



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI İLAÇ ETKEN MADDELERİN TAYİNİ İÇİN TÜREV SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Hasan UYSAL

YÜKSEK LİSANS

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Mart-2014
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Hasan UYSAL

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

BAZI İLAÇ ETKEN MADDELERİN TAYİNİ İÇİN TÜREV SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Hasan UYSAL

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

2014, 101 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
Doç. Dr. S.Beniz GÜNDÜZ
Yrd. Doç. Dr. Serpil EDEBALİ

Tez kapsamında; amlodipin ve valsartanı tek başına içeren ve amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren preparatlarda etken madde miktar tayinleri için spektrofotometrik yöntemler önerilmiştir.

Sadece amlodipin ve sadece valsartanı içeren preparatlarda etken madde miktar tayini için doğrudan UV spektrofotometri ve birinci türev UV spektrofotometri önerilmiştir. Doğrudan UV spektrofotometrede amlodipin besilatın standart ve numunelerinin metanoldeki çözeltilerinin 237,3 ve 360 nm'deki, valsartanın ise 249 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen bu değerlerde kalibrasyon grafiği çizme ve standart ekleme teknikleriyle etken madde miktar tayini yapılmıştır. Korelâsyon katsayıları, kalibrasyon grafiği çizme tekniğinde amlodipin besilat için 0,9994 ve 0,9960, valsartan için 0,9997; standart ekleme tekniğinde ise amlodipin besilat için 1,0000 ve 0,9962 ve valsartan için ise 0,9989 olarak hesaplanmıştır. Birinci türev UV spektrofotometrede standart ve numunelerinin amlodipin besilatın metanoldeki çözeltilerinin 246 nm'deki valsartanın ise 234,3 ve 263 nm'lerdeki türev absorbans değerleri ($dA/d\lambda$) ölçülmüştür. Ölçülen bu değerlerde kalibrasyon grafiği çizme ve standart ekleme teknikleriyle etken madde miktar tayini yapılmıştır. Korelâsyon katsayıları, kalibrasyon grafiği çizme tekniğinde amlodipin besilat için 0,9992, valsartan için 0,9987 ve 0,9987; standart ekleme tekniğinde ise amlodipin besilat için 0,9987 ve valsartan için ise 0,9969 ve 0,9987 olarak hesaplanmıştır. Doğrudan UV ve birinci türev UV spektrofotometride doğrusal çalışma aralıkları amlodipin besilat için 3-18 mg/L, valsartan için ise 10-60 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için iki yöntem önerilmiştir. Bu tezde ilk önerilen metot birinci türev UV spekktrofotometridir. Yöntemde standart ve numunelerin metanoldeki çözeltilerinin amlodipin besilat için 243,6 ve 248,8 nm'lerdeki ve valsartan için ise 237,2 ve 289 nm'lerdeki türev absorbans değerleri ($dA/d\lambda$) ölçülmüştür. Amlodipin

besilat için 243,6 nm'de, valsartan için 289 nm'de kalibrasyon grafiği çizme ve standart ekleme teknikleriyle etken madde miktar tayini yapılmıştır. Yöntemde doğrusal çalışma aralıkları amlodipin besilat için 3–18 mg/L, valsartan için ise 10–60 mg/L olarak hesaplanmıştır. Korelâsyon katsayıları, kalibrasyon grafiği çizme tekniğinde amlodipin besilat için 0,9997 ve 0,9965, valsartan için 0,9992 ve 0,9979; standart ekleme tekniğinde ise amlodipin besilat için 0,9973 ve valsartan için ise 0,9973 olarak hesaplanmıştır.

İkinci olarak önerilen yöntem spektrum oranları birinci türev spektrofotometridir. Yöntemde standart ve numunelerin metanoldeki çözeltilerinin amlodipin besilat için 334,4 nm'deki ve valsartan için ise 231,3 nm'deki türev absorbans değerleri (dA/dλ) ölçülmüştür. Ölçülen bu değerlerde kalibrasyon grafiği çizme ve standart ekleme teknikleriyle etken madde tayini yapılmıştır. Yöntemde doğrusal çalışma aralıkları amlodipin besilat için 3-18 mg/L, valsartan için ise 10-60 mg/L olarak hesaplanmıştır. Korelâsyon katsayıları, kalibrasyon grafiği çizme tekniğinde amlodipin besilat için 0,9986, valsartan için 0,9989; standart ekleme tekniğinde ise amlodipin besilat için 0,9969 ve valsartan için ise 0,9975 olarak hesaplanmıştır.

Önerilen bu spektrofotometrik yöntemler amlodipin besilat, valsartan ve amlodipin besilat-valsartan içeren preparatlara başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Amlodipin besilat; valsartan Birinci türev spektrofotometri; Doğrudan UV spektrofotometri; Korelasyon katsayısı; Spektrum oranları birinci türev spektrofotometri.

ABSTRACT

MS THESIS

DEVELOPMENT OF A DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SOME DRUG ACTIVE COMPOUNDS

Hasan UYSAL

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

Advisor: Assist. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

2014, 101 pages

Jury
Assist. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI
Assoc. Prof. Dr. S.Beniz GÜNDÜZ
Assist. Prof. Dr. Serpil EDEBALİ

In this thesis, spectrofotometric methods for efficient materials quantitative determination are proposed for the preparations including amlodipine and valsartan alone and amlodipine besylate + valsartan combination.

Direct UV spectrofotometry and first derivative UV spectrofotometry have been proposed for the preparation including amlodipine and valsartan alone. In the direct UV spectrophotometry absorbance values of standard and sample solutions in methanol were measured at 237,3 and 360 nm's for amlodipine besylate and 249 nm's for valsartan, respectively. Calibration graphics plooting and standard addition method were used to determine drug active compounds in measured values. The correlation coefficents were calculated as 0,9994 and 0,9990 for amlodipine besylat, 0,9997 for valsartan by calibration graphic plooting technique; 1,0000 and 0,9962 for amlodipine besylat and 0,9989 for valsartan by standard addition method. On the other method, first derivative UV spectrphotometry, solutions of standard and samples derivative absorbance ($dA/d\lambda$) signals were measured at 246 nm' amlodipine besylate and 237,3 and 263 nm' for valsartan, respectively. Calibration graphics plooting and standard addition method were used to determine drug active compounds in measured signals. The correlation coefficents were calculated as 0,9992 for amlodipine besylat, 0,9987 and 0,9987 for valsartan by calibration graphic plooting technique; 0,9987 for amlodipine besylat and 0,9969 and 0,9987 for valsartan by standard adding technique. Linear working range was established as 3,0 - 18,0 mg/L for amlodipine besylate and 10,0-60,0 mg/L for valsartan for both methods.

Two methods are proposed for the simultaneous determination of the preparations containing amlodipine besiylat and valsartan combination. In this thes, the first proposed method is first derivative spectrofotometry. Solutions of standart and samples in methanol derivative absorbance ($dA/d\lambda$) values were measured at 243,6 and

248,8 nm' for amlodipine besylate and 237,2 and 289 nm's for valsartan, respectively. Calibration graphics plooting and standard addition method were used to determine drug active compounds at 243,6 nm's for amlodipine besylat and 289 nm's for valsartan. In this method, the calibration curve for amlodipine besylate and valsartan demonstrated linearity in the range 3,0 – 10,0 mg/L and 10,0 – 60 mg/L, respectively. The correlation coefficent were calculated as 0,9997 and 0,9965 for amlodipine besylat, 0,9992 and 0,9979 for valsartan by calibration graphic plooting technique; 0,9973 for amlodipine besylat and 0,9973 for valsartan by standard addition technique.

The secondly proposed method in this thesis is ratio spectra first derivative spectrophotometry. Solituons of standart and samples in methanol ratio spectra derivative absorbance ($dA/d\lambda$) signals were measured at 344,4 nm for amlodipine besylate and 231,3 nm for valsartan, respectively. Calibration graphics plooting and standard addition method were used to determine drug active compounds in measured signals. In this method, the calibration curve for amlodipine besylat and valsartan demonstrated linearity in the range 3,0 – 10,0 mg/L and 10,0 – 60 mg/L, respectively. The coefficents of correlation were calculated as 0,9986 for amlodipine besylat, 0,9989 for valsartan by calibration graphic plooting technique; 0,9969 for amlodipine besylat and 0,9975 for valsartan by standard addition method.

The methods proposed were succesfully applied to preparations including amlodipine besylat and valsartan alone and amlodipine besylate+ valsartan combination.

Keywords: Amlodipine besylate; First derivative spectrophotometry; Direct UV spectrophotometry; standart adding; calibration graphic; Correlation coefficient; Spectrum ratio first derivative spectrophotometry; valsartan

ÖNSÖZ

Bu tezin yazımında bana her türlü desteği veren, işlerimi kolaylaştıran ve her aşamada yanımda olan danışman hocam sayın Yrd. Doç .Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI'na teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tez yazım sürecinde her aşamada yanımda olan ve gece gündüz bana maddi-manevi destek sağlayan aileme sonsuz teşekür ederim.

Hasan UYSAL
KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kullanılan Etken Maddeler ve İlaçlarla İlgili Bilgiler 2
1.1.1.Amlodipin İle İlgili Bilgiler 2
1.1.1.1. Kimyasal Yapısı 2
1.1.1.2. Farmakolojik Ve Farmakokinetik Özellikleri 3
1.1.2. Valsartan İle İlgili Bilgiler 3
1.1.2.1. Kimyasal Yapısı 3
1.1.2.2. Farmakolojik Ve Farmakokinetik Özellikleri 4
1.2. İlaç Etken Maddeleri Tayin Yöntemi 5
1.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler 5
1.2.1.1. Cihaz 7
1.2.1.2. Uygulamalar 10
1.2.1.3. Türev UV Spektrofotometri 10
1.2.1.4. UV türev Spektrofotometrisinin Avantajları Ve Uygulamaları 13
1.2.1.5. Spektrum Oranları Türev UV Spektrofotometri 14

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **17**

2.1. Amlodipin Besilat İle İlgili Çalışmalar 17
2.2. Valsartan İle ilgili Çalışmalar 20

3. MATERYAL VE YÖNTEM **23**

3.1. Kullanılan Cihazlar 23
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 23
3.2.1. Kullanılan İlaç Standartları Ve İlaçlar 23
3.2.2. Kullanılan Çözücüler Ve Diğer Kimyasal Maddeler 23
3.2.3. Çözeltilerin Hazırlanması 23
3.2.3.1. Standart Çözeltiler 23
3.2.3.2. Numune Çözeltiler 24
3.3. Deneysel İşlem 25
3.3.1. Sadece Amlodipin İçeren İlaçlar İçin Analiz Yöntemleri 25
3.3.1.1. Doğrudan Ultraviyole Spektrofotometri 25
3.3.1.2. Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri 26
3.3.2. Sadece valsartan içeren ilaçlar için analiz yöntemleri 27
3.3.2.1. Doğrudan Ultraviyole Spektrofotometri 27
3.3.2.2. Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri 28
3.3.3. Amlodipin Besilat Ve Valsartan İçeren İlaçlar İçin Analiz Yöntemleri 29

3.3.3.1. Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri 29
3.3.3.2. Spektrum Oranları Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri 31

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 35

4.1. Amlodipin İçeren İlaçlar İçin Analiz Sonuçları 35
4.1.1. Doğrudan Uv Spektrofotometri 35
4.1.1.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları 35
4.1.1.1. Standart Ekleme Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları ... 37
4.1.2. Birici Türev Spektrofotometri 41
4.1.2.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları 42
4.1.2.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları ... 44
4.2. Valsartan İçeren İlaçlar İçin Analiz Sonuçları 46
4.2.1. Doğrudan UV Spektrofotometri 46
4.2.1.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemi İle Valsartan'ın Tayin Sonuçları 46
4.2.1.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Valsartan'ın Tayin Sonuçları 48
4.2.2. Birici Türev Spektrofotometri 50
4.2.2.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Valsartan'ın Tayin Sonuçları 50
4.2.2.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Valsartan'ın Tayin Sonuçları 53
4.3. Amlodipin Besilat Ve Valsartan İçeren İlaçlar İçin Analiz Sonuçları 56
4.3.1. Birici Türev Spektrofotometri 56
4.3.1.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Tayin Sonuçları 56
4.3.1.3 Geri Kazanım Analiz Sonuçları 60
4.3.1.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Tayin Sonuçları 62
4.3.2. Spektrum Oranları Birinci Türev Spektrofotometri İle Analiz Sonuçları 64
4.3.2.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Tayin Sonuçları 64
4.3.2.3. Geri Kazanım Analiz Sonuçları 69
4.3.2.2. Standart Ekleme İle Analiz Sonuçları 70

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 77

5.1 Sonuçlar 77
5.2 Öneriler 82

KAYNAKLAR 83

ÖZGEÇMİŞ 86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ε : Absorbsiyon katsayısı
λ : Dalga boyu
λ_{ek} : Eksitasyon dalga boyu
λ_{em} : Emisyon dalga boyu
C : konsantrasyon
r^2 : korelasyon katsayısı
d : türev

Kısaltmalar

A : Absorbans
Aml : Amlodipin
gr : gram
HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografi
LC : Sıvı kromatografi
mg : miligram
ng : nanogram
nm : nanometre
UV : Ultraviyole
Val : Valsartan
YBSK : Yüksek basınçlı sıvı kromatografi
s : Standart sapma
BSS : bağıl standart sapma
G.A : güven aralığı
Tekr : tekrarlanabilirlik

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. a)Türev spektrumları **b)**örtüşen piklerin türev spektrumlarında ayrılmaları . 12
Şekil 4.1. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde a) 3 mg/L; b) 6 mg/L; c) 9 mg/L; d) 12 mg/L; e) 15 mg/L; f) 18 mg/L'lik çözeltilerine ait doğrudan UV spektrumları 35
Şekil 4.2. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ= 237,3 nm' de doğrudan UV kalibrasyon grafiği 36
Şekil 4.3. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ= 360 nm' de doğrudan UV kalibrasyon grafiği 37
Şekil 4.4. Doğrudan UV standart ilave yöntemi ile tablette amlodipin besilat tayini için elde edilen eğri. (λ = 237,3 nm) 38
Şekil 4.5. Doğrudan UV standart ilave yöntemi ile tablette amlodipin besilat tayini için elde edilen eğri. (λ = 360 nm) 39
Şekil 4.6. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde a) 3 mg/L; b) 6 mg/L; c) 9 mg/L; d) 12 mg/L; e) 15 mg/L; f) 18 mg/L'lik çözeltilerine ait birinci türev UV spektrumları 42
Şekil 4.7. Amlodipin besilat'ın metanol içerinde λ= 246 nm' de birinci türev UV kalibrasyon grafiği. 43
Şekil 4.8. Birinci türev UV standart ilave yöntemi ile tablette amlodipin besilat tayini için elde edilen eğri. (λ = 246 nm) 44
Şekil 4.9. Valsartan'ın metanol içerisinde a) 10 mg/L; b) 20 mg/L; c) 30 mg/L' lik d) 40 mg/L; e) 50 mg/L; f) 60 mg/L' lik çözeltilerine ait doğrudan UV spektrumları 46
Şekil 4.10. Valsartan'ın metanol içerisinde λ= 249 nm' de doğrudan UV kalibrasyon grafiği. 47
Şekil 4.11. Doğrudan UV standart ilave yöntemi ile tablette valsartan tayini için elde. 48
edilen eğri. (λ = 249 nm) 48
Şekil 4.12. Valsartan'ın metanol içerisinde a) 10 mg/L; b) 20 mg/L; c) 30 mg/L' lik d) 40 mg/L; e) 50 mg/L; f) 60 mg/L' lik çözeltilerine ait birinci türev UV spektrumları 50
Şekil 4.13. Valsartan'ın metanol içerisinde λ= 234,2 nm' de birinci türev UV kalibrasyon grafiği. 51
Şekil 4.14. Valsartan'ın metanol içerisinde λ= 263 nm' de birinci türev UV kalibrasyon grafiği. 52
Şekil 4.15. Birinci türev UV standart ilave yöntemi ile tablette valsartan tayini için elde edilen eğri. (λ = 234,2 nm) 53
Şekil 4.16. Birinci türev UV standart ilave yöntemi ile tablette valsartan tayini için elde edilen eğri. (λ = 263 nm) 54
Şekil 4.17. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15mg/L e)18 mg/L, valsartan'ın ğ) 30 mg/L h) 40 mg/L ı) 50 mg/L i) 60 mg/L' lik çözeltilerinin UV spektrumları 57
Şekil 4.18. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15mg/L e)18 mg/L, valsartan'ın ğ) 30 mg/L h) 40 mg/L ı) 50 mg/L i) 60 mg/L' lık çözeltilerinin birinci türev UV spektrumları 57
Şekil 4.19. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ =243,6 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği 58
Şekil 4.20. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ =248,8 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği 58

Şekil 4.21. Valsartan'ın metanol içerisinde λ =237,2 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği 59
Şekil 4.22. Valsartan'ın metanol içerisinde λ =289 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği 59
Şekil 4.23. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlerde amlodipin besilat için 243,6 nm'de birinci türev UV standart ekleme grafiği 63
Şekil 4.24. Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren tabletlerde valsartan için 289 nm'de birinci türev UV standart ekleme grafiği 64
Şekil 4.25. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın a) 3 mg/L b) 6 mg/L c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15 mg/mL e)18 mg/L' lik çözeltilerinin oran spektrumları (bölücü valsartan konsantrasyonu 60 mg/L) 65
Şekil 4.26. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın a) 3 mg/L b) 6 mg/L c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15 mg/L e)18 mg/L' lik çözeltilerinin oran spektrumlarının birinci türev eğrileri (bölücü valsartan konsantrasyonu 60 mg/L) 66
Şekil 4.27. Amlodipin besilat'ın spektrum oranları birinci türev yöntemiyle tayini için 344,4 nm'de çizilen kalibrasyon grafiği 66
Şekil 4.28. Metanol içerisinde valsartan'ın a) 10 mg/L b) 20 mg/L c) 30 mg/L ç) 40 mg/L d) 50mg/L e) 60 mg/L' lık çözeltilerinin oran spektrumları (bölücü amlodipin besilat konsantrasyonu 15,0 mg/L) 67
Şekil 4.29. Metanol içerisinde valsartan'ın a) 10 mg/L b) 20mg/L c) 30 mg/L ç) 40 mg/L d) 50 mg/L e) 60 mg/L' lık çözeltilerinin oran spektrumlarının birinci türev eğrileri (bölücü amlodipin besilat konsantrasyonu 15,0 mg/L) 68
Şekil 4.30. Valsartan'ın spektrum oranları birinci türev yöntemiyle tayini için 231,3 nm'de çizilen kalibrasyon grafiği 68
Şekil 4.31. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlerde amlodipin besilat için 344,4 nm'de spektrum oranı birinci türev UV standart ekleme grafiği 70
Şekil 4.32. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlerde valsartan için 231,3 nm'de spektrum oranı birinci türev UV standart ekleme grafiği 72

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. İlaç etken maddeleri ve ilaçlar..... 23
Çizelge 3.2. Tablet miktarları..... 24
Çizelge 4.1. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi. (237,3 nm)..... 36
Çizelge 4.2. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi. (360 nm)..... 37
Çizelge 4.3. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (237,3 nm)..... 38
Çizelge 4.4. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (360 nm)..... 39
Çizelge 4.5. Tabletlerde amlodipin besilat için birinci türev UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (246 nm)..... 43
Çizelge 4.6. Tabletlerde amlodipin besilat için birinci türev standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (246 nm)..... 45
Çizelge 4.7. Tabletlerde valsartan için doğrudan UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (249 nm)..... 47
Çizelge 4.8. Tabletlerde valsartan için doğrudan UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (249nm)..... 48
Çizelge 4.9. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (234,2 nm)..... 51
Çizelge 4.10. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (263 nm)..... 52
Çizelge 4.11. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (234,2 nm)..... 54
Çizelge 4.12. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (263 nm)..... 55
Çizelge 4.13. Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren tabletlere birinci türev UV spektrofotometrinin uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirilmesi..... 60
Çizelge 4.14. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile amlodipin besilat için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirilmesi (243,6 nm)..... 61
Çizelge 4.15. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile amlodipin besilat için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (248,8 nm)..... 61
Çizelge 4.16. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile valsartan için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (237,2 nm)..... 61
Çizelge 4.17. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile valsartan için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (289 nm)..... 62
Çizelge 4.18. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlere amlodipin besilat için birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 243,6 nm)..... 63

Çizelge 4.19. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlere valsartan için birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 289 nm)..... 64
Çizelge 4.20. Spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrini amlodipin besilat ve valsartan içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi..... 68
Çizelge 4.21. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile amlodipin besilat için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ =344,4 nm)..... 69
Çizelge 4.22. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile valsartan için elde edilen analiz sonuçları (λ =231,3 nm)..... 69
Çizelge 4.23. Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren tabletlere amlodipin besilat için spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 344,4 nm)..... 71
Çizelge 4.24. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlere valsartan için spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 231,3 nm)..... 72
Çizelge 5.1. Amlodipin ve valsartan etken maddelerini içeren preparatlar için toplu sonuçlar..... 78
Çizelge 5.2. Amlodipin besilat ve valsartan etken maddelerini birlikte içeren preparatlar için toplu sonuçlar..... 79
Çizelge 5.3. Denklem değerleri..... 80
Çizelge 5.4. Sentetik karışımlar için analiz sonuçları ve istatistik testler..... 81

1. GİRİŞ

Günümüzde muhtelif maksatlarla çok çeşitli ilaç kullanılmakta ve bunlara her geçen gün yenileri eklenmektedir. İlaçların etkili olan kısımları ilaçların etken maddeleridir. Gerek imalat ve gerekse piyasa kontrolleri sırasında ilaç etken maddelerinin miktarlarının doğru olarak tayini kullanım açısından çok önemlidir. Eksik etken madde içeren ilaçlar gereken yararı göstermemekte ve ilaçların yan etkileri dikkate alındığında, fazla ilaç etken maddeli olanlar ise pek çok zararlı yan etkilere neden olmaktadır. İlaç etken maddeleri farklı ilaçlarda farklı matrikslerde bulunduğundan bunların tayinini doğru olarak yapmak bilimsel açıdan da önemlidir (Küçükkolbaşı, 2003).

Analitik çalışmalarda tek başına, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımların kantitatif analizi için spektrofotometri, spektroflorimetri, infrared spektrofotometrisi, voltametri (polorografi), kromatografi, kütle spektrometrisi ve bu yöntemlerin kombine şekilleri kullanılmaktadır. Analiz işlemlerinde daha doğru, daha kesin, daha ekonomik, daha hızlı ve daha güvenilir sonuçlara ulaşmak için yeni teknik ve yaklaşımlara ihtiyaç olduğu bir gerçektir. Günümüzde sayılan bu özellikleri sağlayan analitik yöntemler geliştirmek amacıyla, klasik analitik yöntemler ile birlikte değişik matematiksel algoritmalara dayanan hesaplama teknikleri kombine olarak uygulanmaktadır.

Özellikle klasik analitik yöntemler ile kemometrik kalibrasyonların karışım analizlerinde başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle farmosötik preparatların analizinde de artan yoğunlukta kullanıldığı yapılan çalışmalardan gözlenmektedir. Farmosötik preparatlar, yardımcı maddelerden oluşan sabit matriks ve bir, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren numunelerdir. Analitik kimyada hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın veya bir ön ayırma işlemi kullanmaksızın kombine farmosötik preparatların aynı anda kantitatif analizi son derece önemlidir. Yapılan bilimsel çalışmalarda geliştirilecek analitik yöntemlerin, aktif bileşikleri içeren farmosötik formülasyonların kalite kontrol ve rutin analizleri için ilaç sanayinde de kullanılabilir olması tez çalışmalarında da temel kriterlerden birisidir (Kaya, 2007).

Türev Spektrofotometresi ile kombine haldeki ilaç preparatlarının hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın aynı anda kantitatif tayinini yapmak mümkündür. Ayrıca türev alma yöntemiyle artan seçicilikle beraber grafiksel ayrıntı da artacağından tek ilaç etken madde içeren preparatlarda yapılan analiz çok daha kolay olacaktır. Çalışmada seçilen

etkin maddeleri içeren formülasyonların analizlerinde spektrofotometri ve kullanımıyla ilgili çok fazla yayın bulunmamaktadır.

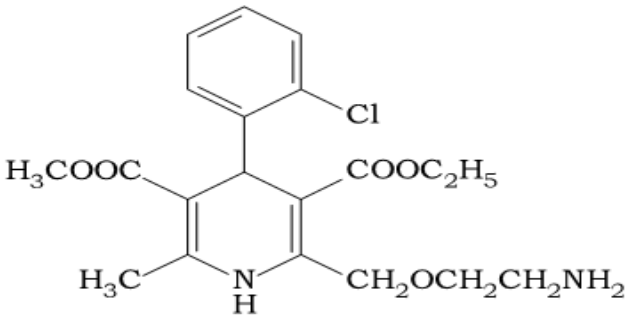
İlaç rehberleri incelendiğinde antihipertansif etkili ilaçların oldukça fazla olması dikkat çekicidir. Yüksek tansiyona karşı kullanılan ilaç etken maddelerin zamanla yenileri eklenmektedir. Kalsiyum kanal blokerleri ve anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, bu amaçla son yıllarda dünyada ve ülkemizde çok popüler olan yeni gruplardır (Çetin, 1996).

Bu tez kapsamında amlodipin ve valsartanı tek tek ve kombine halde içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin miktar tayinleri için çeşitli spektrofotometrik yöntemler önerilmesi planmıştır. Bu plan dahilinde ultraviyole spektrofotometrisi, türev UV spektrofotometrisi ve spektrum oranları türev UV spektrofotometrisi yöntemi kullanılarak etken maddelerin miktar tayinlerinin gerçekleştirilmesi ve bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanarak istatistiksel değerlendirmeleri amaçlanmışıtır.

1.1. Kullanılan Etken Maddeler ve İlaçlarla İlgili Bilgiler

1.1.1.Amlodipin İle İlgili Bilgiler

1.1.1.1. Kimyasal Yapısı



Kapalı Formülü: $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$, 408,88 g. mol^{-1}

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

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

Görünüşü: Beyaz renkli, kristalize yapıdadır.

Erime Derecesi: 178-179 ^{o}C

1.1.1.2. Farmakolojik Ve Farmakokinetik Özellikleri

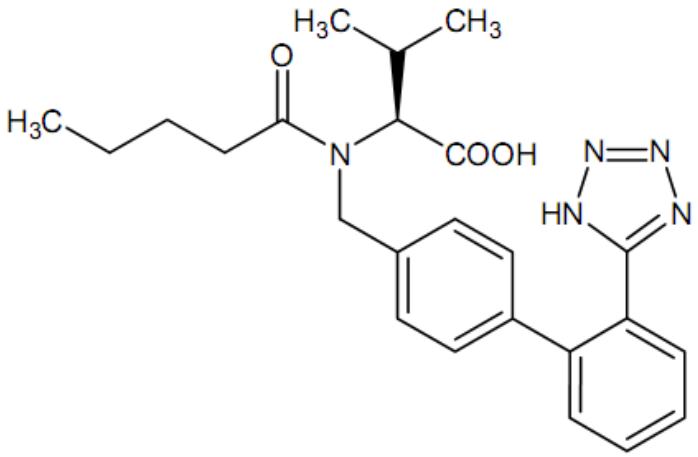
Bir dihidropiridin türevi olan amlodipin, kalsiyum kanal blokerleri sınıfına girmektedir. Bu sınıfın yeni ve uzun etkili bir üyesi olarak, anjina pektoris ve yüksek tansiyona karşı kullanılmaktadır. Amlodipin'in (+) ve (-) olmak üzere iki tane enantiyomeri vardır. Yapılan farmakolojik çalışmalarda, amlodipinin bir dihidropiridin kalsiyum kanal blokeri olarak sağladığı etkinliğin, (-)- enantiomeri şeklinde bulunmasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu nedenle farmasötik preparatlar içinde (-)- amlodipin şeklinde yer almaktadır.

Amlodipin, insan, fare ve köpekte büyük miktarda metabolize edilir. İdrarda, dozun yalnızca %52,2'i değişmemiş halde bulunabilir. Bu metabolizmanın karmaşık olduğu ve piridin analoğuna oksidasyon içerdiği belirtilmektedir. Amlodipin'in damardan ve ağız yoluyla verildikten sonra saptanan ortalama plazma ömrü, 33-36 saattir (Çetin, 1996).

Amlodipin oral uygulamadan sonra iyi absorbe olur. En yüksek plazma konsantrasyonuna 6-12 saat sonra ulaşır. % 97.5 kadar oranda plazma proteinlerine bağlanır. Terminal eliminasyon yarı ömrü 35-50 saate kadar uzar. Plazmada sabit konsantrasyona uygulamaya başladıktan 7-8 gün sonra ulaşır. Amlodipin büyük ölçüde metabolize olur. Metabolitleri ve alınan dozun %10'undan az kısmı değişmeden idrar ile vücuttan atılır.

1.1.2. Valsartan İle İlgili Bilgiler

1.1.2.1. Kimyasal Yapısı



Kapalı Formülü: $C_{24}H_{29}N_5O_3$

Kimyasal okunuşu: N-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)benzil]-N- valeril-L-valin; (S)-N-(1-karboksi-2-metilprop-1-il)-N-pentanoil-N-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4 ilmetil]amin
Molekül Ağırlığı: : 435.52 g. mol^{-1}
Erime derecesi:116 -117ºC'dir. Etanol ve metanolde çok çözünür. Suda az çözünür.
Görünüşü: beyaz renkli bir tozdur

1.1.2.2. Farmakolojik Ve Farmakokinetik Özellikleri

Valsartanın kimyasal yapısı diğer anjiyotensin reseptör antagonistlerinden irbesartan, kandesartan ve losartanla karşılaştırıldığında benzerlik ve farklılıkları vardır. Valsartan yarışmasız anjiyotensin I antagonizması gösterir. Valsartan oral olarak alındıktan sonra çabuk absorbe olur ve 2 saatte maksimal plazma konsantrasyonuna ulaşır ve %20 biyoyararlanım gösterir. Proteine bağlanma oranı özellikle albumine olmak üzere %94-97'dir. Valsartan genelde değişmeden veya %10 oranında değişerek atılır. Bu eliminasyon hastalarda %5-7 saatte olmaktadır. Sitokrom P450 ile metabolize olur. Günlük alımlardan sonra birikimi azdır. Karaciğer hastalarında dozajlarda düzenleme yapılmalıdır.

Hastaların çoğunda antihipertansif etki, bir tek oral dozun alınmasından sonraki 2 saat içerisinde başlar ve 4-6 saat içerisinde en yüksek düzeye ulaşır. Antihipertansif etki dozun verilmesinden sonra 24 saat boyunca devam eder. Tekrarlanan dozlar kullanıldığı zaman, maksimal kan basıncı azalması, hangi doz kullanılırsa kullanılsın genellikle 2-4 hafta içerisinde elde edilir ve uzun süreli tedavi sırasında aynı şekilde devam eder. Valsartanın hidroklorotiazit ile birlikte kullanılması, kan basıncında önemli bir azalma sağlar. Ağızdan alınan valsartan hızla emilir, ancak emilen miktar çok değişik olabilir.

Valsartanın farmakokinetiği, test edilen doz aralığında lineerdir. Tekrarlanan kullanımda valsartanın farmakokinetiğinde değişiklik olmaz ve günde tek doz alındığında, pek az birikime neden olur. Erkeklerdeki ve kadınlardaki plazma konsantrasyonlarının benzer olduğu gözlenmiştir. Valsartan, başlıca serum albümini olmak üzere serum proteinlerine yüksek oranda (%94-97) bağlanır. Kararlı durumdaki dağılım hacmi düşüktür (yaklaşık 17 litre). Plazma klirensi, karaciğerden geçenkan miktarı (saatte yaklaşık 30 litre) göz önünde tutulduğunda nispeten yavaştır (saatte yaklaşık 2 litre). Emilen valsartan dozunun %70'i dışkı, %30'u idrarla değişikliğe uğramamış şekilde vücuttan atılır. Plazmadaki maksimal valsartan konsantrasyonları, dozdan 2-4 saat sonra elde edilir. Besinler valsartan eğri altında kalan alan (AUC)

değerini %40, maksimal plazma konsantrasyonunu (Cmax) %50 oranında azaltır. Klinikte kullanılan doz sınırları arasında kalınması koşuluyla valsartanın AUC ve Cmax değerleri, doz arttıkça lineer artış gösterir. Tekrarlanan dozlar, valsartanın plazmada önemli ölçüde birikmesine neden olmaz.

1.2. İlaç Etken Maddeleri Tayin Yöntemi

İlaç etken madde tayinleri için çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında infrared spektofotometri, ultraviyole-görünür bölge spektrofotometri, NMR spektrometri, atomik spektrometri, floresans spektrofotometri, X-Ray floresans spektrometri ve kromatografik yöntemleri sayabiliriz (British Pharmacopoeia, 1999).

1.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımanın ölçülmesini ve yorumlanmasını inceleyen bilim dalına spektrofotometri denir. Elektromanyetik ışımanın en çok karşılaşılan türleri gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared ışınlarıdır (Uyguner, 2010).

Bir ışıma fotonu söz konusu türün hemen yanından geçerken fotonun enerjisi temel hal ile uyarılmış hallerden birinin enerjisi asındaki farka tam olarak eşitse absorplanma olabilir. Böylece fotonun enerjisi ilgili türe aktarılarak onu uyarılmış hal denilen daha yüksek enerjili hale getirir.

$$\mathrm{M} + h\nu \rightarrow \mathrm{M}* \qquad (1.1)$$

Kısa bir süre (10^{-6}-10^{-9} s) sonra, uyarılmış tür fazla enerjisini ortamdaki başka türlere aktararak temel hale döner, buna durulma (relaksasyon) denir. Durulmaya uğrayan türün çevresinde hafif bir sıcaklık artışı olur.

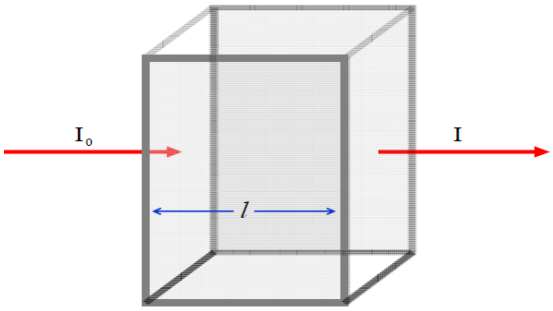
$$\mathrm{M}^* \rightarrow \mathrm{M} + \text{ısı} \qquad (1.2)$$

Durulma, M* türünün fotokimyasal bozunma sonucu başka bir türe dönüşmesi veya floresans ve fosforesans süreçleri ile ışımanın geri salınması yolu ile de olabilir.

Burada M* türünün ömrü çok kısa olduğu için herhangi bir anda M* konsantrasyonu ihmal edilecek kadar küçüktür (Skoog, 1999).

Elektromanyetik ışımanın dalga ve tanecik özellikleri mevcuttur. Elektromanyetik ışımanın dalga özellikleri dalganın ilerleme yönüne dik elektriksel alan vektörleri ile ifade edilir. Işımanın dalga boyu (λ) ard arda gelen dalgaların maksimum veya minimumları arasındaki doğrusal uzaklıktır. Işıma sadece tek dalga boyunda ise monokromatik ışıma, değişik dalga boylarını içeriyorsa polikromatik ışıma olarak adlandırılır.

Monokromatik ve I_0 şiddetindeki bir ışın demeti, kalınlığı b cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki herhangi bir atom, molekül veya iyonların tarafından absorblandığında ışının şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder.



Molekül, atom veya iyonların o dalga boyundaki ışını absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Beer- Lambert Kanunu ile verilir. Bu kanuna göre örnek kabına giren ve örnek kabını terk edenışın şiddetlerinin logaritmaları farkı, ışınla etkileşen moleküllerin konsantrasyonları ve ışının numune içinde aldığı yol ile orantılıdır.

$A = \log(I_o/I) = a.\ b.\ C$ (Beer - Lambert Eşitliği) (1.3)

I_O = Numune üzerine gönderilen ışının şiddeti

I = Numuneyi terk eden ışının şiddeti

C = Çözeltinin konsantrasyonu (g/L)

B = Işının numune içinde aldığı yol (cm olarak)

A = Absorbans

a= Absorpsiyon katsayısı, verilen dalga boyunda, belli bir atom, iyon veya molekül için sabit bir değerdir ve genellikle maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boyları için hesaplanır.

Formülde a absorpsiyon katsayısı olup absorptivite olarak kullanılmaktadır. a'nın büyüklüğü b ve C için kullanılan birimlere bağlıdır. Işın yolu b genellikle 1 cm olarak ve C ise g/L olarak alınır. Eğer Beer- Lambert kanunu ifadesi A = ε. b. C şeklinde kullanılırsa; ışın yolu uzunluğu cm ve numune konsantrasyonu mol/L olarak absorptivite ε şeklinde kullanılan molar absorptivite olarak alınmalıdır. (Uyguner, 2010)

Spektrofotometrenin dayandığı temel kanun Beer- Lambert Kanunu'dur. Bu kanunun geçerli olabilmesi için

1) Kullanılacak ışının sadece monokromatik yani tek dalga boyu değerinde olması, absorpsiyon olayının ve örneğin homojen olması, ayrıca birden fazla bileşenin ışını absorplaması halinde her bir bileşenin diğerlerinin absorpsiyonunu etkilememesi gerekir.

2) Analiz sırasında incelenen örnekte disosiasyon, asosiasyon, polimerleşme, kompleks oluşumu gibi maddenin özelliklerini değiştiren olaylar olmamalıdır.

3) Kırılma, yansıma ve difüzyon gibi parazit olaylar meydana gelmemelidir.

Ayrıca Beer-Lambert Kanunu konsantrasyonu 1.0-0.01 M'den küçük olan çözeltiler için geçerlidir. Çalışılan bileşiğin konsantrasyonu < 0.01 M olduğu halde ortamdaki yabancı bileşik ve özellikle iyonların konsantrasyonu yüksek olduğunda da bağıntıdan sapma görülür. Numune üzerine gönderilen ışının tek dalga boylu ışın olmaması ve numune üzerine ayrıca kaçak ışın gelmesi konumunda da çeşitli sapmalar meydana gelir (Uyguner, 2010).

1.2.1.1. Cihaz

Bir absorpsiyon spektrofotometre cihazı sırasıyla şu kısımlardan oluşur: Işın kaynağı, monokromatör, numune kabı, dedektör ve kaydedici.

Işın Kaynağı

UV ve görünür bölgedeki çalışmalarda genellikle sürekli ışın kaynakları kullanılır. UV bölge için genelde hidrojen veya döteryum lambasıdır. Görünür bölgede

ise tungsten lambası ışın kaynağı olarak kullanılır. Xe ve civa buhar lambaları ise hem UV hem görünür bölgede kullanılan sürekli ışın kaynağıdır.

Monokromatör

Polikromatik ışından tek dalga boyunda yani monokromatik ışın elde edilmesini sağlayan düzeneklerdir. Genel olarak monokromatör olarak prizmalar veya optik ağlar kullanılır.

Numune Kabı

Numune kabı veya hücreleri çalışılan spektrum bölgesinde ışını geçiren maddelerden yapılmaktadır. Böylece ultraviyole bölgesinde yani 200-400 nm arasında çalışılıyorsa kuartz veya erimiş silis küvetler, görünür bölge yani 400-800 nm arasında çalışılıyorsa cam ve kuartz küvetler kullanılmaktadır. Numune kapları ışığın yansımasını azaltmak için yüzeyleri ışığın geliş yönüne dik olarak yerleştirilmelidir.

Dedektör

Işın kaynağından gelen ışın şiddetinin ölçülmesi için kullanılır. Genellikle; 1-Fototüpler, 2-Fotoçoğaltıcı tüpler, 3- Silisyumlu fotodiodlar, 4- Fotovoltaik hücreler, 5-Fotoiletken hücreler 6- Yük aktarım düzenekleri kullanılır (Uyguner, 2010).

Kaydedici

Dedektörden gelen sinyalleri kağıt ortamına aktarırlar. (Uyguner, 2010)

Üç tip spektrofotometrik cihaz vardır: (1) Tek ışınlı, (2) çift ışınlı, (3) çok kanallı (Küçükkolbaşı, 2003).

Tek Işınlı Cihazlar

Bu cihazda, bir ışın kaynağı, dalga boyu seçimi için filtre veya monokromatör, ışın yoluna sıra ile konulacak hücreler, transduer, yükseltici ve bir sinyal okuma düzeneği bulunur. Normal olarak, % 100 *T* ayarı ile numunenin % T ölçümünü süresince ışın şiddetinin değişmesini ve bu nedenle oluşacak hataları önlemek için tek ışınlı çihazlarda kararlı bir potansiyel kaynağına gereksinim vardır.

Çok değişik özelliklere sahip tek-ışınlı cihazlar mevcuttur. Bunlardan en ucuzu ve en basitinde kaynak olarak batarya ile beslenen tungsten lamba, dalga boyu seçimi için bir seri cam filtre, numune koymak için deney tüpleri, transduer olarak fotovoltaik hücre ve sinyal okumak için küçük bir mikroampermetre bulunur. En karmaşık olan cihaz ise, 200 ile 1000 nm veya daha geniş aralıkta çalışan bilgisayar kontrollü cihazlardır.

Çift ışınlı cihazlar

Bir çok modern fotometre ve spektrofotometreler çift ışınlıdır. Uzayda çift ışınlı cihazla, ışın bölücü olarak adlandırılan V- şeklindeki bir ayna ile oluşturulan iki ışından biri referans çözeltisinden geçerek transduere ulaşır ve ikinci ışında, aynı anda numune çözeltisinden geçerek ikinci bir eşdeğer transduere ulaşır. İki transduerin cevapları yükseltilir ve cevapların oranları (veya oranın logaritması) elektronik olarak ölçülerek okuma cihazında gösterilir.

Diğer tip çift ışınlı cihazda, ışınlar dönen bölücü ayna kullanılarak zamana karşı ikiye ayrılır; bölücü ayna ışını önce referans hücreden ve ardından numune hücresinden geçecek şekilde yönlendirir. Oluşan ışın pulsları, ikinci bir bölücü ayna tarafından birleştirilir; bu ayna ışınlardan birini geçirerek, diğerini yansıtarak transduere gönderir.

Işınları zaman yönünden ayrışmış çift-ışınlı cihaz ise null tipi olup, çözücüden geçen ışın şiddeti numuneden geçen ışınınkine eşitleninciye kadar azaltılır. Işın şiddetindeki azalma, geçirgenliği ile doğrusal olarak azalan optik kama ile gerçekleştirilir. Geçirgenlik (veya absorbans) kamaya bağlı göstergeden doğrudan okunur.

Çift-ışınlı cihazların çok kısa süreli değişimler hariç ışın şiddetindeki sapmaların ve transduser ve yükselticideki salınımların sonuçlara etkisini önleme avantajları vardır. Ayrıca, dalga boyu ile ışın şiddetindeki büyük değişimlerin etkisini de önlerler.

Çok Kanallı Cihazlar

1980 yılı başında piyasada gözüken en son spektrofotometre tek-ışınlı diyot-serili transduserli cihazlardır. Bir lambadan çıkan ışınlar önce numune çözücü kabından geçer ve sonra sabit optik ağlı monokromatöre ulaşır. Ayrılan ışınlar fotodiyot transduserine düşer. Bu transduserde bir silikon çip boyunca yerleştirilmiş yüzlerce doğrusal fotodiyot serileri bulunur. Bu çiplerde her bir diyot için kapasitör ve elektrik anahtarı bulunur. Bilgisayar ile kumanda edilen bir kontrol düzeneği de mevcuttur. Elektronik kayıt işlemi hızlı olduğu için tüm spektrum verileri bir saniye veya daha kısa sürede toplanır. Diyot serili bir cihaz, kinetik incelemelerde orta hızdaki reaksiyonların geçici ara ürünlerini incelemek için ve sıvı kromatografi kolonundan çıkan bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayininde çok yararlıdır. Dezavantajı ise biraz sınırlı ayırma güçleri (1-2 nm) ve yüksek fiyatlı olmasıdır.

1.2.1.2. Uygulamalar

Kalitatif Uygulamalar

Ultraviyole ve görünür alan spektrofotometre kalitatif analizde sınırlı bir uygulamaya sahiptir. Çünkü absorbsiyon maksimum ve minimumların sayısı oldukça sınırlıdır

Bir bileşiğin spesifik tanımlanması, nadir olarak tek başına spektral temel üzerine dayanır. Sık sık, spektrum, diğer analitik verinin desteğinde tayinin bir kanıtı olarak işe yarar. Kalitatif uygulamalardaki genellikle takip edilen yaklaşım ilk olarak bağımsız kromatografi ile yapılır. Spektrum daha sonra sulu asidik, bazik ve etanolik ya da metanolik çözeltide kaydedilir. Her bir çözücü sistem için uygun piklerin dalga boyları not edilir. Cetvel haline getirilen verilerin karşılaştırılması ile test yapısına benzer absorbe olmuş özelliklerle bileşiklerin sayısı seçilir (± 2 nm dalga boyu penceresi kullanarak).

Kantitatif Uygulamalar

Absorpsiyon spektroskopisi kantitatif analiz için elverişli olan en yararlı ve en yaygın kullanılan araçlardan biridir. Spektrofotometrik ve fotometrik yöntemlerin önemli özellikleri şu hususları içerir: (1) hem organik hem de inorganik sistemlere yaygın uygulanabilirlik, (2) 10^{-4} den 10^{-5} a kadar değişen tipik duyarlılık, (3) orta-derecede seçimlilik, (4) iyi bir doğruluk, (5) veri toplama kolaylığı ve elverişliliği. Kantitatif ultraviyole/görünür alan adsorbsiyon yöntemlerinin uygulamaları çok sayıda olmakla kalmayıp, kantitatif kimyasal bilgilerin gerekli olduğu her alanla da ilgilidir.

Farmakopik uygulamalar, tek ilaçlar ve ilaçların karışımlarının tayinlerini, renk reaksiyonlarını içeren analizleri (kolorimetrik yöntemler), tablet çözünme testleri, saflık limit testlerini içerir. Ayrıca uygulamalar, enzimatik reaksiyonlardaki hız sabiti veya pKa gibi fizikokimyasal ölçümler içindir. Böyle uygulamaların alanı, yöntemlerle önemli oranda gelişmiştir. Fark spektrofotometrisi ya da türev spektrofotometrisi gibi ek yöntemlere başvurulabilir.

1.2.1.3. Türev UV Spektrofotometri

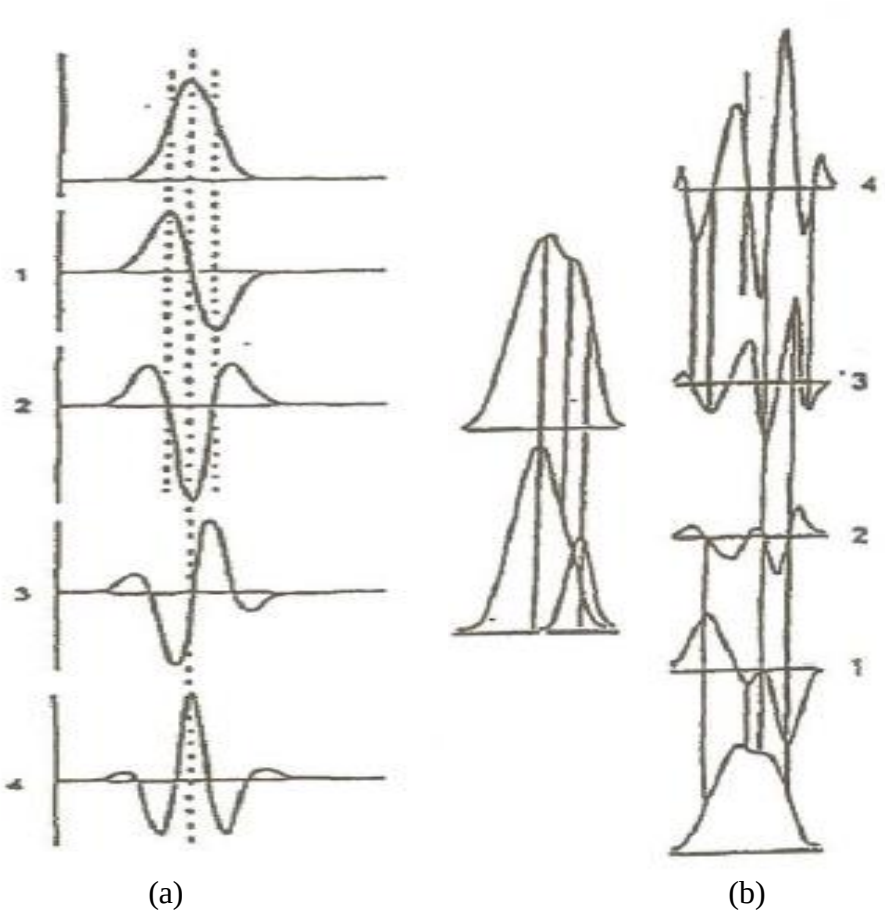
x bağımsız, y bağımlı değişken olmak üzere, bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi dx/dy'dir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda türev $dA/d\lambda$ olacaktır. Spektrumun her bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp dalga boyunun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu

elde edilir. Buna benzer şekilde 2..,3..,..n. türev spektrumları sırasıyla $d_2A/d\lambda_2$, $d_3A/d\lambda_3$, dnA/dλn değerleri ile dalga boyları arasında oluşturulabilir.

Şekil 1'de basit bir pikin 1. 2. 3. ve 4. türev spektrumları verilmiştir. Pikin birinci türevi alındığında yükselen bölgeler pozitif, inen bölgeler negatif pikler oluşturmakta, dönüm noktalarının bulunduğu dalga boylarında ekstremumlar oluşmakta, orijinal pikteki ekstremumların karşılığı olan dalga boylarında ise türev eğrisi sıfırdan geçmektedir.

Orijinal spektrumdaki bir pike karşılık n. türev spektrumunda n+1 adet pik oluşmakta, türevin derecesi arttıkça pikler keskinleşmekte ve daralmaktadır. Orjinal spektrumda absorpsiyon maksimumunun bulunduğu dalga boyunda 2. türev spektrumunda bir minimum, 4. türev spekrumunda bir maksimum ortaya çıkmakta, 1. ve 3. türev spektrumları ise bu dalga boyunda sıfırdan geçmektedir.

Türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla ayırıcılık (rezolüsyon) artmaktadır. Bundan spektral ayrıntıların aydınlatılmasında yararlanılır, bu durum da saflık testleri ve teşhiste önemlidir. Orjinal spektrumda bulunan omuzlar tek sayılı türev spektrumlarında ekstremumlara dönüşmektedir. Bu durumdan ise çakışan piklerin çözümlenmesinde yararlanılır. Şekil 1b)'de görüldüğü gibi iki maddenin absorpsiyon pikleri üst üste geldiği zaman orijinal spektrumda küçük pik omuz şeklinde görülür. Bu omuzdan tek dereceli türev spektrumlarında oluşan ekstremumlar her iki maddenin diğerinin etkisi olmaksızın nicel tayinine olanak sağlar. Bu durum eser analizlerde önemlidir (Özen, 2009).



(a) (b)

Şekil 1.1. a)Türev spektrumları **b)**örtüşen piklerin türev spektrumlarında ayrılmaları

Görüldüğü gibi Lambert-Beer yasasının geçerli olması koşuluyla türev absorbans değerleri ile derişim arasında doğrusal bir ilişki vardır. Türev spektrofotometrisi ile kantitatif analizin temelini bu eşitlik oluşturur. Direkt spetrofotometride derişim ile absorbans arasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri türev spektrofotometrisinde standart çözeltilerin derişimi (C) ile karşılık olan türev absorbans değerleri (Dn) arasında çizilir. Türev absorbans değerlerinin ölçülmesinde çeşitli teknikler uygulanmaktadır (Özen, 2009):

Tanjant Tekniği: Birbirini izleyen iki maksimum ya da iki minimuma ortak teğet çizilir. Bu teğetin aradaki ekstremuma olan uzaklığı ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik, doğrusal bir zemin olduğu zaman daha tatminkar sonuçlar verir ve zeminin spesifik olmayan etkilerinin elimine edilmesinde ya da azaltılmasında yararlıdır.

Pik-Pik Tekniği: Birbirini izleyen iki ekstremum arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik genellikle zemin absorbansının giderilmesinde, çok bileşenli karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.

Pik-Sıfır Tekniği: Peak-zero ya da zero-crossing tekniği olarak adlandırılan bu teknik pik tepesinin absise olan uzaklığının ordinata paralel olarak ölçülmesidir. Çok bileşenli karışımların analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Zemin etkisinin giderilmesinde yararı olmaz.

Pik-Pik Oranı Tekniği: Birbirine komşu iki pikin oranı alınır. Bu teknik ikili karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.

1.2.1.4. UV türev Spektrofotometrisinin Avantajları Ve Uygulamaları

Türev spektroskopisi analitik kimya ağırlıklı kalite kontrolü ile ilgili alanlar başta olmak üzere toksikoloji, biyoloji, biyokimya ve endüstriyel alanlarda önemli uygulamalara sahiptir. Aşağıdaki belirtilen avantajlara sahiptir (Özen, 2009):

Maksimum absorpsiyon dalga boyunun kesin olarak belirlenmesi: Özellikle geniş absorpsiyon bantlarının bulunduğu absorpsiyon spektrumlarında absorpsiyonun maksimum olduğu dalga boyunun kesin bir şekilde saptanmasında 1. türev spektrumu çok yararlıdır. Orijinal spektrumda λmaks'ın bulunduğu dalga boyunda 1.türev eğrisi sıfırdan geçeceği için bu dalga boyu çok daha kesin bir şekilde kolayca saptanabilir.

Rezolüsyonda artış: türev spektrumlarının ikinci avantajı da orjinal spektrumda zor görülebilen spektral ayrıntıların ortaya çıkması yani ayırıcılığın artmasıdır. Bunun için çift sayılı türev spektrumları daha avantajlıdır. Çünkü orjinal spektrumda bulunan maksimum ve minimumlar bu spektrumlarda yine aynı dalga boylarında birer ekstremum halinde ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde türev spektrumlarının alınması ile spektral ayrıntıların netleştirilmesi tanıma, saflık testleri ve eser analizde çok yararlı olmaktadır.

Teşhis: özellikle absorpsiyonu görünür bölgede olan renkli maddelerin absorpsiyon spektrumlarının geniş bantlar halinde olduğu için bu spektrumlar maddenin karakterizasyonu ve saptanmasında önem taşımaz. Buna karşın orijinal spektrumdaki omuzların türev spektrumlarında, özellikle yüksek dereceli olanlarda ekstremum haline dönüşmesi, piklerin sayısının artması ve keskinleşmesi ile spektral ayrıntılar ortaya çıkar ve infrared parmak izi spektrumlarına benzeyen spesifik spektrumlar elde edilir. Bu şekilde absorpsiyon spektrumları birbirine çok benzeyen benzer kimyasal yapıdaki bileşiklerin türev spektrumlarının alınması bunların farklandırılmasına olanak sağlar.

Saflık kontrolü: türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar maddelerin saflık testlerinde de avantaj sağlamaktadır. Eser miktardaki safsızlıklara ait küçük absorpsiyon pikleri türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür. Test edilen numune spektrumlarının, saf maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumlarıyla karşılaştırılmasıyla ham madde, ara ürün ve nihai ürünlerde saflık kontrolü yapılır.

Eser analiz: ilaç maddeleri, besinler vb. maddelerde bulunabilen eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarlarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır.

Karışımların bir arada analizi: türev spektrofotometrisinin oldukça yaygın bir kullanım alanı da absorpsiyon bantları çakışan ve bu sebeple bir ön ayırma yapmaksızın doğrudan tayin edilemeyen karışımların eş zamanlı analizidir. Bu analizlerde pik-sıfır, pik-pik ve pik-pik oranı teknikleri kullanılmaktadır. Her üç teknikte de kalibrasyon eğrileri, derişim ile bu parametrelerden biri arasında hazırlanır. Burada önemli nokta standart ve bilinmeyen çözeltilerin spektrumlarının aynı enstrümantal parametrelerle alınmasıdır.

Bulanık çözeltilerde nicel analiz: bulanık çözeltiler ve süspansiyon veya emülsiyon şeklindeki çözeltilerde spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur. Özellikle ultraviyole alanda ışın saçılması sebebiyle analitin spektrumu kuvvetli ya da zayıf bir zemin absorpsiyonu ile örtüşür. Bulanıklığın sebep olduğu geniş bantlı zemin absorpsiyonu dalga boyu ile hafif bir değişim gösterir. Türev spektrumlarındaki karakteristik pikpik mesafeleri değerlendirilerek bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi yok edilebilir.

Matriks etkisinin giderilmesi: türev spektrumları alınması ile orjinal spektrumdaki keskin spektral özellikler kuvvetlenmekte buna karşın geniş ve yaygın bantlar daha da basıklaşmaktadır. Bu özellik analit piki ile çakışan değişken zemin absorpsiyonunun düzeltilmesine ve bu şekilde matriks etkisinin giderilmesine olanak sağlar.

1.2.1.5. Spektrum Oranları Türev UV Spektrofotometri

İlk kez 1987 yılında Blanco, M. ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem 1992 yılında ise Berzas Nevado J.J. ve arkadaşları tarafından modifiye edilerek kullanılmıştır (Uyguner, 2010). Yöntemi açıklayabilmek için M ve N gibi iki etkin maddeden oluşan bir ikili karışım numunesini ele alalım. Her iki etkin maddenin de

kullanılan dalga boyu aralığında karışımlarının absorbansı, spektrumlarındaki her bir etkin maddenin absorbans değerlerinin toplamına eşittir (Toplanabilirlik kuralı) (Uyguner, 2010). Bu ifade matematiksel olarak;

$A_{m\lambda i} = \varepsilon_{M\lambda i} . C_M + \varepsilon_{N\lambda i} . C_N$ (1.4)

şeklinde ifade edilmiştir.

$A_{m\lambda i}$ = Karışımın i dalga boyundaki absorpsiyonu

$\varepsilon_{M\lambda i}$ ve $\varepsilon_{N\lambda i}$ = M ve N'nin molar absorpsiyon katsayıları

C_N ve C_M = M ve N'nin molar konsantrasyonlarıdır.

(1.3) matematiksel eşitliği M'nin standart çözeltisi absorpsiyon spektrumuna (C_M^o)'a bölünecek olursa aşağıdaki eşitlik yazılabilir:

$$\frac{A_{m\lambda i}}{\varepsilon_{M\lambda i} C_M^\circ} = \frac{C_M}{C_M^\circ} + \frac{\varepsilon_{N\lambda i} C_N}{\varepsilon_{M\lambda i} C_M^\circ} \quad (1.5)$$

Bu eşitlik basitleşirse;

$$\frac{A_{m\lambda i}}{\varepsilon_{M\lambda i}} = C_M + C_N \cdot \frac{\varepsilon_{N\lambda i}}{\varepsilon_{M\lambda i}} \quad (1.6)$$

$A_{m\lambda i} / \varepsilon_{M\lambda i}$, $\varepsilon_{N\lambda i} / \varepsilon_{M\lambda i}$'e karşı grafiğe geçirildiği takdirde doğru denklemi elde edilir. Bu y = mx + n şeklindeki ndoğru denklemindeki m eğim ifadesi C_N, ve denklemdeki n kesim noktası ise C_M ile ifade edilmiş olur.

(1.5) nolu denklemden görüldüğü gibi her bir dalga boyundaki $\varepsilon_{N\lambda i} / \varepsilon_{M\lambda i}$ oranını hesaplamak için N ve M'nin ekimolar standart çözeltilerinin absorpsiyon spektrumlarının çizdirilip her bir dalga boyu için absorbans oranlarının tek tek hesaplanması gerekmektedir. Bunun yerine M'nin varlığında N'nin tayin edilmesi için (1.4) eşitliğinin türevi alınırsa;

$$\frac{d}{d\lambda}\left(\frac{A_{m\lambda i}}{\varepsilon_{M\lambda i} C_M^\circ}\right) = \left(\frac{C_N}{C_M^\circ}\right)\frac{d}{d\lambda}\left(\frac{\varepsilon_{N\lambda i}}{\varepsilon_{M\lambda i}}\right) \quad (1.7)$$

matematiksel ifadesi elde edilir. İfade incelendiğinde türev oran spektrumu yalnızca C_N ve C_M^o değerlerine bağlı, C_M'in karışımdaki konsantrasyonuna bağlı değildir kanısına varılabilir. C_M^o sabit olarak alındığına göre karışım içindeki C_N değeri hesaplanabilir.

Yöntemin analitik amaçlı uygulanması için; N+M'den oluşmuş bir karışımda N tayin edilmek isteniyorsa, analiz edilecek saf numunenin (N) değişik bilinen konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak spektrofotometre yardımıyla spektrumları alınır ve bilgisayar hafızasına kayıt edilir. Daha sonra C_M^o konsantrasyonunda saf olarak M'nin standart çözeltisi hazırlanır ve hazırlanan C_M^o konsantrasyonundaki çözeltinin absorpsiyon spektrumu çizdirilerek bilgisayarın hafızasına kayıt edilir. Önceden kayıt edilen N'nin spektrumları tek tek C_M^o'' nin spektrumuna bölünür (oran spektrumu). Ve böylece oran spektrumu elde edilmiş olur. Elde edilen oran spektrumlarının türev spektrumları çizdirilerek belirlenen dalga boyunda oran türev absorbans değerleri okunur. Okunan oran türev absorbans değerleri C_N'e karşı grafiğe geçirilerek çalışma grafiği hazırlanır. Sonra işlem M + N karışımına uygulanıp daha önce N için hazırlanan çalışma grafiği yardımıyla karışımda N'nin miktarı tayin edilir. Karışımdaki M'nin miktarının tayini için de bu defa C_N^o'' da hazırlanan konsantrasyondaki N çözeltisi bölücü olarak kullanılmaktadır. Diğer işlemler yukarda anlatıldığı gibidir.

Eğer bölücü standardın konsantrasyonu arttırılıp azaltılırsa, elde edilecek türev absorbans değeri de buna bağlı olarak artar ya da azalır. Fakat maksimum ve minimum dalga boyları değişmez.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Amlodipin Besilat İle İlgili Çalışmalar

Prasad ve ark. (1999)'da yaptıkları çalışmada amlodipin-enalapril maleat ve amlodipin-lisinopril'in tablet formlarının ön ayırma yapılmaksızın türev spektrofotometri yöntemiyle tayinini önermişlerdir. Bunun için söz konusu maddelerin tablet formlarının 0,1 M HCl ile ekstraktları hazırlanmıştır. Amlodipin-enalapril maleat karışımı için 215-260 nm aralığında birinci türevleri alınmış olup, enalapril maleatın 0 türev absorbans gösterdiği 251 nm'de amlodipin tayin edilmiş, amlodipinin 0 absorbans gösterdiği 226,6 nm'de de enalapril maleat tayin edilmiştir. Dedeksiyon limiti amlodipin için 0,25 µg/ml, enalapril maleat için 0,38 µg/ml olarak bulunmuştur. Amlodipin-lisinopril karışımı için 210-288 nm aralığında ikinci türevleri alınmış olup, lisinoprilin 0 absorbans gösterdiği 216,6 nm'de amlodipin tayin edilmiş, amlodipinin 0 absorbans gösterdiği 219,4 nm'de de lisinopril tayin edilmiştir. Dedeksiyon limiti amlodipin için 0,08 µg/ml, lisinopril için 0,07µg/ml olarak bulunmuştur. Amlodipin-enalapril maleat karışımında amlodipin geri kazanımı %100,15 ± 0,77, enalapril maleatın geri kazanımı %100,06 ± 0,92 olarak, amlodipin-lisinopril karışımında ise amlodipin geri kazanımı % 99,71 ± 1,56, lisinoprilin geri kazanımı %99,51 ± 01,36 olarak bulunmuştur.

Rahman ve ark. (2001) ninhidrinli amlodipin besilatın farmasötik preparatlarda N, N'–dimetilformamid ile reaksiyonundan oluşan kompleks ara ürününü, oluşan kompleksin spektrofotometrik yöntemle tayinini geliştirmişlerdir. Oluşan ara ürünün 595 nmde maksimum absorbans verdiği saptanmıştır. 10- 60 µg/mL konsantrasyon aralığında lineerlik gözlenmiştir.

Ragno ve ark. (2002) amlodipinin ışıkla bozunmuş ürününün tayini için üçüncü türev spektrofotometri yöntemini önermişlerdir.Amlodipin 60 W'luk 2m uzaklıktaki kırmızı ışık altında aydınlatılmıştır. Böylece amlodipinin piridin grubunun yükseltgenmesi sağlanmıştır. Alınan orijinal spektrumda amlodipin ürünü absorpsiyon vermezken amlodipin maksimum absorpsiyon vermektedir. 3.türev spektrumlarında dalga boyu olarak 243 nmde amlodipinin bozunma ürünü 0 absorpsiyon gösterirken amlodipin yine maksimum absorbans göstermektedir. 229 nm dalga boyunda ise hem amlodipinin hemde bozunma ürünün absorbsiyon gösterdiği bulunmuştur.Yapılan deney sonucu geri kazanım değeri %95-99 arasında değişen değerler göstermiştir. Amlodipin içinde, bozunma ürünün dedeksiyon limiti %1 safsızlığa eşdeğer olarak bulunmuştur.

Basavaiah ve ark (2003) amlodipin besilat ve felodipinin ilaçlarda saf hallerinin Fe(III) ve ferrrisiyanit ile etkileşimlerinden oluşan ürünlerin spektrofotometrik olarak tayin edilebileceğini önermişlerdir. Hem amlodipin besilatın hem de felodipinin oluşturduğu indirgenmiş prusya mavisi rengindeki ürünlerin alınan spektrumlarında 760 nm de maksimum absorbans göstermiştir. Ne Fe(III) ne de ferrisiyanit çözeltisinin bu dalga boyunda absorbans vermediğini gözlemlemişlerdir. Yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini yaptıkları t ve f testleriyle göstermişlerdir.

Rahman ve ark. (2004)'de yaptıkları çalışmada farmasötik formülasyonlarda amlodipin besilatın yükseltgenmiş halinin spektrofotometrik yöntemle tayin edilebileceğini önermişlerdir. Yaptıkları çalışmada amlodipin besilatın 1,10- fenontrolin ve 2,2'-bipiridil ile ayrı ayrı şelatını oluşturarak Fe(III) ile yükseltgenmesini sağlamışlardır. Amlodipin besilatın 1,10- fenontrolin ile yapmış olduğu şelat yapısının 2-10 µg/mL derişim aralığında, 2,2'-bipiridil ile yapmış olduğu şelat yapısının ise 4-14 µg/mL derişim aralığında beer yasasına uyduğunu gözlemlemişlerdir. Bir diğer yöntemde ise amlodipin besilatın amonyum heptamolibdat tetrahidrat ile etkileşiminden oluşan ürünün 825 nm deki absorpsiyonundan yararlanarak tayinini yapmışlardır. Oluşan ürünün 15-59 µg/mL derişim aralığında lineer olduğunu bulmuşlardır. Önerilen metotların validasyonunu istatistiksel olarak ve referans yöntemle yapmışlardır. Ticari tabletlerdeki amlodipin besilatın tayini için önerdikleri yöntemlerin başarılı bir şekilde uygulandığını söylemişlerdir.

Rathee ve ark. (2010), amlodipin besilat ve lisinopril dihidrat'ın beraber bulunduğu tablet formlarının ayırma işlemine tabi tutmadan, eşzamanlı olarak tayini için türev spektrofotometri yöntemini önermişlerdir. Çözücü olarak iki kere distile edilmiş su kullanılarak. 8 µg/ml aml : 8 µg/ml lis oranında madde miktarları alınmıştır.. İkinci türev spektrofotometride amlodipin besilat tayini için 256 nm, lisinopril dihidrat tayini için 216 nm kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Çizilen grafiğe göre amlodipin besilat için r_2 değeri 0,9989, lisinopril dihidrat için ise 0,9993 olarak belirlenmiştir. Dedeksiyon limiti, amlodipin besilat için 0,229, lisinopril dihidrat için 0,248 olarak belirlenmiştir. Tayin alt sınırı amlodipin besilat için 0,694, lisinopril dihidrat için 0,751 olarak belirlenmiştir.

Kardile ve ark. (2010)'da yaptıkları çalışmada amlodipin besilat ve olmesartan medoxomil'in birlikte bulunduğu tabletlerde eş zamanlı olarak HPLC ve UV spektrofotometrik metotlarla tayinini geliştirmişlerdir. İlk metotta birinci türev spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde olmesartan medoximil'in 0 türev

absorbans değeri gösterdiği 259 nm'de amlodipin besilat, amlodipin besilatın 0 türev absorbans değeri gösterdiği 237 nm de olmesartan medoximil tayin edilmiştir. 10 dk ya bir ölçüm yapılarak heriki maddenin de kararlı olduğu bulunmuştur. Amlodipin besilat için ortalama verim %100,13 ve standart sapması 0,5164, olmesartan medoximil'in ortalama verimi %99,90 ve standart sapması 0,2569 olarak bulunmuştur. Ters faz HPLC için taşıyıcı faz olarak 0,5 M KH_2PO_4 : ACN (50 : 50 v/v), pH 6,8 ve C18 (4,16x250 mm) kolon kullanılmıştır. AML bes için 230 nm ve konsantrasyon aralığı 5 µg/ml, olme med için ise dalga boyu 260 nm ve konsantrasyon aralığı 20 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Shaalan ve Belal (2010)'da yaptıkları çalışmada amlolodipin besilat ve valsartanın kombine haldeki farmasötik tabletlerde spektroflorimetrik olarak tayinni önermişlerdir. Yapılan çalışmada amlodipin tayini için çözücü olarak damıtık su, valsartan için 0,1 M asetik asit kullanılmıştır. Amlodipin besilat ve valsartan için emisyon ve eksitasyon dalga boyları sırasıyla λ_{em} 455 nm, λ_{ek} 360 nm ve λ_{em} 378 nm, λ_{ek} 245 nm olarak seçilmiştir. Dedeksiyon limiti amlodipin besilat ve valsartan için sırayla 0,025 µg/mL ve 0,0012 µg/mL olarak saptanmıştır. Her iki ilaç etken maddesinin geri kazanım değerleri % 98,85' ten kötü bulunmamıştır.

Abdallaha ve Badawey (2011) tarafından amlodipin ve valsartanın ikili karışımının tayini için üç yöntem geliştirilmiştir. Birinci türev oran spektrofotometrisinde amlodipin tayini için seçilen 234,5 ve 247 nm dalga boylarında bölücü olarak kullanılan valsartan miktarı 30 µg/ml dir. Valsartan tayini için ise 282 ve 292 nm dalga boyları seçilmiş olup bölücü olarak kullanılan amlodipin 80 µg/ml dir. İkinci yöntem en küçük kareler yöntemiyle çizilen kalibrasyon grafiğidir. PLS yönteminde amlodipin için 40-80 µg/mL, valsartan için ise 10-30 µg/mL aralığında çalışmalar yapılmıştır.Amlodipinin tayin alt sınırı 15, valsartan için 3 ; Amlodipinin yakalama sınırı 5, valsartan için 1 olarak bulunmuştur. Çalışılan üçüncü metot ters faz HLPC dir. Taşıyıcı faz olarak ACN : KH_2PO_4 (50 : 50 v/v) tür. H_3PO_4 ile pH 3,5 yapılmıştır. Akış hızı 1.0 ml/dk, partikül büyüklüğü ise 5µm'dir. Dedektörün çalışma dalga boyu amlodipin için 238 nm, valsartan için 210 nm, kolon sıcaklığı 20-22 °C olarak saptanmıştır. Yöntemde çalışma aralıklarını amlodipin için 5.0-40.0 µg/mL ve valsartan için ise 2.5-25.0 µg/mL olarak hesaplamışlardır.

2.2. Valsartan İle ilgili Çalışmalar

Carlucci ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini 5-10 μg/mL valsartan için ve 0,5-2,0 μg/mL hidroklorotiazid için kullanılan çalışma aralıklarında YBSK yöntemi ile yapmışlardır. Bu analizde ters faz Hypersil ODS kolonu ve asetonitril-asetat tamponu (0,1 M, pH: 49) (40:60) karışımını taşıyıcı faz olarak kullanmışlardır.

Şatana ve ark. (2001) tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini 1. türev spektrofotometri ile gerçekleştirerek YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu yöntemde valsartan ve hidroklorotiazid için sırasıyla 270,6 nm ve 335 nm'deki türev absorbans değerlerini kullanmışlardır.

Cagigal ve ark. (2001), tarafından losartan, irbesartan, valsartan, kandesartan, telmisartan ve kandesartan metaboliti olan kandesartan M1 'in asit-baz denge sabitleri (pKa) spektrofluorimetrik olarak tayin edilmiştir.

Hillaert ve ark. (2002) , kandesartan, irbesartan,losartan,telmisartan,eprosartan ve valsartan gibi anjiotensin II reseptör antagonistleri için kapiller zon elektroforez yöntemiyle optimizasyon ve validasyon işlemleri yapmışlardır. Yöntemde 60 mM sodyum fosfat tamponu (pH=2) kullanmışlardır.

Gonzales ve ark. (2002), telmisartan ile birlikte losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan ve eprosartan (anjiotensin II reseptör antagonistler) ve metabolitleri için kapiller zon elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin uygulamasında optimal koşuların saptanması için kesirli faktöriyel tasarım ve merkezi bileşen tasarımı kullanılmıştır. Yöntemde uygulanmasında % 5 metanol varlığında 5 mM 'lar potasyum di hidrojen fosfat ve borik asit (25:75 h/h) (pH=5) kullanmışlardır.

Tatar ve Sağlık (2002) valsartanın farmakolojik formunun tayini için spektrofotometrik yöntemleri ve likit kromatografisi yöntemini karşılaştırmalı olarak önermişlerdir. Yaptıkları UV çalışmasında valsartanın tayini için 205,6 nm yi kullanmışlardır. Alınan ikinci türev spektrumlarında ise 221.6 ve 231,2 nm yi kullanmışlardır. Spektrofotometrik yöntemlerde çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Önerilen HPLC yönteminde C18 kolon ve hareketli faz olarak asetonitril ve fosfat tamponu kullanmışlardır. Dedektör olarak 265 nm dalga boylu UV dedektör kuulanmışlardır. Ticari kapsüllere yöntemler uygulanmış ve sonuçlar % 95 güven seviyesinde istatiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Erk N. (2002) yaptığı çalışmda valsartan ve hidroklorotiazitin farmakolojik ilaçlardaki ikili karışımlarının birinci türev spektrofotometrik yöntemle tayinini önermiştir.

Nie ve ark (2005), insan plazması ve idrarında anjiotensin II reseptör antagonistlerinin katı faz mikroektraksiyon için bir poli monolitik kapiler (metakrilik acit-etilen glikol dimetakrilat, MAA-EGDMA) kulanmışlardır. YBSK yöntemi floresans dedeksiyon ile kandesartan, losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan miktar tayinlerin uygulanmıştır. Bu bileşikleri için yakalama sınırı sırasıyla insan plazmasında ve idrarda 0.1-15.3 ng/mL and 0.1-15.2 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin uygulamasında doğrusal konsantrasyon çalışma aralığı telmisartan için 0.5-200 ng/mL, kandesartan ve irbesartan için 5-2000 ng/mL, valsartan için 10-2000 ng/mL ve losartan için 50-5000 ng/mL olarak verilmiştir.

Kadam ve Bari (2007) valsartan ve hidroklorotiazit içeren farmastik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için yeni, basit, doğru ve duyarlı yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Numune ve standartlar içerisinde bulunan etken maddelerin ayırımlarını silika jel G 60 F-254 plakaları üzerinde kloroform : etil asetat : asetik asit (5.5.0.2 h/h/h) hareketli fazı kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Dansitometrik incelemeleri 248.0 nm'de gerçekleştirmişlerdir. Yöntem için tüm validasyon parametrelreini incemişlerdir. Yöntemi etken maddeleri içeren farmasötik preparatlara başarı ile uygulamışlarır. Yöntemde korelasyon katsayıları valsartan için 0.9998 ve hidroklorotiazit için ise 0.9998 olarak hesaplanmıştır.

Tian ve ark. (2008) valsartan ve hidroklorotiazit içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin hiçbir ayırma işlemi yapılmaksızın aynı anda tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem önermişlerdir. Yöntemde metanol: asetonitril: su: izopropilalkol (22: 18: 68: 2; h/h/h/h) karışımı hareketli faz, akış hızı 1.0 ml/dk. ve 270 nm ise çalışma dalga boyu olarak saptanmıştır. Yöntemde çalışma aralıklarını valsartan için 5.0-150.0 μg/mL ve hidroklorotiazit için ise 78.0- 234.0 μg/mL olarak hesaplamışlardır.

Liu ve ark. (2008) tarafından valsartan ve hidroklorotiazit'in aynı anda insan plazmasından tayini için hızlı, spesifik yüksek performanslı kromatografik yöntem tanımlanmıştır. Tanımladıkları bu yöntemde hidroflumetazit ve irbesartanı iç standart olarak kullanmışlardır. Kromatografik ayrımı Phenomenex Kromasil C_8 kolonu kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Hareketli faz olarak su : metanol (27 : 73 h/h)

karışımı kullanmışlar ve kütle dedektörleri yardımıyla analitik değerlendirme yapmışlardır. Yöntemde çalışma aralıklarını valsartan için 1.72 – 3000.00 ng/mL ve hidroklorotiazit için ise 3.13 – 800.00 ng/mL olarak hesaplamışlardır. Bu yöntemin farmakokinetik çalışmalar içinde kullanılabilineceğinden bahsetmişlerdir.

Stolarczyk ve ark. (2008) tarafından enalapril maleat, hidroklorotiazit, kandesartan ve valsartan birlikte içeren antihipertansif etkili ilaçlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde enalapril + hidroklorotiazit, kandesartan + hidroklorotiazit karışımları için birinci türev absorbans değerlerini valsartan + hidroklorotiazit karışımı için ise ikinci türev absorbans değerlerini kullanmışlardır. Yakalama sınırlarını enalapril maleat için 2.81 µg/mL, kandesartan için0.56 µg/mL, valsartan için ise 1.78 µg/mL olarak hesaplamışlardır. Bulunan % geri kazanım değerlerinin ise %105-95 aralığında olduğu göstermektedirler.

Stolarczyk, Anna ve Krzek (2008) tarafından hidroklorotiazit ile ikili karışımlar halinde bulunan valsartan, kandesartan ve enalapril malet'ın farmasötik preparatlardan miktar tayinleri için yeni kromatografik ve dansitometrik yöntemler önerilmiştir. Kromatografik ayırımlarda TLC F-254 plakaları ve hidroklorotiazit + valsartan ve hidroklorotiazit + kandesartan karışımı için etil asetat : tetrahidrofuran : asetik asit (8:2:0.5 h/h/h) ve hidroklorotiazit + enalapril karışımı için ise butan-1-ol : buzlu asetik asit : su (12:3:5 h/h/h) hareketli fazlarını kullanmışlardır. Dansitometik ölçümler için 252 nm, 274 ve 208 nm'leri kullanmışlardır. Bu yöntemin yüksek duyarlıkta ve spesifik olduğunu tanımlamaktadırlar.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre için Shimadzu UV 1700 kullanıldı. Bu cihazda tungsten ve döteryum lambaları mevcut olup 200- 400 nm arsındaki dalga boylarında çalışıldığı için döteryum lambası kullanıldı. 0,1 nm dalga boyu aralığında çalışıldı. Dedektör olarak silisyum fotodiod dedektör kullanıldı.

Ultrasonik banyo olarak LC 30 H kullanıldı.

Santrifüj olarak MISTER 2000 marka kullanıldı

Elektronik terazi olarak 0,0001 gr hassasiyetiki ACCULAP ATILON marka terazi kullanıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.2.1. Kullanılan İlaç Standartları Ve İlaçlar

Spektrofotometrik analizler için kullanılan standart ilaç etken standart maddeleri, ilaç etken maddelerini içeren piyasadan temin edilen ilaçların ticari isimleri ve bileşimleri çizelge 3.1. de gösterilmiştir**.**

Çizelge 3.1. İlaç etken maddeleri ve ilaçlar

Etken madde	**İlaç**	**Farmasötik Şekil**	**Bileşimi (mg/tablet)**	**Firma**
Amlodipin besilat	Norvasc	Tablet	5 mg AML, TiO_2, sodyum sakarin	Pfizer
Valsartan	Cardopan	Tablet	160 mg VAL, TiO_2,	Sanovel
Amlodipin besilat-Valsartan	Exforge	Tablet	10 mg AML-160 mg VAL	Novartis

3.2.2. Kullanılan Çözücüler Ve Diğer Kimyasal Maddeler

Çözücü olarak metanol (Merck, kromatografik saflıkta) kullanılmıştır.

3.2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.3.1. Standart Çözeltiler

Amlodipin besilat

Derişimi 128 mg/L olan amlodipin besilat stok standart çözeltisi metanolde hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden belirlenen derişimlerde çözeltiler hazırlamak için

uygun miktarlarda alınarak 10 ml'lik balon jojelerde bir seri standart çözelti elde edilmiştir.

Valsartan

Derişimi 204 mg/L olan valsartan stok standart çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden belirlenen derişimlerde çözeltiler hazırlamak için uygun miktarlarda alınarak 10 ml'lik balon jojelerde bir seri standart çözelti elde edilmiştir.

3.2.3.2. Numune Çözeltiler

Tayin edilecek etken maddeyi (çizelge 3.1.) içeren tabletlerden 10 adet alınmış, hepsi birden tartılmış ve havanda iyice toz haline getirilmiştir. Bir tabletteki etken madde miktarından yola çıkarak tartımlar yapılmıştır. Tartılan miktar 100 ml'lik balonjojelere alınarak hacmi metanolle tamamlanmıştır. Ultrasonik banyoda 1,5 saat boyunca karıştırılarak tabletteki etken madde miktarlarının çözeltiye geçmesi sağlanmıştır. Çözelti, 3000 rpm'lik hızla 5 dakika santrifüjlendikten sonra süzülmüştür. Süzüntülerden belirli miktarlar alınarak, maksimum absorbansın görüldüğü dalga boyunda absorbans değerleri kaydedilmiş ve tablet içindeki etken madde miktarları hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. Tablet miktarları

Tablet numunesi parametreleri	**AMLODİPİN**	**VALSARTAN**	**AMLODİPİN BESİLAT-VALSARTAN**
10 Tablet miktarı(gr)	2,0118	5,0270	3,4726
1Tablet miktarı (gr)	0,20118	0,5027	0,34726
1 Tabletteki miktar(mg)	5	160	13,87-160 (Aml bes-Val)
hacim(ml)	100	100	100
Konsantrasyon (mg/L)	**50**	**1600**	**138,7-1600 (Aml bes-Val)**

3.3. Deneysel İşlem

3.3.1. Sadece Amlodipin İçeren İlaçlar İçin Analiz Yöntemleri

Piyasada kullanılan ve sadece amlodipin içeren tabletlerde etken madde tayini için doğrudan ultraviyole spektrofotometri ve türev ultraviyole spektrofotometri teknikleri uygulanmıştır.

3.3.1.1. Doğrudan Ultraviyole Spektrofotometri

Kalibrasyon grafikleri kullanılarak etken madde miktarının tayini

Bölüm 3.2.3.1. de hazırlanan amlodipin besilat standart stok çözeltisinden 10 mililitrelik balon jojelerde derişim aralığı 3,0 –18,0 mg/L olacak şekilde bir seri çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin UV spektrofotometrede 200,0 ile 400,0 arasındaki spektrumları alınmıştır. Değişen konsantrasyonlar için maksimum absorbsiyonun gözlendiği 360,0 nm ve 237,3 nm'lerdeki absorbans değerleri okunarak, bilgisayar yardımıyla kaydedilmiştir. Kaydedilen absorbans değerleri yukarda belirtilen dalga boyları için, derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Bölüm 3.2.3.2.'den elde edilen metanollü tablet çözeltisinden belirli derişimde alınıp 360,0 nm ve 237,3 nm dalga boyları kullanılarak absorbans değerleri okunmuştur. Bu absorbans değerlerine karşı gelen amlodipin derişimi kalibrasyon grafiklerinden bulunmuş ve tabletlerdeki amlodipin miktarı hesaplanmıştır. Numune hazırlama ve kalibrasyon eğrilerinden derişim bulma işlemi dört kez tekrarlanıp istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Standart ekleme yöntemi ile etken madde miktarının tayini

Tabletlerdeki etken maddelerin kalibrasyon grafikleri kullanılarak elde edilen sonuçlarını karşılaştırmak ve matriks etkilerini incelemek amacıyla aynı numunelerdeki etken madde miktarı standart ekleme yöntemi ile de tayin edilmiştir.

3.2.3.2.de anlatıldığı gibi hazırlanan tablet stok çözeltisinden belirli derişimde 5 adet 10 ml'lik balon jojelere alınmış ve bu tablet çözeltilerine bölüm 3.2.3.1 de anlatıldığı gibi hazırlanan amlodipin besilat standart çözeltilerinden sırayla 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 mg/L olacak şekilde ilave edilip hacimleri metanolle tamamlanmıştır. Her çözelti için 200,0-400,0 nm dalga boylarında spektrumları elde edilerek maksimum absorbansın görüldüğü 360,0 ve 237,3 nm'lerde derişim-absorbans grafiği çizilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Çizilen grafiğin x eksenini kestiği nokta yardımıyla tabletteki

amlodipin besilat miktarı hesaplanmıştır. Bu işlem dört farklı numune için dörder kez tekrarlanıp, elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

3.3.1.2. Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri

Kalibrasyon grafikleri kullanılarak etken madde miktarının tayini

Bölüm 3.2.3.1. de hazırlanan amlodipin besilat standart stok çözeltisinden derişim aralığı 3,0 –18,0 mg/L olacak şekilde bir seri çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin UV spektrofotometrede 225,0 ile 265,0 arasındaki spektrumları alınarak birinci türev spektrumları çizdirilmiştir. Çizdirilen birinci türev spektrumlarında minimum absorbsiyonun gözlendiği 246,0 nm'deki birinci türev absorbans (dA/dλ) değerleri okunarak, bilgisayar yardımıyla kaydedilmiştir. Kaydedilen türev absorbans değerleri yukarda belirtilen dalga boyu için, her bir derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. 3.2.3.2.'den elde edilen metanollü tablet çözeltisinden belirli derişimde alınarak birinci türev spektrumları çizdirilmiştir. Çizdirilen birinci türev spektrumlarının 246,0 nm dalga boyu kullanılarak birinci türev absorbans (dA/dλ) değeri okunmuştur. Bu absorbans değerine karşı gelen amlodipin derişimi kalibrasyon eğrisi verilerinden bulunmuş ve tabletlerdeki amlodipin miktarı hesaplanmıştır. Numune hazırlama ve kalibrasyon eğrilerinden derişim bulma işlemi dört kez tekrarlanıp elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Standart ekleme metodu ile tayin

Tabletlerdeki etken maddelerin kalibrasyon grafikleri kullanılarak elde edilen sonuçlarını karşılaştırmak ve matriks etkilerini incelemek amacıyla aynı numunelerdeki etken madde miktarı standart ekleme yöntemi ile de tayin edilmiştir.

Bölüm 3.3.1.1.2. de anlatıldığı gibi hazırlanan standart ilaveli tablet çözeltilerinin UV spektrumlarının birinci türev spektrumları çizdirilmiştir. 246,0 nm'deki birinci türev absorbans (dA/dλ) değeri okunmuştur. Okunan türev absorbans değeri her bir derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Çizilen grafiğin x eksenini kestiği nokta yardımıyla tabletteki amlodipin besilat miktarı hesaplanmıştır. Bu işlem dört farklı numune için dörder kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

3.3.2. Sadece valsartan içeren ilaçlar için analiz yöntemleri

Piyasada kullanılan ve sadece valsartan içeren tabletlerde etken madde tayini için doğrudan ultraviyole spektrofotometri ve birinci türev ultraviyole spektrofotometri teknikleri uygulanmıştır.

3.3.2.1. Doğrudan Ultraviyole Spektrofotometri

Kalibrasyon grafikleri kullanılarak etken madde miktarının tayini

Bölüm 3.2.3.1. de hazırlanan valsartan standart stok çözeltisinden 10 mililitrelik balon jojelerde derişim aralığı 10,0-60,0 mg/L olacak şekilde bir seri çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin UV spektrofotometrede 220,0 ile 300,0 nm arasındaki spektrumları alınmıştır. Değişen derişimler için maksimum absorbsiyonun gözlendiği 249,0 nm'deki absorbans değerleri okunarak, bilgisayar yardımıyla kaydedilmiştir. Kaydedilen absorbans değerleri yukarda belirtilen dalga boyu için, derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Bölüm 3.2.3.2.'den elde edilen metanollü tablet çözeltisinden belirli derişimde alınıp 249,0 nm dalga boyu kullanılarak absorbans değeri okunmuştur. Bu absorbans değerine karşı gelen valsartan derişimi çizilen kalibrasyon grafiğinden bulunmuş ve tabletlerdeki valsartan miktarı hesaplanmıştır. Numune hazırlama ve kalibrasyon eğrilerinden derişim bulma işlemi dört kez tekrarlanıp elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Standart ekleme yöntemi ile etken madde miktarının tayini

Tabletlerdeki etken maddelerin kalibrasyon grafikleri kullanılarak elde edilen sonuçlarını karşılaştırmak ve matriks etkilerini incelemek amacıyla aynı numunelerdeki etken madde miktarı standart ekleme yöntemi ile de tayin edilmiştir.

Bölüm 3.2.3.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanan tablet stok çözeltisinden belirli derişimde 5 adet 10 ml'lik balon jojelere alınmış ve bu tablet çözeltilerine bölüm 3.2.3.1 de anlatıldığı gibi hazırlanan valsartan standart çözeltilerinden sırayla 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L olacak şekilde ilave edilip hacimleri metanolle tamamlanmıştır. Her çözelti için 200,0-400,0 nm arasındaki dalga boylarında spektrumlar elde edilerek maksimum absorbansın görüldüğü 249,0 nm'de derişim-absorbans grafiği çizilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2

değeri elde edilmiştir. Çizilen grafiğin x eksenini kestiği nokta yardımıyla tabletteki valsartan miktarı hesaplanmıştır. Bu işlem dört farklı numune için dörder kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

3.3.2.2. Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri

Kalibrasyon grafikleri kullanılarak etken madde miktarının tayini

Bölüm 3.2.3.1. de hazırlanan valsartan standart stok çözeltisinden derişim aralığı 10,0 –60,0 mg/L olacak şekilde bir seri çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin UV spektrofotometrede 220,0 ile 300,0 arasındaki spektrumları alınarak birinci türev spktrumları çizdirilmiştir. Çizdirilen birinci türev spektrumlarında minimum absorbsiyonlarınun gözlendiği 234,2 ve 263,0 nm'deki birinci türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri okunarak, bilgisayar yardımıyla kaydedilmiştir. Kaydedilen türev absorbans değerleri yukarda belirtilen dalga boyları için, her bir derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Bölüm 3.2.3.2.'den elde edilen metanollü tablet çözeltisinden belirli derişimde alınıp birinci türev spektrumlarının 234,2 ve 263,0 nm dalga boyları kullanılarak türev absorbans değeri ($dA/d\lambda$) okunmuştur. Bu absorbans değerine karşı gelen valsartan derişimi kalibrasyon grafiğinden bulunmuş ve tabletlerdeki valsartan miktarı hesaplanmıştır. Numune hazırlama ve kalibrasyon eğrilerinden derişim bulma işlemi dört kez tekrarlanıp elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Standart ekleme metodu ile etken madde miktarının tayini

Tabletlerdeki etken maddelerin kalibrasyon grafikleri kullanılarak elde edilen sonuçlarını karşılaştırmak ve matriks etkilerini incelemek amacıyla aynı numunelerdeki etken madde miktarı standart ekleme yöntemi ile de tayin edilmiştir.

Bölüm 3.3.2.1.2. de anlatıldığı gibi hazırlanan standart ilaveli tablet çözeltilerinin UV spektrumlarının birinci türev spektrumları çizdirilmiştir. 234,2 ve 263,0 nm'lerdeki birinci türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri okunmuştur. Okunan türev absorbans değerleri her bir derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Çizilen grafiğin x eksenini kestiği nokta yardımıyla tabletteki valsartan miktarı

hesaplanmıştır. Bu işlem dört farklı numune için dörder kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

3.3.3. Amlodipin Besilat Ve Valsartan İçeren İlaçlar İçin Analiz Yöntemleri

Piyasada kullanılan, amlodipin ve valsartanı birlikte içeren tabletlerde her bir etken maddenin tayini için birinci türev ultraviyole spektrofotometri ve spektrum oranı birinci türev ultraviyole spektrofotometri teknikleri uygulanmıştır.

3.3.3.1. Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri

Çalışma grafiklerinin hazırlanması

Amlodipin besilat ve valsartan için uygun çözücü olarak seçilen metanol kullanılarak hazırlanan stok çözeltilerden hareketle değişik konsantrasyonlarda ayrı ayrı amlodipin besilat ve valsartan içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin 200,0 – 300,0 nm arasındaki UV spektrumları çizdirilerek bilgisayarın hafızasına kaydedilmiştir. Daha sonra kaydedilen her bir standart madde spektrumlarının ayrı ayrı birinci türev eğrileri çizdirilmiş ve bu eğriler üst üste çizdirilmiştir.

Amlodipin besilatın miktar tayini yapılması için, 243,6 ve 248,8 nm'lerde valsartan'ın türev absorbansının " 0 " olduğu ve amlodipin besilat'ın bir türev absorbans değerine (dA/dλ) sahip olduğu görülmüştür. Saptanan bu dalga boylarında sadece amlodipin besilat'ın türev absorbansının bulunduğu anlaşılmıştır. Yukarda belirtilen dalga boylarında amlodipin besilat'ın türev absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Elde edilen birinci türev absorbans ve bilinen derişim değerleri kullanılarak en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur.Valsartan'ın miktar tayini yapılması için, 237,2 ve 289,0 nm'lerde amlodipin besilat'ın türev absorbansının " 0" olduğu ve valsartan'ın bir türev absorbans değerine sahip olduğu görülmüştür. Saptanan bu dalga boylarında sadece valsartan'ın türev absorbansının bulunduğu anlaşılmıştır. Yukarda belirtilen dalga boylarında valsartan'ın türev absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Elde edilen birinci türev absorbans ve bilinen derişim değerleri kullanılarak en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur.

Amlodipin besilat ve valsartan içeren tabletlerden bölüm 3.2.3.2.'ye göre hazırlanan numune çözeltilerinin birinci türev spektrumları elde edilmiş, amlodipin

besilat için 243,6 nm'deki ve valsartan için ise 289,0 nm'deki türev absorbans değerleri kaydedilmiştir. Kaydedilen bu değerler çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen doğru denklemlerinde absorbans değerleri yerine konularak, her bir tabletteki amlodipin besilat ve valsartan miktarları hesaplanmıştır.

Numune hazırlama ve çalışma eğrilerinden derişim bulma işlemi her bir etken madde tayini için dört kez tekrarlanmış elde edilen souçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Geri kazanım çalışmaları

Laboratuvar şartlarında yöntemin uygulanabilmesi için amlodipin besilat ve valsartan etken maddelerinden hazırlanan stok çözeltilerden hareketle iki farklı seri hazırlanmıştır. Bu hazırlanan serilerden birinde sabit miktarda amlodipin besilat üzerine değişen miktarlarda doğrusal derişim aralığında olacak şekilde valsartan ilave edilmiştir. Amlodipin besilat'ın % geri kazanımı için hazırlanan bu sentetik karışımların UV spektrumları alınıp bilgisayar yardımıyla birinci türev spektrumları çizdirilmiştir. Çizdirilen bu spektrumların 243,6 ve 248,8 nm dalga boylarındaki türev absorbans değerleri, amlodipin besilat için çizdirilmiş kalibrasyon grafiğinde elde edilen doğru denkleminde yerine konularak amlodipin besilat'ın derişimi ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Hazırlanan diğer seride ise sabit miktarda valsartan üzerine değişen miktarlarda doğrusal derişim aralığında olacak şekilde amlodipin besilat ilave edilerek sentetik karışımlar hazırlanmıştır. Valsartan'ın % geri kazanımı için hazırlanan bu sentetik karışımların UV spektrumları alınıp bilgisayar yardımıyla birinci türev spektrumları çizdirilmiştir. Çizdirilen bu spektrumların 237,2 ve 289,0 nm dalga boylarındaki türev absorbans değerleri ($dA/d\lambda$) valsartan için çizdirilmiş kalibrasyon grafiğinde elde edilen doğru denkleminde yerine konularak valsartan'ın derişimi ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Numune hazırlama ve çalışma eğrilerinden derişim bulma işlemi her bir etken madde tayini için dört kez tekrarlanıp elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Standart ekleme yöntemi ile tayin

Tabletlerdeki etken maddelerin kalibrasyon grafikleri kullanılarak elde edilen sonuçlarını karşılaştırmak ve matriks etkilerini incelemek amacıyla aynı numunelerdeki etken madde miktarı standart ekleme yöntemi ile de tayin edilmiştir.

Amlodipin besilat tayini için 13,87 mg amlodipin besilat ve 160 mg valsartan içeren tabletten hazırlanan stok çözeltiden beş tane 10 ml'lik balonjojelere amlodipin besilat derişimi 4,0 mg/L olacak şekilde alınmıştır. Balonjojelere sırasıyla 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 mg/L hazırlanmış amlodipin besilat standart stok çözeltiden ilave edilip balonjojelerin üzeri 10 ml'ye tamamlanmıştır. Valsartan tayini için ise 13,87 mg amlodipin bezilat ve 160 mg valsartan içeren tabletten hazırlanan stok çözeltiden beş tane 10 ml'lik balonjojelere konsantrasyonu valsartan 20 mg/L olacak şekilde alınmıştır. Balonjojelere sırasıyla 0,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg/L valsartan standart stok çözeltiden ilave edilip balonjojelerin üzeri 10 ml'ye tamamlanmıştır. Amlodipin besilat ve valsartan için hazırlanan çözeltilerin UV spektrumları alınıp kaydedilmiştir. Kaydedilen UV spektrumlarının türev spektrumları çizdirilmiştir. Amlodipin besilat için 243,6 ve 248,8 nm'lerdeki birinci türev absorbans (dA/dλ) değerleri okunmuştur. Okunan türev absorbans değerleri her bir derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Çizilen grafiğin x eksenini kestiği nokta yardımıyla tabletteki amlodipin besilat miktarı hesaplanmıştır. Valsartan için 237,2 ve 289,0 nm'lerdeki birinci türev absorbans (dA/dλ) değerleri okunmuştur. Okunan türev absorbans değerleri her bir derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri elde edilmiştir. Çizilen grafiğin x eksenini kestiği nokta yardımıyla tabletteki valsartan miktarı hesaplanmıştır. Bu işlem dört farklı numune için dörder kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

3.3.3.2. Spektrum Oranları Birinci Türev Ultraviyole Spektrofotometri

Çalışma grafiklerinin hazırlanması

Bölüm 3.2.3.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan standart çözeltilerinin 200,0 - 400,0 nm arasındaki UV spektrumları çizdirilerek bilgisayarın hafızasına kaydedilmiştir. Amlodipin besilatın miktar tayini yapılması için, her bir derişimdeki kalibrasyon çözeltisinin UV spektrumu, valsartanın her bir derişimdeki kalibrasyon çözeltisinin UV spektrumuna bilgisayar yardımıyla oranlanmış ve daha sonra birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Elde edilen eğriden 342,4 – 348,0 nm arası alınmış, 344,4 nm'de elde edilen türev absorbans değerleri (dA/dλ) derişime karşı grafiğe geçirilerek çalışma grafiği elde edilmiştir. Elde edilen birinci türev absorbans ve bilinen derişim değerleri kullanılarak en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi ve r^2

değeri bulunmuştur. Valsartan'ın miktar tayini yapılması için, her bir derişimdeki kalibrasyon çözeltisinin UV spektrumu, amlodipin besilat'ın her bir derişimdeki kalibrasyon çözeltisinin UV spektrumuna bilgisayar yardımıyla oranlanmış ve daha sonra birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Elde edilen eğriden 220,0 – 240,0 nm arası alınmış, 231,3 nm'de elde edilen türev absorbans değerleri (dA/dλ) derişime karşı grafiğe geçirilerek çalışma grafiği elde edilmiştir. Elde edilen birinci türev absorbans ve bilinen derişim değerleri kullanılarak en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi ve r^2 değeri bulunmuştur.

Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlerden bölüm 3.2.3.2.'ye göre hazırlanan numune çözeltilerinin UV spektrumları elde edilmiş olup bu spektrumlar, amlodipin besilatın miktar tayini yapılması için, hazırlanan valsartan kalibrasyon çözeltilerine her bir derişim için bilgisayar yardımıyla tek tek oranlanıp birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Elde edilen spektrum oranları birinci türev eğrilerinde 344,4 nm'deki türev absorbans değerleri (dA/dλ) kaydedilmiştir. Kaydedilen bu değerler çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen doğru denklemlerinde absorbans değerleri yerine konularak, her bir tabletteki amlodipin besilat miktarı hesaplanmıştır.

Valsartan'ın miktar tayini yapılması için, bölüm 3.2.3.2.'ye göre hazırlanan numune çözeltilerinin UV spektrumları, hazırlanan amlodipin besilat kalibrasyon çözeltilerine her bir derişim için bilgisayar yardımıyla tek tek oranlanıp birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Elde edilen spektrum oranları birinci türev eğrilerinde 231,3 nm'deki türev absorbans değerleri (dA/dλ) kaydedilmiştir. Kaydedilen bu değerler çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen doğru denklemlerinde absorbans değerleri yerine konularak, her bir tabletteki valsartan miktarı hesaplanmıştır.

Numune hazırlama ve çalışma eğrilerinden derişim bulma işlemi her bir etken madde tayini için dört kez tekrarlanıp elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Geri kazanım çalışmaları

Laboratuvar şartlarında yöntemin uygulanabilmesi için amlodipin besilat ve valsartan etken maddelerinden hazırlanan stok çözeltilerden hareketle iki farklı seri hazırlanmıştır. Bu hazırlanan serilerden birinde sabit miktarda amlodipin besilat üzerine değişen miktarlarda doğrusal konsantrasyon aralığında olacak şekilde valsartan ilave edilmiştir. Hazırlanan diğer seride ise sabit miktarda valsartan üzerine değişen

miktarlarda doğrusal konsantrasyon aralığında olacak şekilde amlodipin besilat ilave edilerek sentetik karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan sentetik karışımların UV spektrumları alınmıştır.

Eğer amlodipin besilat'ın % geri kazanımı hesaplanacaksa amlodipin besilat derişiminin sabit olduğu fakat valsartan derişiminin değiştiği sentetik karışımların UV spektrumları, valsartanın her bir derişimdeki standart kalibrasyon çözeltilerinin UV spektrumlarına bilgisayar yardımıyla oranlanmıştır. Daha sonra bu spektrum oranlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Amlodipin besilat için çizdirilmiş spektrum oranları birinci türev eğrileri çalışma grafiğinde elde edilen doğru denklemi yardımıyla 344,4 nm dalga boyundaki amlodipin besilat'ın % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Eğer valsartanın % geri kazanımı hesaplanacaksa valsartan konsantrasyonunun sabit olduğu fakat amlodipin besilat konsantrasyonunun değiştiği sentetik karışımların UV spektrumları amlodipin besilatın standart kalibrasyon çözeltilerinin UV spektrumlarına bilgisayar yardımıyla oranlanmıştır. Daha sonra bu spektrum oranlarının birinci türev spektrumları çizdirilmiştir. Valsartan için çizdirilmiş spektrum oranları birinci türev spektrumları çalışma grafiğinde elde edilen doğru denklemi yardımıyla 231,3 nm dalga boyundaki valsartanın % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Numune hazırlama ve çalışma eğrilerinden derişim bulma işlemi her bir etken madde tayini için dört kez tekrarlanıp elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

Standart ekleme metodu ile tayin

Tabletlerdeki etken maddelerin kalibrasyon grafikleri kullanılarak elde edilen sonuçlarını karşılaştırmak ve matriks etkilerini incelemek amacıyla aynı numunelerdeki etken madde miktarı standart ekleme yöntemi ile de tayin edilmiştir.

Amlodipin besilat tayini için 13,87 mg amlodipin besilat ve 160 mg valsartan içeren tabletten hazırlanan stok çözeltiden beş tane 10 ml'lik balonjojelere amlodipin besilat derişimi 4,0 mg/L olacak şekilde alınmıştır. Balon jojelere sırasıyla 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 mg/L olacak şekilde hazırlanmış amlodipin besilat standart stok çözeltisinden ilave edilip balon jojelerin üzeri 10 ml'ye tamamlanmıştır. Valsartan tayini için ise 13,87 mg amlodipin besilat ve 160 mg valsartan içeren tabletten hazırlanan stok çözeltiden beş tane 10 ml'lik balonjojelere konsantrasyonu valsartan 20 mg/L olacak şekilde alınmıştır. Balonjojelere sırasıyla 0,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg/L valsartan standart stok çözeltisinden ilave edilip balonjojelerin üzeri 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Amlodipin besilat ve valsartan için hazırlanan çözeltilerin UV spektrumları alınıp kaydedilmiştir. Amlodipin besilatın miktar tayini yapılması için, hazırlanan her bir amlodipin besilat çözeltisinin UV spektrumu, bölüm 3.2.3.1.' de anlatıldığı gibi hazırlanan valsartanın herbir kalibrasyon çözeltisinin UV spektrumuna bilgisayar yardımıyla oranlanmıştır. Elde edilen spektrum oranlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiş olup 344,4 nm'deki türev absorbans değerleri (dA/dλ) kaydedilmiştir. Kaydedilen bu değerler çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen doğru denklemlerinde türev absorbans değerleri yerine konularak, her bir tabletteki amlodipin besilat miktarı hesaplanmıştır.

Valsartanın miktar tayini yapılması için, hazırlanan her bir valsartan çözeltisinin UV spektrumu, bölüm 3.2.3.1.' de anlatıldığı gibi hazırlanan amlodipin besilatın her bir kalibrasyon çözeltisinin UV spektrumuna bilgisayar yardımıyla oranlanmıştır. Elde edilen spektrum oranlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiş olup 231,3 nm'deki türev absorbans değerleri (dA/dλ) kaydedilmiştir. Kaydedilen bu değerler çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen doğru denklemlerinde türev absorbans değerleri yerine konularak, her bir tabletteki valsartan miktarı hesaplanmıştır.

Bu işlem dört farklı numune için dörder kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.

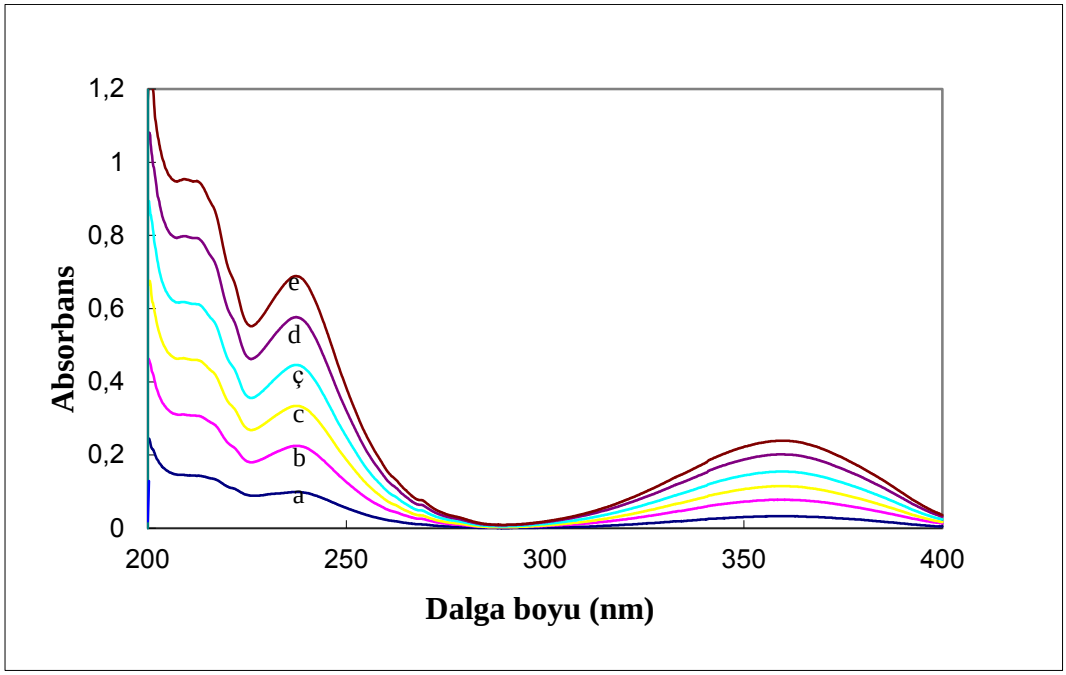
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Amlodipin İçeren İlaçlar İçin Analiz Sonuçları

4.1.1. Doğrudan Uv Spektrofotometri

4.1.1.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları

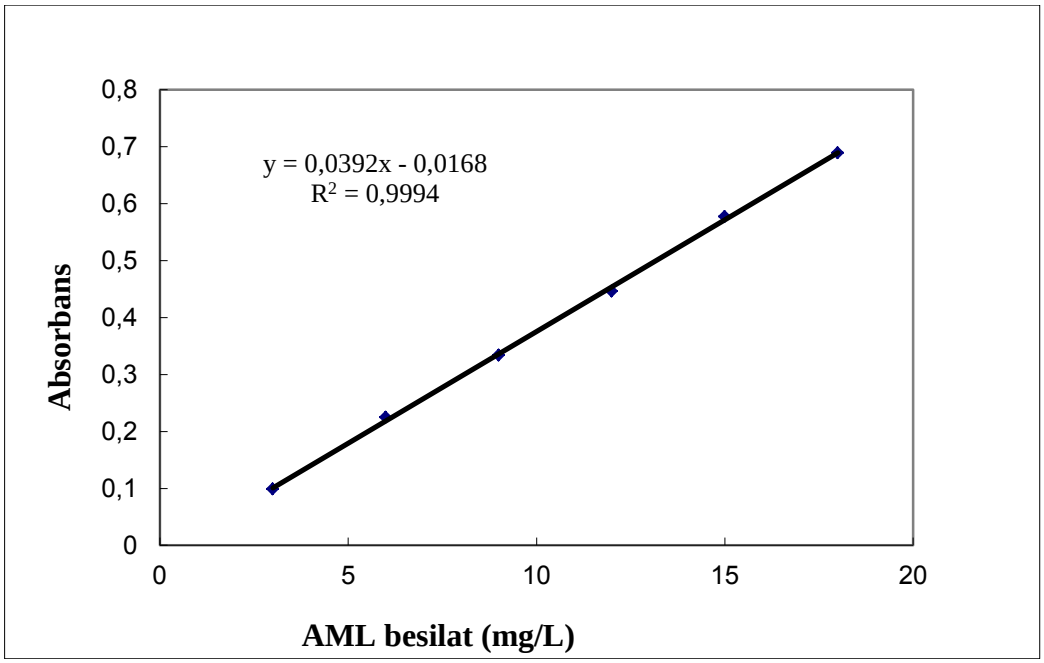
Şekil 4.1.'de amlodipin besilat'ın metanoldaki değişen konsantrasyonlarına ait UV spektrumları gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde a) 3 mg/L; b) 6 mg/L; c) 9 mg/L; d) 12 mg/L; e) 15 mg/L; f) 18 mg/L'lik çözeltilerine ait doğrudan UV spektrumları

Uv spektrumlarındaki maksimum absorbansın olduğu 237,3 nm'deki absorbans değerlerinin değişen derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Yöntem etken madde olan amlodipin besilat'ı içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar dalga boyu 237,3 nm için çizelge 4.1. ve 360,0 nm için çizelge 4.2.'de verilmiştir. Çizelgelerde "alınan" ile kastedilen ilaç preparatlarındaki bilgilere dayanarak hesaplanan amlodipin besilat etken madde miktarıdır. Çizelgelerden görüleceği gibi doğrudan kalibrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği oldukça iyidir.



Şekil 4.2. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ= 237,3 nm' de doğrudan UV kalibrasyon grafiği

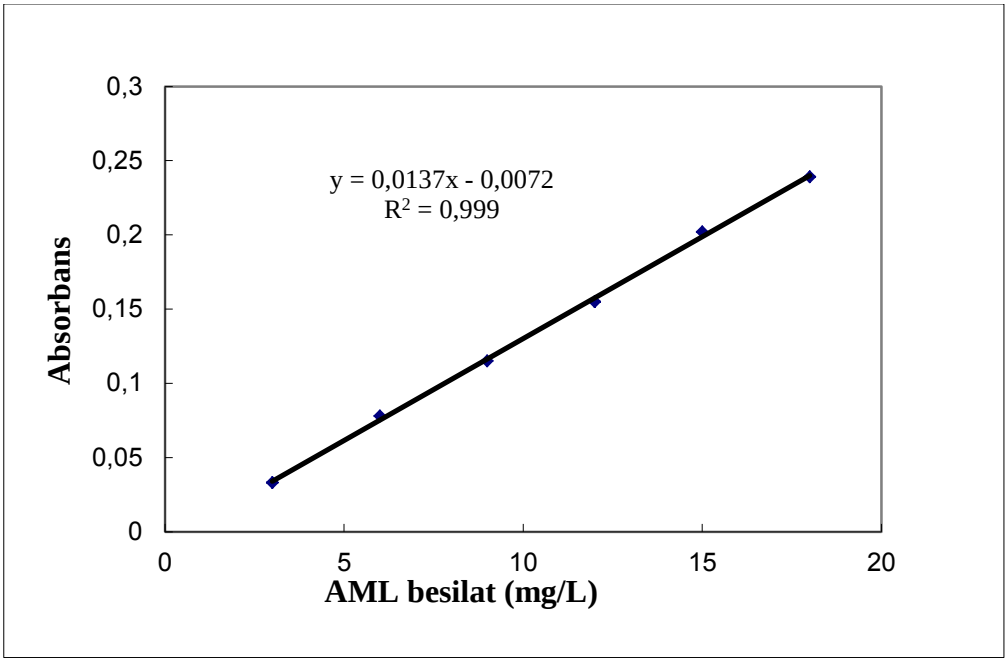
Çizelge 4.1. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi. (237,3 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	6,935	6,881	99,2
2	6,935	6,831	98,5
3	13,870	14,09	101,6
4	6,935	6,984	100,7
5	6,935	6,716	96,8
6	13,870	14,083	101,5
7	13,870	13,566	97,8
8	13,870	13,989	100,8

Deney Sayısı, N = 8
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 99,6
Standart Sapma, s = 1,8

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,8
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 99,6 ± 1,5
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 6,0

Uv spektrumlarındaki maksimum absorbansın olduğu 360,0 nm'deki absorbans değerlerinin değişen derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ= 360,0 nm' de doğrudan UV kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi. (360,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/L	Geri Kazanım, %
1	4,161	4,094	98,4
2	8,322	8,384	100,8
3	6,935	6,875	99,1
4	6,935	6,729	97,0
5	13,870	13,722	98,9
6	13,870	14,000	100,9
7	13,870	13,814	99,6
8	13,870	13,629	98,3

Deney Sayısı, N = 8

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 99,1

Standart Sapma, s = 1,3

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,3

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 99,1 ± 1,1

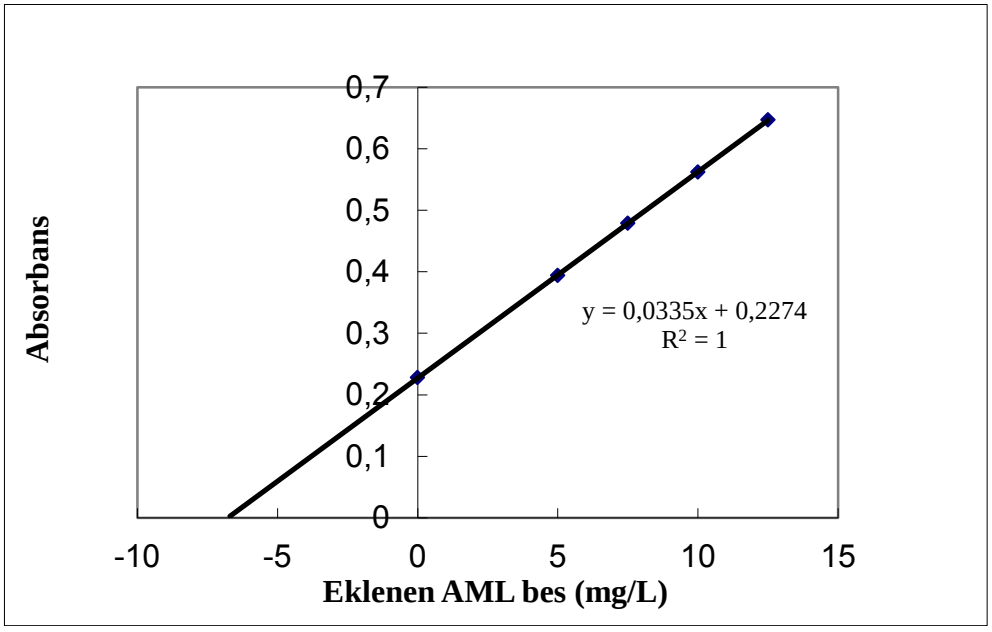
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 4,4

4.1.1.1. Standart Ekleme Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları

Numunelerin analize hazırlanması sırasında oluşabilecek matriks etkilerinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla amlodipin besilat miktar tayini standart ekleme

yöntemiyle de yapılmıştır. Bu amaçla bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı gibi numunenin metanolde çözeltisine yine metanolde hazırlanmış standartlar katılarak elde edilen çözeltilerin spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlardan yararlanarak eklenen standart derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak numune derişimleri bulunmuştur.

Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafikler şekil 4.4. ve şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Doğrudan UV standart ilave yöntemi ile tablette amlodipin besilat tayini için elde edilen eğri. (λ = 237,3 nm)

Yöntem etken madde olan amlodipin besilat'ı içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.3. ve çizelge 4.4.'de verilmiştir.

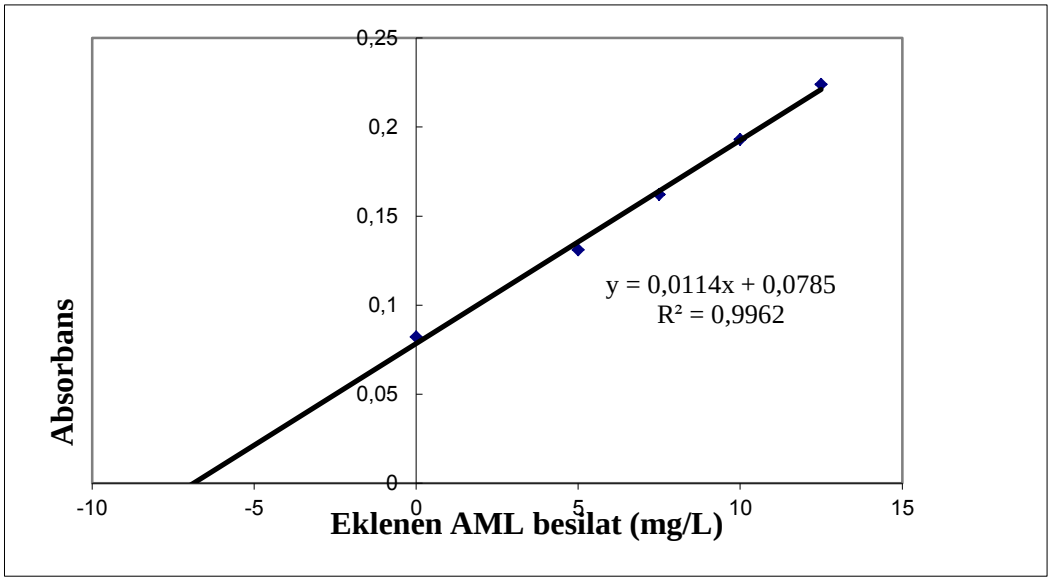
Çizelge 4.3. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (237,3 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	6,935	6,788	97,9
2	10,000	9,585	95,8
3	10,000	9,758	97,5
4	6,935	6,800	98,0

Deney Sayısı, N = 4

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 97,3
Standart Sapma, s = 1,0

Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 1,0
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 97,3 ± 1,6
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 4,6



Şekil 4.5. Doğrudan UV standart ilave yöntemi ile tablette amlodipin besilat tayini için elde edilen eğri. (λ = 360,0 nm)

Çizelge 4.4. Tabletlerde amlodipin besilat için doğrudan UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (360,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	6,935	6,880	99,0
2	6,935	7,073	102,0
3	6,935	6,927	99,9
4	6,935	6,847	98,5

Deney Sayısı, N = 4
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 99,8
Standart Sapma, s = 1,5

Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 1,5
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 99,8± 2,4
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 6,9

Bu sonuçlar kullanılarak doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri karşılaştırıldı. Şekil 4.2. ile şekil 4.4. (237,3 nm) ve şekil 4.3. ile şekil 4.5. (360,0 nm) karılaştırıldığında doğruların eğimlerinin birbirine yakın olması bize tabletlerde bulunan katkı maddelerinin yöntem üzerinde bozucu etki yapmadığını göstermektedir.

Doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme yöntemlerinin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırılmış ve F testi uygulanmıştır: Buna göre varyans oranları sonucu hesaplanan değer, F_{kritik}* çizelgesinden bulunan değer ile karşılaştırılır. Eğer hesaplanan F değeri, F_{kritik} değerinden küçükse %95 güven seviyesinde söz konusu iki yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucu elde edilen varyansların kesinliğinde anlamlı bir fark olmadığı kanısına varılabilir.

$$F = \frac{s_1^{\,2}}{s_2^{\,2}} \quad , \ (s_1 > s_2) \qquad (4.1)$$

s_1 = büyük olan standart sapma

s_2 = küçük olan standart sapma

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için uygulanırsa, F değeri;

$F = \frac{s_1^{\,2}}{s_2^{\,2}} = \frac{1{,}5^2}{1{,}3^2} = 1{,}33$ olarak bulunur (s_1, standart ilave tekniğinin standart sapması; s_2, kalibrasyon çizme tekniğinin standart sapması).

Kalibrasyon çizme tekniğinde 8 ölçüm yapıldığı için serbbestlik derecesi, $v_2 = 7$, standart tekniğinde ise 4 ölçüm yapıldığı için serbestlik derecesi $v_1 = 3$'tür. F kritik değer $F_{3,7} = 4{,}35$ olarak bulunmuştur. Hesapladığımız F değeri F kritik değerinden küçük olduğu için ($1{,}33 < 4{,}35$) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır.Buna göre her iki yöntem için biriktirilmiş standart sapma değeri kullanılmıştır.

---

* F_{kritik} çizelgesinden değer (Fv_1v_2) bulma ; v_1 paydakinin serbestlik derecesini,v_2 paydadakinin serbestlik derecesini göstermek üzere Fkritik çizelgesinde v_1 satırı, v_2 sütunu ifade eder.

$$s_{biriktirilmiş} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}(x_i - \bar{x}_1)^2 + \sum_{j=1}(x_j - \bar{x}_2)^2 + \sum_{k=1}(x_k - \bar{x}_3)^2 + \ldots}{N_1 + N_2 - N_3 + \ldots - N_t}} \quad (4.2)$$

Null hipotezine göre iki ortalama değer arasındaki mutlak fark , $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$, aşağıda verilen eşitlikten (eşitlik 4.3) küçükse iki teknik arasında % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur kanısına varılabilir.

$$t.\, s_{biriktirilmiş} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}} \quad (4.3)$$

Kalibrasyon çizme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 99,1 standart ekleme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 99,8' dir. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2$ -2 olup, 8 + 4 – 2 =10'dur. %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 10 için bulunan t değeri 2,23'tür.

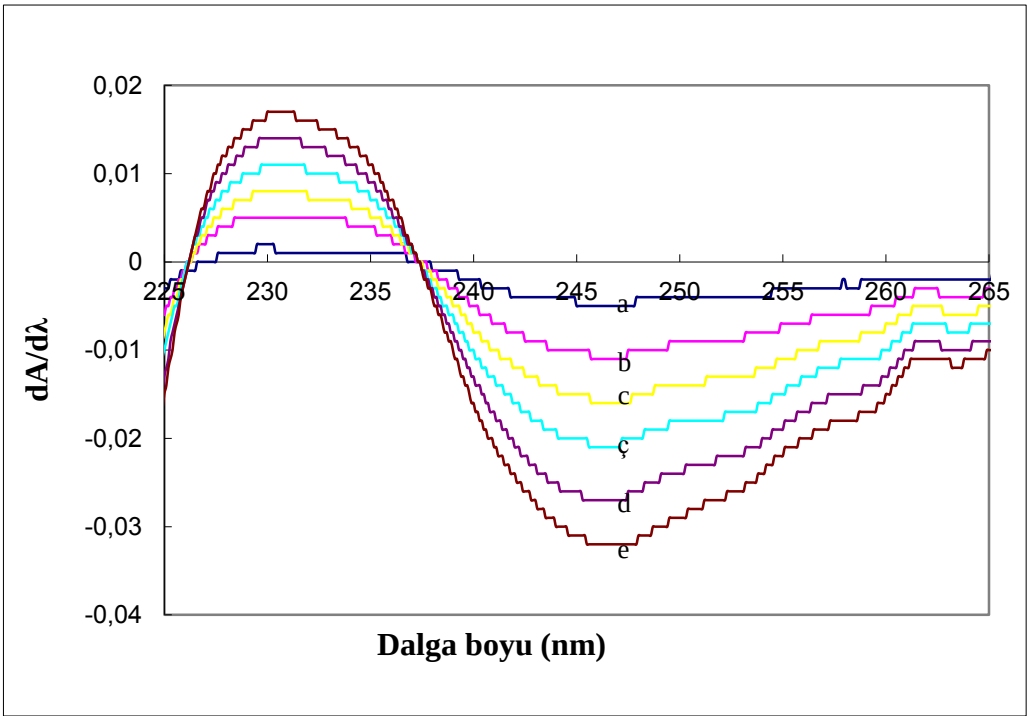
Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 1,38 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2{,}23.1{,}38\sqrt{\frac{8+4}{8.4}}$ = 1,89 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right| = \left|99{,}1 - 99{,}8\right|$ = 0,7 olarak bulunur. $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = 0,7 < $t.s_{biriktirilmiş}$ $\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$ = 1,89 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

4.1.2. Birinci Türev Spektrofotometri

Birinci türev UV spektrofotometri ile amlodipin besilat içeren farmasötik preparatlardan etken maddenin miktar tayini için doğrudan UV spektrofotometrik yöntem sonucunda elde edilen orijinal spektrumların bilgisayar ortamında birinci türev eğrileri çizdirilmiştir.

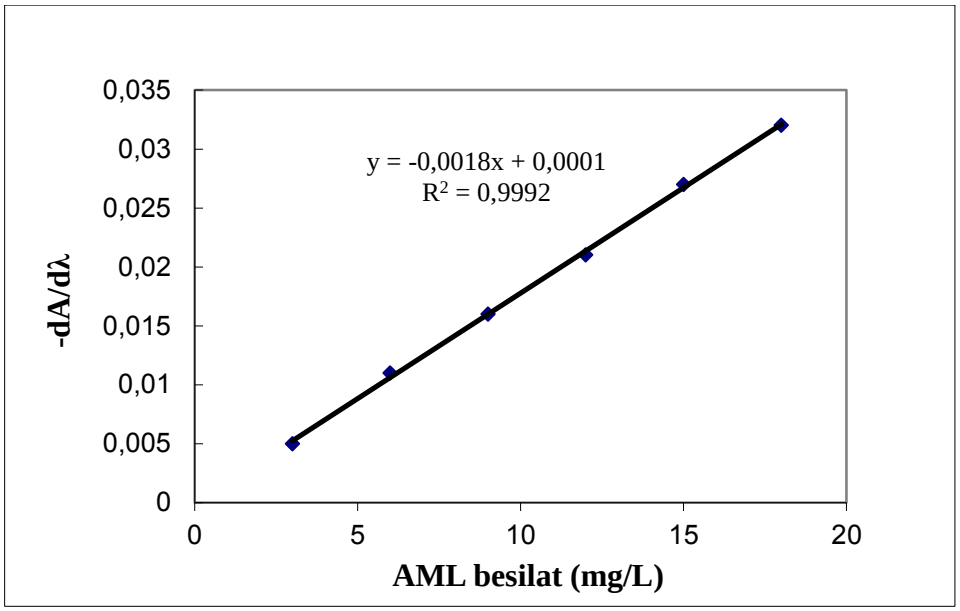
4.1.2.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları

Amlodipin besilat'ın giderek artan farklı derişimlerdeki birinci türev UV spektrumları şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde a) 3 mg/L; b) 6 mg/L; c) 9 mg/L; d) 12 mg/L; e) 15 mg/L; f) 18 mg/L'lik çözeltilerine ait birinci türev UV spektrumları

Birinci türev UV spektrumunda, elde edilen türev eğrilerinin 246,0 nm'deki türev absorbans (dA/dλ) değerinin, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Amlodipin besilat'ın metanol içerinde λ= 246,0 nm' de birinci türev UV kalibrasyon grafiği.

Yöntem etken maddeyi tek başına içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Tabletlerde amlodipin besilat için birinci türev UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (246,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	4,161	3,944	96,8
2	6,935	6,722	96,3
3	6,935	7,000	100,9
4	6,935	7,000	100,9
5	8,322	7,833	96,1
6	13,870	13,470	97,1
7	13,870	13,928	100,4
8	13,870	13,928	100,4

Deney Sayısı, N = 8

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 98,6

Standart Sapma, s = 2,2

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 2,2

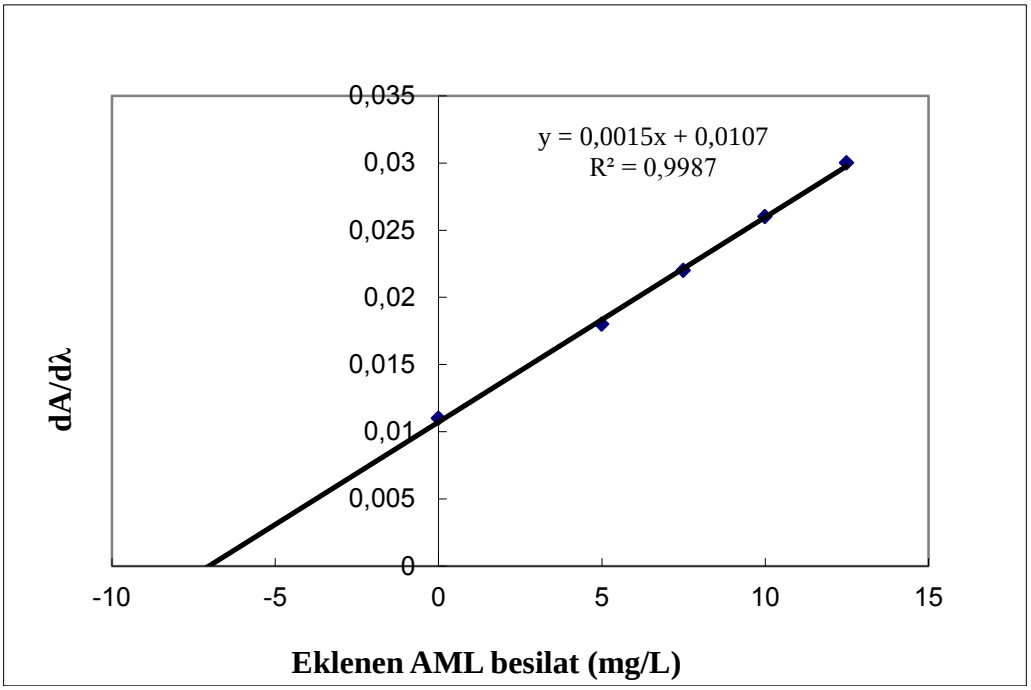
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 98,6 ± 1,8

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 7,4

4.1.2.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Amlodipin Besilat'ın Tayin Sonuçları

Bölüm 3.2.3.2.'de anlatıldığı gibi numunenin metanolde çözeltisine yine metanolde hazırlanmış standartlar katılarak elde edilen çözeltilerin UV spektrumlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Bu eğrilerden yararlanarak eklenen standart konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak numune derişimleri bulunmuştur.

Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafik şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Birinci türev UV standart ilave yöntemi ile tablette amlodipin besilat tayini için elde edilen eğri. (λ = 246 nm)

Yöntem etken maddeyi tek başına içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Tabletlerde amlodipin besilat için birinci türev standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (246,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	6,935	6,800	98,0
2	6,935	7,133	102,8
3	10,000	10,000	100,0
4	10,000	10,000	100,0

Deney Sayısı, N = 4

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 100,2

Standart Sapma, s = 2,0

Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/ $\bar{x}$)×100 = % 2,0

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 100,2 ± 3,1

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 8,9

Bu sonuçlar kullanılarak birinci türev kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.7. ile şekil 4.8. (246,0 nm) karılaştırıldığında doğruların eğimlerinin birbirine yakın olması bize tabletlerde bulunan katkı maddelerinin yöntem üzerinde bozucu etki yapmadığını göstermektedir.

Doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme yöntemlerinin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırımış ve F testi uygulanmıştır.

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için uygulandığında, F değeri;

F = $\frac{s_1^{\,2}}{s_2^{\,2}} = \frac{2{,}2^2}{2{,}0^2}$ = 1,21 olarak bulunur (s_1, kalibrasyon çizme tekniğinin standart sapması; s_2, standart ilave tekniğinin standart sapması).

Hesaplanan F değeri = 1,21 çizelgeden bulunan $F_{7,3}$ = 8,89 kritik değerden küçük olduğu için (1,21 < 8,89) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır.

Kalibrasyon çizme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 98,6 standart ekleme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 100,2' dir. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2$ -2 olup, 8 + 4 – 2 =10'dur. %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 10 için bulunan t değeri 2,23'tür.

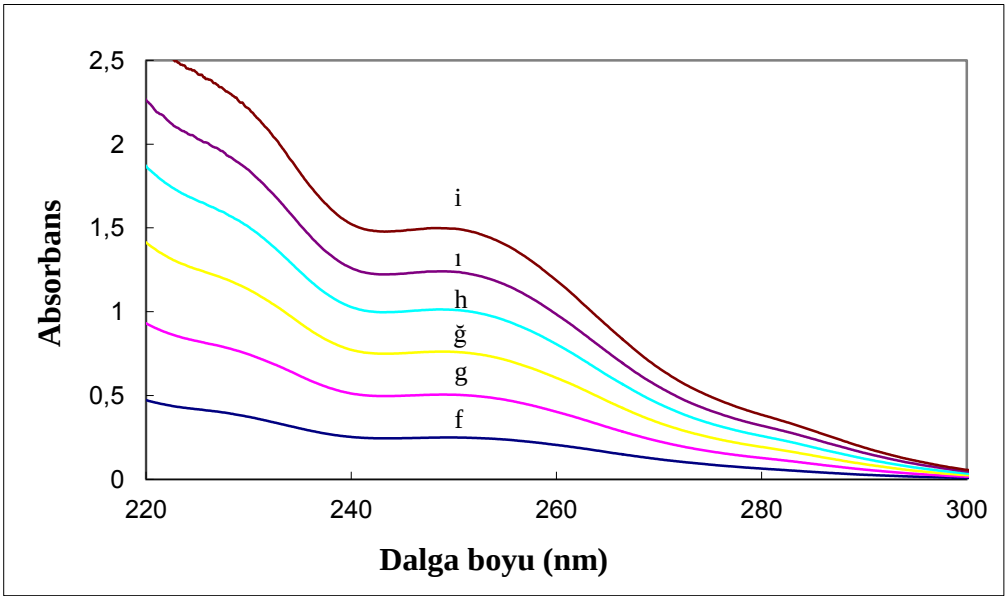
Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 2,14 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2{,}23.2{,}14\sqrt{\frac{8+4}{8.4}}$ = 2,92 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ = $|98{,}6 - 100{,}2|$ = 1,6 olarak bulunur. $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ = 1,6 < $t.s_{biriktirilmiş}\sqrt{\frac{N_1+N_2}{N_1N_2}}$ = 2,92 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

4.2. Valsartan İçeren İlaçlar İçin Analiz Sonuçları

4.2.1. Doğrudan UV Spektrofotometri

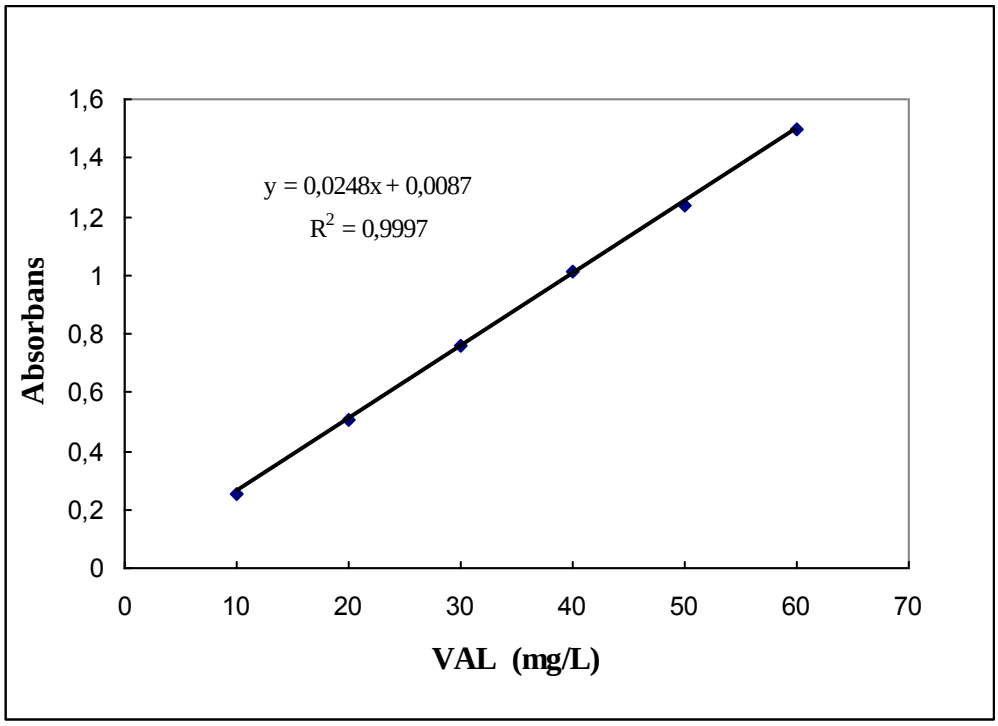
4.2.1.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemi İle Valsartan'ın Tayin Sonuçları

Şekil 4.9.'da valsartanın metanoldaki değişen derişimlerine ait UV spektrumları gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Valsartan'ın metanol içerisinde a) 10 mg/L; b) 20 mg/L; c) 30 mg/L' lik d) 40 mg/L; e) 50 mg/L; f) 60 mg/L' lik çözeltilerine ait doğrudan UV spektrumları

Uv spektrumlarındaki maksimum absorbansın olduğu 249,0 nm'deki absorbans değerlerinin valsartanın değişen derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen çalışma grafikleri şekil 4.10.' da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Valsartan'ın metanol içerisinde λ= 249,0 nm' de doğrudan UV kalibrasyon grafiği.

Yöntem etken madde olan amlodipin besilat'ı içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Tabletlerde valsartan için doğrudan UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (249,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	40,000	41,085	102,7
2	60,000	61,606	102,7
3	40,000	42,190	105,5
4	40,000	42,107	105,3
5	40,000	42,397	106,0
6	40,000	41,680	104,2
7	40,000	41,694	104,2
8	40,000	42,562	106,4

Deney Sayısı, N = 8

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 104,6

Standart Sapma, s = 1,4

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,3

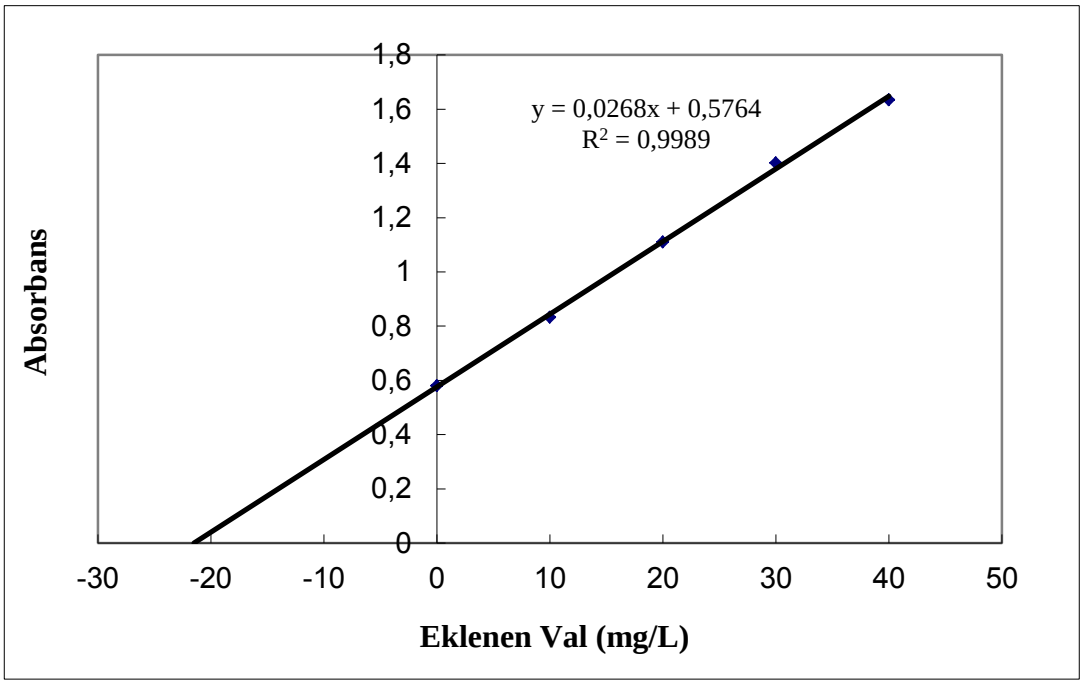
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 104,6 ± 1,2

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 4,7

4.2.1.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Valsartan'ın Tayin Sonuçları

Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı gibi valsartan numunesinin metanolde çözeltisine yine metanolde hazırlanmış standartlar katılarak elde edilen çözeltilerin spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlardan yararlanarak eklenen standart derişiminekarşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak numune derişimleri bulunmuştur.

Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafik şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Doğrudan UV standart ilave yöntemi ile tablette valsartan tayini için elde edilen eğri. (λ = 249,0 nm)

Yöntem etken maddeyi tek başına içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Tabletlerde valsartan için doğrudan UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (249,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	20,000	20,805	104,0
2	20,000	21,530	107,6
3	20,000	21,392	107,0
4	20,000	21,507	107,5

Deney Sayısı, N = 4

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 106,5

Standart Sapma, s = 1,7

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,6

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 106,5 ± 2,7

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 7,7

Bu sonuçlar kullanılarak doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.10. ve şekil 4.11. karılaştırıldığında doğruların eğimlerinin birbirine yakın olması bize tabletlerde bulunan katkı maddelerinin yöntem üzerinde bozucu etki yapmadığını göstermektedir.

Doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme yöntemlerinin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırılmış ve F testi uygulanmıştır.

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için uygulandığında, F değeri;

$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{1,7^2}{1,4^2} = 1,47$ olarak bulunur (s_1, standart ilave tekniğinin standart sapması; s_2, kalibrasyon çizme tekniğinin standart sapması).

Hesaplanan F değeri = 1,47 çizelgeden bulunan $F_{3,7}$ = 4,35 kritik değerden küçük olduğu için (1,47 < 4,35) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır.

249 nm'de kalibrasyon çizme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 104,6 standart ekleme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 106,5' dir. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2$ -2 olup, 8 + 4 – 2 =10'dur. %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 10 için bulunan t değeri 2,23'tür.

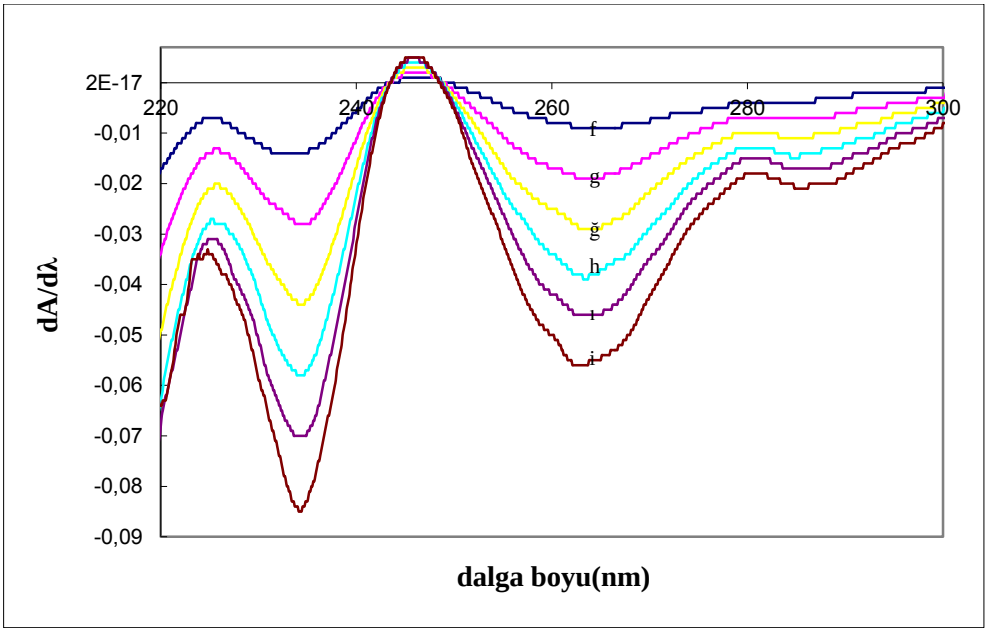
Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 1,51 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2,23.1,51\sqrt{\frac{8+4}{8.4}}$ = 2,06 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = $\left|104,6 - 106,5\right|$ = 1,9 olarak bulunur. $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = 1,9 < $t.s_{biriktirilmiş}\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$ = 2,06 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

4.2.2. Birinci Türev Spektrofotometri

4.2.2.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Valsartan'ın Tayin Sonuçları

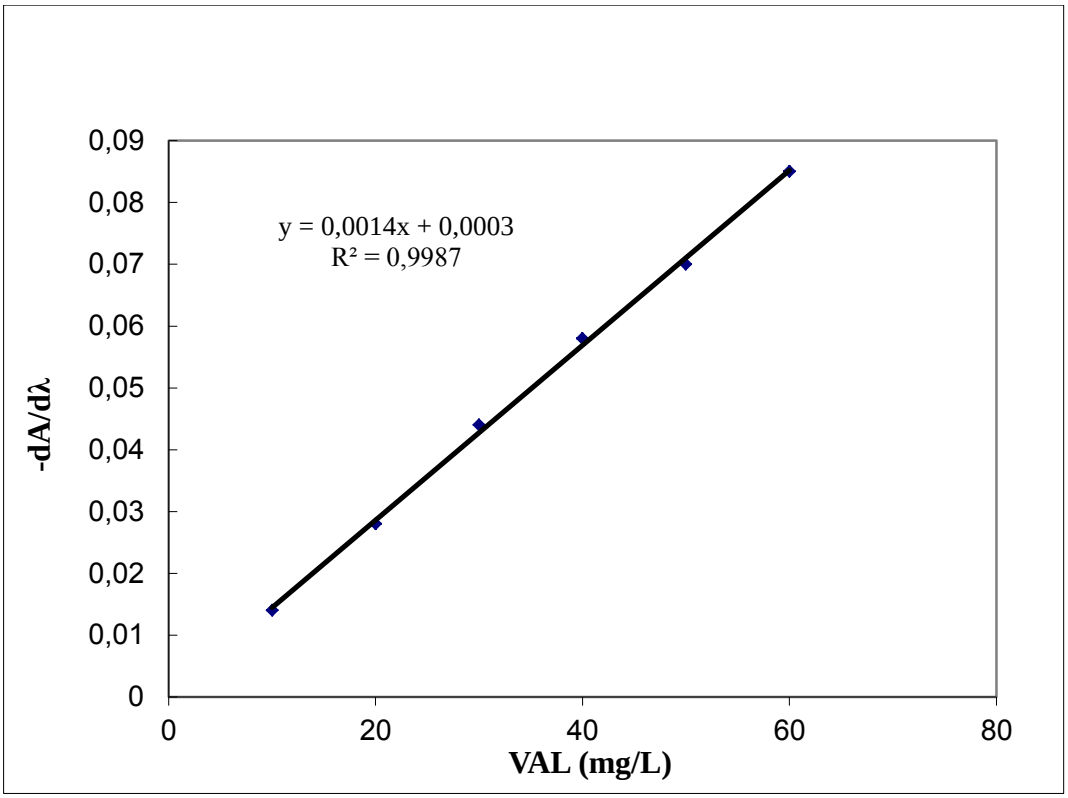
Birinci türev UV spektrofotometri ile valsartan içeren farmasötik preparatlardan etken maddenin miktar tayini için doğrudan UV spektrofotometrik yöntem sonucunda elde edilen orijinal spektrumların bilgisayar ortamında birinci türev eğrileri çizdirilmiştir.

Amlodipin besilatın giderek artan farklı derişimlerindeki birinci türev UV spektrumları şekil 4.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Valsartan'ın metanol içerisinde a) 10 mg/L; b) 20 mg/L; c) 30 mg/L' lik d) 40 mg/L; e) 50 mg/L; f) 60 mg/L' lik çözeltilerine ait birinci türev UV spektrumları

Birinci türev UV spektrumunda, elde edilen türev eğrilerinin 234,2 ve 263 nm'lerdeki türev absorbans (dA/dλ) değerlerinin, derişime karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri şekil 4.13 ve şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Valsartan'ın metanol içerisinde λ= 234,2 nm' de birinci türev UV kalibrasyon grafiği.

Yöntem etken maddeyi tek başına içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.9. ve çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (234,2 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan	Geri Kazanım, %
1	40,000	43,143	107,9
2	40,000	43,357	108,4
3	60,000	65,500	109,2
4	40,000	44,250	110,6
5	40,000	45,500	112,4
6	60,000	65,500	109,2
7	60,000	66,750	111,2
8	60,000	67,428	110,4

Deney Sayısı, N = 8

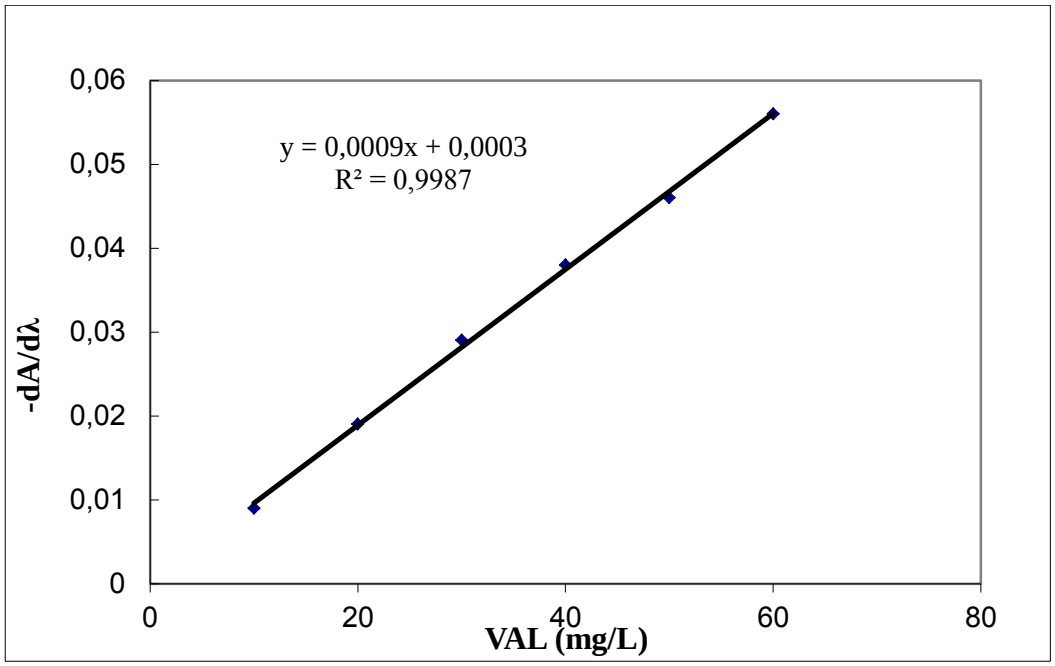
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 109,9

Standart Sapma, s = 1,5

Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 1,4

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 109,9 ± 1,3

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 5,0



Şekil 4.14. Valsartan'ın metanol içerisinde λ= 263,0 nm' de birinci türev UV kalibrasyon grafiği.

Çizelge 4.10. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV kalibrasyon grafiği yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (263,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	40,000	44,273	110,7
2	40,000	44,111	110,3
3	100,000	111,111	111,1
4	40,000	44,273	110,7
5	60,000	67,000	111,7
6	60,000	67,000	111,7
7	60,000	67,000	111,7
8	40,000	44,778	111,9

Deney Sayısı, N = 8

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 111,2

Standart Sapma, s = 0,6

Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 0,5

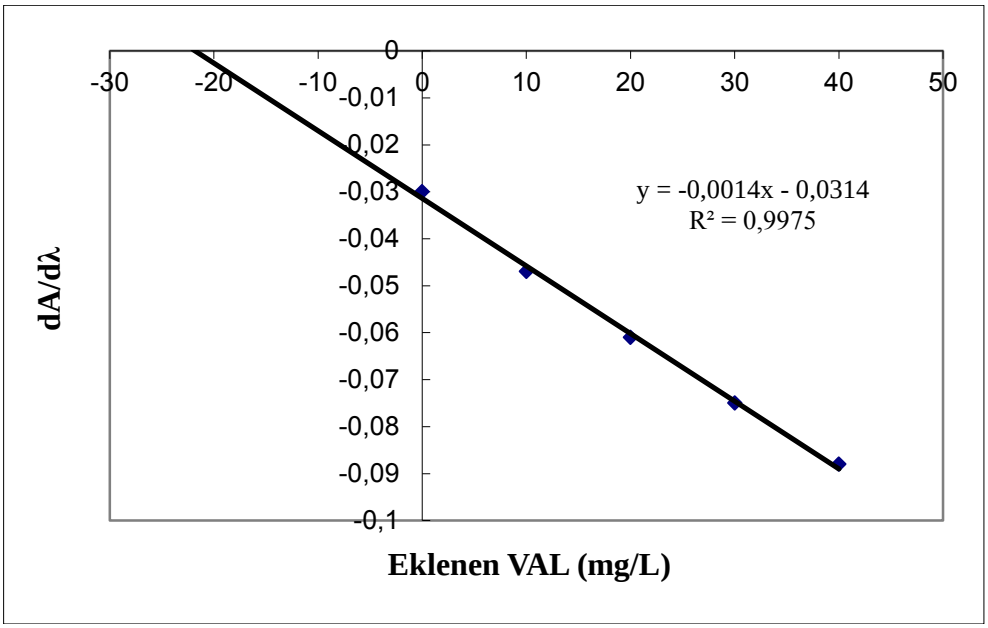
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 111,2 ±0,5

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 2,0

4.2.2.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Valsartan'ın Tayin Sonuçları

Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı gibi valsartan numunesinin metanolde çözeltisine yine metanolde hazırlanmış standartlar katılarak elde edilen çözeltilerin UV spektrumlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Bu eğrilerden yararlanarak eklenen standart konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak numune konsantrasyonları bulunmuştur.

Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafikler şekil 4.15. ve şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Birinci türev UV standart ilave yöntemi ile tablette valsartan tayini için elde edilen eğri. (λ = 234,2 nm)

Yöntem etken maddeyi tek başına içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.11. ve çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (234,2 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	20,000	22,571	112,9
2	20,000	22,142	110,7
3	20,000	22,428	112,1
4	20,000	22,000	110,0

Deney Sayısı, N = 4

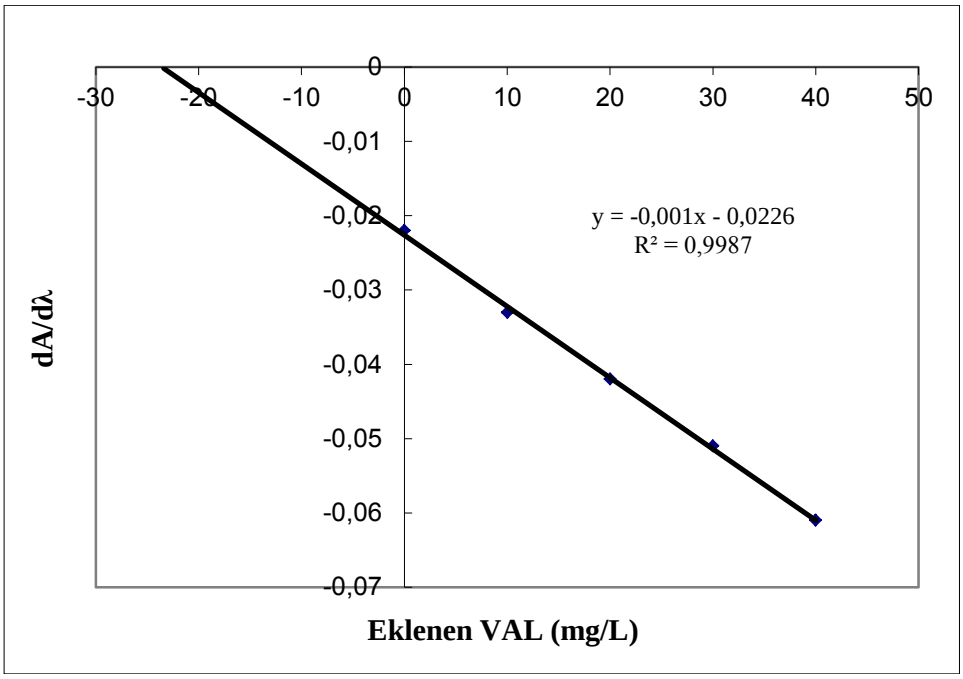
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 111,4

Standart Sapma, s = 1,3

Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 1,2

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\,s/\sqrt{N}$ = % 111,4 ± 2,1

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 5,9



Şekil 4.16. Birinci türev UV standart ilave yöntemi ile tablette valsartan tayini için elde edilen eğri. (λ = 263,0 nm)

Çizelge 4.12. Tabletlerde valsartan için birinci türev UV standart ekleme yöntemiyle elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi (263,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	20,000	22,600	113,0
2	20,000	22,600	113,0
3	20,000	22,727	113,6
4	20,000	22,400	112,2

Deney Sayısı, N = 4

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 112,9

Standart Sapma, s = 0,6

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 0,5

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 112,9 ± 0,9

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 2,6

Bu sonuçlar kullanılarak doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme yöntemleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.13. ile şekil 4.15. (234,2 nm) ve şekil 4.14. ile şekil 4.16. (263,0 nm) karılaştırıldığında doğruların eğimlerinin birbirine yakın olması bize tabletlerde bulunan katkı maddelerinin yöntem üzerinde bozucu etki yapmadığını göstermektedir.

Doğrudan kalibrasyon ve standart ekleme yöntemlerinin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırılmış ve F testi uygulanmıştır.

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için uygulandığında, F değeri;

$F = \frac{s_1^{\,2}}{s_2^{\,2}} = \frac{1{,}5^2}{1{,}3^2} = 1{,}33$ olarak bulunur (s_1, kalibrasyon çizme tekniğinin standart sapması; s_2, standart ilave tekniğinin standart sapması).

Hesaplanan F değeri = 1,33; çizelgeden bulunan $F_{7,3}$ = 8,89 kritik değerden küçük olduğu için (1,33 < 8,89) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır. 234,2 nm'de kalibrasyon çizme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 109,9 standart ekleme tekniği ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 111,4' dır. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2$ -2 olup, 8 + 4 – 2 =10'dur. %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 10 için bulunan t değeri 2,23'tür.

Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 1,45 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2{,}23.1{,}45\sqrt{\frac{8+4}{8.4}}$ = 1,98 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ = $|109{,}9 - 111{,}4|$ = 1,5 olarak bulunur. $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ = 1,5 < $t.s_{biriktirilmiş}\sqrt{\frac{N_1+N_2}{N_1N_2}}$ = 1,98 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

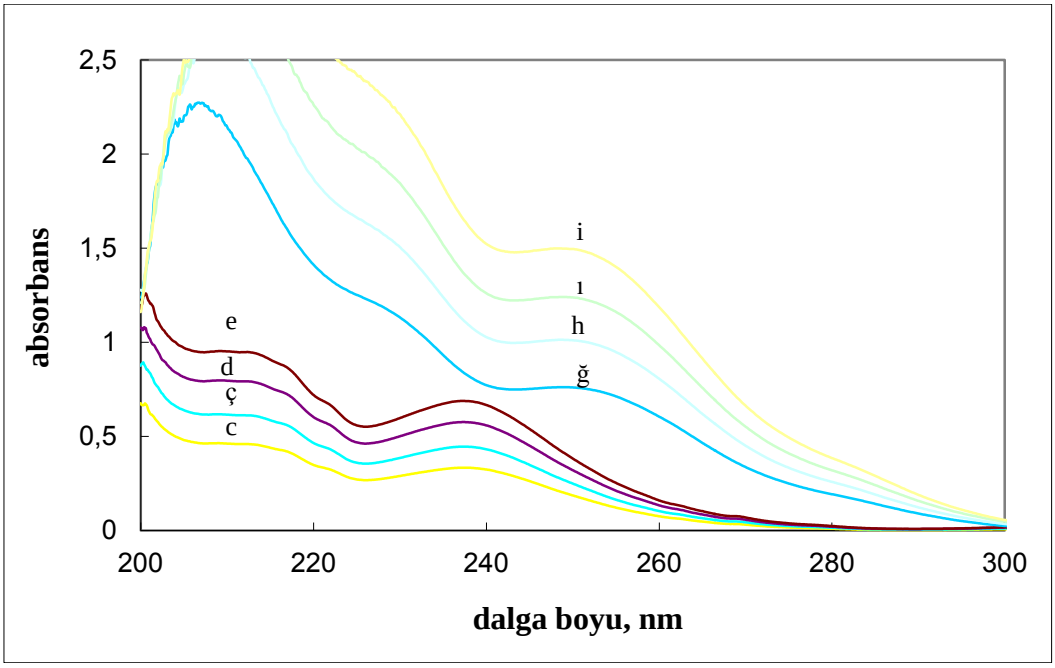
4.3. Amlodipin Besilat Ve Valsartan İçeren İlaçlar İçin Analiz Sonuçları

İlaç preparatlarında hem amlodipin hem valsartan etken maddesi bir arada bulunduğunda her birinin miktarını tayin etmek için türev spektrofotometri ve spektrum oranları türev spektrofotometri yöntemleri kullanılmıştır.

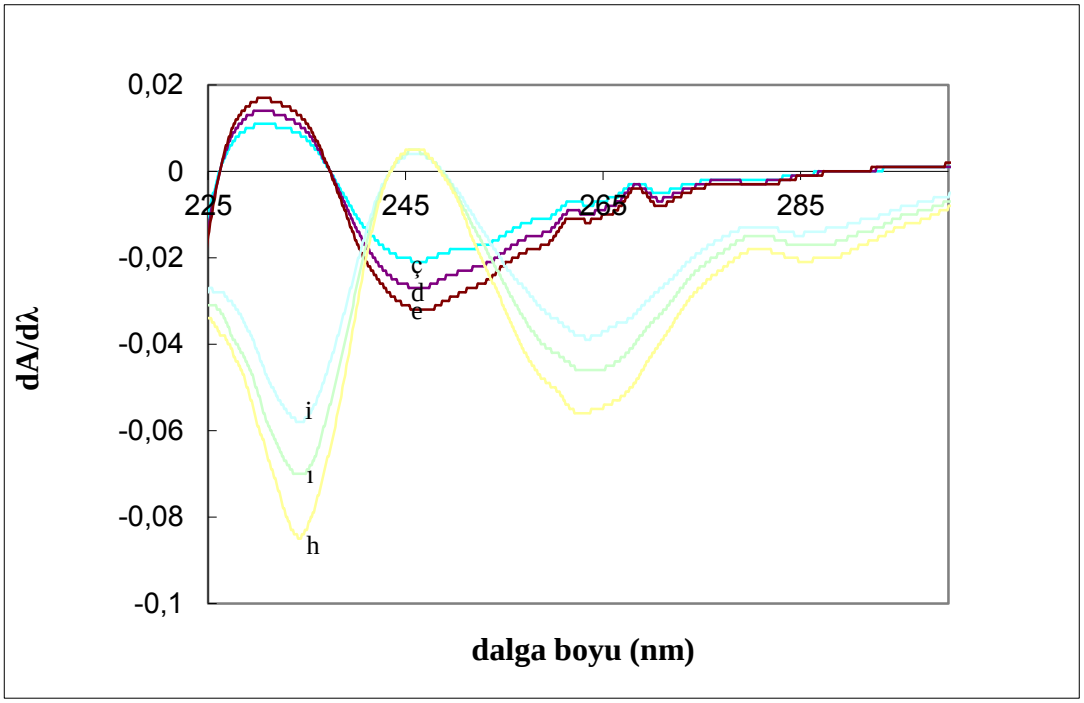
4.3.1. Birinci Türev Spektrofotometri

4.3.1.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Tayin Sonuçları

Şekil 4.1.7. ve şekil 4.1.8.'de metanol içerisinde hazırlanan amlodipin besilat ve valsartana ait UV ve birinci türev UV spektrumları gösterilmiştir**.**



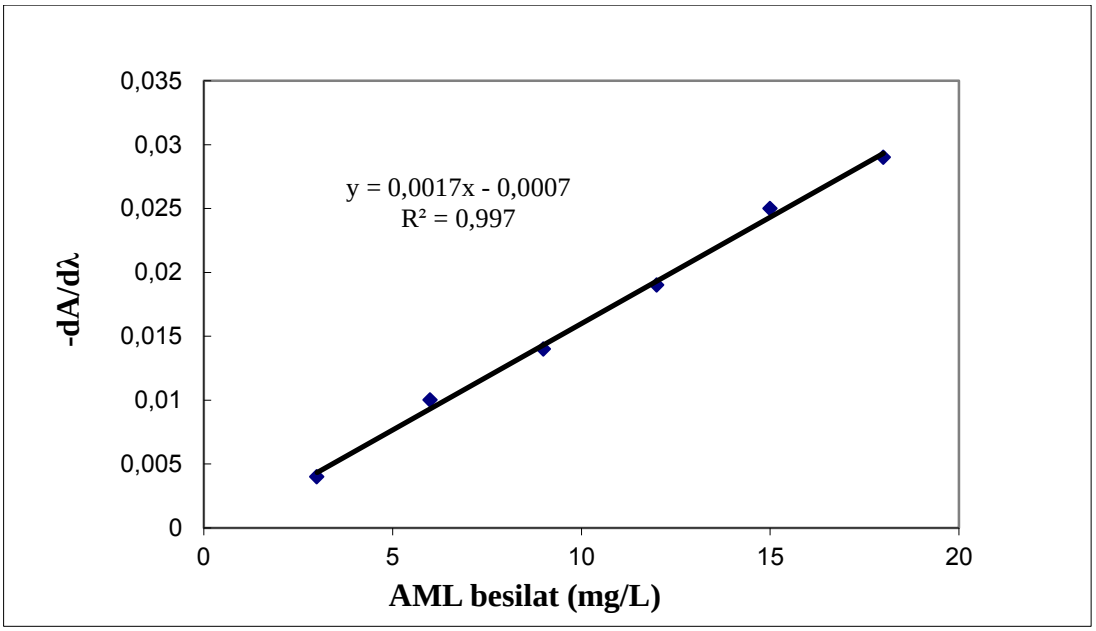
Şekil 4.17. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15mg/L e)18 mg/L, valsartan'ın ğ) 30 mg/L h) 40 mg/L ı) 50 mg/L i) 60 mg/L' lik çözeltilerinin UV spektrumları



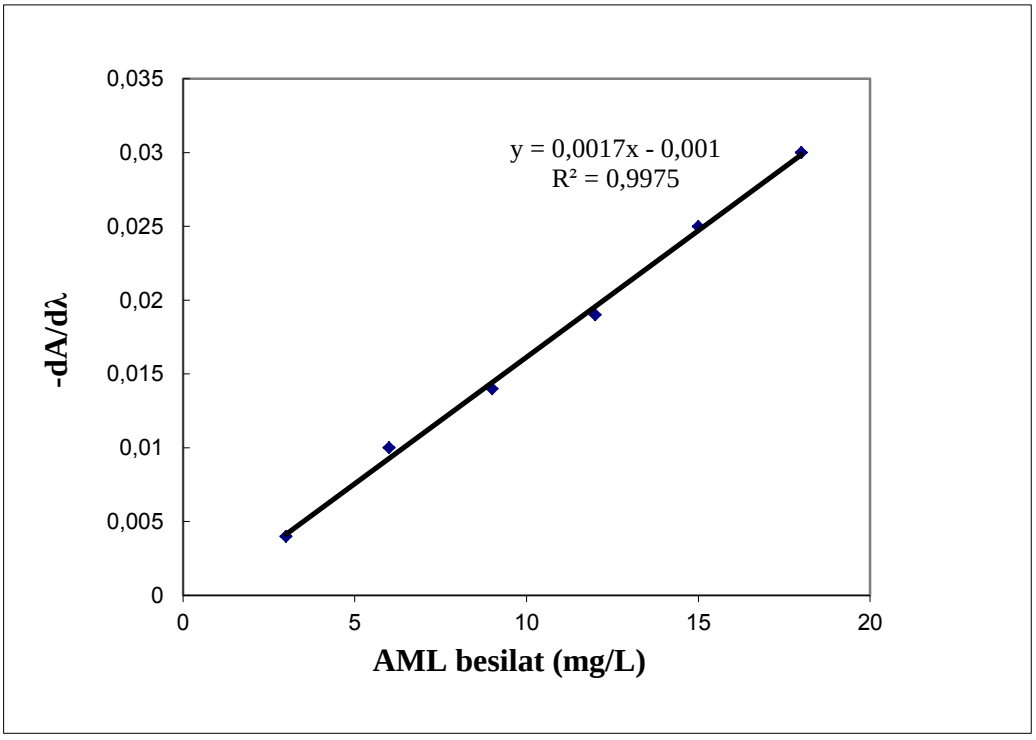
Şekil 4.18. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15mg/L e)18 mg/L, valsartan'ın ğ) 30 mg/L h) 40 mg/L ı) 50 mg/L i) 60 mg/L' lık çözeltilerinin birinci türev UV spektrumları

Şekil 4.18.'de UV spektrumların birinci türev eğrileri görülmektedir. Türev spektrofotometrik yöntem için etken maddelerin karışımını içeren bir ortamda amlodipin besilat tayini yapılabilmesi içi valsartan'ın birinci türev spektrumunda "0" türev absorbans değerine sahip olduğu dalga boyları seçilmiştir. Valsartan tayini yapılabilmesi için ise amlodipin besilat'ın birinci türev spektrumunda "0" türev absorbans değerine sahip olduğu dalga boyları seçilmiştir.

Birinci türev UV spektrumlarında amlodipin besilat için 243,6 ve 248,8 nm'deki türev absorbans değerlerinden yararlanılarak hazırlanan çalışma grafiği verileri şekil 4.19. ve şekil 4.20. de gösterilmiştir.

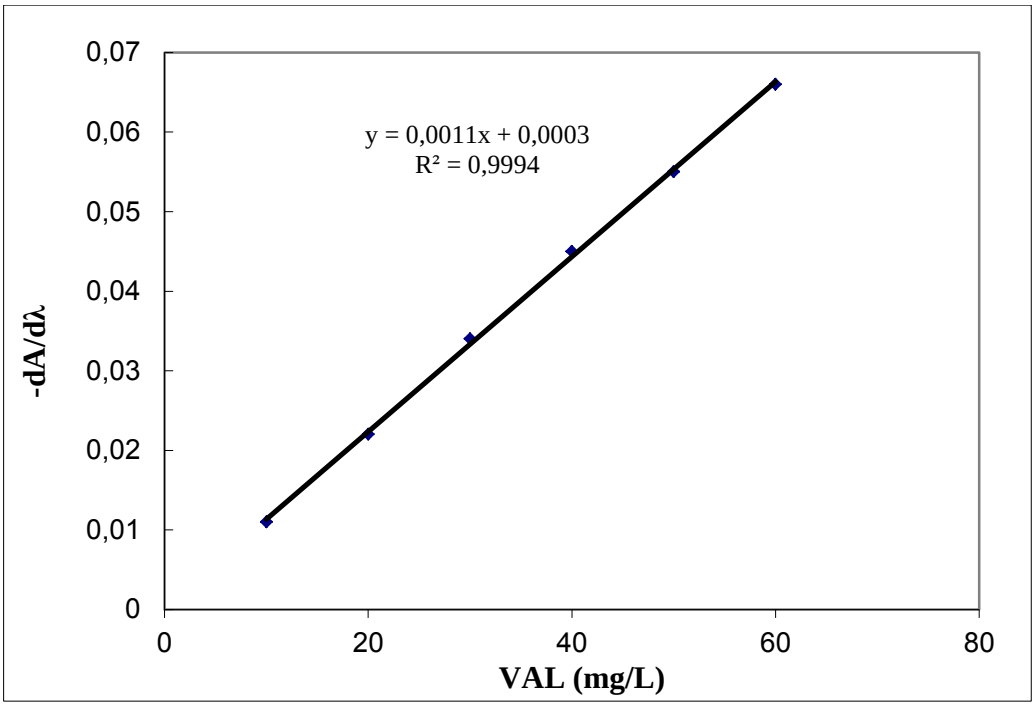


Şekil 4.19. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ =243,6 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği

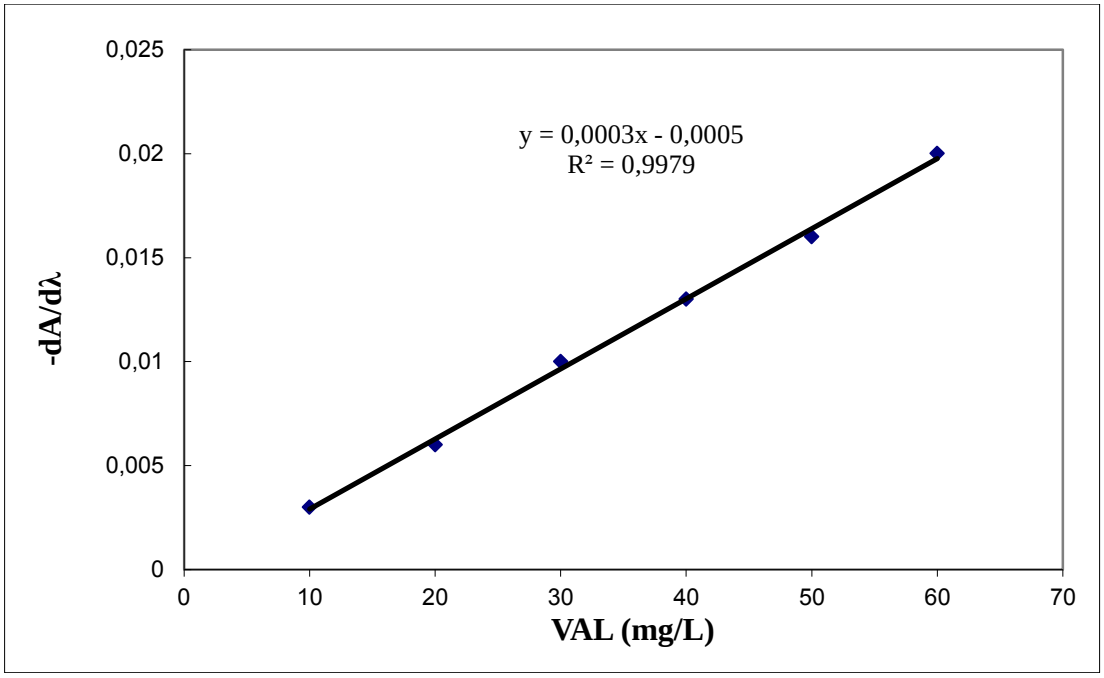


Şekil 4.20. Amlodipin besilat'ın metanol içerisinde λ =248,8 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği

Birinci türev UV spektrumlarında valsartan için 237,2 ve 289 nm'deki türev absorbans değerlerinden yararlanılarak hazırlanan çalışma grafiği verileri şekil 4.21. ve şekil 4.22.' de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Valsartan'ın metanol içerisinde λ =237,2 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği



Şekil 4.22. Valsartan'ın metanol içerisinde λ =289,0 nm'de birinci türev UV kalibrasyon grafiği

Yöntem amlodipin besilat ve valsartan etken maddelerini birlikte içeren farmasötik preparata amlodipin besilat için 243,6 nm'de, valsartan için 289 nm'de uygulandığında, elde edilen sonuçlar çizelge 4.13.'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren tabletlere birinci türev UV spektrofotometrinin uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirilmesi

Deney No	Tabletteki AML bes (243,6 nm) mg/tablet	Bulunan, mg/tablet	Tabletteki VAL (289,0 nm) mg/tablet	Bulunan, mg/tablet
1	13,870	13,447	160,000	154,286
2	13,870	13,447	160,000	161,429
3	13,870	14,791	160,000	161,429
4	13,870	13,279	160,000	154,286
Deney Sayısı, N = 4			Deney Sayısı, N = 4	
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = 13,741			Ortalama Değer = $\bar{x}$ = 157,858	
Standart Sapma, s = 0,705			Standart Sapma, s =4,124	
Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 5,127			Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 =%2,612	
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\,s/\sqrt{N}$ = 10,367 ± 1,120			**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\,s/\sqrt{N}$ = 157,858 ± 6,557	
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 3,169			Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 18,546	

** % 95 (p: 005) güven seviyesinde

Çizelge 4.13.'de elde edilen verilerden amlodipin ve valsartan'ın hiçbir ayırma işlemi yapılmaksızın birinci türev UV spektrofotometrik yöntemiyle aynı anda tayinin yapılabileceği görülmektedir.

4.3.1.3 Geri Kazanım Analiz Sonuçları

Laboratuar şartlarında sentetik olarak hazırlanan iki etken maddenin değişik oranlardaki karışımlarından elde edilen sonuçlar çizelge 4.16. ve çizelge 4.17. ile çizelge 4.18. ve çizelge 4.19.da gösterilmiştir**.** Hesaplamalar sonucu ulaşılan değerler yöntemin doğruluk açısından uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.14. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile amlodipin besilat için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirilmesi (243,6 nm)

Deney No	Alınan valsartan, mg/mL	Alınan amlodipin bes, mg/mL	Bulunanmg/mL	Geri Kazanım, %
1	20,000	4,000	3,941	98,5
2	40,000	4,000	3,941	98,5
3	60,000	4,000	3,941	98,5

Deney Sayısı, N = 3

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 98,5

Standart Sapma, s = 0,0

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 0,0

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 98,5 ± 0,0

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 0,0

Çizelge 4.15. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile amlodipin besilat için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (248,8 nm)

Deney No	Alınan valsartan, mg/mL	Alınan amlodipin bes, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	20,000	4,000	3,944	98,6
2	40,000	4,000	3,944	98,6
3	60,000	4,000	3,944	98,6

Deney Sayısı, N = 3

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 98,6

Standart Sapma, s = 0,0

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 0,0

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 98,6 ± 0,0

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 0,0

Çizelge 4.16. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile valsartan için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (237,2 nm)

Deney No	Alınan amlodipin bes, mg/mL	Alınan valsartan, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	4,000	60,000	58,818	98,0
2	8,000	60,000	60,636	101,0
3	12,000	60,000	59,727	99,5

Deney Sayısı, N = 3

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 99,5

Standart Sapma, s = 1,5

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,5
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 99,5 ± 3,7
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 9,1

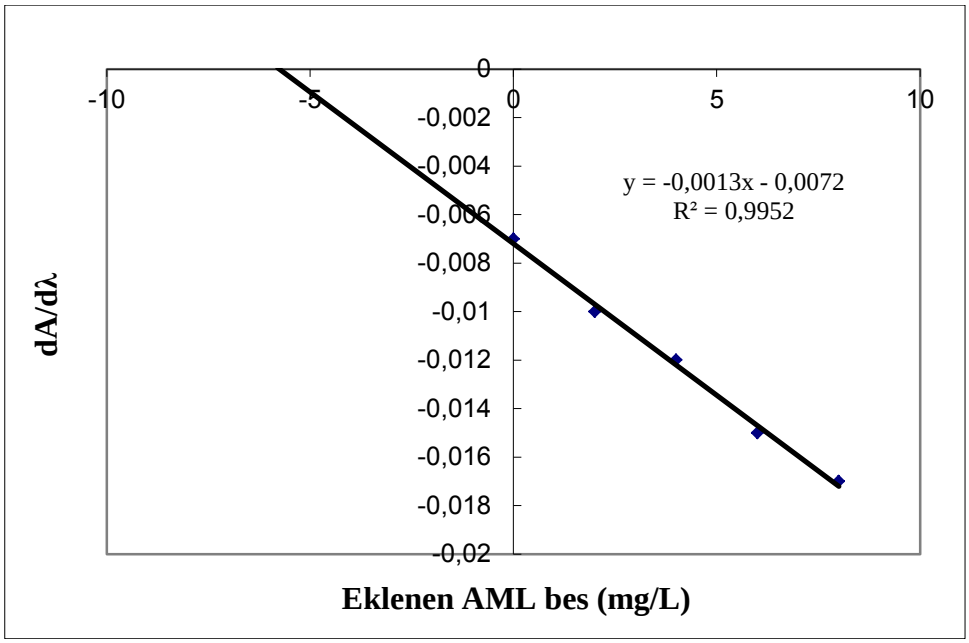
Çizelge 4.17. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile valsartan için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (289,0 nm)

Deney No	Alınan amlodipin bes, mg/mL	Alınan valsartan, mg/mL	Bulunanmg/mL	Geri Kazanım, %
1	4,000	60,000	60,000	100,0
2	8,000	60,000	60,000	100,0
3	12,000	60,000	60,000	100,0

Deney Sayısı, N = 3
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 100,0
Standart Sapma, s = 0,0
Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 0,0
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 100,0 ± 0,0
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 0,0

4.3.1.2. Standart Ekleme Yöntemiyle Tayin Sonuçları

Bölüm 3.2.3.2.'de anlatıldığı gibi amlodipin besilat ve valsartan'ı içerisinde bulunduran tablet numunesinin metanolde çözeltisine yine metanolde hazırlanmış amlodipin besilat standartları katılarak elde edilen çözeltilerin UV spektrumlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Bu eğrilerden yararlanarak eklenen standart derişimine karşı absorbans değerleri 243,6 nm'de grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak amlodipin besilat derişimleri bulunmuştur. Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafik şekil 4.23.'de gösterilmiştir. Bulunan sonuçlar çizelge 4.14.'de verilmiştir.



Şekil 4.23. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlerde amlodipin besilat için 243,6 nm'de birinci türev UV standart ekleme grafiği

Çizelge 4.18. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlere amlodipin besilat için birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 243,6 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan*, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	5,548	5,538	99,8
2	5,548	5,538	99,8
3	5,548	5,615	101,2

Deney Sayısı, N = 3

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 100,3

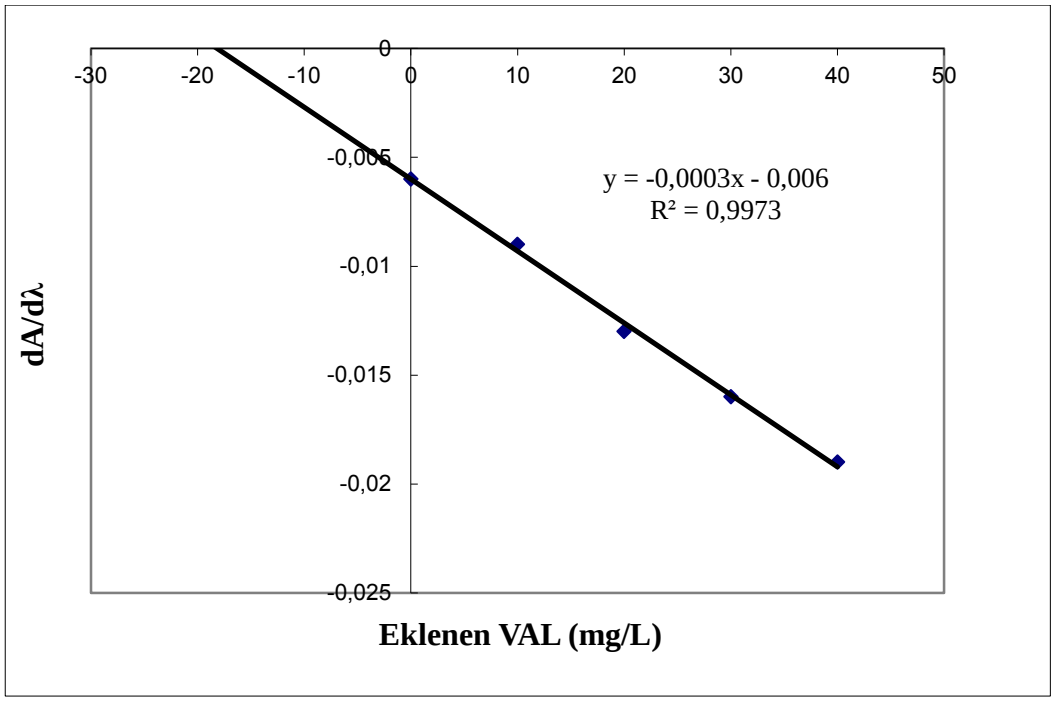
Standart Sapma, s = 0,8

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 0,8

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 102,0 ± 2,0

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 4,9

Yöntemin valsartan'a uygulanması ile 289,0 nm'de eklenen standart derişimine karşı türev absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak numune konsantrasyonları bulunmuştur. Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafik şekil 4.24.'de gösterilmiştir. Bulunan sonuçlar çizelge 4.15.' de verilmiştir.



Şekil 4.24. Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren tabletlerde valsartan için 289,0 nm'de birinci türev UV standart ekleme grafiği

Çizelge 4.19. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlere valsartan için birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 289,0 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan,mg/mL	Geri Kazanım, %
1	20,000	20,667	103,3
2	20,000	20,667	103,3
3	20,000	20,000	100,0

Deney Sayısı, N = 3

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 102,2

Standart Sapma, s = 1,9

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,9

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 102,2 ± 4,7

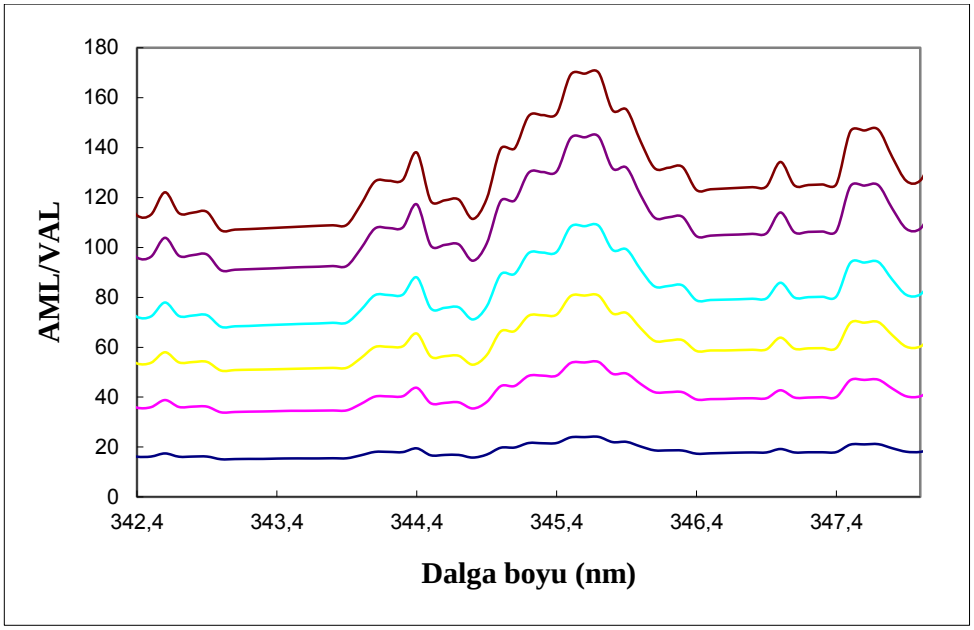
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 11,5

**% 95 (p: 005) güven seviyesinde

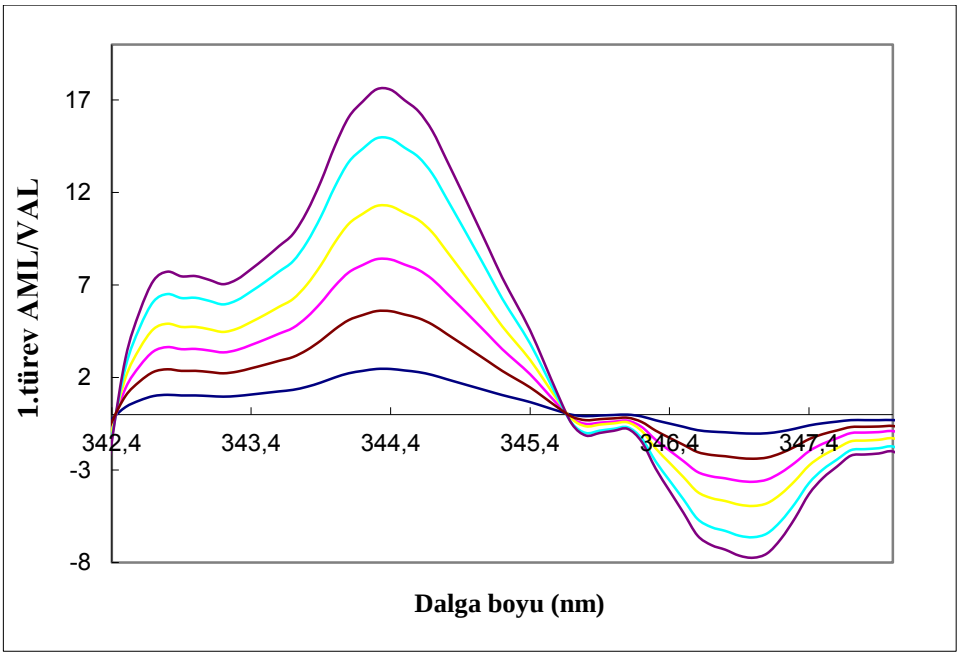
4.3.2. Spektrum Oranları Birinci Türev Spektrofotometri İle Analiz Sonuçları

4.3.2.1. Kalibrasyon Grafiği Yöntemiyle Tayin Sonuçları

Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayini için önerilen diğer bir yöntem spektrum oranları UV spektrofotometridir. Bu metotta amlodipin besilat ve valsartan'ın miktar tayini için UV spektrumları alınmış ve bu spektrumlar değişik konsantrasyonlar denenerek en uygun bölücü konsantrasyon tespit edilmeye çalışılmıştır. Bölücü etken maddeleri içeren karışımlarda amlodipin besilatın tayini için valsartan'ın bölücü olarak kullanılmasıyla elde edilen oran spektrumları şekil 4.25.'de gösterilmiştir. Daha sonra alınan bu spektrumların bilgisayara çizdirilmiş birinci türev eğrileri ise şekil 4.26'da gösterilmiştir.

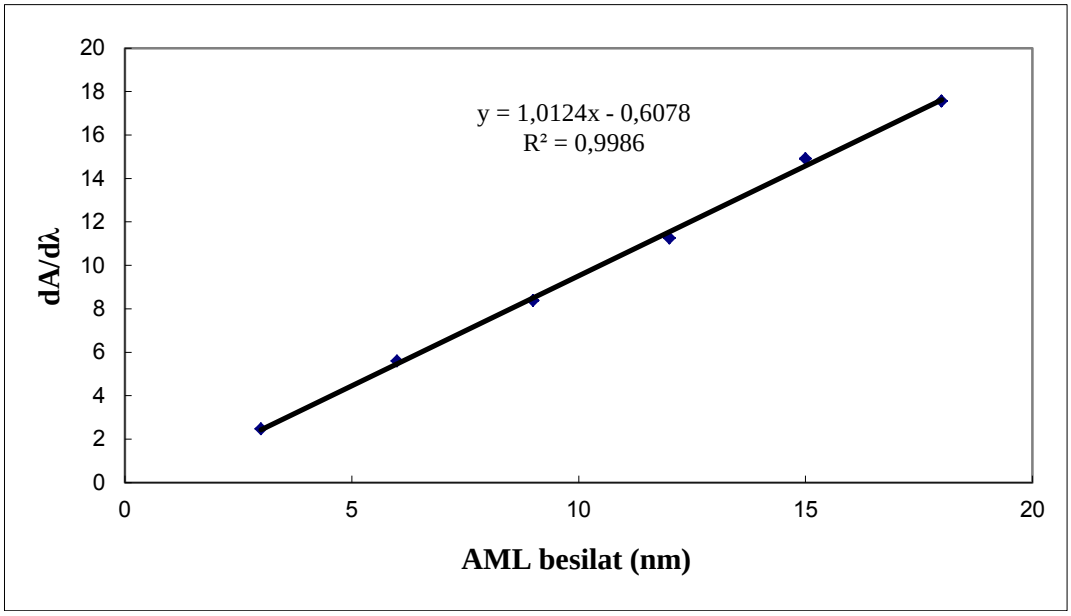


Şekil 4.25. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın a) 3 mg/L b) 6 mg/L c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15 mg/mL e)18 mg/L' lik çözeltilerinin oran spektrumları (bölücü valsartan konsantrasyonu 60 mg/L)



Şekil 4.26. Metanol içerisinde amlodipin besilat'ın a) 3 mg/L b) 6 mg/L c) 9 mg/L ç) 12 mg/L d) 15 mg/L e)18 mg/L' lik çözeltilerinin oran spektrumlarının birinci türev eğrileri (bölücü valsartan konsantrasyonu 60 mg/L)

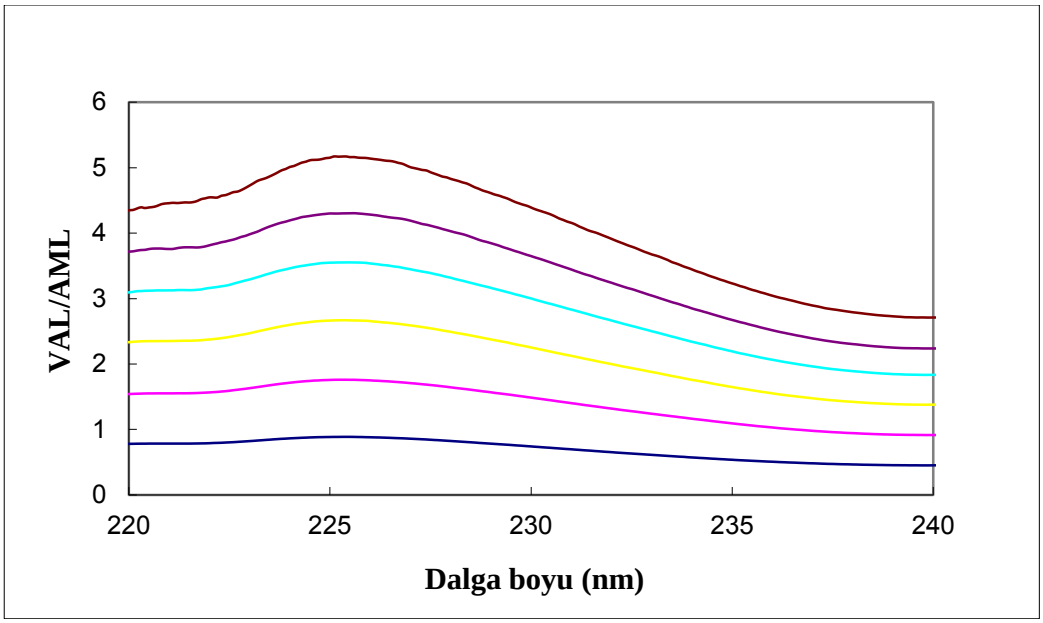
Spektrum oranları birinci türev UV spektrumlarından amlodipin besilat için elde edilen türev eğrilerinin 344,4'deki türev absorbans (dA/dλ) değerlerinin, derişime karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.27. de gösterilmiştir.



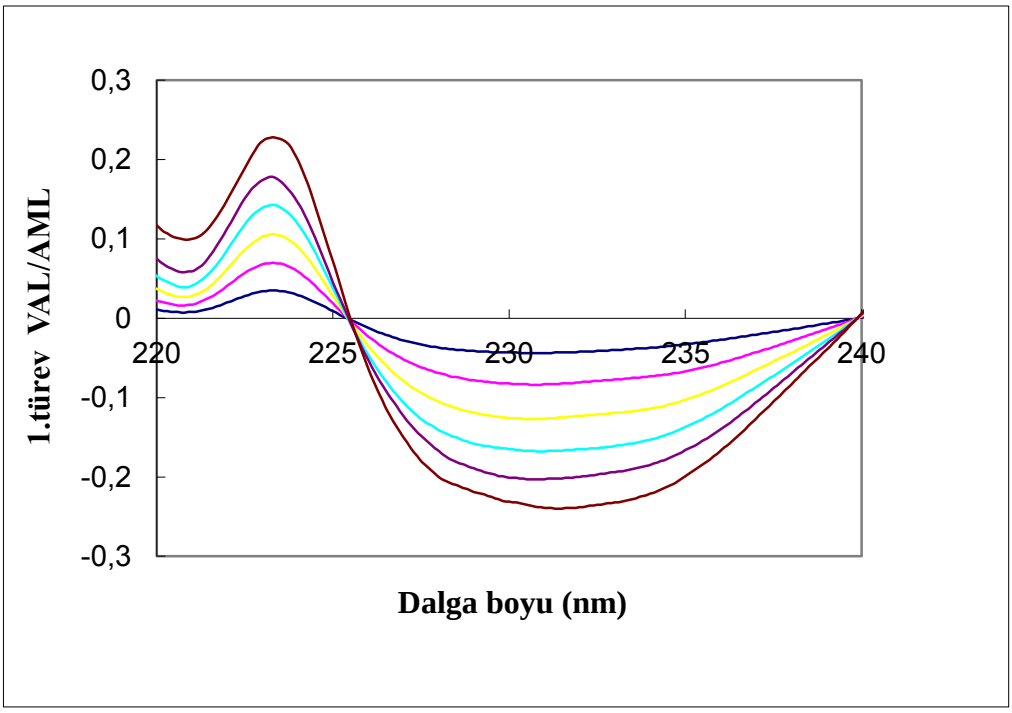
Şekil 4.27. Amlodipin besilat'ın spektrum oranları birinci türev yöntemiyle tayini için 344,4 nm'de çizilen kalibrasyon grafiği

Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayini için önerilen bu metotta etken maddeleri içeren

karışımlarda valsartan tayini için amlodipin besilat'ın bölücü olarak kullanılmasıyla elde edilen oran spektrumları şekil 4.28'de gösterilmiştir. Daha sonra alınan bu spektrumların bilgisayara çizdirilmiş birinci türev eğrileri ise şekil 4.29'da gösterilmiştir.

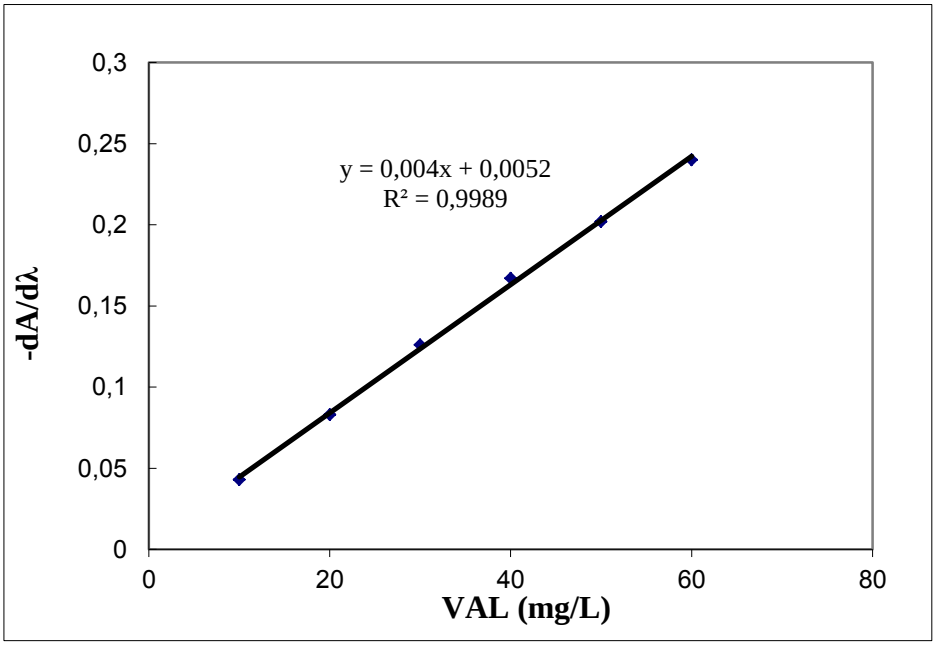


Şekil 4.28. Metanol içerisinde valsartan'ın a) 10 mg/L b) 20 mg/L c) 30 mg/L ç) 40 mg/L d) 50mg/L e) 60 mg/L' lık çözeltilerinin oran spektrumları (bölücü amlodipin besilat konsantrasyonu 15,0 mg/L)



Şekil 4.29. Metanol içerisinde valsartan'ın a) 10 mg/L b) 20mg/L c) 30 mg/L ç) 40 mg/L d) 50 mg/L e) 60 mg/L' lık çözeltilerinin oran spektrumlarının birinci türev eğrileri (bölücü amlodipin besilat konsantrasyonu 15,0 mg/L)

Spektrum oranları birinci türev UV spektrumlarından valsartan için elde edilen türev eğrilerinin 231,3 nm'deki türev absorbans (dA/dλ) değerlerinin, derişime karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Valsartan'ın spektrum oranları birinci türev yöntemiyle tayini için 231,3 nm'de çizilen kalibrasyon grafiği

Yöntemin amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren preparata uygulandığında her bir etken madde için bulunan sonuçlar çizelge 4.20.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. Spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrini amlodipin besilat ve valsartan içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi

Deney No	Tabletteki AML bes (344,4 nm) mg/tablet	Bulunan, mg/tablet	Tabletteki VAL (231,3 nm) mg/tablet	Bulunan, mg/tablet
1	13,870	13,132	160,000	161,286
2	13,870	13,273	160,000	162,714
3	13,870	14,061	160,000	163,429
4	13,870	13,725	160,000	164,857
Deney Sayısı, N = 4			Deney Sayısı, N = 4	
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = 13,548			Ortalama Değer = $\bar{x}$ = 163,071	
Standart Sapma, s = 0,425			Standart Sapma, s = 1,487	

Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 3,141	Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 =%0,912
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\,s/\sqrt{N}$ = 9,768 ± 0,677	**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\,s/\sqrt{N}$ = 166,821 ± 2,364
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 1,914	Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 6,686

4.3.2.3. Geri Kazanım Analiz Sonuçları

Yöntemin labarotuarda hazırlanan sentetik karşımlara uygulandığında elde edilen sonuçlar çizelge 4.23 ve 4.24.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile amlodipin besilat için elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ =344,4 nm)

Deney No	Alınan valsartan, mg/mL	Alınan amlodipin bes, mg/mL	Bulunan, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	20,000	4,000	4,280	107,0
2	40,000	4,000	4,189	104,7
3	60,000	4,000	4,263	106,6

Deney Sayısı, N = 3
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 106,1
Standart Sapma, s = 1,2
Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 1,2
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\,s/\sqrt{N}$ = % 106,1± 3,0
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 7,3

Çizelge 4.22. Laboratuar ortamında hazırlanan amlodipin besilat ve valsartan sentetik karışımlarına spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin uygulanması ile valsartan için elde edilen analiz sonuçları (λ =231,3 nm)

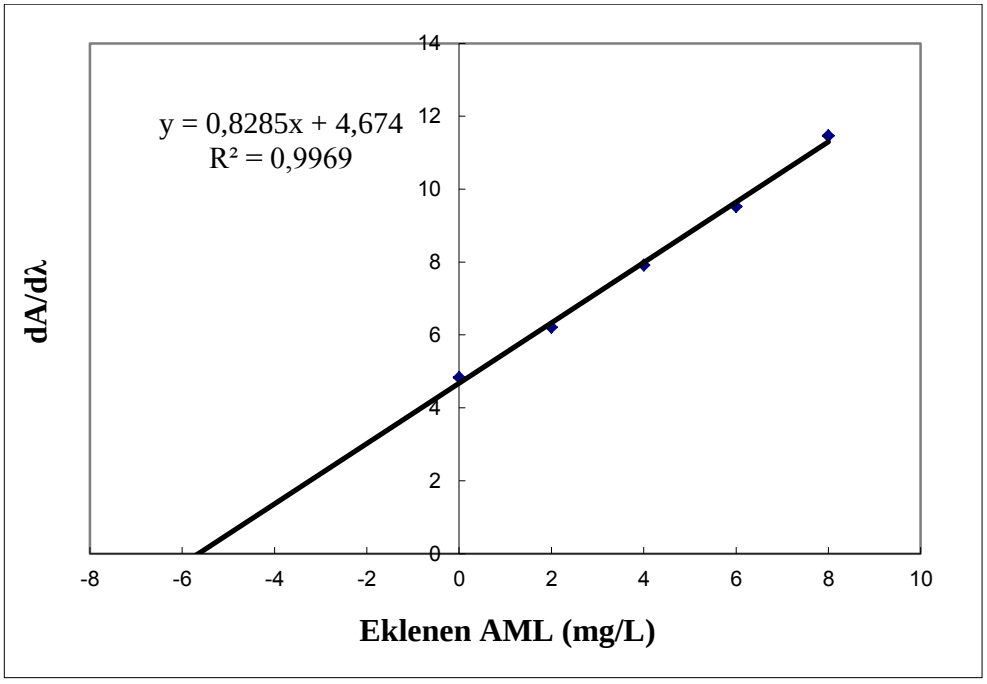
Deney No	Alınan amlodipin bes, mg/mL	Alınan valsartan, mg/mL	Bulunan,mg/mL	Geri Kazanım, %
1	4,000	60,000	58,638	97,7
2	8,000	60,000	59,202	98,7
3	12,000	60,000	58,757	97,9

Deney Sayısı, N = 3
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 98,1
Standart Sapma, s = 0,5
Bağıl Standart Sapma, BSS = (s/$\bar{x}$)×100 = % 0,5

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\,s/\sqrt{N}$ = % 98,1 ± 1,2
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 3,0

4.3.2.2. Standart Ekleme İle Analiz Sonuçları

Bölüm 3.2.3.2.'de anlatıldığı gibi amlodipin besilat ve valsartan'ı içerisinde bulunduran tablet numunesinin metanolde çözeltisine yine metanolde hazırlanmış amlodipin besilat standartları katılarak elde edilen çözeltilerin UV spektrumları alınmıştır. Amlodipin besilat'ın her derişimi valsartan'ın 60 mg/L derişiminin UV spektrumuna bilgisayar yardımıyla oranlanmıştır. Elde edilen spektrum oranlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Bu eğrilerden yararlanarak eklenen standart derişimine karşı absorbans değerleri 344,4 nm'de grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak amlodipin besilat derişimleri bulunmuştur. Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafik şekil 4.32.'de gösterilmiştir. Bulunan sonuçlar çizelge 4.21.'de verilmiştir.



Şekil 4.31. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlerde amlodipin besilat için 344,4 nm'de spektrum oranı birinci türev UV standart ekleme grafiği

Çizelge 4.23. Amlodipin besilat ve valsartan'ı birlikte içeren tabletlere amlodipin besilat için spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 344,4 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan*, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	5,548	5,538	99,8
2	5,548	5,536	99,8
3	5,548	5,641	101,7

Deney Sayısı, N = 3

Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 100,4

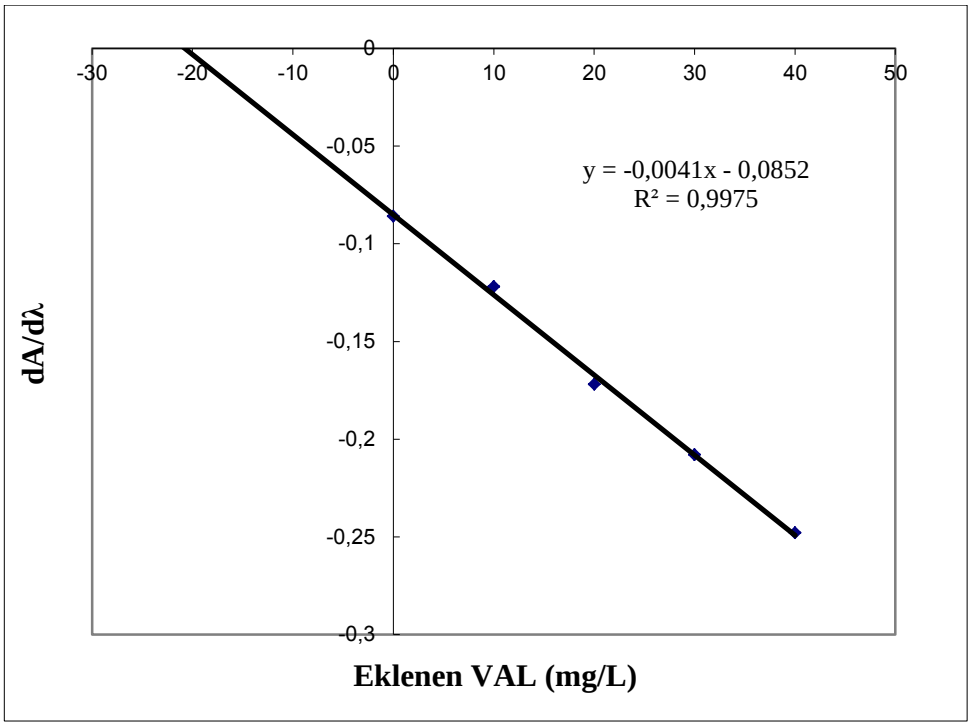
Standart Sapma, s = 1,1

Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,1

**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 100,4 ± 2,7

Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ =6,7

Bölüm 3.2.3.2.'de anlatıldığı gibi amlodipin besilat ve valsartan'ı içerisinde bulunduran tablet numunesinin metanolde çözeltisine yine metanolde hazırlanmış valsartan standartları katılarak elde edilen çözeltilerin UV spektrumları alınmıştır. Valsartan'ın her derişimi amlodipin besilat'ın 15 mg/L derişiminin UV spektrumuna bilgisayar yardımıyla oranlanmıştır. Elde edilen spektrum oranlarının birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Bu eğrilerden yararlanarak eklenen standart derişimine karşı absorbans değerleri 231,3 nm'de grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin x eksenini kestiği noktadan yararlanarak valsartan derişimleri bulunmuştur. Standart ekleme yöntemiyle elde edilen grafik şekil 4.33.'de gösterilmiştir. Bulunan sonuçlar çizelge 4.22.'de verilmiştir.



Şekil 4.32. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlerde valsartan için 231,3 nm'de spektrum oranı birinci türev UV standart ekleme grafiği

Çizelge 4.24. Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren tabletlere valsartan için spektrum oranları birinci türev UV spektrofotometri standart ekleme tekniği uygulanarak elde edilen analiz sonuçları ve istatistik değerlendirmesi (λ = 231,3 nm)

Deney No	Alınan, mg/mL	Bulunan*, mg/mL	Geri Kazanım, %
1	20	20,780	103,9
2	20	20,488	102,0
3	20	20,976	105,6
Deney Sayısı, N = 3			
Ortalama Değer = $\bar{x}$ = % 103,8			
Standart Sapma, s = 1,8			
Bağıl Standart Sapma, BSS = $(s/\bar{x})\times 100$ = % 1,7			
**Güven Aralığı = $\bar{x} \pm t\, s/\sqrt{N}$ = % 103,8 ± 4,5			
Tekrarlanabilirlik, r = $ts\sqrt{2}$ = 10,9			

Bu sonuçlar kullanılarak amlodipin ve valsartan etken maddelerini birlikte içeren preparatlarda birinci türev spektrofotometri ile spektrum oranları birinci türev

spektrofotometri yöntemleri karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon ve standart ekleme teknikleri kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.

Kalibrasyon Tekniği

Birinci türev spektrofotometri ile spektrum oranları birinci türev spektrofotometri yöntemlerine uygulanan kalibrasyon tekniklerinin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırılmış ve F testi uygulanmıştır.

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için amlodipin besilat'a uygulandığında, F değeri;

$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0,704^2}{0,425^2} = 2,74$ olarak bulunur (s_1, birinci türev spektrofotometrinin standart sapması; s_2, spektrum oranları birinci türev spektrofotometrinin standart sapması).

Hesaplanan F değeri = 2,74 çizelgeden bulunan $F_{3,3}$ = 9,28 kritik değerden küçük olduğu için (2,74 < 9,28) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır.

Birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 13,741; spektrum oranları birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 13,548' dir. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2 - 2$ olup, 4 + 4 – 2 =6'dır. Ek 1'deki çizelgeden %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 6 için bulunan t değeri 2,45'tir.

Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 0,582 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2,45.0,582\sqrt{\frac{8+4}{8.4}}$ = 1,008 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ = $|13,741 - 13,548|$ = olarak bulunur. $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ = 0,193 < $t.s_{biriktirilmiş}\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$ = 1,008 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için valsartan'a uygulandığında, F değeri;

$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{4{,}124^2}{1{,}487^2}$ = 7,692 olarak bulunur (s_1, birinci türev spektrofotometrinin standart sapması; s_2, spektrum oranları birinci türev spektrofotometrinin standart sapması).

Hesaplanan F değeri = 2,857 çizelgeden bulunan $F_{3,3}$ = 9,277 kritik değerden küçük olduğu için (2,857 < 9,277) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır.

Birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 157,857 ;spektrum oranları birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 163,071' dir. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2$ -2 olup, 4 + 4 – 2 =6'dır. %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 6 için bulunan t değeri 2,45'tir.

Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 3,1 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2{,}45.3{,}1\sqrt{\frac{4+4}{4.4}}$ = 5,37 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = $\left|157{,}857 - 163{,}071\right|$ = 5,214 olarak bulunur. $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = 5,214 < $t.s_{biriktirilmiş}\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$ = 5,37 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

Standart Ekleme

Birinci türev spektrofotometri ile spektrum oranları birinci türev spektrofotometri yöntemlerine uygulanan standart ekleme tekniklerinin kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığı araştırılmış ve F testi uygulanmıştır.

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için amlodipin besilat'a uygulandığında, F değeri;

$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{1{,}1^2}{0{,}8^2}$ = 1,89 olarak bulunur (s_1, spektrum oranları birinci türev spektrofotometrinin standart sapması; s_2, birinci türev spektrofotometrinin standart sapması).

Hesaplanan F değeri = 1,89; çizelgeden bulunan $F_{2,2}$ = 19 kritik değerden küçük olduğu için (1,89 < 19) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır.

Birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 100,3 ;spektrum oranları birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 100,4'tür. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2$ -2 olup, 3 + 3 – 2 =4'dır. Çizelgeden %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 6 için bulunan t değeri 2,78'dir.

Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 0,79 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2{,}78.0{,}79\sqrt{\frac{3+3}{3.3}}$ = 1,79 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = $\left|100{,}3 - 100{,}4\right|$ = 0,1 olarak bulunur. $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = 0,1 < $t.s_{biriktirilmiş}\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$ = 1,79 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

Eşitlik 4.1 her iki yöntem için valsartan'a uygulandığında, F değeri;

F = $\frac{s_1^{\,2}}{s_2^{\,2}}$ = $\frac{1{,}9^2}{1{,}8^2}$ = 1,11 olarak bulunur (s_1, birinci türev spektrofotometrinin standart sapması; s_2, spektrum oranları birinci türev spektrofotometrinin standart sapması).

Hesaplanan F değeri = 1,11; çizelgeden bulunan $F_{3,3}$ = 19 kritik değerden küçük olduğu için (1,11 < 19) söz konusu iki yöntemin uygulanması sonucu elde edilen kesinliklerde % 95 güven seviyesinde anlamlı bir fark yoktur.

Ayrıca bu iki yöntem arasında fark olup olmadığı araştırılmış ve T testi uygulanmıştır.

Birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_1$) 102,2 ;spektrum oranları birinci türev spektrofotometri yöntemi ile bulunan ortalama değer ($\bar{x}_2$) 103,8' dir. Serbestlik derecesi $N_1 + N_2$ -2 olup, 3 + 3 – 2 = 4'tür. %95 güven seviyesinde serbestlik derecesi 4 için bulunan t değeri 2,87'dir.

Eşitlik (4.2)' de değerler yerine konulursa $s_{biriktirilmiş}$ = 1,85 olarak bulunur. Bu değer (4.3) eşitliğinde yerine konursa; $2{,}78.1{,}85\sqrt{\frac{3+3}{3.3}}$ = 4,20 değeri hesaplanır. Ortalalma farkı $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = $\left|102{,}2 - 103{,}8\right|$ = 1,6 olarak bulunur. $\left|\bar{x}_1 - \bar{x}_2\right|$ = 1,6 < $t.s_{biriktirilmiş}\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$ = 4,2 olduğundan %95 güven seviyesinde iki yöntem arasında anlamlı bir fark yoktur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Yüksak lisans tez çalışması kapsamında ilaç piyasasında geniş bir kullanım alanına sahip olan amlodipin besilat, valsartan ve amlodipin besilat-valsartan etken maddelerini içeren ilaç preparatlarına tayini için spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir.

Amlodipin etken maddesini tek başına içeren preparatlarda etken madde tayini için ultraviyole spektrofotometrik ve birinci türev UV spektrofotometrik yöntemler önerilmiştir. Bu yöntemlerde kullanılan dalga boyları, çalışma denklemi, geri kazanım sonuçları hesaplanarak karşılaştırma istatistik testleri yapılmıştır. Çizelge 5.1.'de toplu sonuçlar görülmektedir. Amlodipin besilat için denklem değerleri, çalışma arlığı ve tayin sınırları şekil 5.3.'de görülmektedir.

Valsartan etken maddesini tek başına içeren preparatlarda etken madde tayini için ultraviyole spektrofotometrik ve birinci türev UV spektrofotomtrik yöntemler önerilmiştir. Bu yöntemlerde kullanılan dalga boyları, çalışma denklemi, geri kazanım sonuçları hesaplanarak karşılaştırma istatistik testleri yapılmıştır. Çizelge 5.1.'de toplu sonuçlar görülmektedir. Valsartan için denklem değerleri, çalışma arlığı ve tayin sınırları şekil 5.3.'de görülmektedir.

Amlodipin besilat ve valsartanı birlikte içeren ilaç preparatlarında ise her birinin tayini için öncelikle birinci türev spektrofotometri önerilmiş ve bu yöntemle elde edilen sonuçlar spektrum oranları birinci türev spektrofotometresiyle karşılaştırılmıştır. Çizelge 5.2.'de toplu sonuçlar görülmektedir. Amlodipin besilat-Valsartan için denklem değerleri, çalışma aralığı ve tayin sınırları şekil 5.3.'de görülmektedir.Aynı zamanda laboratuarda sentetik olarark karışımlar hazırlanıp geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bununla ilgili sonuçlar çizelge 5.4.' de görülmektedir. Hesaplamalar sonucu ulaşılan değerler yöntemlerin kesinlik ve doğruluğunu oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 5.1. Amlodipin ve valsartan etken maddelerini içeren preparatlar için toplu sonuçlar

ETKEN MADDE / YÖNTEM		Amlodipin Besilat			Valsartan		
		Doğrudan		Birinci türev	Doğrudan	Birinci türev	
Kalibrasyon	**Dalga Boyu, λ**	**237,3**	**360**	**246**	**249**	**234,2**	**263**
	N	8	8	8	8	8	8
	$\bar{x}$	99,6	99,1	98,6	104,6	110,2	111,2
	S.S	1,8	1,3	2,2	1,4	1,5	0,6
	B.S.S	1,8	1,3	2,2	1,4	1,4	0,5
	G.A	1,5	1,1	1,8	1,2	1,2	0,5
	Tekr	6	4,4	7,4	4,7	5	2
Standart ekleme	**Dalga Boyu, λ**	**237,3**	**360**	**246**	**249**	**234,2**	**263**
	N	4	4	4	4	4	4
	$\bar{x}$	97,3	99,8	100,2	106,5	104,7	113
	S.S	1	1,5	2	1,7	2,5	0,6
	B.S.S	1	1,5	2	1,6	2,4	0,6
	G.A	1,6	2,4	3,1	2,7	3,9	0,9
	Tekr	4,6	7	8,9	7,7	11,1	2,6
F testi	F bulunan	1,33		1,21	1,47	1,33	
	F kritik	4,35		8,89	4,35	8,89	
T testi	$\lvert\bar{x}_1 - \bar{x}_2\rvert$	0,7		1,6	1,9	1,5	
	t.sbir $\sqrt{\frac{N_1+N_2}{N_1 N_2}}$	1,89		2,92	2,06	1,98	

Çizelge 5.2. Amlodipin besilat ve valsartan etken maddelerini birlikte içeren preparatlar için toplu sonuçlar

ETKEN MADDE / YÖNTEM		Amlodipin Besilat		Valsartan	
		Birinci türev	**Spektrum oranı Birinci türev**	**Birinci türev**	**Spektrum oranı Birinci türev**
Kalibrasyon	**Dalga Boyu, λ**	**243,6**	**344,4**	**289**	**231,3**
	N	4	4	4	4
	$\bar{x}$	13,741	13,548	157,858	163,071
	S.S	0,705	0,425	4,124	1,487
	B.S.S	5,127	3,141	2,612	0,912
	G.A	1,120	0,677	6,557	2,364
	Tekr	3,169	1,914	18,546	6,686
F testi	F bulunan	2,74		7,69	
	F kritik	9,28		9,28	
Ttesti	$\lvert\bar{x}_1 - \bar{x}_2\rvert$	0,193		5,214	
	t.sbir $\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$	1,008		5,370	
Standart ekleme	**Dalga Boyu, λ**	**243,6**	**344,4**	**289**	**231,3**
	N	3	3	3	3
	$\bar{x}$	100,3	100,4	102,2	103,8
	S.S	0,8	1,1	1,9	1,8
	B.S.S	0,8	1,1	1,9	1,7
	G.A	2,0	2,7	4,7	4,5
	Tekr	4,9	6,7	11,5	10,9
F testi	F bulunan	1,89		1,11	
	F kritik	19,00		19,00	
T testi	$\lvert x_1 - x_2\rvert$	0,1		1,60	
	t.sbir $\sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$	1,79		4,2	

Çizelge 5.3. Denklem değerleri

Tek başına amlodipin besilat ve valsartan							
Etken Madde		**Amlodipin Besilat**			**Valsartan**		
Yöntem		**Doğrudan**		**Türev**	**Doğrudan**	**Türev**	
Kalibrasyon	**Dalga Boyu, λ**	237,3	360	246	249	234,2	263
	m	0,0392	0,0137	-0,0018	0,0248	-0,0014	-0,0009
	n	-0,0168	-0,0072	0,0001	0,0087	-0,0003	-0,0003
	r	0,9994	0,999	0,9992	0,9997	0,9987	0,9987
	çalışma aralığı(mg/L)	3,0-18,0	3,0-18,0	3,0-18,0	10,0-60,0	10,0-60,0	10,0-60,0
Standart Ekleme	M	0,0335	0,0114	0,0015	0,0268	-0,0015	-0,001
	N	0,2274	0,0785	0,0107	0,5764	-0,0312	-0,0226
	R	1	0,9962	0,9987	0,9989	0,9969	0,9987
	çalışma aralığı(mg/L)	3,0-18,0	3,0-18,0	3,0-18,0	10,0-60,0	10,0-60,0	10,0-60,0
Amlodipin besilat – Valsartan karışımı							
Etken Madde		**Amlodipin Besilat**			**Valsartan**		
Yöntem		**Birinci türev**		**Spektrum oranı birinci türev**	**Birinci türev**	**Spektrum oranı birinci türev**	
Kalibrasyon	**Dalga Boyu, λ**	243,6	248,8	344,4	237,2	289	231,3
	M	-0,0017	-0,0017	1,0124	-0,0011	-0,0003	-0,004
	N	0,0007	0,001	-0,6078	-0,0003	0,0005	-0,0052
	R	0,997	0,9975	0,9986	0,9994	0,9979	0,9989
	çalışma aralığı(mg/L)	3,0-18,0	3,0-18,0	3,0-18,0	10,0-60,0	10,0-60,0	10,0-60,0
Standart Ekleme	M	-0,0013		0,8285		-0,0003	-0,0041
	N	-0,0072		4,674		-0,006	-0,0852
	R	0,9952		0,9969		0,9973	0,9975
	çalışma aralığı(mg/L)	3,0-18,0		3,0-18,0		10,0-60,0	10,0-60,0

Çizelge 5.4. Sentetik karışımlar için analiz sonuçları ve istatistik testler

Etken Madde	Yöntem	Dalga Boyu, λ	N	$\bar{x}$	S.S	B.S.S	G.A	Tekr
AMLODİPİN	**Birinci türev**	243,6	3	98,5	0	0	0	0
		248,8	3	98,6	0	0	0	0
	Spektrum oranı birinci türev	344,4	3	106,1	1,2	1,2	3,0	7,3
VALSARTAN	**Birinci türev**	237,2	3	99,5	1,5	1,5	3,7	9,1
		289	3	100,0	0	0	0	0
	Spektrum oranı birinci türev	231,3	3	98,1	0,5	0,5	1,2	3,0

5.2 Öneriler

Yüksek lisans çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurularak geliştirdiğimiz yöntemlerin kısa sürede yapılabilmesi, hiçbir ayırma işlemi gerektirmemesi, doğru, basit olması nedeniyle tüm araştırma geliştirme laboratuarlarında kullanılabilir olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abdallah, O.M., Badawey A.M., 2011 Determination of amlodipine and valsartan in binary mixture using derivative- ratio spectrophotometric, chemometric and high-performance liquid chromatographic-UV methods, *International Journal of Industrial Chemistry,* basımda

Basavaiah, K., Chandrashekar, U., Prameela, H.C., 2003, Sensitive spectrophotometric determination of amlodipine and felodipine using iron (III) and ferricyanide, *Il Farmaco,* 58, 141-148.

British Pharmacopoeia, 1999.

Cagıgal, E., Gonzales, L., Alonso, R.M., Jımenez, R.M., 2001, pK determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spetrofluorimetry, *J.Pharm. Biomed. Anal*, 26 (3), 477-86.

Carluccı, G., DI Carlo, V., Mazzeo, P., 2000, Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography, *Analytıcal Letters*, 33 (12), 2491-2500.

.

Çetin, G., 1996, Bazı antihipertansif ilaçların spektrofotometrik ve sıvı kromatografik analizi, Doktora Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 1, 5-7

Erk, N., 2002, Spectrophotometrıc analysıs of valsartan and hydrochlorothıazıde, *Analytical Letters*, 35 (2), 283-302.

Gonzales, L., Akesolo,U., Alonso, R.M., Jımenez, R.M., 2002, Application of capillary zone electrophoresis tothe screening of some angiotensin II receptor antagonists. *Electrophoresis*, 23 (2), 23-29.

.

Hıllaert, S., Van Den Bossche, W., 2002, Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the analysis of several angiotensin -II- receptor antagonists, *Journal of Chromatography*A, 979, (1-2), 323-333.

Kadam, BR., Bari SB., 2007, Quantative analysis of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high performance thin-layer chromatography with ultraviolet absorption densitometry, *Acta chromatographıa,* 18, 260-269.

Kadrile, D.P. , Kalyane, N.V., Thakkar, T.H., Patel, M.R., Moradiya, R.K., 2010,. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil drug formulations by HPLC and UV-spectrophotometric methods, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,* 2 (9), 599-614.

Kaya, B., 2007, Kombine farmasötik preparatlardan telmisartan ve hidroklorotiyazid'in kemometrik kalibrasyon yöntemleriyle aynı anda miktar tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara,1

Küçükkolbaşı, S.,2003, imidazol türevi ilaçlarda etken madde tayini için spektroflorimetrik yöntem geliştirilmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya

Lıu, F., Zhang, JD., Xu, Y., Gao, S., Guo, QX., 2008, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in human plazma by liqid chromatohgraphy/tandem mass spectrometry, *Analytıcal Letters*, 41 (8), 1348-1365.

Nie, J., Zhang, M., Fan, Y., Wen, Y., Xıang, B., Feng, Y.Q., 2005, Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of anjiotensin II reseptor antagonists in human plasma and urine, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed, Life Sc.i*, 828 (1-2), 62-9.

Prasad, C.V.N., Saha, R.N., Parimoo, P., 1999, Simultaneous determination of amlodipine-enalapril maleate and amlodipine-lisinopril in combined tablet preparations by derivative spectrophotometry, *Pharm. Pharmacol. Commun*, 5, 383-388.

Ragno, G., Garofalo, A,. Vetuschi, C., 2002, Photodegradation monitoring of amlodipine by derivative spectrophotometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27, 19-24.

Rahman, N., Azmi S.N.H., 2001, Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate with ninhydrin in drug formulations, *Il Farmaco*, 56, 731-735.

Rahman, N., Singh, M., Hoda, N,Md., 2004, Application of oxidants to the spectrophotometric determination of amlodipine besylate in pharmaceutical formulations, *Il Farmaco*, 59, 913-919.

Rathee, P., Rathee, S., Thakur S., Kumar,V., 2010, Simultaneous estimation of Amlodipine Besylate and Lisinopril Dihydrate as A.P.I. and in tablet dosage forms by modified form of simultaneous equation method using derivative UV-Spectrophotometry, *International Journal of PharmTech Research*, 2 (1), 556-562.

Satana, E., Altınay, S., Goger, N.G., Ozkan, S.A., Senturk, Z., 2001, Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by first–derivative ultraviolet spectrophotometry and LC, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 25 (5–6), 1009–1013.

Shaalan, R.A., Belal T.S., 2010, Simultaneous spectrofluorimetric determination of amlodipine besylate and valsartan in their combined tablets, *Drug Testing and Analysis, basımda,489-493*

Skoog, DA., Holler, FJ., Nieman, TA., 1999, Principles of instrümental analysis fifty edition, Cilt no, Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Enstrümental Analiz İlkeleri 2, Bilim Yayıncılık, 502-503

Stolarczyk, M., Anna, M. and Krzek J., 2008, Chromatographic and densitometric analysis of hydrochlorothiazide, valsartan, kandesartan, and enalapril in selected complex hypotensive drugs, *Journal of Lıquıd Chromatography & Related Technologıes*, 31 (13), 1892-1902.

Stolarczyk, M., Apola, A., Krzek, J., Lech, K., 2008 Simultaneous determination of triamterene and hydrochlorothiazide in tablets using derivative spetrophotometry, *Acta Polonıae Pharmaceutica*, 65 (3), 283-287

Tatar, S., Saglık, S., 2002, Comparison of UV- and second derivative spectrophotometric and LC methods for the determination of valsartan in pharmaceutical formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 371-375.

Tian, DF., Tian, XL., Tian, T., Wang, ZY., Mo, FK., 2008, Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by RP-HPLC, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70 (3), 372-U7

Uyguner, N., 2010, Eprosartan ve hidroklorotiazit'in tabletlerde türev spektrofotometri ile miktar tayini, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 31-36, 41-43

Özen, G., 2009, Farmasötik kremlerde UV türev spektrofotometrisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri ile izokonazol nitrat ve diflukortolon valerat miktar tayini, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 20-24

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Hasan Uysal
Uyruğu	**:**	T.C
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Silifke 15.01.1985
Telefon	**:**	0536 207 84 47
Faks	**:**	
e-mail	**:**	haskimya@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Karaman YDA Lise	2004
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi	2014
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**

UZMANLIK ALANI

Analitik Kimya

YABANCI DİLLER

İngilizce