 0.9929 korelasyon katsayısı ile ortalama kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliği;

$$\text{Log (Reaksiyon hızı)} = 1.08x - 0.329$$

olarak belirlendi. n değeri reaksiyonun derecesini göstermekte olup denkleme göre reaksiyonun 1'inci mertebeden olduğu tespit edildi. Reaksiyon hız sabiti ise 0.468 s⁻¹ olarak belirlendi.

Tablo 4.1. [KIO₃] ve [KI] sabit tutularak LP'nin farklı derişimlerinde reaksiyon başlangıç hızı

C [LP] mol/L	Log C	Reaksiyon Başlangıç Hızı (v)(mol/L s)	Log (v)
0.0086	-2.0635	0.0028	-2.5451
0.0130	-1.8874	0.0042	-2.3767
0.0172	-1.7625	0.0050	-2.3010
0.0260	-1.5864	0.0093	-2.0315
0.0345	-1.4614	0.0106	-1.9747
0.0432	-1.3645	0.0167	-1.7773
0.0518	-1.2853	0.0174	-1.7594
0.0647	-1.1884	0.0260	-1.5850

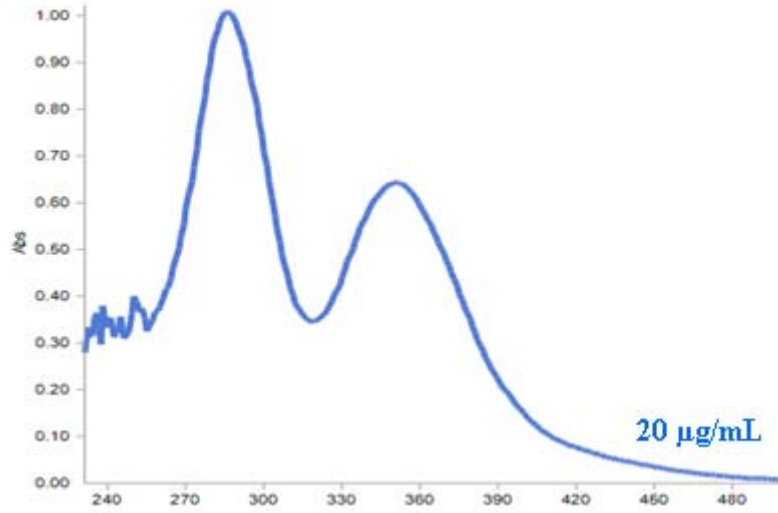


Şekil 4.5. LP'nin degradasyon ürünlerinin varlığında triiyodür kompleks iyonunun absorbansının zamanla değişimi (λ : 286 nm, 32.3°C)

Oluşan triiyodür kompleks iyonunun absorbansının zamanla değişimine bakıldığında Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2'de belirtilen reaksiyonlarının meydana gelmesi için 10 dakika süreye ihtiyaç duyulduğu gözlemlendi. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu süre göz önüne alındı.

4.3. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Yöntemin Optimum Koşullarının Merkezi Kompozit Diyazn Yöntemi ile Belirlenmesi

LP'nin degradasyon ürünlerinin varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu oluşan triiyodür kompleks iyon çözeltisinin 230-500 nm dalga boyu aralığında taraması yapılarak spektrumları alındı ve 286 nm ve 352 nm dalga boylarında 2 maksimum pik gözlemlendi. (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 20 µg/mL LP'den oluşan degradasyon ürünlerinin varlığında triiyodür kompleks iyon çözeltisinin UV-Görünür bölge spektrumu

Optimum spektrofotometrik deney koşulları belirlendikten sonra merkezi kompozit dizayn için 16 µg/mL LP içeren örnekler ile 20 deney yapıldı. Daha belirgin pikler elde edildiği için 286 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu (Tablo 4.2). Elde edilen absorbans değerleri ile matematiksel model oluşturularak Tablo 4.3'de verilen b değerleri ve Tablo 4.4'de verilen denklemler elde edildi.

Oluşturulan y denklemleri dizayn expert 8 programından yararlanılarak çözüldü. Ayrıca Sıcaklık, KI ve KIO₃ derişimlerinin bir fonksiyonu olarak absorbansın yüzey cevap eğrileri belirlendi.

Tablo 4.2. Merkezi kompozit dizayn kapsamında yapılan deney sonucunda bulunan yanıt değerleri

Absorbans (286 nm)	Deney	Deney	Absorbans (286 nm)
0.603	1	11	0.544
0.753	2	12	0.737
0.676	3	13	0.690
0.643	4	14	0.204
0.715	5	15	0.745
0.579	6	16	0.710
0.604	7	17	0.697
0.648	8	18	0.590
0.694	9	19	0.735
0.610	10	20	0.530

Tablo 4.3. Hesaplamalar sonunda bulunan b değerleri

Deney	Absorbans (286 nm)
b1	0.132900
b2	0.031639
b3	0.011969
b11	-0.102780
b22	-0.035784
b33	-0.053108
b12	-0.039250
b13	0.074500
b23	-0.036500
b123	0.770780

Tablo 4.4. Oluşturulan y denklemleri ve dizayn expert 8 programından yararlanılarak çözülen denklemler

$Y = 0.1329X_1 + 0.031639 X_2 + 0.011969 X_3 - 0.10278 X_1^2 - 0.035784 X_2^2 - 0.053108 X_3^2 - 0.039250X_1 X_2 - 0.074500X_1X_3 - 0.036500X_2X_3 + 0.77078$
$dY/d X_1 = 0.1329 - 0.20556 X_1 - 0.039250 X_2 - 0.074500 X_3 = 0$
$dY/d X_2 = 0.031639 - 0.071568 X_2 - 0.039250 X_1 - 0.036500 X_3 = 0$
$dY/d X_3 = 0.011969 - 0.106216X_3 - 0.074500 X_1 - 0.036500X_2 = 0$

Deneysel veriler kullanılarak oluşturulan Tablo 4.4'deki denklemlerin çözümü ile Tablo 4.5'de verilen X_1 , X_2 ve X_3 kod değerleri ve Tablo 4.6'daki optimum değerler bulundu. X_1 (0.05 M KI miktarı), X_2 (0.003 M KIO_3 miktarı), ve X_3 'ün (sıcaklık) bir fonksiyonu olarak elde edilen absorbansın yüzey cevap eğrileri Şekil 4.7'de verildi.

Tablo 4.5. Numerik analizde iterasyon yöntemi ile bulunan X_1 , X_2 ve X_3 kod değerleri

X_1	0.820
X_2	0.320
X_3	-0.60

Optimum değerlerin elde edilebilmesi için aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

$$X(\text{kod}) = [X_{\text{gerçek}} - \text{orta değer}] / \text{orta değer} \text{ ile en yakın değer arasındaki fark}$$

Tablo 4.6. LP analizi için bulunan optimum değerler

X_1	0.05 M KI miktarı (mL)	1.953
X_2	0.003M KIO_3 miktarı (mL)	1.961
X_3	Sıcaklık ($^{\circ}C$)	32.3

Bu parametrelere bakıldığında f testine göre en iyi sonuçların quadratic yaklaşımla tespit edildiği gözlemlendi. Deney sonuçlarına göre χ^2 değerinin anlamlı çıkması bu tezi doğrulamaktadır. Daha sonra her bir parametre anova testine tabi tutuldu ve bu hesaplamalara göre KI miktarının karesi, KIO_3 miktarı ve sıcaklık parametreleri açısından modelin anlamlı olduğu f -testi ile belirlendi.

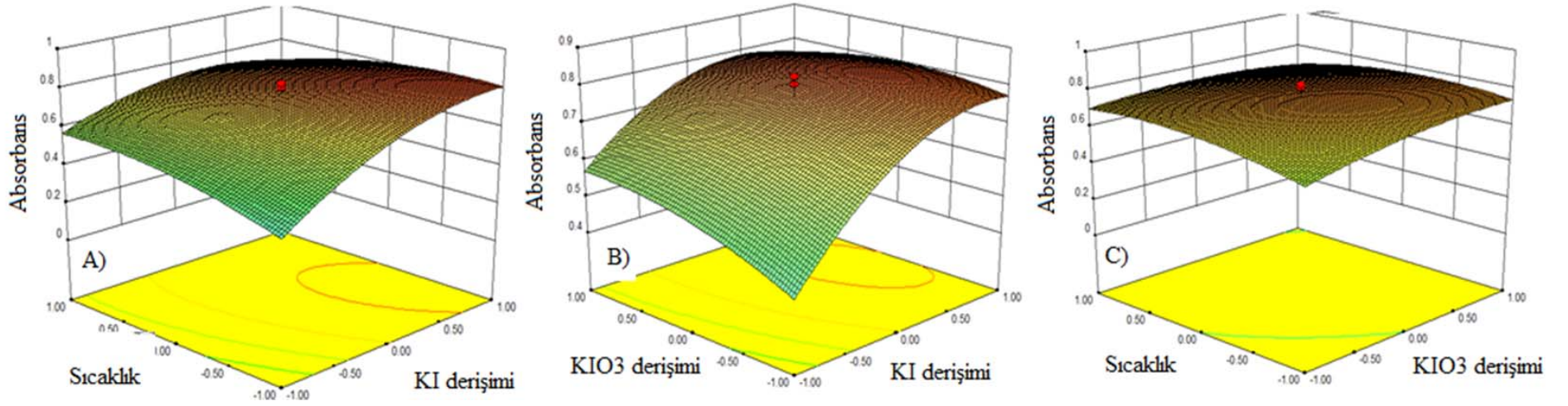
X_1 , X_2 ve X_3 ile yapılan modellemede 0.82 absorbans değeri matematiksel olarak hesaplandı.

Optimum değerler kullanılarak LP'nin son derişimi 16 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntemler ile UV-Görünür bölge spektrumu alındı ve elde edilen absorbans değerleri Tablo 4.7'de verildi.

Tablo 4.7. Teorik ve deneysel absorbans değerleri

Deney Sayısı	Teorik absorbans değeri	Deneysel absorbans değeri
1	0.82	0.81
2	0.82	0.79
3	0.82	0.82
4	0.82	0.83
5	0.82	0.82
6	0.82	0.78
7	0.82	0.75
8	0.82	0.76
9	0.82	0.76
10	0.82	0.82
Ortalama		0.794
%GK		96.8
SS		0.0298

Optimum şartlarda yapılan deneysel çalışma ile elde edilen değerlerin yapılan modelleme ile hesaplanan değere %96.8 geri kazanım ile yakın değerler olduğu tespit edildi. Yöntemin var olan sonuçlarla lineer ilgisinin bulunup bulunmadığı lack of fit değeri ile saptandı. H_0 hipotezine göre lineer bir ilişki vardı ve bu ilişki bulunan 0.0084 değeriyle reddedildi. Yöntem kümülatif olarak f -testine sokuldu ve elde edilen 6.11 değeri yöntemin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu kanıtlandı. Tüm bu sonuçlar ışığında istatistiksel olarak modelin ve optimizasyonun anlamlı olduğu ve deneysel verilerle karşılaştırıldığında da modelin gerçek örneklere uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 4.7. Sıcaklık, KI ve KIO_3 derişimlerinin bir fonksiyonu olarak triiyodür kompleks iyonunun absorbans yüzey cevap eğrileri A) Sıcaklık ve KI derişimi B) KI derişimi ve KIO_3 derişimi C) Sıcaklık ve KIO_3 derişimi

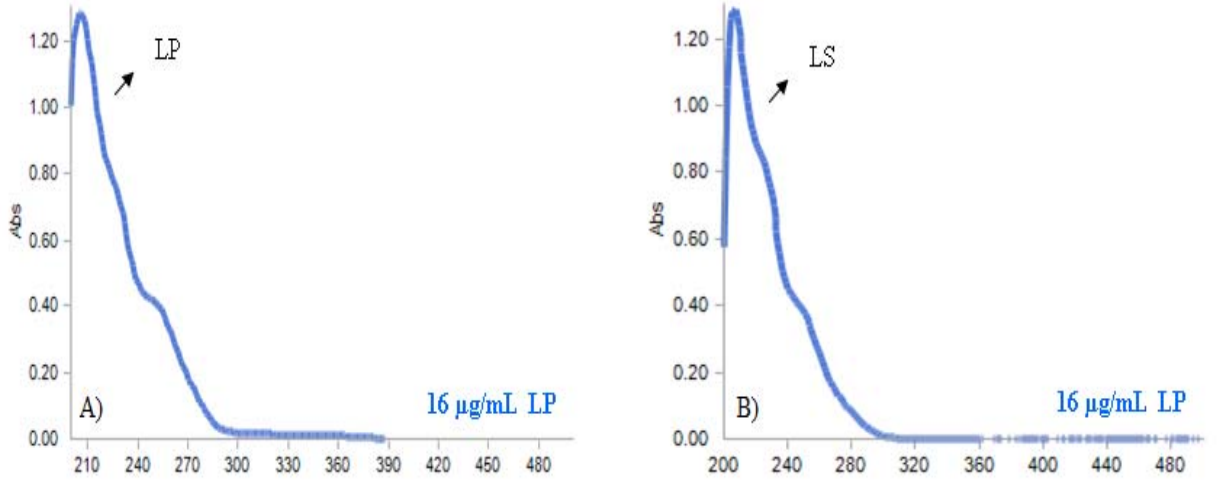
4.4. LP'nin Belirlenebilmesi için Önerilen Geliştirilen Yöntemin Geçerlilik

Testleri

4.4.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

LP çözeltisinin 200–480 nm dalga boyu aralığında taraması yapıldı ve spektrumları alındı. LP'nin metanol ile hazırlanan çözeltisinin alınan UV-Görünür bölge spektrumunda 209 nm dalga boyunda 1 maksimum pik gözlemlendi (Şekil 4.8A).

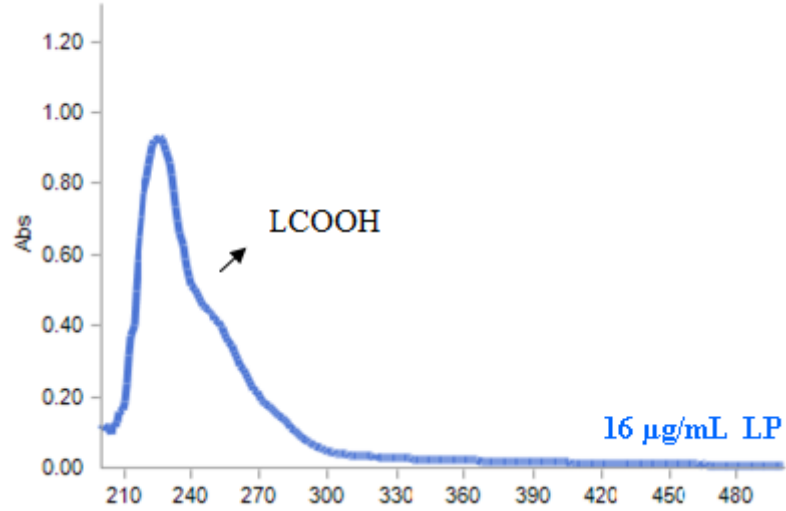
İyonik formdaki 16 µg/mL LP'nin HCl ile asitlendirilerek LS formuna dönüştürülen çözeltisinin 200–480 nm dalga boyu aralığında taraması yapılarak UV-Görünür bölge spektrumları alındı ve LS çözeltisinin alınan spektrumunda 209 nm dalga boyunda 1 maksimum pik gözlemlendi (Şekil 4.8B).



Şekil 4.8. A) 16 µg/mL derişimde standart LP'nin ve B) LS formuna dönüştürülen LP'nin UV-Görünür bölge spektrumu

16 µg/mL LP'den oluşan LS'nin iyodat ile oksidasyonu sonucu meydana gelen LCOOH çözeltisinin 200–480 nm dalga boyu aralığında taraması yapılarak UV-

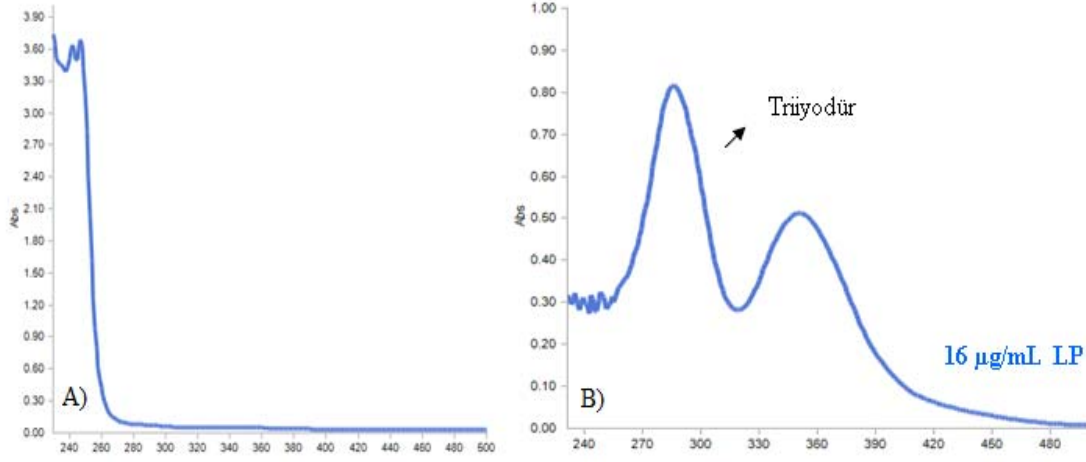
Görünür bölge spektrumları alındı ve LCOOH çözeltisinin alınan spektrumunda 236 nm dalga boyunda 1 maksimum pik gözlemlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. LCOOH formuna dönüştürülen LP'nin UV-Görünür bölge spektrumu

Belirtilen reaksiyon ortamında hazırlanan kör çözeltinin 230–480 nm dalga boyu aralığında taraması yapıldı ve UV-Görünür bölge spektrumları alındı. Kör çözeltinin absorban pikinin analit için elde edilen pikten farklı dalga boyunda geldiği tespit edildi ve körden kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadığı gösterildi (Şekil 4.10A).

16 µg/mL LP'den oluşan LCOOH varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu meydana gelen triiyodür kompleks iyon çözeltisinin 230–480 nm dalga boyu aralığında taraması yapılarak belirtilen reaksiyon ortamında hazırlanan kör çözeltisine karşı UV-Görünür bölge spektrumları alındı ve triiyodür kompleks iyon çözeltisinin alınan spektrumunda 286 nm ve 352 nm dalga boylarında 2 maksimum pik gözlemlendi (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10. UV-Görünür bölge spektrumu A) Kör çözelti B) LP'den oluşan LCOOH varlığında triiyodür kompleks iyon çözeltisi

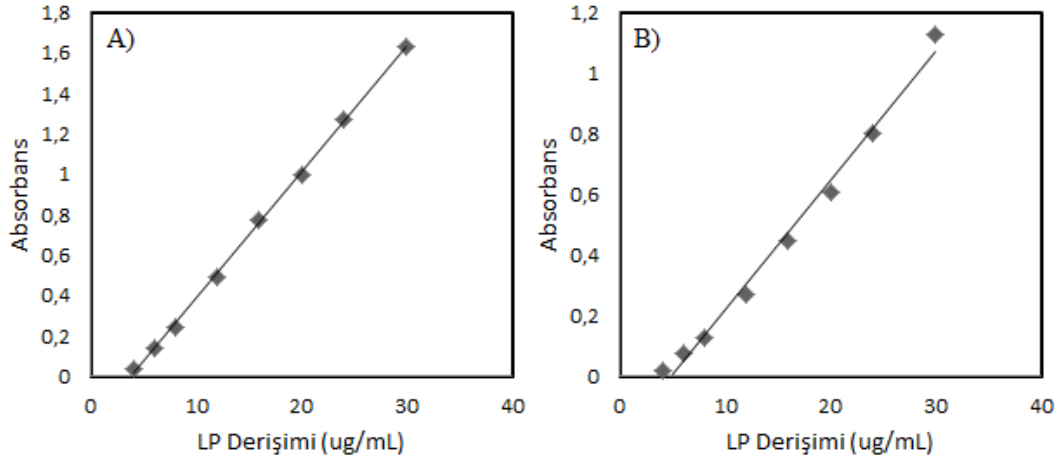
4.4.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntemler ile hazırlanan sekiz farklı derişimde (4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL, 12 µg/mL, 16 µg/mL, 20 µg/mL, 24 µg/mL ve 30 µg/mL) LP'nin derişimine karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle standart kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.11). Her bir eğrinin (Şekil 4.11A ve Şekil 4.11B) istatistik değerlendirmesi yapıldı (Tablo 4.8)

Tablo 4.8. Çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

ÇA (µg/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R
4-30	$A_{286nm}=0.0622x-0.2337$	0.0115	0.0008	0.9996
4-30	$A_{352nm}=0.0423x-0.2011$	0.0500	0.0005	0.9950

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 kalibrasyon eğrisi, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı



Şekil 4.11. Çalışma çözeltilerinin 286 nm’de (A) ve 352 nm’de (B) çizilen ortalama kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.6’da görüldüğü gibi LP analizinde hazırlanan çalışma çözeltilerinin 286 nm’de okunan absorbans değerleri ile elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı, 352 nm’de okunan absorbans değerleri ile elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısından daha büyüktür. Bu yüzden bundan sonraki tüm çalışmalarımız, 286 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerine göre yapıldı.

4.4.3. Doğruluk/ Kesinlik

Yüksek, orta ve düşük derişimleri temsil eden kalite kontrol çözeltilerinin (6 µg/mL, 12 µg/mL ve 24 µg/mL) gün içi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) UV-Görünür bölge spektrumları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlenerek değişim katsayıları hesaplandı ve elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.9’da verildi.

Tablo 4.9. Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Gün içi			Günler Arası		
	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk	%BSS	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk	%BSS
6.0	6.05± 0.170	0.875	2.813	6.11±0.347	1.817	5.681
12.0	11.45±0.219	-4.559	1.917	11.64±0.07	-2.931	0.602
24.0	24.21±0.182	0.890	0.755	23.93±0.439	-0.273	1.835

λ : dalga boyu, SS: standart sapma (n=6), doğruluk: (bulunan-eklenen)/eklenenx100, %BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalamax100)

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

UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi ile LP'nin gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri sırasıyla 0.61 µg/mL ve 1.85 µg/mL olarak tespit edildi.

4.4.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. LP içeren, film tablet formundaki beş adet ticari farmasötik preparat (Cozaar® (50 mg), Eklips (50 mg), Loxibin (50 mg), Sarilen (50 mg) ve Sarvas (50 mg)) Bölüm 3.6'da belirtildiği gibi metanolde hazırlandı ve LP'nin 3 farklı derişimde metanol ile hazırlanan standart çözeltileri (6 µg/mL, 12 µg/mL ve 24 µg/mL) eklendi. Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntemler ile reaksiyonları gerçekleştirildi ve UV-Görünür bölge spektrumları alındı. Belirlenen absorbans aynı derişimdeki standart çözeltilerinin absorbansı ile kıyaslanarak sonuçlar %GK olarak Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10. Farmasötik preparatlara katım yapılan LP çözeltilerinin geri kazanım değerler

Ticari Preparat (6µg/mL)	Eklenen (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	Geri Kazanım	%BSS
Cozaar	6.0	5.943 ± 0.073	99.06	1.63
	12.0	11.33 ± 0.279	94.48	2.46
	24.0	23.29 ± 0.160	97.04	0.63
Eklips	6.0	6.024 ± 0.247	91.78	6.86
	12.0	11.77 ± 0.523	92.87	4.69
	24.0	22.48 ± 1.469	93.20	5.99
Loxibin	6.0	5.413 ± 0.278	92.45	5.02
	12.0	11.12 ± 0.654	92.69	5.88
	24.0	22.05 ± 1.139	91.91	4.71
Sarilen	6.0	5.756 ± 0.075	95.93	1.31
	12.0	11.20 ± 0.326	93.36	2.91
	24.0	23.34 ± 0.413	97.25	1.61
Sarvas	6.0	5.381 ± 0.152	93.83	2.70
	12.0	11.16 ± 0.459	93.00	4.12
	24.0	21.89 ± 1.426	91.24	5.94

SS: standart sapma (n=6), %BSS: bağlı standart sapma (SS/ortalamax100)

4.4.6. Stabilite (Kararlılık)

LP'nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi

16 µg/mL derişimlerde metanol ile hazırlanan LP ve DMSO ile hazırlanan LS çözeltilerinin oda sıcaklığında 24 saate kadar 209 nm'deki absorbanları değerlendirilerek yapılan stabilite çalışmasının analiz sonuçları Tablo 4.11'de verildi.

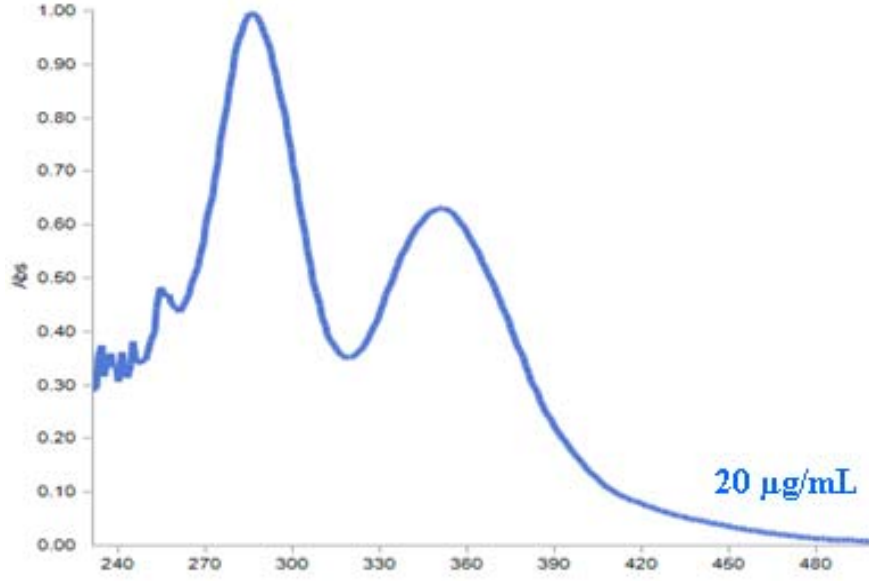
Tablo 4.11. LP ve LS standart çözeltilerinin stabilitesi

Analit	Çözücü	Eklenen LP (µg/mL)	6 Saat (%GK±SS)	12 saat (%GK±SS)	24 Saat (%GK±SS)
LP	Metanol	16.0	100.3 ± 1.987	99.9± 0.295	100.54 ± 0.789
LS	DMSO	16.0	100.6 ± 1.845	97.7 ± 0.344	50.56±1.965

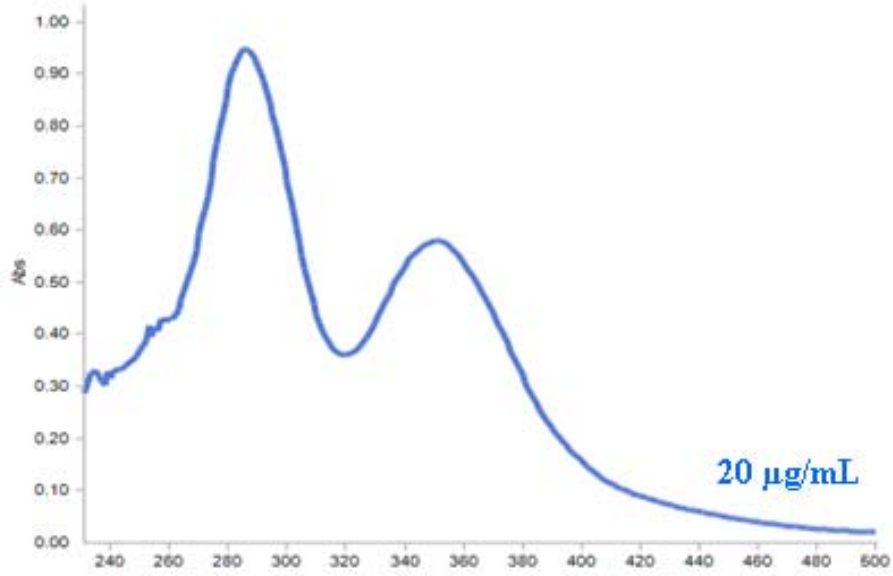
SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım

4.5. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

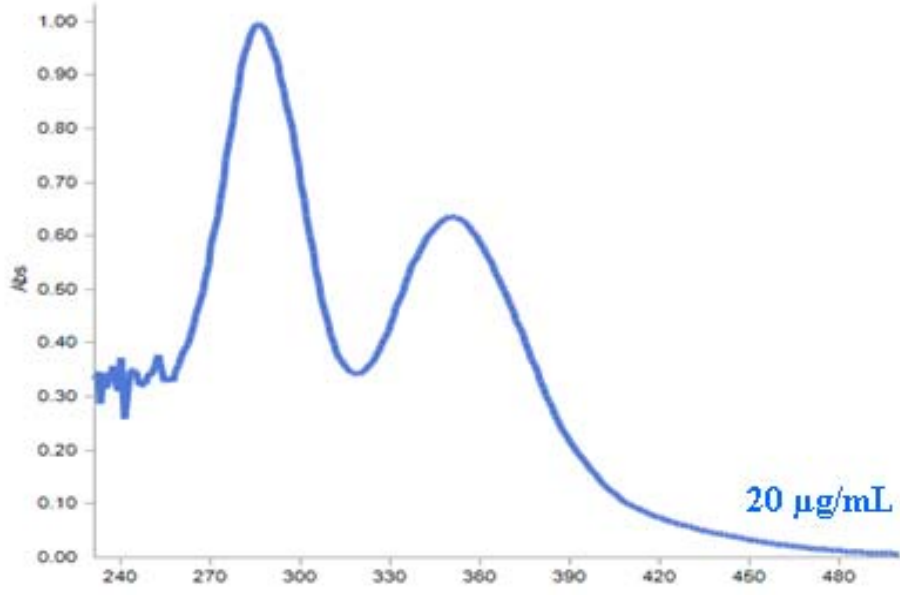
Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan UV-Görünür bölge spektrofotometri yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, LP içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar analizleri yapıldı. LP içeren, film tablet formundaki beş adet ticari farmasötik preparat (Cozaar (50 mg), Eklips (50 mg), Loxibin (50 mg), Sarilen (50 mg) ve Sarvas (50 mg)), Bölüm 3.6'da verildiği gibi metanolde çözülerek 1mg/mL'lik çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözelti süzülerek LP'nin son derişimi 8 µg/mL ve 20 µg/mL olacak şekilde metanol ile seyreltildi ve sırasıyla Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntemler ile ilgili reaksiyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen çözeltilerin UV-Görünür bölge spektrumu alındı (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) ve UV-Görünür bölge absorbansı ölçülüp standart kalibrasyon grafiğinden (Şekil 4.11) yararlanılarak LP derişimi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.12'de verildi.



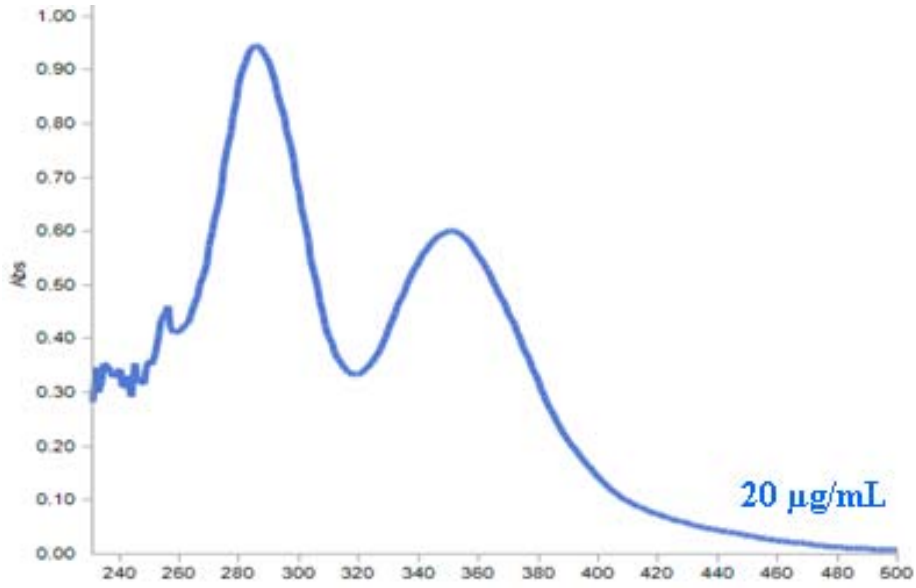
Şekil 4.12. 20 µg/mL derişimde Cozaar (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu



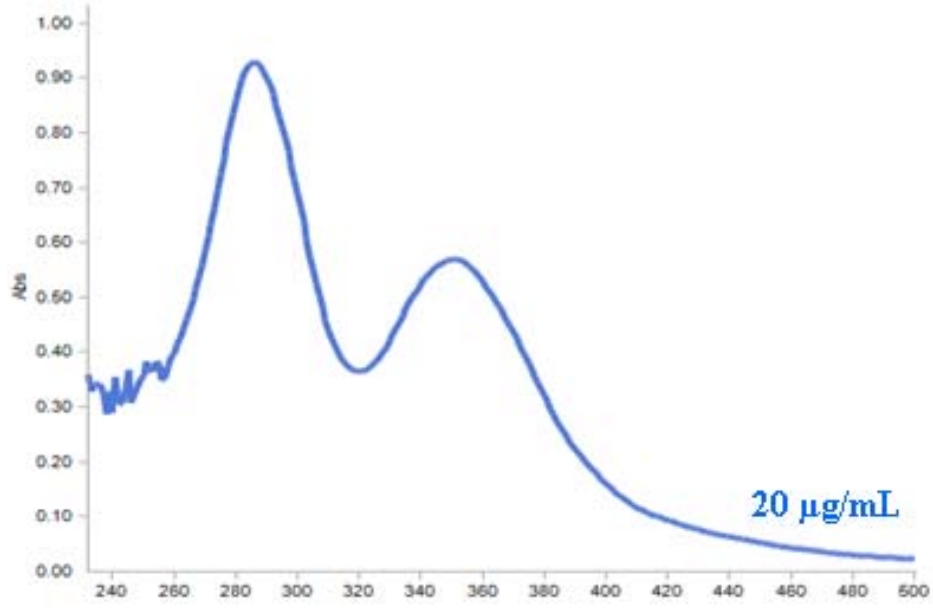
Şekil 4.13. 20 µg/mL derişimde Eklips (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu



Şekil 4.14. 20 µg/mL derişimde Loxibin (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu



Şekil 4.15. 20 µg/mL derişimde Sarilen (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu



Şekil 4.16. 20 µg/mL derişimde Sarvas (50 mg) ilaç çözeltilerinin UV-Görünür bölge spektrumu

Tablo 4.12. LP içeren farmasötik preparatların spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini

Ticari Preparat	n	Ortalama±SS (mg)	%GK	%BSS	Güven Aralığı
Cozaar (50 mg)	24	50.48±0.916	100.9	1.815	98.1-103.9
Eklips (50 mg)	24	47.96±0.893	95.93	1.86	92.9-99.1
Loxibin (50 mg)	24	49.96±1.198	99.93	2.39	95.6-103.2
Sarilen (50 mg)	24	48.97±1.483	97.94	3.02	93.0-99.2
Sarvas (50 mg)	24	47.48±1.254	94.96	2.64	91.9-100.7

SS: standart sapma, %BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalama×100), %GK: yüzde geri kazanım

5. TARTIŞMA

Kan basıncı (tansiyon), dolaşım sistemi atardamarları içindeki kanın basıncıdır ve kalbin kasılması sırasında oluşan en büyük basınç (sistolik) ve kalbin kasılması sırasında oluşan en küçük basınç (diyastolik) ile ifade edilir. Hipertansiyon sistolik kan basıncının 140 mm-Hg ve üzeri diyastolik kan basıncının 90 mm-Hg ve üzeri olmasıdır.¹ Kan basıncı yüksekliği, eğer tedavi edilmezse atardamarlarda sertleşmeye ve daralmalara neden olur. Dolayısıyla atardamarların beslediği organlarda yapısal ve işlevsel bozukluklara yol açar. Beyin, kalp, göz (retina) ve böbrekler hipertansiyondan en çok etkilenen organlar arasındadır. Hipertansiyon, beyin kanaması, kalp krizi, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği, göz dibi kanamaları ve felç gibi hastalıkların en önemli nedenleri arasındadır.^{1,2}

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar 5 ana grupta toplanabilir. Bunlar, diüretikler, sempatikolitikler ya da adrenerjik sinir sistemi antagonistleri, renin anjiyotensin sistemini (RAS) etkileyen ilaçlar, damar düz kasında etkili ilaçlar ve yeni geliştirilmekte olan ilaçlardır. Renin-anjiyotensin sistemini etkileyen ilaçlar da ACE inhibitörleri ve Anjiyotensin II reseptör blokerleri (ARB) olmak üzere iki ana grupta toplanır.⁵ ARB, vücutta AT₂ hormonunun etkilerini bloke ederek kan basıncını düşüren anti-hipertansif bir ilaç grubudur. LP, ilk tanımlanan ARB grubu ilaçtır. LP vücutta dönüştüğü aktif metaboliti ile birlikte renin anjiyotensin aldesteron sistemine katılarak, aldosteron sekresyonu ve sempatik aktivasyona neden olan fizyolojik olarak aktif olan Anjiyotensin-II reseptörünü inhibe ederek antihipertansif etki gösterir.^{1,2}

Hipertansiyon dünya genelinde 600 milyon ve Türkiye'de 18 milyon civarında insanda görülen ve her yıl 3 milyon insanın ölümüne neden olan yaygın bir hastalıktır.² Hipertansiyonun tedavisinde ilk olarak yaşam tarzı değişikliği önerilmektedir. Kilo verilmesi, tuzdan fakir diyet, egzersiz, sebze ve meyveden zengin diyetle beslenme ve

diyette doymuş yağ miktarının azaltılması bunlardan birkaçıdır. Yaşam tarzı değişikliklerinin yanı sıra kan basıncı kontrolü sağlanamayan hastalarda antihipertansif ilaç başlanması önerilmektedir. Gerek JNC-VI ve gerekse WHO-ISH-1999 hipertansiyon kılavuzlarında, tüm antihipertansif ilaç gruplarının ilk seçenek olarak kullanılabilmesi ve ilaç seçiminde bireyselleştirilmiş tedavi prensibinin uygulanması gerektiği vurgulanmaktadır.² Bireyselleştirilmiş tedavi, hastada tanı konulduktan sonra hastalığın aşamasına göre tedavinin planlanması ve uygulanması anlamına gelir ve bu şekilde tedaviye başlamadan önce, hastalığın özellikleri belirlenerek uygulanacak tedaviye karşı alınacak yanıtlar saptanmalıdır. Bu yanıtları belirleyebilmek yani ilaç ve kimyasal maddenin biyolojik etkisinin belirlenebilmesi için, şüphesiz ki farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda ilaç etkin maddelerinin analizlerinin gerçekleştirilebilmesi gerekmektedir. Ayrıca gerek imalat ve gerekse piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin miktarlarının doğru olarak belirlenmesi ilacın kullanımı açısından çok önemlidir. Eksik etkin madde içeren ilaçlar gereken yararı göstermemekte ve ilaçların yan etkileri dikkate alındığında, fazla ilaç etkin maddeye sahip olanlar ise pek çok zararlı etkilere neden olmaktadır.

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı, ilaç etkin maddelerinin, çeşitli analitik yöntemler kullanarak farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda teşhisi ve belirlenmesi önemli bilimsel çalışmalar arasında yer almaktadır.

Belirtilen ilaç analizlerinde kullanılabilen iyi bir analitik yöntem seçimi yapabilmek için analitik yöntemler hakkında yeterli bir bilgi ve donanıma ve iyi bir literatür bilgisine sahip olmak gerekir. Uygulanması düşünülen analitik tekniğin nasıl seçilmesi gerektiği hususunda kesin bir şey söylemek mümkün değildir, çünkü farklı koşullar altında en iyi yol birden fazla olabilir. Yöntem seçiminde genellikle ilk olarak

analiz sırasında ölçülmek istenen değerler belirlenmeli ve bu sonuca ulaşmanın en hızlı ve güvenli yolu bulunmalıdır.⁶⁵

Spektroskopi, genel anlamda elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bir bilim dalı olarak tanımlanır ve spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur.⁵⁵ Atomik spektroskopi, sadece elektronun bir enerji düzeyinden diğer bir enerji düzeyine geçişini (elektronik geçiş) incelerken, moleküler spektroskopi elektronik geçişlere ek olarak dönme ve titreşim enerji düzeyleri arasındaki geçiş de incelemektedir. Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir.^{53,56}

Atomik ve moleküler spektrokimyasal yöntemler, absorpsiyon, emisyon, lüminesans ve saçılma gibi birtakım etkileşimleri içermektedir. Bu etkileşimlerin sonuçları göz önüne alınarak çeşitli spektroskopik yöntemler ve cihazlar geliştirilmiştir. UV-Görünür bölge spektroskopisi, 200-400 nm dalga boyu arası ultraviyole ve 400-800 nm dalga boyu arası görünür bölgede meydana gelen absorpsiyonun ölçülmesi temeline dayanan yöntemdir. Belirtilen bölgede meydana gelen absorpsiyon, genel olarak bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır.^{53,55,56} UV-Görünür bölge spektroskopisi yöntemi, maddenin ışığı soğurma (absorplama) derecesini ölçmek ve bundan yararlanarak derişimi saptamak için, soğurma ile derişim arasındaki ilişkiyi veren Lambert-Beer eşitliğinden yararlanılarak başlıca kantitatif analizlerde olmak üzere kalitatif, fotometrik titrasyonlarda, molekül ağırlığı tayinlerinde, asit-baz denge sabitlerinin tayininde, kompleks formüllerinin ve kompleks oluşum sabitlerinin tayininde kullanılır.⁵⁸

Maddenin ultraviyole ve görünür bölgedeki ışığı absorplamasını incelemek için “UV-Görünür bölge spektrofotometresi” adı verilen bir düzenek kullanılır ve başlıca ışın kaynağı, monokromatör, örnek kabı, dedektör ve okuyucudan oluşur.^{53,55,58}

UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi, ilaç, tarım, gıda ve çevresel olmak üzere birçok alanı içeren birçok bilimdalında kullanımı yaygındır. Yaygın olarak kullanım sebebi, bu yöntemin diğer yöntemlere olan üstünlüklerinden kaynaklanmaktadır. UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi, kromatografik yöntemler ile kıyaslandığında, daha ucuz ve numunenin analize hazırlanma işlemleri daha azdır. Yöntemin diğer üstünlükleri ise; çabuk sonuç alınması ve çalışmacının fazla yorulmaması, doğruluk derecesinin oldukça yüksek olması, her maddenin kendine özgü bir absorblama piki olduğundan seçiciliğin olması, düşük derişimlerde maddelerin analizinin yapılabilmesi ve uygulama alanının oldukça geniş olması şeklinde sıralanabilir.

UV-Görünür bölge spektrofotometrisi ile ilaç etkin madde analizleri doğrudan yapılabildiği gibi duyarlılık ve seçiciliğin düşük olduğu durumlarda etkin madde analizi, bir veya daha fazla reaktif ile oluşturdukları kompleks bileşiklerin spektrofotometrik ölçümlerine dayalı olarak gerçekleştirilebilir.⁶⁶

Doğrudan spektrofotometrik yöntemler ile farmasötik preparatlarda LP'yi, Shankar ve ark.²⁸ suda 206.6 nm, Patil ve ark.³⁵ metanolde 208 nm, Rathee ve ark.³⁶ 0.01 N HCl çözeltisinde 227.4 nm, metanolde 224.2 nm, Bonfilio ve ark.⁴⁰ suda 205 nm, Wankhede ve ark.⁴² 254 nm, Thomas ve ark.⁴⁸ 222 nm, Subbarao ve ark.⁴⁹ suda 205 nm, Tsvetkova ve ark.⁵⁰ suda 208 nm, Pranshu ve ark.⁵¹ suda 237 nm dalga boyunda absorbans spektrumlarını alarak; Naqavalli ve ark.³⁹ 230.5-350.4 nm ($\Delta\lambda = 0.1$ nm) dalga boyu aralığında absorbans alıp CLS, PCR, MLR ve PLS kemometrik

yöntemlerini kullanarak; Wankhede ve ark.⁴² 249-259 nm dalga boyu aralığında pik alanlarını ölçerek belirlemişlerdir.

UV-Görünür bölge spektrofotometrik yöntem, çözeltide bulunan absorbans gösteren diğer moleküllerin varlığında istenilen molekülü belirlemek için yeterince hassas bir teknik değildir. Türev spektrofotometri yöntemi ile geniş pik maksimumlarının dalga boylarını doğru bir şekilde belirlemek mümkündür. Türev tekniği orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi vererek bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesini sağlar ve bileşiğin daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanmasına olanak verir.^{53,66,67}

Türev spektrofotometrik yöntemler ile birden fazla etkin madde içeren farmasötik preparatlarda LP'yi, Erk²², asetonitril-su çözücü karışımında 238.5 nm, Shah ve ark.²⁴ suda 271.6 nm, Lastra ve ark.²⁹ suda 234 nm, Ansari ve ark.³¹ asetonitrilde 232.5 nm, Kolsure ve ark.³⁸ metanolde 237.2 nm, Bonfilio ve ark.⁴⁰ suda 234 nm ve Shah ve ark.⁴³ suda 271.6 nm dalga boyunda birinci türev spektrumlarını alarak; Rao ve ark.⁴⁵ 234 nm dalga boyunda ikinci türev spektrumlarını alarak belirlemişlerdir.

Farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için kompleks oluşumuna dayalı spektrofotometrik çalışmalarda; asidik ortamda calmagite (CT)²⁷, Orange-II²⁷, wool fast mavisi³⁰, bromoksresol yeşil³⁰, kobalt(II)-tiyo siyonat⁴⁴ ve molibdenum(V)-tiyosiyonat⁴⁴ ve bromocresol mor (BCP)⁵² kimyasalları ile LP arasında kompleks oluşturulmuştur. Bazik ortamda ise LP potasyum permanganat ile oksidasyona³² uğratılmıştır. Daha sonra sırasıyla 491 nm²⁷, 486 nm²⁷, 630 nm⁴⁴, 468 nm⁴⁴ ve 603 nm³² dalga boylarında renkli komplekslerin UV-Görünür bölge absorbans spektrumları alınarak analizler gerçekleştirilmiştir.

LP'yi içeren sartanlar olarakta adlandırılan ARB grubu ilaç etkin maddelerinin butil zincirindeki metil grubu iyodat ile oksidasyona uğrayarak karboksilik asit türevi oluşturur ve oluşan karboksilik asit türevinin varlığında iyodür iyodat ile oksidasyona uğrar ve sarı renkli triiyodür kompleks iyonu meydana gelir.³³ Bu reaksiyon mekanizması ile LP'nin farmasötik preparatlarda spektrofotometrik olarak belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Yukarıda belirtilen bilgiler ışığında, LP üzerine sırasıyla HCl, KIO₃ ve KI eklenerek sarı renkli triiyodür kompleks iyonu oluşturuldu (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) ve oluşan kompleks iyon, 286 nm dalga boyunda UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi ile analiz edildi. Geliştirilen bu yöntem literatürden farklı yeni bir spektrofotometrik yöntemdir.

Gerçekleşen reaksiyonlar esnasında oluşan bileşiklerin karakterizasyonu LC-MS yöntemi kullanılarak yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verildi. Spektrumda moleküllere ait iyon piki sırasıyla [LP]- 421.2 m/z; [LS]- 422.1 m/z; [LCOOH]- 451.9 m/z'de gözlemlendi.

UV-Görünür bölge spektrofotometre ile kantitatif analizlerin yanı sıra kinetik çalışmalar da gerçekleştirilebilmektedir. Kimyasal kinetik, bir reaksiyonun nasıl yürüdüğü, ne kadar hızlı yürüdüğü, hangi mekanizma ile (yoldan) yürüdüğü ve hızına hangi faktörlerin nasıl etki ettiği hakkında bilgi veren, kimyanın çalışma alanlarından biridir. Kimyasal reaksiyonların çoğunda, reaktantlardan ürün oluşumu birden fazla adımda (basamakta) gerçekleşir. Bir reaksiyonun yürüyüşü sırasında ardarda gerçekleşen basit reaksiyonlar dizisi o reaksiyonun mekanizmasını verir.⁵⁹

Çalışmada, 4-30 µg/mL derişim aralığında LP'nin degradasyon ürünlerinin varlığında triiyodür kompleks iyonunu oluşturmak üzere gerçekleştirilen reaksiyonların, dengeye gelmesi ve karalılık sürelerinin belirlenmesi amacıyla tespit edilen uygun dalga

boyunda kinetik çalışmalar yapıldı ve zaman ile absorbands sinyallerinin değişimi Şekil 4.5’de verildi. Oluşan triiyodür kompleks iyonunun absorbandsının zamanla değişimine bakıldığında Bölüm 3.4.1 ve Bölüm 3.4.2’de belirtilen reaksiyonlarının meydana gelmesi için 10 dakika süreye ihtiyaç duyulduğu gözlemlendi. Daha sonra yapılan çalışmalar da bu süre göz önüne alınarak yapıldı.

Belirtilen reaksiyonların hız eşitliği diferansiyel yöntem ile belirlendi. Diferansiyel yöntem ilk kez bir Alman fizikokimyacı olan J.H van’t Hoff tarafından 1884 yılında önerilmiştir. Bu yöntemin esası, deneysel olarak derişimin zaman grafiklerini oluşturma, oluşan grafikteki eğriler üzerinden eğimler alarak reaksiyon hızlarını belirleme ve bu değerleri diferansiyel hız ifadesinde kullanma esasına dayanır.⁶⁸

Çalışmada, $KIO_3 \geq 0.00117$ ve $KI \geq 0.0195$ ve 305.3 K ‘de reaksiyon hızı $= k [C]^n$ şeklinde ifade edildi ve diferansiyel yöntem kullanılarak reaksiyon hız eşitliği (Log (Reaksiyon hızı)= 1.08 log[c] – 0.329) olarak bulundu. Bu eşitlikten yararlanılarak ise reaksiyon derecesi (1) ve pseudo reaksiyon hız sabiti (0.468 s^{-1}) tespit edildi.

Günümüzde bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik alanlarındaki gelişmeler, kimya alanında, özellikle de analitik kimya da kompleks sistemlerin çözümü için kemometri adı verilen yeni bir disiplinin doğuşuna neden olmuştur. Bu gelişmeler, analitik kimya ve komşu branşlardaki araştırmacılara, analitik problemlerin çözümünde yeni olanaklar sağlayan çok boyutlu ve çok değişkenli parametrelerin kullanıldığı kemometrik yöntemlerle yeni çalışma alanları doğurmuştur. Kemometri, istatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanarak kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya disiplini. Kemometri, kimyasal analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ekstraksiyonunu veya saklı bilgilerin açığa çıkarılmasına olanak tanıyan güçlü bir araçtır. Kemometrinin temel uygulama alanlarından biri analitik kimyadır.⁶¹

Kemometri; özellikle analitik kimyada kompleks sistemlerin çözümü için oluşturulan, kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya bilim dalıdır. Kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunar.⁶¹ Analitik kimya, modern analitik enstrümantal yöntemlerle oluşturulan veriler sayesinde kemometrik yöntemlerin uygulanmasının gelişmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur.⁶²

Verilerin değerlendirilmesi ve açıklanması için uygulanan bazı kemometrik yöntemler vardır. Kimyasal problemlerin çözümü için uygun kemometrik yöntemlerin kullanılması, bu yöntemlerin sınırlarını ve varsayımlarının tam olarak anlaşılmasıyla mümkün olmaktadır. Kimyasal veriler bir veya birçok değişkene bağlı olabilir. Tek değişkenli verilerin analizinden çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemler tercih edilmektedir.⁶¹

Tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme, deneysel tasarım, modelleme, kalibrasyon, optimizasyon, yapı tanıma, sınıflandırma, yapay akıl yöntemleri, resim işleme bilgi ve sistem kuramı gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

Kemometrik tekniklerden biri olan deneysel dizaynın kimyasal verilere uygulanma sebepleri; deneysel sonucu etkileyen en önemli faktörlerin neler olduğunu belirlemek, verileri incelemek, optimize edilmesi gereken faktörlerin hangileri olduğunu saptamak ve zaman ile maliyetten tasarruf yapmaktır. Optimizasyon işlemlerinin öncelikli amacı, daha az deney yaparak; daha az çözücü ve zaman kaybıyla matematiksel modelleme teknikleri kullanarak optimum şartların belirlenmesidir. Merkezi kompozit dizayn yöntemi deneysel dizayn yöntemlerinden biridir ve yaygın olarak uygulanır.⁶² Merkezi kompozit dizayn yöntemi ile deneysel faktörlerin etkileri, aralarındaki etkileşim, deneysel hatalar ve optimum deney koşulları incelenebilir.

Avrupa birliğinin getirdiği normlar çerçevesinde çevrenin daha az kirlenmesine neden olan daha ekonomik analitik yöntemlerin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması merkezi kompozit tasarımı ve optimizasyonunu çok önemli ve sıkça başvuru bir yöntem haline getirmiştir.⁶³

Yukarıda bahsedilen özelliklerden dolayı bu çalışmada, belirtilen reaksiyonlar ile LP'nin belirlenmesinde, KI miktarı, KIO₃ miktarı ve reaksiyon sıcaklığının optimum değerlerini bulmak için merkezi kompozit dizayn yöntemi uygulandı. Her bir parametrenin maksimum ve minimum değerleri saptandı ve bu değerler 0.05 M KI için 0.6-2.0 mL 0.003 M KIO₃ için 0.8-2.6 mL ve sıcaklık için ise 30-40 °C olarak belirlendi. Bu değerler 3 faktörlü merkezi kompozit tasarımına göre 20 deneyden oluşan bir set halinde belirlendi ve 286 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometrede ölçüldü (Tablo 4.2). Elde edilen absorbans değerlerini kullanarak Tablo 4.3'de verilen b değerleri ve Tablo 4.4'de verilen denklemler elde edildi. Elde edilen absorbans değerlerine göre dizayn expert programı yardımıyla optimum şartlar ve bu şartlar sonucu elde edilmesi gereken cevap değeri matematiksel model olarak ifade edildi. Bu parametrelere bakıldığında *f*-testi ile elde edilen değerlere göre en iyi sonuçların quadratic yaklaşımla tespit edildiği gözlemlendi. Deney sonuçlarına göre χ^2 değerinin anlamlı çıkması bu deney faktörlerini doğrulamaktadır. Daha sonra her bir parametre Anova testine tabi tutuldu ve bu hesaplamalara göre KI miktarının karesi, KIO₃ miktarı ve sıcaklık parametreleri açısından modelin anlamlı olduğu *f*-testi ile belirlendi. Deney sonuçlarına göre optimum şartlar 1.953 mL 0.05 M KI, 1.961 mL 0.003 M KIO₃ ve 32.3 °C olarak belirlendi (Tablo 4.6). Bu değerler ile yapılan modellemede 16 µg/mL LP için 0.82 absorbans değeri matematiksel olarak saptandı. Daha sonra optimum şartlarda yapılan deneysel çalışma ile bu değere çok yakın değerler bulundu. Geri kazanım % 96.8 olarak hesaplandı. Yöntemin var olan sonuçlarla lineer ilgisinin bulunup

bulunmadığı lack of fit değeri ile saptandı. Ho hipotezine göre lineer bir ilişki vardı ve bu ilişki bulunan 0.0084 değeriyle reddedildi. Yöntem kümülatif olarak *f*-testine sokuldu ve elde edilen 6.11 değeri yöntemin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu kanıtlandı. Tüm bu sonuçlar ışığında istatistiksel olarak modelin ve optimizasyonun anlamlı olduğu ve deneysel verilerle karşılaştırıldığında da modelin gerçek örneklere uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.

Analitik yöntem seçimi ve yöntemin optimisasyonu yapıldıktan sonra geliştirilen bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğruluk, kesinlik, doğrusallık, seçicilik, spesifiklik ve hassaslık gibi parametreleri içeren geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Geçerlilik testlerinde bileşimi tam olarak bilinen standart maddeler kullanılır. Kullanılan standart maddeler, analizi yapılacak analit ile aynı ya da kimyasal özelliklerinin birbirine yakın olması gerekir.⁶⁷

Çalışmada, farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için geliştirilen kinetik spektrofotometrik yöntemin geçerlilik testleri gerçekleştirildi. Yöntemin, 0.9996 korelasyon katsayısı ile 4 ile 30 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu, gün içi ve günler arası doğruluk değerlerinin 0.89 ile -4.55 aralığına olduğu; gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin 0.60 ile 5.68 aralığına olduğu ve LOD ve LOQ değerinin ise sırasıyla 0.61 µg/mL ve 1.85 µg/mL olduğu tespit edildi.

LP'nin farmasötik preparatlarda doğrudan spektrofotometrik yöntem ile analizinin yapıldığı çalışmalarda, LP'nin 2-20 µg/mL³⁵, 2.02-22.22 µg/mL³⁶, 5.05-50.50 µg/mL³⁶, 3-7 mg/L⁴⁰, 10-50 µg/mL⁴², 1-5 µg/mL⁴⁹, $3 \cdot 10^{-4}$ - $6.75 \cdot 10^{-4}$ g/µL⁵⁰ ve 2-20 µg/mL⁵¹ derişim aralıklarında doğrusal olduğu ve belirtilen yöntemlerin LOQ değerinin ise 0.04 µg/mL ile 2.75 µg/mL arasında değiştiği belirtilmektedir.

LP'nin farmasötik preparatlarda türev spektrofotometrik yöntem ile analizinin yapıldığı çalışmalarda, 10-50 µg/mL²², 30-70 µg/mL²⁴, 4-6 mg/L²⁹, 2-50 µg/L³¹, 10-30

$\mu\text{g/mL}^{38}$, $6-10 \text{ mg/L}^{40}$, $30-70 \mu\text{g/mL}^{43}$ ve $8-22^{45} \mu\text{g/mL}$ derişim aralıklarında doğrusal olduğu ve belirtilen yöntemlerin LOQ değerinin ise $0.23 \mu\text{g/mL}$ ile $2.97 \mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği belirtilmektedir.

LP'nin farmasötik prepartlarda farklı reaktiflerle kompleks oluşumu esasına dayanan spektrofotometrik yöntem ile analizinin yapıldığı çalışmalarda, $10-100 \mu\text{g/mL}^{27}$, $7.5-60.0 \mu\text{g/mL}^{32}$, $5-25 \mu\text{g/mL}^{41}$, $20-400 \mu\text{g/mL}^{44}$, $2.5-20 \mu\text{g/mL}^{46}$, $10-30 \mu\text{g/mL}^{52}$ derişim aralıklarında doğrusal olduğu ve belirtilen yöntemler arasında en düşük LOQ değerinin $2.73 \mu\text{g/mL}$ olduğu belirtilmiştir.

LP'nin farmasötik prepartlarda spektrofluorometri yöntemi⁴⁷ ile analizinin yapıldığı çalışmada, LP'nin $0.006-1.7 \mu\text{g/mL}^{47}$ derişim aralığında doğrusal olduğu LOQ değerinin $0.5 \mu\text{g/mL}$ olduğu belirtilmektedir.

Ayrıca LP'nin farmasötik prepartlarda HPLC yöntemleri ile analizinin yapıldığı çalışmalarda, LP'nin, $0.5-2.0 \mu\text{g/mL}^{21}$, $1-30 \mu\text{g/mL}^{22}$, $25-10000 \text{ ng/mL}^{25}$, $30-70 \text{ mg/L}^{34}$, $30-70 \text{ mg/L}^{40}$, $20-140 \mu\text{g/mL}^{42}$, $400-1200 \text{ ng/spot}^{43}$ derişim aralıklarında doğrusal olduğu ve belirtilen yöntemlerin LOQ değerinin ise en düşüğünün 1.02 ng/mL olduğu belirtilmektedir.

$4-30 \mu\text{g/mL}$ derişim aralığı ve $1.85 \mu\text{g/mL}$ LOQ değeri ile geliştirdiğimiz yöntemin literatürlerdeki spektrofotometri, türev spektrofotometri yöntemlerinden daha seçici, kompleks oluşumu esasına dayanan spektrofotometrik yöntemlerden daha hassas ve HPLC yöntemlerinden daha kolay ve hızlı bir yöntem olduğu söylenebilir.

Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amacı ile seçilen 5 adet film tablet formundaki ticari farmasötik preparat Bölüm 3.6.'da anlatıldığı gibi hazırlanarak iki farklı derişimleri halinde geliştirilen yöntem ile absorbans spektrumları alındı. Analiz bulguları etiketli miktarlarla uyumlu olarak bulundu. Ayrıca beş farklı farmasötik preparat için yapılan geri kazanım çalışmasında % 91.24-99.06 aralığında geri kazanım

değerleri elde edildi ve bu da yöntemin doğruluğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. Geliştirilen kinetik spektrofotometrik yöntem ile Cozaar, Eklips, Loxibin, Sarilen ve Sarvas isimli farmasötik preparatlarda yapılan analizlerde % 94.9 ile % 100.9 arasında sonuçlar elde edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hipertansiyon, tüm dünyada ciddi olarak insan ve toplum sağlığını tehdit eden, kalp krizi, felç ve böbrek yetmezliği gibi ölümcül sonuçlara yol açan, tehlikeli ve yaygın bir hastalıktır. Türkiye'de her 5 kişiden biri hipertansiyon hastasıdır. Yüksek tansiyonun yol açtığı birçok ölüm, erken tanı ve tedavi ile önlenir. Hipertansiyon tedavisinde son yıllarda ilaçla tedavide büyük atılımlar olmuştur ve bu durum ilaçların farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda analizi için yeni analitiksel yöntemlerin geliştirilmesi ile ilişkilendirilir. Kemometri, istatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanarak kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya disiplindir. Kemometrik tekniklerden biri olan deneysel dizayn deneyin optimum şartlarını belirler ve amacı daha az deney yaparak; daha az çözücü ve zaman kaybıyla matematiksel modelleme teknikleri kullanarak optimum şartları belirlemektir. Merkezi kompozit dizayn yöntemi de deneysel dizayn yöntemlerinden biridir.

Bu çalışma, LP'nin karboksilik asit formunun varlığında iyodürün iyodat ile oksidasyonu sonucu triiyodür kompleks iyonunun oluşumu esasına dayanan yeni bir kinetik spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi, deneysel koşulların merkezi kompozit dizayn yöntemi ile optimize edilmesi, geçerlilik testlerinin yapılması ve geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduğunun gösterilmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışma sonucunda LP'nin analizinde geliştirilen kinetik spektrofotometrik yöntemin hassas, doğru ve kesin olduğu gösterilmiş ve yöntemin farmasötik preparatlarda LP'nin rutin analizlerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Avrupa birliğinin getirdiği normlar çerçevesinde çevrenin daha az kirlenmesine neden olan daha ekonomik analitik yöntemlerin geliştirilmesine örnek teşkil edeceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Altınbas A, Dogan A, Ozguner F. Kısa süreli losartan tedavisinin hafif ve orta derece esansiyel hipertansiyonlu olgulardaki etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1998, 5: 175-177.
2. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Hipertansiyon, Obezite ve Lipit Metabolizması Hekim için Tanı ve Tedavi Rehberi, 2009: 9-92.
3. Adcock B, Ireland Jr R. Secondary hypertension: a practical diagnostic approach. *American Family Physician*, 1997, 55: 1263.
4. Beevers G, Lip GYH, O'Brien E. The pathophysiology of hypertension. *British Medical Journal*, 2001, 322: 912-916.
5. Yılmaz R, Erdem Y. Anjiyotensin II reseptör blokerleri ve yeni bir ajan: olmesartan medoksomil. *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*, 2006, 13: 176-182.
6. Jeb S, Pickard MD. *Losartan Potassium: A review of its suitability for use in military aircrew*, Defense Technical Information Center, 2001: 139-143
7. Gradman AH, Arcuri KE, Goldberg AI, Ikeda LS, Nelson EB, Snavely DB, Sweet CS. A randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel study of various doses of losartan potassium compared with enalapril maleate in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 1995, 25: 1345-1350.
8. McIntyre M, Caffè S, Michalak R, Reid J. Losartan, an orally active angiotensin (AT1) receptor antagonist: a review of its efficacy and safety in essential hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 1997, 74: 181-194.
9. Smith R, Sweet C, Goldberg A, Timmermans P. Losartan Potassium (Cozaar (R)): A Nonpeptide Antagonist of Angiotensin II. *Drugs of Today*, 1995, 31: 463-498.

10. Weber MA, Byyny RL, Pratt JH, Faison EP, Snavely DB, Goldberg AI, Nelson EB. Blood pressure effects of the angiotensin II receptor blocker, losartan. *Archives of Internal Medicine*, 1995, 155: 405.
11. Sasaki M, Fujimura A, Harada K, Sunaga K, Ebihara A. Clinical pharmacology of multiple-dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in patients with essential hypertension. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, 36: 403-408.
12. Weir MR, Elkins M, Liss C, Vrecenak AJ, Barr E, Edelman JM. Efficacy, tolerability, and quality of life of losartan, alone or with hydrochlorothiazide, versus nifedipine GITS in patients with essential hypertension. *Clinical Therapeutics*, 1996, 18: 411-428.
13. Wood AJJ, Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *New England Journal of Medicine*, 1996, 334: 1649-1655.
14. Dina R, Jafari M. Angiotensin II-receptor antagonists: an overview. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2000, 57: 1231-1241.
15. Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1995, 58: 641-649.
16. Munafo A, Christen Y, Nussberger J, Shum LY, Borland RM, Lee RJ, Waeber B, Biollaz J, Brunner HR. Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1992, 51: 513-521.
17. Conlin PR, Spence JD, Williams B, Ribeiro AB, Saito I, Benedict C, Bunt AMG. Angiotensin II antagonists for hypertension: are there differences in efficacy? *American Journal of Hypertension*, 2000, 13: 418-426.

18. Conlin PR. Angiotensin II antagonists in the treatment of hypertension: more similarities than differences. *Journal of Clinical Hypertension-Greenwich*, 2000, 2: 253-257.
19. Mazzolai L, Maillard M, Rossat J, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects: a direct comparison of three AT1 receptor antagonists. *Hypertension*, 1999, 33: 850-855.
20. Zhao ZZ, Wang Q, Tsai EW, Qin XZ, Ip D. Identification of losartan degradates in stressed tablets by LC-MS and LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 20: 129-136.
21. Carlucci G, Palumbo G, Mazzeo P, Giovanna Quaglia M. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2000, 23: 185-189.
22. Erk N. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 24: 603-611.
23. Cagigal E, González L, Alonso RM, Jiménez RM. Experimental design methodologies to optimise the spectrofluorimetric determination of Losartan and Valsartan in human urine. *Talanta*, 2001, 54: 1121-1133.
24. Shah SA, Rathod IS, Suhagia BN, Savale SS, Patel JB. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in combined dosage forms by first-derivative spectroscopy and high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Aoac International*, 2001, 84: 1715-1723.

25. Ozkan SA, Simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide from tablets and human serum by RP-HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2001, 24: 2337-2346.
26. Hertzog DL, McCafferty JF, Fang X, Tyrrell RJ, Reed RA. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 30: 747-760.
27. Prabhakar AH, Giridhar R. A rapid colorimetric method for the determination of Losartan potassium in bulk and in synthetic mixture for solid dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 27: 861-866.
28. Shankar MB, Mehta FA, Bhatt KK, Mehta RS, Geetha M. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 65: 167-170.
29. Lastra OC, Lemus IG, Sánchez HJ, Pérez RF. Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of losartan potassium in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 33: 175-180.
30. Sankar DG, Raju MSM, Murthy TK, Kumar JMR, Sastry CSP. Extractive spectrophotometric determination of losartan potassium using acidic and basic dyes. *Indian Drugs*, 2003, 40: 724-726.
31. Ansari M, Kazemipour M, Khosravi F, Baradaran M. A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography applied to the determination of losartan potassium in tablets. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 52: 1166-1170.

32. Rahman N, Siddiqui MR, Azmi SNH. Development and validation of kinetic spectrophotometric method for the determination of losartan potassium in pure and commercial tablets. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2006, 53: 735-743.
33. Rahman N, Siddiqui MR, Azmi SNH. Quantitative analysis of irbesartan in commercial dosage forms by kinetic spectrophotometry. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 54: 626-631.
34. Bonfilio R, Tarley CRT, Pereira GR, Salgado HRN, de Araújo MB. Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. *Talanta*, 2009, 80: 236-241.
35. Patil PR, Rakesh SU, Dhabale PN, Burade KB. Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2009, 2: 183-187.
36. Rathee P, Rathee S, Rathee D, Chaudhary H. Stability indicating UV-spectrophotometric methods for simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 4: 98-109.
37. Bari S, Sathe S, Jain P, Surana S. Spectrophotometric method for simultaneous estimation of atenolol in combination with losartan potassium and hydrochlorothiazide in bulk and tablet formulation. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2010, 2: 372-375.
38. Kolsure AK, Ingale SS, Abnawe SA, Chabukswar AR, Choudhari VP, Kuchekar BS. Spectrophotometric simultaneous determination of atorvastatin and losartan potassium in combined tablet dosage form by ratio derivative method. *Journal of Pharmacy Research*, 2010, 3: 2262-2264.

39. Nagavalli D, Vaidhyalingam V, Santha A, Sankar AS, Divya O. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. *Acta Pharm*, 2010, 60: 141-152.
40. Bonfilio R, Favoretto LB, Pereira GR, Azevedo RCP, Araújo MB. Comparative study of analytical methods by direct and first-derivative UV spectrophotometry for evaluation of losartan potassium in capsules. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 46: 147-155.
41. Latheeshjlal L, Parthiban P, Alagarsamy V, Sunil M, Mahul JV, Mohan TR. Spectrophotometric determination of losartan potassium and its dosage form by bromothymol blue and phosphate buffer. *E-Journal of Chemistry*, 2010, 7: 320-324.
42. Wankhede SB, Raka KC, Wadkar SB, Chitlange SS. Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of amlodipine besilate, losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 72: 136-140.
43. Shah SA, Rathod IS, Suhagia BN, Savale SS, Patel JB. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in combined dosage forms by first-derivative spectroscopy and high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Aoac International*, 2001, 84: 1715-1723.
44. El-Shiekh R, Akl M, Gouda A, Ali W. Extractive spectrophotometric determination of some drugs through Ion-pair complex formation with thiocyanate and cobalt (II) or molybdenum (V). *Journal of American Science*, 2011, 7: 794-807.

45. Rao PLKM, Venugopal V, Anil Kumar G, Rajesh B, Prasad GAL, Ravindergoud D. Quantitative estimation of losartan potassium in pharmaceutical dosage forms by UV spectrophotometry. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 2011, 1: 295-302.
46. Abd El-Hay SS, El-Mammlly MY, Shalaby AA. Determination of clemastine hydrogen fumarate, desloratadine, losartan potassium and moxepiril HCl through binary complex formation with eosin. *Arabian Journal of Chemistry*, 2011, 4: 417-423.
47. El-Shaboury SR, Hussein SA, Mohamed NA, El-Sutohy MM. Spectrofluorimetric method for determination of some angiotensin II receptor antagonists. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011, 2: 12-18.
48. Thomas AB, Chaudhari AA, Nanda RK, Kothapalli LP, Chavan UB, Deshpande AD. Simultaneous determination of enalapril and losartan in pharmaceutical preparations by UV spectrophotometry and LC. *Chromatographia*, 2012, 69: 1-3.
49. Subbarao J, Rao PV, Vidyadhara S, Rao BV, Sasidhar RLC. UV spectrophotometric validation for identification and determination of losartan potassium in tablets. *International Journal of Pharmacy and Technology*, 2012, 4: 4137-4143.
50. Tsvetkova DD, Obreshkova DP. Validation of UV – spectrophotometric method for identification and determination of angiotensin II receptor antagonist losartan potassium. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2012, 4: 428-431.
51. Pranshu T, Prem S, Lakshmayya, Sayantan M, Shaffi T. Development and validation of UV spectrophotometric method for the estimation of losartan bulk drug and pharmaceutical formulation. *International Research Journal of Pharmacy*, 2012, 3: 391-393.

52. Ahmed SS, Karajgi SR, Simpi CC, Sonawane S, Kalyane NV. Visible spectrophotometric methods for the estimation of losartan potassium and omeprazole in single component pharmaceutical formulations. *International Journal of PharmTech Research*, 2009, 1: 1247-1250.
53. Skoog DA, West, D.M. *Principles of Instrumental Analysis*. Baskı. 1980.
54. Holler JF, Skoog DA, West DM. Fundamentals of analytical chemistry Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F eds. Analitik Kimya Temelleri. Bilim matbaa. Ankara, 1999: 497-597.
55. Hollas JM. *Modern spectroscopy*. 4th Baskı. Chichester ; Hoboken, NJ, J. Wiley, 2004.
56. Gündüz T. *İnstrümental analiz*, Ankara, Gazi Kitabevi, 2002: 229-295.
57. Holler JF, Skoog DA, Nieman T. Principles of Instrumental Analysis. Çeviri: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Ankara, Bilim Matbaa, 1998:116-137.
58. Humaira S, Dey AK, Sanaullah S, Raju SA. *International Journal of Chemical Sciences* 2009, 7: 912-918.
59. Şener M. İçme Sularında kalsiyum ve Magnezyumun Spektrofotometrik Metotla Simultane Tayini ve Yapay Sınır Ağları İle Kemometrik Analizi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, 2006.
60. Demiray G. İnsan Plazmasında Risperidon ve Aktif Metaboliti 9-Hidroksirisperidonun Miktar Tayini ve Yöntem Validasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2008.
61. Dinc E. Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2007, 27: 61-92.

62. Baran KE. [N,N-bis(salisiliden)-2,2-dimetil-1,3-propandiamin] Komplekslerinden Yararlanılarak Zeytinyağında Metal Analizleri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2006.
63. Tokay F. [N,N'-bis(4-metoksisalisiliden)-1,2-diaminoetan] Ligandı Kullanılarak Zeytinyağında Bakır, Demir, Nikel, Çinko Metallerinin Ekstraksiyonu ve FAAS ile Tayini. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2009.
64. Sogutertas O, Kayalı A. Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2005, 34(1):41-57.
65. Buick A, Doig M, Jeal S, Land G, McDowall R. Method validation in the bioanalytical laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1990, 8: 629-637.
66. Görög S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48: 247-253.
67. Huber L. Validation of analytical methods. *LC-GC International February*, 1998.
68. Onganer Y. *Kimyasal Kinetik*, Erzurum, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 2008: 1-102

EK-1.ÖZGEÇMİŞ







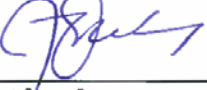
KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Elmas MİROĞLU
Doğum Tarihi	02.02.1985
Doğum yeri	Erzincan
Medeni hali	Bekar
Uyruğu	T.C.
Adres	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, 25240 ERZURUM
Tel	
e-mail	elmas.miroglu@atauni.edu.tr
EĞİTİM	
Lise	Erzincan Anadolu Lisesi (2003)
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2004-2009)
Yüksek Lisans	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2009-2013)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	Orta Derece (ÜDS 60.00, Mart 2011)

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

“2012. 3.1/ 3 “SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 24.07.2012

3/1.3- Enstitümüz Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Elmas MİROĞLU’ nun “ Farmasötik Pireperatlarda Losartan Potasyumun Spektrofotometrik Yöntem İle Analizi” tez konusu görüşüldü;

İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Doç. Dr. Ayşe OKANLI	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. Samih DİYARBAKIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof.Dr.Yavuz Selim SAĞLAM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Ahmet YILDIZ	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr.Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd.Doç.Dr.Engin SAYGIN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi ve Raportör	