

**ZOFENOPRİL VE HİDROKLOROTİYAZİTİN
KAPİLER ELEKTROFOREZ VE YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMLERİ İLE FARMASÖTİK
PREPARATLARINDAN MİKTAR TAYİNİ**

**Yüksek Lisans Tezi
Sadık Onur AYRANCI
Eskişehir 2019**

**ZOFENOPRİL VE HİDROKLOROTİYAZİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ
VE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ
İLE FARMASÖTİK PREPARATLARINDAN MİKTAR TAYİNİ**

Sadık Onur AYRANCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1705S118 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sadık Onur AYRANCI'nın "Zofenopril ve Hidroklorotiyazitin Kapiler Elektroforez ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile Farmasötik Preparatlarından Miktar Tayini" başlıklı tezi 20/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Dr. Öğr. Üy. Arın Gül DAL POÇAN

Üye : Dr. Öğr. Üy. Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Üye : Doç. Dr. Erol ŞENER

Prof.Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü



ÖZET

ZOFENOPRİL VE HİDROKLOROTİYAZİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ VE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE FARMASÖTİK PREPARATLARINDAN MİKTAR TAYİNİ

Sadık Onur AYRANCI

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Arın Gül DAL POÇAN

Bu çalışmada Zofenopril (ZOF) ve hidroklorotiyazitin (HCT) farmasötik preparatlarından tayini için bir kapiler elektroforez (KE) yöntemi geliştirilmiş ve yöntemi karşılaştırmak için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi kullanılmıştır. Yöntemlerde iç standart (IS) olarak telmisartan (TEL) kullanılmış ve deteksiyon foto diyot dizisi (DAD) detektörle sağlanmıştır. KE yönteminde ayırım 75 µm iç çapa ve 40 cm efektif uzunluğa sahip balon hücreli kapiler ile sağlanmıştır. Optimum koşullar çalışma tamponu olarak %15 metanol içeren 10 mM borat tamponu (pH 9,00) ve 25 kV potansiyelin uygulanması ile elde edilmiştir. Bu koşullar altında ZOF, HCT ve IS'nin göç zamanları sırasıyla 4,67 dakika (dk), 3,38 dk ve 4,25 dk olarak gözlenmiştir. YPSK yönteminde ayırım için C8 kolon (3,0×150,0 mm, 3,5 µm iç çap) ve hareketli faz olarak %1 fosforik asit (H₃PO₄) içeren %10 asetonitril ve %1 H₃PO₄ içeren asetonitril çözeltileri gradient oluşturulacak şekilde 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu yöntemde ZOF, HCT ve IS'nin alıkonma zamanları sırasıyla 9,05 dk, 1,89 dk ve 6,53 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin geçerliliği doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık ve kararlılık parametreleri ile incelenmiştir. ZOF ve HCT için yöntemlerin tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla KE'de $8,28 \times 10^{-8}$ M ve $6,31 \times 10^{-8}$ M, YPSK'da ise $6,93 \times 10^{-8}$ M ve $4,40 \times 10^{-8}$ M olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen iki yöntem de ZOF ve HCT'nin tabletlerinden tayinine başarı ile uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Zofenopril, Hidroklorotiyazid, Kapiler elektroforez, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, Miktar tayini

ABSTRACT

DETERMINATION of ZOFENOPRIL and HYDROCHLOROTHIAZIDE by
CAPILLARY ELECTROPHORESIS and HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY in PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

Sadık Onur AYRANCI

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2019

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Arın Gül DAL POÇAN

In this study, a capillary electrophoresis (KE) method was developed for the determination of zofenopril (ZOF) and hydrochlorothiazide (HCT) from pharmaceutical preparations and for comparison high performance liquid chromatography (YPSK) method is used. Telmisartan (TEL) was used as internal standard (IS) and the detection was achieved by photo diode array (DAD) detector in the methods. In the CE method, the separation was performed by bubble cell capillary with an inner diameter of 75 μm and an effective length of 40 cm. Optimum conditions were obtained by applying 10 mM borate buffer containing 15% methanol (pH 9,00) and 25 kV potential. Under these conditions, the migration times of ZOF, HCT and IS were observed as 4,67 min, 3,38 min and 4,25 min. In the YPSK method, for separation C8 column (3,0 $\times$ 150,0 mm, 3,5 μm i.d.) as mobile phase; 10% acetonitrile containing 1% phosphoric acid (H_3PO_4) and acetonitrile containing 1% H_3PO_4 solutions were used in gradient system at a flow rate of 1 mL/min. In this method, the retention times of ZOF, HCT and IS were observed as 9,05 min, 1,89 min and 6,53 min, respectively. Validation of the developed methods were examined by linearity, precision, accuracy, selectivity, sensitivity and stability parameters. The limit of quantification (LOQ) values of ZOF and HCT were $8,28 \times 10^{-8}$ M and $6,31 \times 10^{-8}$ M in CE and $6,93 \times 10^{-8}$ M ve $4,40 \times 10^{-8}$ M in YPSK, respectively. Both of the developed methods were successfully applied for the determination of ZOF and HCT from tablets.

Keywords: Zofenopril, Hydrochlorothiazide, Capillary electrophoresis, High performance liquid chromatography, Determination

ÖNSÖZ

Bu çalışmada ZOF'un KE yöntemi ile miktar tayininin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu yöntem ile karşılaştırılması amacıyla da bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) yöntemi geliştirilmiştir.

Yüksek lisans tezim boyunca bana sabır ve ilgiyle yardım eden, her alanda benden yardım ve desteklerini esirgemeyen tez hocam Dr.Öğr.Üyesi Arın Gül DAL POÇAN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunan, benimle tüm bilgi ve birikimleri paylaşan hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her alanında yanımda bulunan ve her koşulda bana destek olan sevgili aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durum saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Sadık Onur Ayrancı

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. ADE İnhibitörleri	3
2.2. ZOF'un Farmakolojik Özellikleri	3
2.3. ZOF'un Farmakokinetik Özellikleri	4
2.4. HCT'nin Farmakolojik Özellikleri.....	4
2.5. HCT'nin Farmakokinetik Özellikleri	4
2.6. Kullanılan Yöntemler	5
2.6.1. KE yöntemi.....	5
2.6.2. YPSK yöntemi.....	7
2.7. ZOF'un Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	9
2.8. HCT'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	10
2.9. ZOF'un Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar	10
3. GEREÇLER	16
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	16
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	16
4. YÖNTEMLER	17
4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı.....	17
4.2. Kapiler Elektrophorez Yöntemi	17
4.2.1. Cihazla ilgili koşullar	17
4.2.2. Çalışma tamponu.....	18

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
4.2.3. Optimizasyon çalışmaları	18
4.2.3.1. <i>Tampon derişimi</i>	18
4.2.3.2. <i>pH</i>	19
4.2.3.3. <i>Organik çözücü oranı</i>	19
4.2.3.4. <i>Potansiyel</i>	19
4.2.4. Validasyon çalışmaları	19
4.2.4.1. <i>Doğrusallık</i>	20
4.2.4.2. <i>Kesinlik</i>	20
4.2.4.3. <i>Doğruluk</i>	20
4.2.4.4. <i>Duyarlılık</i>	20
4.2.4.5. <i>Kararlılık</i>	21
4.3. YPSK Yöntemi	21
4.3.1. Cihaz ile ilgili koşullar	21
4.3.2. Hareketli fazın hazırlanışı	21
4.3.3. Optimizasyon çalışmaları	21
4.3.3.1. <i>Dalga boyu</i>	22
4.3.3.2. <i>Hareketli faz bileşimi</i>	22
4.3.3.3. <i>Akış hızı</i>	22
4.3.4. Validasyon	23
4.3.4.1. <i>Doğrusallık</i>	23
4.3.4.2. <i>Kesinlik</i>	23
4.3.4.3. <i>Doğruluk</i>	23
4.3.4.4. <i>Duyarlılık</i>	24
4.3.4.5. <i>Kararlılık</i>	24
4.4. Yöntemlerin Uygulanması	24
5. BULGULAR VE YORUM	25
5.1. KE Yöntemi	25
5.1.1. Optimizasyon	25
5.1.1.1. <i>Tampon derişimi</i>	25
5.1.1.2. <i>pH</i>	26

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
5.1.1.3. <i>Organik çözücü</i>	27
5.1.1.4. <i>Uygulanan potansiyel</i>	28
5.1.1.5. <i>İç standart</i>	29
5.1.2. Validasyon	31
5.1.2.1. <i>Doğrusallık</i>	31
5.1.2.2. <i>Kesinlik</i>	33
5.1.2.3. <i>Doğruluk</i>	33
5.1.2.4. <i>Seçicilik</i>	35
5.1.2.5. <i>Duyarlılık</i>	36
5.1.2.6. <i>Kararlılık</i>	36
5.1.2.7. <i>Sistem uygunluk testleri</i>	37
5.2. YPSK Yöntemi	38
5.2.1. Optimizasyon	38
5.2.1.1. <i>Dalga boyu</i>	38
5.2.1.2. <i>Hareketli faz bileşimi</i>	39
5.2.1.3. <i>Akış hızı</i>	40
5.2.1.4. <i>pH</i>	40
5.2.2. Validasyon	41
5.2.2.1. <i>Doğrusallık</i>	41
5.2.2.2. <i>Kesinlik</i>	43
5.2.2.3. <i>Doğruluk</i>	44
5.2.2.4. <i>Seçicilik</i>	46
5.2.2.5. <i>Duyarlılık</i>	46
5.2.2.6. <i>Kararlılık</i>	47
5.2.2.7. <i>Sistem uygunluk testleri</i>	47
5.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	48
5.4. Yöntemlerin Karşılaştırılması.....	53
6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	55
KAYNAKÇA.....	58
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. KE yönteminde elektroozmotik akış şeması	5
Şekil 2.2. KE sisteminin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3. YPSK sisteminin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.4. ZOF'un açık kimyasal formülü	9
Şekil 2.5. HCT'nin açık kimyasal formülü.....	10
Şekil 5.1. Çalışma tamponu derişimi incelemesi.....	26
Şekil 5.2. Çalışma tamponu pH incelemesi.....	27
Şekil 5.3. Çalışma tamponundaki organik çözücü oranı incelemesi	28
Şekil 5.4. Uygulanan potansiyelin incelemesi.....	29
Şekil 5.5. Optimum koşullar altında analizi gerçekleşen TEL ait elektroferogram	30
Şekil 5.6. Optimum koşullar altında ZOF-HCT-TEL'e ait elektroferogram	30
Şekil 5.7. KE yöntemi ile ZOF'un doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi	31
Şekil 5.8. KE yöntemi ile HCT'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi	32
Şekil 5.9. Tablet matriksine ait elektroferogram	36
Şekil 5.10. Maddelerin 225 nm'deki kromatogramı.....	39
Şekil 5.11. Hareketli faz bileşimi incelemesi	39
Şekil 5.12. Optimum koşullar altında analiz edilen ZOF, HCT ve TEL'e ait kromatogram	41
Şekil 5.13. YPSK yönteminde ZOF'un doğrusal olduğu aralığın grafiksel görünümü..	42
Şekil 5.14. YPSK yönteminde HCT'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel görünümü	42
Şekil 5.15. YPSK yöntemi ile tablet matriks ortamına ait kromatogram	46
Şekil 5.16. ZOF tablet analizine ait elektroferogram	49
Şekil 5.17. ZOF ve HCT içeren tablet analizine ait elektroferogram.....	49
Şekil 5.18. ZOF tablet analizine ait kromatogramlar	51
Şekil 5.19. ZOF ve HCT içeren tablet analizine ait kromatogramlar	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. Hareketli faz bileşimi gradient oranları gösterimi.....	22
Çizelge 5.1. ZOF'un KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	32
Çizelge 5.2. HCT'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri	32
Çizelge 5.3. ZOF'un KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	33
Çizelge 5.4. ZOF'un KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri	33
Çizelge 5.5. ZOF'un KE yöntemi ile doğruluk verileri.....	34
Çizelge 5.6. HCT'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri.....	34
Çizelge 5.7. ZOF'un KE yöntemi ile kararlılık verileri	37
Çizelge 5.8. HCT'nin KE yöntemi ile kararlılık verileri	37
Çizelge 5.9. ZOF ve HCT'nin KE yöntemi ile sistem uygunluk verileri	37
Çizelge 5.10. ZOF'un YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri.....	43
Çizelge 5.11. HCT'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri	43
Çizelge 5.12. ZOF'un YPSK yöntemi ile kesinlik verileri.....	43
Çizelge 5.13. HCT'nin YPSK yöntemi ile kesinlik verileri	44
Çizelge 5.14. ZOF'un YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	44
Çizelge 5.15. HCT'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri	45
Çizelge 5.16. ZOF'un YPSK yöntemi ile kararlılık verileri	47
Çizelge 5.17. HCT'nin YPSK yöntemi ile kararlılık verileri	47
Çizelge 5.18. ZOF'un YPSK yöntemi ile sistem uygunluk verileri	48
Çizelge 5.19. HCT'nin YPSK yöntemi ile sistem uygunluk verileri	48
Çizelge 5.20. ZOF tabletlerinin KE yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi	50
Çizelge 5.21. ZOF ve HCT tabletlerinin KE yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi	50
Çizelge 5.22. ZOF tabletlerinin YPSK yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi	52
Çizelge 5.23. ZOF ve HCT tabletlerinin YPSK yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi	52
Çizelge 5.24. Yöntemlerin karşılaştırılması	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik faktörü
ADE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
a	: Eğim
As	: Asimetri faktörü
b	: Kesim
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
DAD	: Foto diyot dizisi
dk	: Dakika
GA	: Güven aralığı
h	: Hacim
HCT	: Hidroklorotiyazit
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
ICH	: Uluslararası uyum konferansı
IS	: İç standart
k'	: Kapasite faktörü
KE	: Kapiler elektroforez
LC-MS	: Kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	: Tandem (dizili) kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
n	: Deney sayısı
N	: Tabaka sayısı
NaOH	: Sodyum hidroksit
Ort	: Ortalama
PNO	: Pik normalizasyon oranı
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Döngü/dakika
Rs	: Ayrım gücü
SD	: Serbestlik derecesi
Ss	: Standart sapma

TEL	: Telmisartan
USP	: Amerikan Farmakopesi
UV	: Mor ötesi
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ZOF	: Zofenopril

1. GİRİŞ

ZOF uzun süreli doku penetrasyonu ve kardiyak ADE inhibisyonu ile karakterize bir ADE inhibitörüdür. Hafif ve orta şiddette hipertansiyonun tedavisi ve hemodinamik olarak stabil, kalp yetmezliği belirti ve semptomları olan akut miyokard infarktüsli hastaların tedavisinde endikedir (Rx-Media, 2019). HCT ise ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazit yapılı bir diüretiktir. Tiazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla beraber kullanılırlar. ZOF ile tiazit grubu diüretik olan HCT'nin sabit dozlu kombinasyonu hafif ve orta derecede esansiyel hipertansiyonun tedavisinde kullanılır. Kombinasyondaki her iki bileşen birlikte aditif hipertansif etki gösterirler. ZOF ve HCT'nin kombine kullanımı Dünya Anti-Doping Ajansı'nın 2019 yılı kullanımı her zaman yasaklı maddeler listesinde 'idrar söktürücüler ve diğer maskeleyici maddeler' başlığı altında yer almaktadır (Rx-Media, 2019). Bu nedenle bu etkin maddelerin eş zamanlı miktar tayinleri önem taşımaktadır.

ZOF ve HCT'nin miktar tayinine yönelik yapılmış çalışmalar incelendiğinde ağırlıklı olarak kromatografik yöntemlerle (Carlucci, Di Federico ve Iuliani, 2010, s.1717; Devika, Sudhakar ve Venkateshwara, 2012, s.999; Kurbanoglu, Gumustas ve Ozkan, 2013, s.198; Sağlık Aslan, 2011, s.259; Bouaissi ve Hamida, 2015, s.271; Dal Bo, Mazzucchelli ve Marzo, 2000, s.287; Ramesh, Nageswara ve Nageswara, 2014, s.209; Tian, vd., 2014, s.253; Jiand, vd., 2011, s.527; Kwok, vd., 2016, s.41; Kwok, vd., 2017, s.89; Wyszomirska, Czerwinska, Mazurek, 2010, s.137) ve spektrofotometrik yöntemlerle (Carlucci, Di Federico ve Iuliani, 2009, s.2609; Kurbanoglu, Gumustas ve Ozkan, 2014, s.935; Stolarczyk, vd., 2015, s.66; Sbarcea, vd., 2012, s.562) karşılaşılmıştır. Bunların dışında literatürde ZOF'un elektrokimyasal yöntemlerle miktar tayinini gerçekleştiren bir çalışma (Taşdemir, Ece ve Kılıç, 2012, s.339) ve ZOF ve HCT'nin KE yöntemi ile miktar tayinini gerçekleştiren bir çalışma (Fayed, vd., 2018, s.461) bulunmaktadır.

KE yöntemi, iletken bir çözelti içindeki yüklü/yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan etkisiyle bir kapiler içerisinde hareket etmesine dayanan bir yöntemdir. KE'nin diğer ayırım yöntemlerine göre yüksek verimlilikte olması, çok küçük hacimlerde örneklerle çalışılabilmesi, madde sarfiyatının az olması ve hızlı ayırım yapabilmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Baker, 1995).

YPSK yöntemi, kolonun küçük dolgu maddeleri ile doldurulup yüksek basınç altında mobil faz geçirilmesi ile bileşenlerin ayrımının yapıldığı bir kromatografik yöntemdir (Gündüz, 2002). YPSK en çok kullanılan analitik ayırma tekniğidir. Uçucu olmayan ve ısıya dayanıklı maddelere uygulanabilmesi, inorganik iyonlara uygulanabilmesi, duyarlılığı, düşük madde sarfıyatı gibi özellikleri bakımından en yaygın kullanılan yöntemdir (Skoog, West ve Holler, 1999, s.701).

Bu çalışmada KE yöntemi kullanılarak ZOF içeren farmasötik preparatlarında ZOF içerik tekdüzeliğinin tayin edilmesi için hızlı, kolay ve seçici bir yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. ZOF'un piyasada hem tek başına hem de HCT ile kombine preparatları bulunduğu için tüm çalışma HCT ile birlikte yürütülmüştür.

KE yöntemini karşılaştırmak amacı ile bir YPSK yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu yöntemin de geçerliliği gösterildikten sonra yöntem ZOF içeren farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

Yöntemlerin geçerliliği doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık ve kararlılık parametreleri ile incelenmiştir. Ayrıca her iki yöntemin de sistem uygunluğu parametreleri hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemler ZOF içeren farmasötik preparatlara uygulanmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. ADE İnhibitörleri

ADE inhibitörleri kalp yetmezliğinin tedavisinde ilk seçenek ilaçlardır. Bu grup ilaçlar refleks olarak kardiyak debiyi, atım hızını ve kasılma gücünü artırmadan periferik direnci azaltarak kan basıncını düşürürler. Bu ilaçlar anjiyotensin I'ı güçlü bir vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye çeviren ADE'yi bloke ederler. Dönüştürücü enzim aynı zamanda bradikininin yıkılmasından da sorumludur. Vazodilatasyon, anjiyotensin II'nin konsantrasyonunun azalmasıyla, vazokonstriksiyonun azalması ve artmış bradikardinin güçlü vazodilatör etkisinin ortak sonucu olarak ortaya çıkar. Dolaşımdaki anjiyotensin II konsantrasyonunu azaltan ADE inhibitörleri aldosteron salınımını azaltırlar ve bunun sonucunda sodyum ve su tutulumu azalır. ADE inhibitörü olan ZOF da orta ve hafif şiddeti hipertansiyonun tedavisine endikedir.

2.2. ZOF'un Farmakolojik Özellikleri

ZOF'un hipertansiyon ve akut miyokard infarktüsündeki yararlı etkileri esas olarak plazma renin-anjiyotensin aldosteron sistemini baskılamasından kaynaklanır (Rx-Media, 2019).

ZOF verilmesi hipertansiyonlu hastalarda sırtüstü yatan ve ayakta hastaların kan basıncını, kalp hızında komansatuvar bir artma olmaksızın aynı düzeyde düşürür. ZOF verilen hastalarda ortalama sistemik kan basıncı düşme eğilimi gösterir (Rx-Media 2019).

Bazı hastalarda kan basıncında optimal düzeyde bir düşme sağlanabilmesi için tedavinin birkaç hafta sürdürülmesi gerekir. Antihipertansif etkisi uzun süreli tedavide de süreklilik gösterir (Rx-Media, 2019).

ZOF'un antihipertansif etkisi araştırıldığı tüm ırklarda gösterilmiş olmasına rağmen, genelde düşük-reninli bir hipertansif popülasyonu oluşturan siyah ırktan hipertansif hastalarda ADE inhibitörü monoterapisine karşı verilen ortalama yanıt siyah ırktan olmayanlara kıyasla daha düşüktür. Bu farklılık tedaviye bir diüretik eklendiği zaman ortadan kalkar (Rx-Media, 2019).

ZOF'un miyokard infarktüsü ardından erken dönemde kullanılmasından kaynaklanan klinik etkisi ventriküler remodeling (infarktüs geçirmiş hastada prognozu olumsuz yönde etkileyen bir faktör) sürecinin sınırlandırılmasını sağlayan plazma

anjyotensin II düzeylerinde neden olduğu azalma ve vazodilatör (prostoglandin-kinin sistemi) maddelerin plazma/doku konsantrasyonlarında yaptığı artma ile ilişkili olabilir (Rx-Media, 2019).

2.3. ZOF'un Farmakokinetik Özellikleri

ZOF kalsiyum oral yoldan kullanılır. Oral yoldan alındığında hızla ve tam olarak absorbe edilir ve hemen tamamen aktif metabolit olan zofenoprilata dönüştürülür. Zofenoprilat, ZOF'un oral bir dozunu takiben 1,5 saat sonra doruk kan düzeylerine ulaşır. ZOF kalsiyumun 10-80 mg doz aralığında tek doz kinetiğı lineerdir ve 3 hafta boyunca 15-60 mg ZOF kalsiyum uygulamasından sonra bir birikme görülmemiştir. Besinlerle birlikte alınması absorbe olan miktarını değıştirmez, fakat absorpsiyon hızını azaltır. Radyoaktivite ile işaretli ZOF kalsiyum oral yoldan verildiğinde, ölçülen dolaşımdaki radyoaktivitenin yaklaşık %88'i plazma proteinlerine bağlıdır ve kararlı durum dağılım hacmi 96 L'dir. Radyoaktivite ile işaretli ZOF kalsiyum oral yoldan verildiğinde, idrarda toplam radyoaktivitenin %76'sına tekabül eden sekiz metaboliti tanımlanmıştır. Ana metabolit zofenoprilattır (%22). Zofenoprilatın yarı ömrü 5,5 saat ve Z.OF kalsiyumun oral dozundan sonra toplam vücut klirensi 1300 mL/dk'dır. İntravenöz uygulanan radyoaktivite ile işaretli zofenoprilat idrar (%76) ve feçesle (%16) elimine edilir. Buna karşın, radyoaktivite ile işaretli zofenoprilatın oral bir dozundan sonra idrara ve feçeste saptanan radyoaktivite sırasıyla %69 ve %26 olarak ölçülmüştür. Bu, ilacın dual bir eliminasyon yolu (böbrek, karaciğer) olduğunu göstermektedir. (Rx-Media, 2019).

2.4. HCT'nin Farmakolojik Özellikleri

HCT ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiyazit yapıllı bir diüretiktir. Kıvrım diüretiklerinden farklı olarak, böbrek yetmezliğı olan hastalarda etkinliğı zayıflar. HCT diabetes insipidus ve hiperkalsüri tedavisi içinde de kullanılır.

HCT'nin ht'nin başlangıç tedavisinde tek başına ya da diğeri ilaçlarla kombine kullanılır. ADE inhibitörü olan ZOF ile kombine tabletleri hafif ve orta derecede yüksek kan basıncı tedavisine endikedir (Rx-Media, 2019).

2.5. HCT'nin Farmakokinetik Özellikleri

HCT'nin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu verildiğı farmasötik şekle ve verilen doza bağılı olarak değışkenlik gösterir. Sistemik biyoyararlanımı yaklaşık %50-

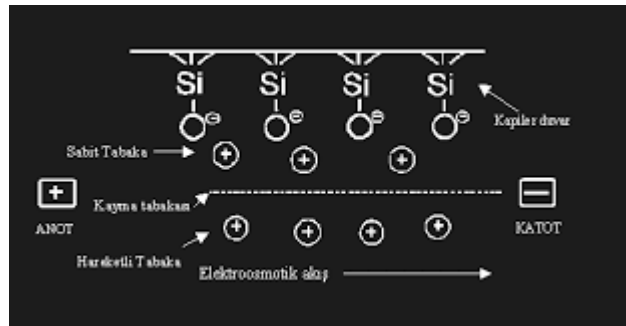
60'tır. Etkisi oral yolla verildikten 2 saat sonra başlar ve pik etki 4 saatte gözlenir. Toplam etki süresi 6-12 saattir. HCT plasentayı aşmasına rağmen kan-beyin engelini aşamaz. Anne sütüne geçebilir. HCT metabolize olmaz ve esas olarak idarla değişmeden atılır; verilen dozun %61'i 24 saatte elimine olur (Rx-Media, 2019).

2.6. Kullanılan Yöntemler

2.6.1. KE yöntemi

Yüklü taneciklerin (iyonlar, kolloidal tanecikler gibi) elektrik alan etkisiyle farklı hızlarda hareket etmelerinden yararlanılarak ayrılmasına yarayan bir metottur. Kapiler elektroforezde bir kapiler boru belli pH'da iletken bir sıvı ile doldurulur. Bu, numunenin ayrılacağı tampon çözeltidir. Numune kapilere injeksiyonla uygulanır. Kapiler üzerinde bir yüksek voltaj meydana getirilir ve oluşan elektrik alandan dolayı, numune bileşenleri kapiler boyunca farklı hızlarda hareket ederler. Pozitif bileşenler negatif elektroda, negatif bileşenler pozitif elektroda göç ederler. Kapilere belirli bir yerden bir detektörle bakıldığında, önce hızlı olan bileşenlerin, daha sonra da yavaş olan bileşenlerin geçtiği görülür (http-1).

Elektroozmotik akış madde çözeltisinin yanında çalışma tamponunun da elektrik alanının etkisi altında kapiler içinde hareket etmesidir. Elektroozmotik akışın yönü negatif yüklü katoda doğrudur. Böylece de giriş vialinden, kapilere, detektöre ve çıkış vialine doğru akış olur. Katyonlar elektroozmotik akıştan daha hızlı hareket ederek, nötr maddeler elektroozmotik akış ile aynı hızda ve anyonlar ise elektroozmotik akıştan daha yavaş hareket ederler. Elektroozmotik akış Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



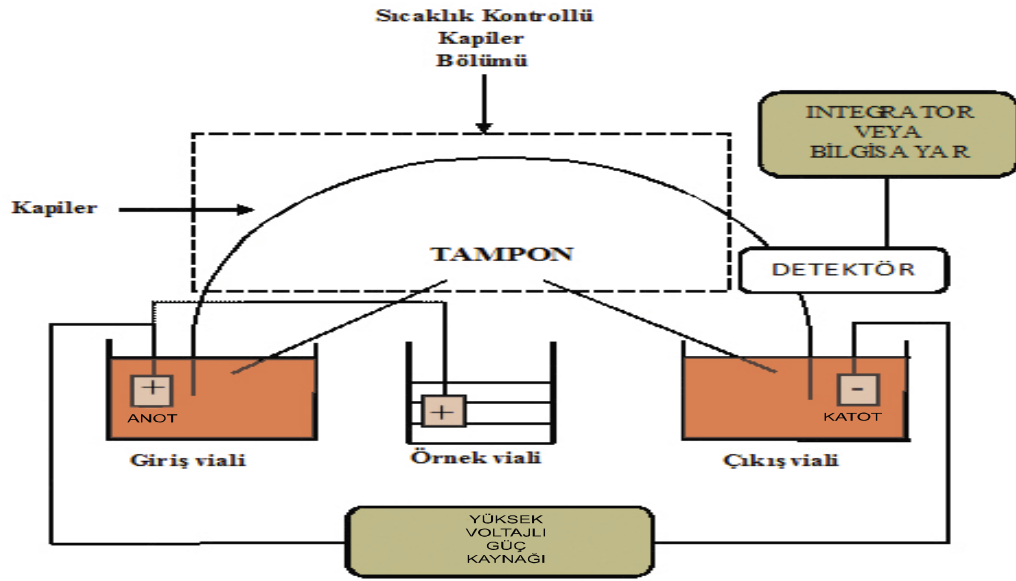
Şekil 2.1. KE yönteminde elektroozmotik akış şeması (http-2)

Pozitif yüklü katyonlar katoda yani negatif yüklü elektrota, negatif yüklü anyonlar ise anoda yani pozitif yüklü elektroda göç ederler. Elektroforetik hızları iyonların yük/kütle oranına bağlıdır. Aynı yüke sahip iyonlardan küçük bir iyon, kendisinden büyük bir iyonla göre daha hızlı göç eder. Nötr moleküller elektrik alanından etkilenmezler.

Ayrılan moleküller kapiler sonuna yerleştirilen bir detektör yardımı ile analiz edilirler. Detektör çıktısı, zamana karşı detektör yanıtının bir grafiğidir ve buna elektroferogram adı verilir.

Elektroforezde bileşiklerin iletken ortam içinde zonlar halinde hareket ettiği düşünülür. Fakat kapilere bir bileşik girdiğinde bir miktar dağılma ve dolayısıyla zonların yayılması söz konusu olur. Bu dağılma göç yönüne paralel, göç yönüne dik veya termal dağılma şeklinde olabilir. Elektrik alan uygulanması, iletken çözeltide Joule ısınmasına neden olur. Kapilerin daha sıcak olan merkezindeki moleküller daha soğuk olan kapiler duvarına yakın moleküllere göre daha hızlı göç ederler. Göç yönüne paralel ve göç yönüne dik dağılma, zon yayılması üzerine az etkilidir. Fakat termal dağılma, zon yayılmasında büyük paya sahiptir. Termal dağılmayı azaltmak için tampona bir jel gibi stabilite edici ajan eklenmesi, kapilerin çevrilerek kullanılması ya da kapilerin çapının azaltılması uygulanmalıdır.

KE'nin ana bileşenleri örnek, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, detektör, yüksel voltajlı güç kaynağı ile bilgisayar gibi bir bilgi işleme cihazıdır. KE sisteminin ana bileşenleri Şekil 2.2.'de sunulmuştur.



Şekil 2.2. KE sisteminin şematik gösterimi (Baker, 1995)

Elektroforez, giriş vialı, kapiler ve çıkış vialinin bir elektrolit ile doldurulmasıyla gerçekleşmektedir. Genellikle sulu bir tampon çözeltisi elektrolit olarak kullanılır. Kapiler girişi örnek vialinin içine yerleştirilir, örnek koyulur ve daha sonra kapiler girişi tekrar giriş vialine alınır ve giriş ve çıkış vialı arasında elektrik alanı uygulanır. Çözünen maddeler, kapiler boyunca göç ederler ve detektörler tarafından tespit edilirler. Detektör çıkışları bilgisayara gönderilir ve çıkan veriler bir elektroferogram olarak görüntülenir.

Çözünen maddeleri kapiler içinde farklı hızlarda hareket ettikleri için detektör önünde farklı zamanlarda geçerler. Elektroferogramda, ayrılmış bileşikler, pikler halinde farklı göç zamanlarında görünürler.

KE'nin diğer ayırım yöntemlerine göre yüksek verimlilikte olması, çok küçük hacimlerde örneklerle çalışılabilmesi, reaktif sarfiyatının az olması ve hızlı ayırım yapabilmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Baker, 1995).

2.6.2. YPSK yöntemi

Kromatografi, bir karışım içindeki bileşenlerin biri sabit, diğeri hareketli iki faz arasındaki dağılım dengelerinin farklı oluşu esasına dayanan bir ayırma yöntemidir (http-3).

Klasik sıvı kromatografisinde kolonun üst kısmından numune ve hareketli faz ilave edilir. Hareketli faz kolondan aşağıya inerken numunedeki bileşenlerin bantlar

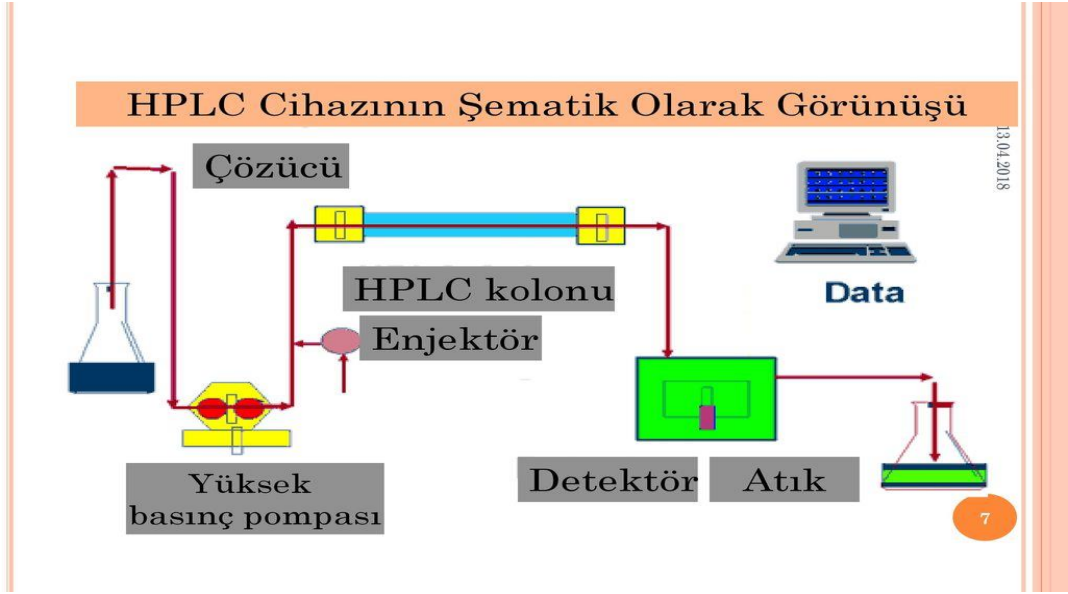
halinde ayrılmaları sağlanır. Bantların iyi ayrılmamaları durumunda daha uzun kolonlar kullanılmaktadır. Bu ayrılma ise çok uzun bir sürede gerçekleşmektedir. Alternatif olarak da kolondaki dolgu maddesi küçültülebilmektedir. Bu işlem uygulandığı zaman da ayırım çok uzun bir sürede gerçekleşmektedir. Bu süreyi kısaltmak için kolon uygun büyüklükteki dolgu maddeleriyle doldurulmaktadır ve kolonun üstünde yüksek basınç uygulanmaktadır. Bunun sonucunda da kısa sürede gerçekleşen ayırımlar gözlemlenmektedir. Böylece, kolonu küçük dolgu maddeleriyle doldurup yüksek basınç altında yapılan kromatografi türlerine YPSK denilmektedir. Buna göre, YPSK'ye eski kromatografi türlerinin iyileştirilmiş ve hızlandırılmış şekli denilebilmektedir (Gündüz, 2002).

YPSK'de hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin ayırmayı etkileyici özelliklerinin bulunması YPSK'nin daha geniş bir kullanım alanına sahip olmasına olanak verir. ([http-3](http://3)).

YPSK en yaygın kullanılan analitik ayırma tekniğidir. Duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla bozunabilen bileşiklerin uygun bir şekilde ayrılmasından dolayı en yaygın kullanılan yöntemdir (Hamilton ve Sewel, 1998).

YPSK cihazının ana bileşenleri hareketli faz kapları, pompa, enjektör, kolon, detektör ve bilgisayar gibi bir kayıt cihazıdır. Şekil 2.3.'te cihazın şematik gösterimi verilmiştir.

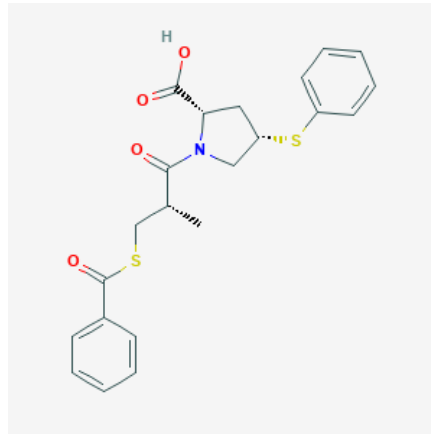
YPSK yöntemi nükleik asitler, terpenoitler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, proteinler, amino asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, metalorganik bileşikler ve bazı inorganik maddelere uygulanabilmektedir (Gündüz, 2002).



Şekil 2.3. YPSK sisteminin şematik gösterimi (<http-4>)

2.7. ZOF'un Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

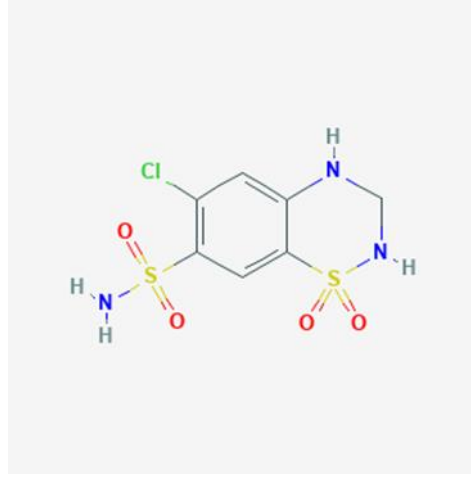
ZOF kalsiyum kimyasal olarak stabil, beyaz, kristalize bir tozdur. Erime derecesi 25°C'nin üzerindedir. ZOF'un sudaki çözünürlüğü 0,3 mg/mL'dir. Molekül ağırlığı 448,58 g/mol'dür. Kapalı formülü ise $C_{44}H_{44}CaN_2O_8S_4$ 'tür. ZOF dimetilformamit ve metanolde hafifçe çözünür. Aseton, asetonitril ve etil asetatla pratik olarak çözünmez (Rx-Media, 2019).



Şekil 2.4. ZOF'un açık kimyasal formülü (<http-5>)

2.8. HCT'nin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

HCT beyaz ve beyaza yakın renkte, kokusuz veya çok az kokulu kristalize bir tozudur. Suda çok hafif veya hafif çözünür; alkolde az çözünür; asetonda çözünür; dimetilformamid, n-butilamin ve alkali hidroksit çözeltilerde çözünür; eter, kloroform ve seyreltik mineral asitlerde çözünmez. Molekül ağırlığı 297,74 g/mol'dür. Kapalı formülü ise $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ 'dir (Rx-Media, 2019).



Şekil 2.5. HCT'nin açık kimyasal formülü (<http-6>)

2.9. ZOF'un Miktar Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

Carlucci, Di Federico ve Iuliani, (2009, s. 2609) ZOF ve HCT'nin tabletlerden tayini için bir türev spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada tayin için 4. derece türev verileri kullanılmıştır. Yöntemin geçerliliği doğrusallık, kesinlik ve doğruluk parametreleri ile saptanmıştır. Çalışmada LOQ değerleri ZOF için 1,3 µg/mL, HCT için 0,2 µg/mL bulunmuştur.

Kurbanoglu, Gumustas ve Ozkan, (2014, s. 935) ZOF-HCT-Olmesartan ikili karışımlarının farmasötik dozaj formlarından hızlı, doğru, kesin ve eşzamanlı belirlenmesi için türev spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Uygulanan yöntemde ZOF için 250,4 nm ve 298,1 nm, HCT için 231,8, 332,2, 232,3 ve 280,4 nm dalga boyları analiz için seçilmiştir. Çalışmada 2 nm slit genişliği ve 1 cm boyutunda kuvars hücresi olan çift ışınli spektrofotometre kullanılmıştır. LOQ değerleri sırasıyla HCT-ZOF için 0,06 µg/mL ve 0,116 µg/mL ve ZOF-HCT için 0,02 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stolarczyk vd., (2015, s. 66) farmasötik dozaj formlarında ZOF ve fluvastatin tayini için yeni bir türev spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. 3 farklı türev kullanılan bu yöntemde UV aralıkta belirgin girişim olmasına rağmen bu yöntem ile dolaysız yoldan analiz gerçekleştirilmiştir. ZOF için sırasıyla; 270,85 nm, 286,38 nm, 253,90 nm dalga boylarında çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik ve doğrusallık parametreleri incelenmiştir. Bu çalışmada LOD değeri ZOF için 0,19 µg/mL olarak bulunmuştur.

Sbarcea vd., (2012, s. 562) ZOF'un farmasötik dozaj formlarından kantitatif tayini için basit, ekonomik, hassas, kesin ve doğru bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. ZOF'un deteksiyonu 248 nm'de gerçekleştirilmiştir. Yöntemin geçerliliği doğruluk, hassaslık, kesinlik, doğruluk ve seçicilik parametreleri ile gösterilmiş ve yöntem ZOF içeren tabletlere uygulanmıştır. Yöntemde ZOF için LOD değeri 1,531 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Taşdemir, Ece ve Kılıç, (2012, s. 339) ZOF'un elektrokimyasal davranışın incelendiği tek çalışma olan bu deneyde voltametrik tayin de gerçekleştirmişlerdir. Tüm çalışmaların, Britton-Robinson tamponunda (pH 5,0) Ag/AgCl'e karşı yaklaşık 1,1 V'deki ZOF'un geri dönüşümsüz ve adsorpsiyon kontrollü elektrokimyasal oksidasyon sinyaline dayandığı bildirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin geçerliliği doğrusallık, kesinlik, seçicilik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemler arasında hesaplanan en düşük tayin sınırı 16,8 µg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler ZOF'un tablet, insan serumu ve idrarından tayinine uygulanmıştır.

Wyszomirska, Czerwinska ve Mazurek, (2010, s. 147) bazı ADE inhibitörlerinin tabletlerden tayini için ince tabaka kromatografisi ile bir yöntem geliştirmişler ve sonuçları YPSK sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Analiz sonunda lekelerin görünürleştirilmesi için plakalar önce 254 nm'de UV ışık altında incelenmiş, daha sonra iyot buharına tutulmuştur. Çalışmada ZOF için en uygun hareketli faz toluen:glasiyel asetik asit (30:10, h/h) olarak bulunmuş ve bu hareketli faz ile alıkonma faktörü 0,045 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin LOQ değeri ZOF için 0,025 µg/mL olarak bulunmuştur.

Carlucci, Di Federico ve Iuliani, (2010, s. 1717) ZOF ve HCT'nin oral farmasötik preparatlarından tayini için DAD detektör ile bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırma, 250 mm × 4 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapında bir C18 kolon kullanılarak, gradient elüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak 8-

kloroteofilin kullanılmıştır. Mobil faz 1,0 mL/ dk'lık akış hızında asetonitril-trifloroasetikasit (TFA) (99,1:0,1 h/h) ve su-TFA (99,9:0,1 h/h)'dan oluşturulmuştur. Alıkonma zamanı ZOF için 14,4 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntem için doğrusallık, sağlamlık, kesinlik, doğruluk ve özgünlük parametreleri gösterilmiştir. ZOF için LOQ değerleri 0,08 µg/mL, HCT için tayin sınırı 0,06 µg/mL olarak bulunmuştur.

Devika, Sudhakar ve Venkateshwara, (2012, s. 999) ZOF ve HCT'nin kombine farmasötik dozaj formlarından eş zamanlı tayin edilebilmesi için basit, hızlı ve hassas bir izokratik ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Deteksiyon DAD detektör ile 245 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım 250 mm×4.6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül büyüklüğü olan bir C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Asetonitril:metanol:0,02 M sodyum fosfat tamponu (40:20:40, h/h) karışımından oluşan hareketli fazın akış hızı 1,0 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Hareketli faz sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 7,2'ye ayarlanmıştır. Yöntemin validasyonu için sağlamlık, kesinlik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri incelenmiştir. HCT'nin alıkonma süresi 4,62 ve ZOF 6,86 dk olarak gözlenmiştir.

Kurbanoglu, Gümüştas ve Özkan, (2013, s. 198) farmasötik dozaj formlarında ZOF-HCT ve olmesartan-HCT ikili karışımlarının, iki tane yeni nesil silika kolon kullanarak hızlı, doğru, kesin ve eş zamanlı olarak belirlenmesi için iki ters fazlı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Deteksiyon 216 nm'de DAD detektörle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 250 mm × 3 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapında bir C18 kolon ile 250 mm × 4,60 mm boyutlarında 5 µm partikül çapında bir C18 kolon kullanılmıştır. İlk C18 kolon için su:asetonitril (55:45, h/h) pH 4 ve diğer C18 kolon için su:asetonitril (60:40, h/h) pH 4'e ayarlanmış hareketli faz kullanılmıştır. Hareketli fazların akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında alıkonma süresi ZOF için ilk C18 kolonda 7,82 dk, diğer C18 kolonda 7,91 dk, HCT için ilk C18 kolonda 2,88 dk, ve diğer C18 kolonda 1,50 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin geçerliliği doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve sistem uygunluk testleri ile gösterilmiştir. Yöntemin LOQ değerleri ZOF için ilk C18 kolonda 0,10 µg/mL ve diğer C18 kolonda 0,63 µg/mL, HCT için ilk C18 kolonda 0,40 µg/mL ve diğer C18 kolonda 0,35 µg/mL olarak kaydedilmiştir.

Sağlık Aslan, (2011, s. 259) ZOF ve HCT'nin farmasötik formlarından eş zamanlı tayini için basit, seçici ve kesin bir ters fazlı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiş ve valide etmiştir. Deteksiyon 270 nm'de UV detektörle sağlanmıştır. Ayırım için 150 mm

× 4,6 mm boyutlarında ve 5 µm partikül çapında C18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak pH 2,5'a fosforik asitle ayarlanmış metanol:su karışımı gradient elüsyon yöntemi ile kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 mL/dk kaydedilmiştir. Bu koşullar altında alıkonma zamanları ZOF için 11,16 dk ve HCT için 2,86 dk olarak gözlenmiştir. Yöntemin validasyonu için doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, seçicilik, sağlamlık ve kararlılık parametreleri incelenmiş ve sistem uygunluk testleri gösterilmiştir. Yöntemde LOQ değerleri ZOF için 0,292 µg/mL, HCT için 0,556 µg/mL olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntem ZOF ve HCT içeren tabletlere uygulanmıştır.

Bouaissi ve Hamida, (2015, s. 271). ZOF'un tablet formlarından basit, hassas ve tekraredilebilir bir sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Analizde 250 mm×4,6 mm boyutlarında 5 µm partikül boyutunda C18 kolon kullanılmıştır, bunun yanında (pH 2,5, 0,02 M, 80/20, h/h) asetonitril;fosfat tamponu 2,0 mL/dk akış hızında izokratik olarak uygulanmıştır. ZOF'un 205 nm'de alıkonma süresi 4,27 dk olarak kaydedilmiştir. Yöntem validasyonu için doğruluk, doğrusalılık, kesinlik, tekraredilebilirlik parametreleri incelenmiştir.

Dal Bo, Mazzucchelli ve Marzoi, (2000, s. 287) ZOF ve aktif metaboliti olan zofenoprilat'ın tayini için bir sıvı kromatografisine bağlı kütle spektrometrik (LC-MS/MS) yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde hareketli faz olarak glasiyel asetik asitle pH 4,5'a ayarlanmış 26 mM asetonitril-amonyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmada ayırım için 75 mm × 4.6 mm boyutlarında 3 µm partikül çapına sahip C18 kolon ve 5 µm partikül çapında 10 mm × 3.2 mm boyutlarında C18 bir koruyucu kolon kullanılmıştır. Çalışmada LOQ değerleri ZOF için 1 ng/mL ve zofenoprilat için 2 ng/mL bulunmuştur. Geliştirilen deneyin kesinliği, doğrulu ve stabilitesi incelenmiştir. Geliştirilen yöntem ZOF kullanan gönüllülerin plazmalarından tayinine başarı ile uygulanmıştır.

Ramesh, Nageswara ve Nageswara, (2014, s. 609) ZOF'un stres koşullarında oluşan bozunma ürünlerinin karakterizasyonu için bir izokratik LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada ayırım için 250 mm × 4,6 mm boyutlarında 5 µm partikül çapında bir C18 kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 20 mM amonyum asetat:asetonitril (50:50, h/h) çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmada ZOF asidik, bazik, nötr, oksidatif, fotolitik ve termal stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Bazik ve oksidatif stres koşullarında ZOF'un aşırı bozunmaya uğradığı tespit edilmiştir. Yöntem

geçerliliği için seçicilik, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik parametreleri incelenmiş ve LOD değeri 13 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Tian vd., (2015, s. 253) ZOF ve onun aktif metaboliti olan zofenoprilatın insan plazmasından eş zamanlı analizi için bir LC-MS/MS yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada diazepam iç standart olarak kullanılmıştır. 150 mm × 2,1 mm boyutlarında ve 3,5 µm partikül boyutunda bir C8 kolon ile ayırım sağlanmıştır. Hareketli faz olarak metanol:%0,1 formik asit (85:15, h/h) çözeltisi 0.2 mL/dk'lık bir akış hızında izokratik olarak kullanılmıştır. Yöntemde seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, kararlılık, duyarlılık, ekstraksiyon geri kazanımı ve matriks etkileri incelenmiştir. ZOF için LOQ değeri 0,2 ng/mL olarak bulunmuştur.

Jiang vd., (2011, s. 527) ZOF ve onun aktif metaboliti zofenoprilatın insan plazmasından tayini için bir LC-MS/MS yöntem geliştirmişlerdir. Analizde 250 mm × 4,6 mm boyutlarında 5 µm partikül boyutuna sahip fenil-hegzil kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak %0,1'lik formik asit içeren metanol:su (95:5, h/h) çözeltisi 1,0 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu koşullar altında ZOF için alıkonma zamanı 4,7±0,05 dk olarak belirlenmiştir. Yöntem geçerliliği seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, kararlılık, duyarlılık, ekstraksiyon geri kazanımı ve matriks etkileri parametreleri ile incelenmiştir. Çalışmada ZOF için alt tayin sınırı 0,10 ng/mL olarak bulunmuştur.

Kwok vd., (2016, s. 41) ZOF'un da dahil olduğu 46 polar ilacın, at plazması ve idrarından tayini için LC-MS/MS bir yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım 10 cm×2,1 mm boyutlarında 1,7 µm partikül boyutuna sahip kolon ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 5 mM amonyum format (pH 3,0) ve %0,1 formik asit içeren asetonitril çözeltileri gradient sistemle kullanılmıştır. Bu koşullar altında tüm analitlerin 1-6,2 dk aralığında belirlediği bildirilmiştir. Yöntemin geçerliliği ise doğrusallık, seçicilik, kesinlik, geri kazanım ve matriks etkisi parametreleri ile incelenmiştir. Çalışmada ZOF için sırasıyla plazma ve idrar LOD değerleri 2,5 ng/mL ve 31,3 ng/mL olarak bulunmuştur.

Kwok vd., (2017, s. 89) bir başka çalışmalarında doping amaçlı kullanılan yüzden fazla ilacın tayinini LC-MS/MS yöntem ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışma at idrarında yapılmış ve örnekler önce katı faz ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Çalışmada ayırım için 75 mm x 3 mm boyutlarında 2,6 µm partikül boyutuna sahip bir C18 kolon kullanılmıştır. Toplam analiz süresi 16 dk sürmüştür ve ZOF'un alıkonma zamanı 8,99

dk olarak gözlenmiştir. Yöntemin geçerliliği seçicilik, kesinlik ve ekstraksiyon geri kazanımı parametreleri ile gösterilmiştir. Yöntemde ZOF için LOD değeri 2,5 µg/mL bulunmuştur.

Fayed vd., (2018, s. 461) çalışmalarında HCT'nin iki ana kirliliği, HCT ve ZOF'un farmasötik preparatlardan eş zamanlı tayini için KE yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada UV dalga boyu 225,0 nm ve kapiler sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır. Ayrım için 50 µm iç çapa sahip 40 cm uzunlukta bir silika kapiler kullanılmıştır. Çalışma tamponu olarak 10 mM borat tamponu (pH 9,15) kullanılmıştır. Ayrım 17 kV potansiyel altında sağlanmıştır. Bu koşullar altında göç zamanları ZOF ve HCT için sırasıyla 3,053 ve 3,687 dk olarak gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliği doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık ve sistem uygunluk testleri ile gösterilmiştir. Çalışmada LOQ değerleri ZOF için 7,15 µg/mL, HCT için 9,23 µg/mL olarak gözlenmiştir. Yöntemin ZOF ve HCT içeren tabletlere uygulanması ile elde edilen sonuçlar, daha önce yayınlanmış bir YPSK yöntemi ile t ve F testleri kullanılarak karşılaştırılmış ve aradaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bildirilmiştir.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum borat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
ZOF	: Referans Kimya, Türkiye
Fosforik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
Asetonitril	: Sigma-Aldrich, Almanya
HCT	: Referans Kimya, Türkiye
TEL	: Referans Kimya, Türkiye

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost&Electronic, Türkiye
C8 kolon	: Agilent Technologies, A.B.D.
C18 kolon	: Agilent Technologies, A.B.D.
Filtre	: Macherey Nagel, Almanya
Filtre kağıdı	: Lubitech Technologies, Çin Halk Cumhuriyeti
Hassas terazi	: Mettler Toledo, İsviçre
Kapiler	: Agilent Technologies, A.B.D.
Kapiler elektroforez	: Agilent Technologies, CE7100, A.B.D.
Otomatik pipet	: Eppendorf, Almanya
pH metre	: Mettler Toledo, İsviçre
Ultra saf su cihazı	: Millipore, A.B.D.
Ultrasonik banyo	: Sonorex, Almanya
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech, Kore
YPSK	: Agilent Technologies, 1260 Infinity, Almanya

4. YÖNTEMLER

4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Geliştirilecek yöntemlerde kullanılmak üzere öncelikle ZOF için uygun çözücü araştırılmıştır. Bu aşamada piyasada ZOF'un hem tek başına hem de kombine preparatları (HCT ile birlikte) olduğu göz önünde bulundurularak tüm çalışmaların HCT ile birlikte yürütülmesine karar verilmiştir. Bu amaçla ZOF ve HCT, ayrı ayrı 5 mL metanolde çözüldükten sonra ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilip üzerine 5 mL distile su eklenerek stok çözeltileri (10^{-3} M düzeyinde) hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler yine bu çözeltilerle yapılarak analiz edilmiştir.

KE'de tekrarlayan analizlerde seyreltmeler metanol:su (50:50, h/h) çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Ancak zemin gürültüsünde gözlenen sorunları azaltabilmek amacı ile ZOF ve HCT'nin 10^{-6} M düzeyindeki seyreltmesinin çalışma tamponu ile yapılması öngörülmüştür. Bu amaçla çalışma tamponu 1/10 oranında seyreltilmiş ve son seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır.

YPSK da ise böyle bir sorunla karşılaşmadığı için seyreltmeler metanol:su (50:50, h/h) çözeltisi ile yapılmıştır.

Çalışmada IS olarak kullanılan TEL için de aynı çözücü sistemi denenmiş ve uygun sonuçlar elde edildiğinden IS'nin tüm çözme ve seyreltme işlemleri etkin maddelerle aynı olacak şekilde yapılmıştır.

4.2. Kapiler Elektroforez Yöntemi

4.2.1. Cihazla ilgili koşullar

Yöntemde optimizasyon süresince deteksiyon DAD detektör ile 220 nm, 225 nm ve 230 nm'de gerçekleştirilmiştir. Ayrımında duyarlılığı arttırmak amacı ile için 75 µm iç çapa sahip 40 cm efektif uzunlukta (48,5 cm toplam) balon hücreli kapiler kullanılmıştır. Kapilerin şartlanması için ilk kullanımında 30 dk 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile yıkanmıştır.

Cihazın her açılışında ise kapiler 10 dk 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkanmıştır. Örneklerin analizleri arasında şartlandırma sırasıyla 2 dk 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi, 2 dk distile su ve 2 dk

Çalışma tamponu ile yıkama olacak şekilde sağlanmıştır. Cihazın günlük kullanımı sonrasında kapiler sırasıyla 10 dk 0,1 M sodyum hidroksit zltisi ve 5 dk distile su ile yıkadıktan sonra 2 dk hava çekilerek bırakılmıştır.

4.2.2. Çalışma tamponu

Çalışma tamponu hazırlanabilmesi için sodyum borattan 2,8602 g tartım alınmıştır. Bu tartım 150 mL'ye distile su ile tamamlanarak 50 mM düzeyinde ana stok hazırlanmıştır. Tamponun suda tam olarak znmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Gerekli seyreltmeler su ile yapıldıktan sonra çalışılacak uygun derişimdeki tamponun pH ayarı seyreltik HCl ile yapılmıştır. Çalışma tamponu 0,45 m'lik filtre ile szldkten sonra cihaza verilmiştir.

4.2.3. Optimizasyon alışmaları

KE yönteminde kullanılmak üzere 4,67 mg ZOF tartılarak üzerine 5 mL metanol eklenmiştir ($5,2053 \times 10^{-4}$ M). Vorteks karıştırıcıda 10 dk karıştırıldıktan sonra 5 mL distile su eklenip, 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. HCT zltisi hazırlamak için 4.18 mg tartım alınarak 5 mL metanol eklenmiştir ($1,3998 \times 10^{-3}$ M). Maddenin tam olarak znmesi için vortekste 10 dk karıştırılmıştır. zerine 5 mL distile su eklenip, 10 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. IS olarak kullanılmak üzere TEL'den 5,40 mg tartım alınarak 5 mL metanolde üzülmüştür ($1,049 \times 10^{-3}$ M). Etkin maddelere uygulanan tüm işlemler IS zltisine de uygulanmıştır.

Hazırlanan tüm zltiler alüminyum folyoya sarılı halde +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu stok zltiler üzerinden yapılmıştır.

KE yönteminin optimizasyonu için çalışma tamponunun derişimi, pH, organik üzücü oranı ve uygulanan potansiyel parametreleri incelenmiştir. Enjeksiyonlar 10 s süre ile 50 mbar basınç altında gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.1. Tampon derişimi

Yöntemdeki alışma tampon derişimine karar vermek amacıyla pH'ı 9,00 olan 10 mM, 15 mM ve 20 mM derişiminde 3 farklı borat tamponu hazırlanmıştır. Bu alışma tamponları ile 25 kV potansiyel altında ZOF-HCT karışımının 3'er analizi

gerçekleştirilmiştir. Analiz sonunda elde edilen piklerin pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirilerek uygun derişimdeki borat tamponuna karar verilmiştir.

4.2.3.2. pH

Çalışma tamponunun pH'ının belirlenmesi amacıyla 10 mM borat derişiminde pH'ları sırasıyla 8,50, 9,00 ve 9,50 olan çalışma tamponları hazırlanmıştır. ZOF-HCT karışımının 3'er analizi bu çalışma tamponları ile 25 kV potansiyel altında gerçekleştirilmiştir. Pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirilerek yeterli ayırımın sağlandığı uygun pH seçilmiştir.

4.2.3.3. Organik çözücü oranı

Çalışma tamponundaki organik çözücü oranının ayırma katkısını incelemek amacıyla pH'ı 9,00 olan 10 mM derişimde %5 metanol, %10 metanol ve %15 metanol içeren 3 farklı borat tamponu hazırlanmıştır. Bu çalışma tamponları ile 25 kV potansiyel altında ZOF-HCT karışımının 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Pik morfolojileri ve alıkonma zamanları değerlendirilerek yeterli ayırımın sağlandığı uygun metanol oranı seçilmiştir.

4.2.3.4. Potansiyel

Uygulanacak potansiyelin belirlenmesi amacı ile ZOF-HCT karışımının 10 mM borat tamponu (pH 9,00) ile 22,5 kV, 25 kV ve 27,5 kV potansiyel altında 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda gözlenen analiz süreleri ve pik morfolojileri değerlendirilerek çalışma potansiyeline karar verilmiştir.

4.2.4. Validasyon çalışmaları

KE'de geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla yöntemin doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Validasyon hesaplamaları için pik normalizasyon oranları (PNO) ($\text{Pik Normalizasyonu} = \frac{\text{Alan}_{\text{madde}}}{\text{Göç zamanı}_{\text{madde}}} / \frac{\text{Alan}_{\text{IS}}}{\text{Göç zamanı}_{\text{IS}}}$) kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları boyunca IS'nın son derişimi $5,00 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde kullanılmıştır.

4.2.4.1. Doğrusallık

Analit derişimleri ile elde edilen sinyaller arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığının incelenmesi için ZOF ve HCT'nin yaklaşık 3×10^{-5} M- 4×10^{-8} M aralığında 12 farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu derişimler ZOF için $3,34 \times 10^{-8}$ M, $6,92 \times 10^{-8}$ M, $9,89 \times 10^{-8}$ M, $2,20 \times 10^{-7}$ M, $4,40 \times 10^{-7}$ M, $7,33 \times 10^{-7}$ M, $9,77 \times 10^{-7}$ M, $2,05 \times 10^{-6}$ M, $4,11 \times 10^{-6}$ M, $7,48 \times 10^{-6}$ M, $9,98 \times 10^{-6}$ M ve $3,12 \times 10^{-5}$ M ve HCT için $3,72 \times 10^{-8}$ M, $7,45 \times 10^{-8}$ M, $1,06 \times 10^{-7}$ M, $2,36 \times 10^{-7}$ M, $4,73 \times 10^{-7}$ M, $7,89 \times 10^{-7}$ M, $1,05 \times 10^{-6}$ M, $2,21 \times 10^{-6}$ M, $4,43 \times 10^{-6}$ M, $8,06 \times 10^{-6}$ M, $1,07 \times 10^{-5}$ M ve $3,36 \times 10^{-5}$ M şeklindedir. Bu 12 çözelti optimum koşullar altında analiz edilmiştir.

Yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra yöntemin kalibrasyonu için ZOF ve HCT'nin son derişimleri sırasıyla $2,20 \times 10^{-7}$ M, $4,40 \times 10^{-7}$ M, $7,33 \times 10^{-7}$ M, $9,77 \times 10^{-7}$ M, $2,05 \times 10^{-6}$ M, $4,11 \times 10^{-6}$ M ve $2,36 \times 10^{-7}$ M, $4,73 \times 10^{-7}$ M, $7,89 \times 10^{-7}$ M, $1,05 \times 10^{-6}$ M, $2,21 \times 10^{-6}$ M, $4,43 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde 6 farklı çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 3'er analizi gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.2. Kesinlik

Yöntemin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için ZOF ve HCT'nin son derişimleri sırasıyla $9,77 \times 10^{-7}$ M ve $1,05 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde hazırlanan çözeltiler gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analiz edilmiştir.

4.2.4.3. Doğruluk

Yöntemin doğruluk çalışması için son derişimleri $2,21 \times 10^{-6}$ M, $1,05 \times 10^{-7}$ M ve $7,89 \times 10^{-7}$ M HCT ve $2,05 \times 10^{-6}$ M, $9,77 \times 10^{-7}$ M ve $7,33 \times 10^{-7}$ M ZOF olacak şekilde 3 set ZOF-HCT çözeltileri hazırlanmıştır. Her setin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analizi gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.4. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi amacıyla sinyal/gürültü (S/N) oranları kullanılmıştır. Hesaplamalarda S/N oranı LOD değeri için 3,3, LOQ değeri için 10 olarak alınmıştır.

4.2.4.5. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için ZOF ve HCT için sırasıyla $2,05 \times 10^{-6}$ M, $2,21 \times 10^{-6}$ M derişimlerdeki çözeltisinin taze hazırlanmış, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiş ve alüminyum folyo ile sarılı halde -18°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltileri 3'er kez analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.3. YPSK Yöntemi

4.3.1. Cihaz ile ilgili koşullar

YPSK yönteminde ayırım DAD detektör ile sağlanmıştır. Ayırım için 150×3.0 mm boyutunda ve $3,5 \mu\text{m}$ partikül boyutuna sahip C8 kolon kullanılmıştır.

Cihazın açılış ve kapanışlarında kolonun şartlanması amacı ile %50 metanol ile 15 dk yıkanmıştır. Her analize başlamadan ise kolondan 20 dk hareketli faz geçirilmiştir.

4.3.2. Hareketli fazın hazırlanışı

Bu çalışmada iki farklı çözelti hazırlanarak analiz süresince farklı oranlarda karıştırılıp bir gradient sistem oluşturulmuştur. İlk hareketli faz çözeltisi %1 fosforik asit içeren %10 asetonitril (A) çözeltisidir. Bu çözeltiyi hazırlamak için 100 mL asetonitril ve 10 mL fosforik asit mezürde ölçüldükten sonra 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. İkinci hareketli faz çözeltisi %1 fosforik asit içeren asetonitril (B) çözeltisidir. Bu çözeltinin hazırlanması için 10 mL fosforik asit mezürde ölçüldükten sonra 1 L'ye asetonitril ile tamamlanmıştır.

Her iki hareketli faz çözeltisi iyice karıştırıldıktan sonra içinde çözünmüş olabilecek gazların uzaklaştırılabilmesi için 15 dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra kolona verilmiştir.

4.3.3. Optimizasyon çalışmaları

YPSK yönteminin optimizasyonu için KE yöntemi için hazırlanmış olan ZOF, HCT ve TEL stok çözeltileri kullanılmış ve gerekli seyreltmeler $0,45 \mu\text{m}$ 'lik filtre ile filtrelenmiş %50 metanol çözeltisi ile yapılmıştır.

Yöntemin optimizasyon çalışmaları için dalga boyu, hareketli fazın bileşimi ve akış hızı parametreleri incelenmiştir.

4.3.3.1. Dalga boyu

Yöntemin dalga boylarının belirlenmesi için KE yöntemi verilerinden ve literatürden yararlanılarak seçilen çeşitli dalga boylarında ZOF ve HCT'nin analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu parametrenin incelenmesi sırasında A ve B hareketli fazları gradient sistemle 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Gözlenen pik alan ve morfolojilerine değerlendirilerek dalga boyu seçilmiştir.

4.3.3.2. Hareketli faz bileşimi

Hareketli faz bileşimine karar vermek için A ve B çözeltileri arasındaki karışım oranları 3-9. ve 9-10. dakika aralığında olmak üzere A-B oranları sırasıyla (30:70), (20:80), (10:90) olarak değiştirilerek 3 farklı gradient hazırlanmıştır. Bu hareketli fazlarla ZOF-HCT karışımı 1 mL/dk akış hızı altında 3'er kez analizi gerçekleştirilmiştir. Alıkonma zamanı ve PNO'ya göre uygun gradient sisteme karar verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hareketli faz bileşimi gradient oranları gösterimi

DAKİKA	GRADİENT 1		GRADİENT 2		GRADİENT 3	
	%A	%B	%A	%B	%A	%B
0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
3,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
9,00	30,00	70,00	20,00	80,00	10,00	90,00
10,00	30,00	70,00	20,00	80,00	10,00	90,00
10,01	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	100,00
13,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	100,00

4.3.3.3. Akış hızı

Yöntemin aletsel parametrelerinden olan akış hızının belirlenmesi için seçilen hareketli faz gradienti ile en yükseği 1 mL/dk olmak üzere çeşitli akış hızlarında ZOF ve HCT'nin analizleri gerçekleştirilmiştir. Gözlenen piklerin alıkonma zamanı ve birbirlerinden ayrılma düzeylerine göre akış hızı belirlenmiştir.

4.3.4. Validasyon

YPSK yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Validasyon hesaplamaları için PNO kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları boyunca IS'nin son derişimi $5,025 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde kullanılmıştır.

4.3.4.1. Doğrusallık

Çalışma aralıkları boyunca doğrusal bir ilişki olup olmadığının incelenmesi için ZOF'un $2,64 \times 10^{-5}$ M ve $3,65 \times 10^{-8}$ M aralığında ($2,64 \times 10^{-5}$ M, $1,58 \times 10^{-5}$ M, $9,51 \times 10^{-6}$ M, $5,7 \times 10^{-6}$ M, $3,42 \times 10^{-6}$ M, $2,05 \times 10^{-6}$ M, $1,23 \times 10^{-6}$ M, $9,24 \times 10^{-7}$ M, $6,93 \times 10^{-7}$ M, $5,2 \times 10^{-7}$ M, $3,9 \times 10^{-7}$ M, $2,92 \times 10^{-7}$ M, $1,46 \times 10^{-8}$ M, $7,31 \times 10^{-8}$ M ve $3,65 \times 10^{-8}$ M) ve HCT'nin $2,51 \times 10^{-5}$ M ve $3,48 \times 10^{-8}$ M aralığında ($2,51 \times 10^{-5}$ M, $1,51 \times 10^{-5}$ M, $9,07 \times 10^{-6}$ M, $5,44 \times 10^{-6}$ M, $3,26 \times 10^{-6}$ M, $1,95 \times 10^{-6}$ M, $1,17 \times 10^{-6}$ M, $8,81 \times 10^{-7}$ M, $6,61 \times 10^{-7}$ M, $4,95 \times 10^{-7}$ M, $3,71 \times 10^{-7}$ M, $2,58 \times 10^{-7}$ M, $1,39 \times 10^{-8}$ M, $6,97 \times 10^{-8}$ M ve $3,48 \times 10^{-8}$ M) 15 farklı çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir.

Doğrusal aralık belirlendikten sonra kalibrasyon için ZOF'un $2,05 \times 10^{-6}$ M, $1,23 \times 10^{-6}$ M, $9,24 \times 10^{-7}$ M, $6,93 \times 10^{-7}$ M, $5,20 \times 10^{-7}$ M, $3,90 \times 10^{-7}$ M, $2,92 \times 10^{-7}$ M ve HCT'nin $1,95 \times 10^{-6}$ M, $1,17 \times 10^{-6}$ M, $8,81 \times 10^{-7}$ M, $6,61 \times 10^{-7}$ M, $4,95 \times 10^{-7}$ M, $3,71 \times 10^{-7}$ M, $2,58 \times 10^{-7}$ M son derişimlere sahip 7 farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar analizi gerçekleştirilmiştir.

4.3.4.2. Kesinlik

YPSK yönteminin kesinliğinin gösterilebilmesi amacı ile $6,61 \times 10^{-7}$ M HCT ve $6,93 \times 10^{-7}$ M ZOF derişimine sahip çözeltinin 3 ardışık günde 6'şar defa analizi gerçekleştirilmiştir.

4.3.4.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmaları için ZOF ve HCT'nin sırasıyla $2,05 \times 10^{-6}$, $9,24 \times 10^{-7}$ ve $5,20 \times 10^{-7}$ M ve $1,95 \times 10^{-6}$, $8,81 \times 10^{-7}$ ve $4,95 \times 10^{-7}$ M derişim düzeyindeki çözeltileri 3 set halinde hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.4.4. Duyarluluk

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi amacıyla sinyal/gürültü (S/N) oranları kullanılmıştır. Hesaplamalarda S/N oranı LOD değeri için 3,3, LOQ değeri için 10 olarak alınmıştır.

4.3.4.5. Kararluluk

Kararluluk çalışması için $1,23 \times 10^{-6}$ M ZOF'un ve $1,17 \times 10^{-6}$ M HCT'nin taze hazırlanmış, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiş ve alüminyum folyo ile sarılı halde -18°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltileri 3'er kez analiz edilerek sonuçlar kıyaslanmıştır.

4.4. Yöntemlerin Uygulanması

Yöntemlerin uygulanabilirliğini göstermek amacıyla 30 mg ZOF içeren Zoprotec® ve 30 mg/12,5 mg ZOF/HCT içeren Zoprotec Plus® tabletler piyasadan temin edilmiştir. Her preparattan 10'ar tane tablet tartılıp ortalama tablet ağırlığı belirlenmiştir (Zoprotec® için 204,904 mg, Zoprotec Plus® için 240,923 mg). Tabletler toz edilip her ikisinden de ortalama bir tablet ağırlığı kadar tartım alınmıştır. Her tablet 5 mL metanolde çözüldükten sonra ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilmiş ve üzerine 5 mL distile su eklenmiştir. Elde edilen karışımlar 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmından istenilen miktar alınarak filtre edilmiştir.

Gerekli seyreltmeler her yöntemde standart çözeltilerde olduğu gibi yapılmıştır. Kalibrasyon aralığına göre seçilen her derişime ait 3'er analiz iki yöntemle de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PNO değerlerine göre istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

5. BULGULAR VE YORUM

5.1. KE Yöntemi

KE yönteminde deteksiyon DAD detektör ile sağlanmıştır. Literatürde ZOF'un miktar tayini için yapılmış çalışmalarda çok farklı dalga boylarının (216-270 nm) kullanıldığı görülmüştür (Carlucci, Di Federico ve Luliani, 2010, s.1717; Devika, Sudhakar ve Venkateshwara, 2012, s.999; Fayed, vd., 2018, s.461; Kurbanoglu, Gumustas ve Ozkan, 2013, s.198; Aslan, 2011, s.259; Bouaissi ve Hamida, 2015, s.271). Bu nedenle DAD detektörde 210-270 nm'lerde her iki madde için elde edilen pikler incelenmiş ve çalışma dalga boyu olarak 220 nm'ye karar verilmiştir. Ayrım için 75 µm iç çapa sahip 40 cm efektif ve 48,5 cm toplam uzunlukta balon hücreli kapiler kullanılmıştır. Bu kapiler ile duyarlılığın artırılması hedeflenmiştir. Kapiler sıcaklığı tüm çalışma boyunca 25°C'ta sabit tutulmuştur. Örnekler 10 s süre ile 50 mbar basınç altında sisteme verilmiştir. Yöntemin optimizasyonu ve validasyonu sağlandıktan sonra geliştirilen yöntem ZOF'un tek ve HCT ile kombine preparatlarına uygulanmıştır.

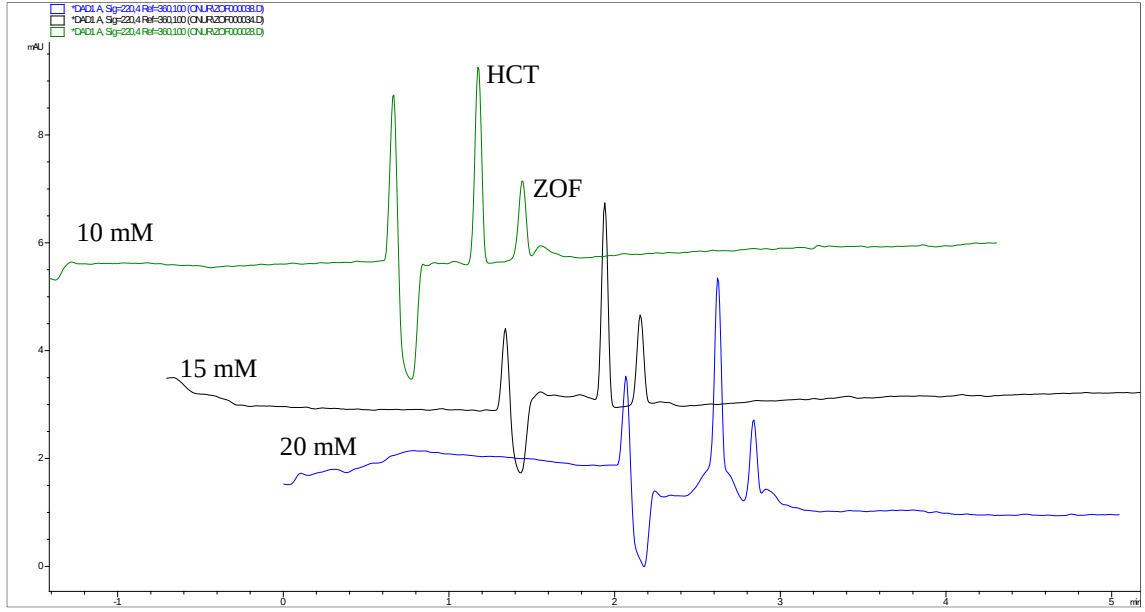
5.1.1. Optimizasyon

ZOF ve HCT'nin KE yöntemi ile miktar tayini için öncelikle her iki analit için optimum analiz koşullar araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılacak çalışma tamponu ve derişimi, çalışma tamponunun pH'ı, çalışma tamponundaki organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel parametreleri incelenerek ayırım için en uygun koşullar belirlenmiştir. Yöntemin optimizasyon çalışmalarında ZOF'un $5,20 \times 10^{-6}$ M ve HCT'nin $5,39 \times 10^{-6}$ M derişimdeki çözeltileri kullanılmıştır.

5.1.1.1. Tampon derişimi

KE yönteminde zayıf asidik yapıdaki ZOF'un iyonize olması için bazik bir çalışma tamponu kullanılması öngörülmüştür. Bu amaçla borat tamponu seçilmiş ve ZOF ve HCT'nin bazik ortamdaki davranışı gözlenmiştir.

Tampon derişimini belirlemek için 10 mM, 15 mM ve 20 mM derişimde 3 ayrı borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmış ve 10^{-6} M düzeyindeki ZOF ve HCT çözeltileri 25 kV potansiyel altında 3'er kez analiz edilmiştir. Şekil 5.1.'de bu analizlere ait elektroferogramlar görülmektedir.

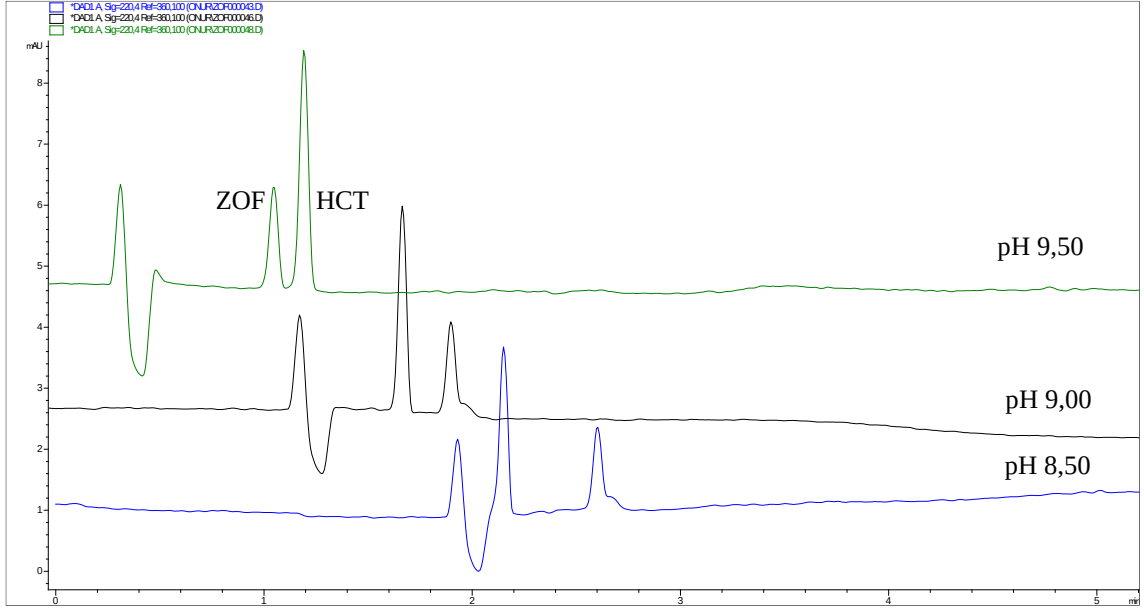


Şekil 5.1. Çalışma tamponu derişimi incelemesi

Tampon derişimindeki artışla birlikte maddelerin göç zamanları artmış ve dolayısı ile analiz süresi artmıştır. Ayrıca maddelerin ayırım gücü (R_s) değerlerinin tampon derişiminin artması ile iyileşmediği görülmüş ve çalışmanın 10 mM borat tamponu ile yürütülmesine karar verilmiştir.

5.1.1.2. pH

Çalışma tamponu pH'ının, ZOF ve HCT'nin elektroforetik davranışı üzerine etkisini incelemek amacı ile pH'ı 8,50, 9,00 ve 9,50 olan 10 mM borat tamponu hazırlanmıştır. Bu 3 farklı tampon ile ZOF ve HCT'nin KE'de 3'er defa analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.2.'de bu analizlere ait elektroferogramlar verilmiştir.

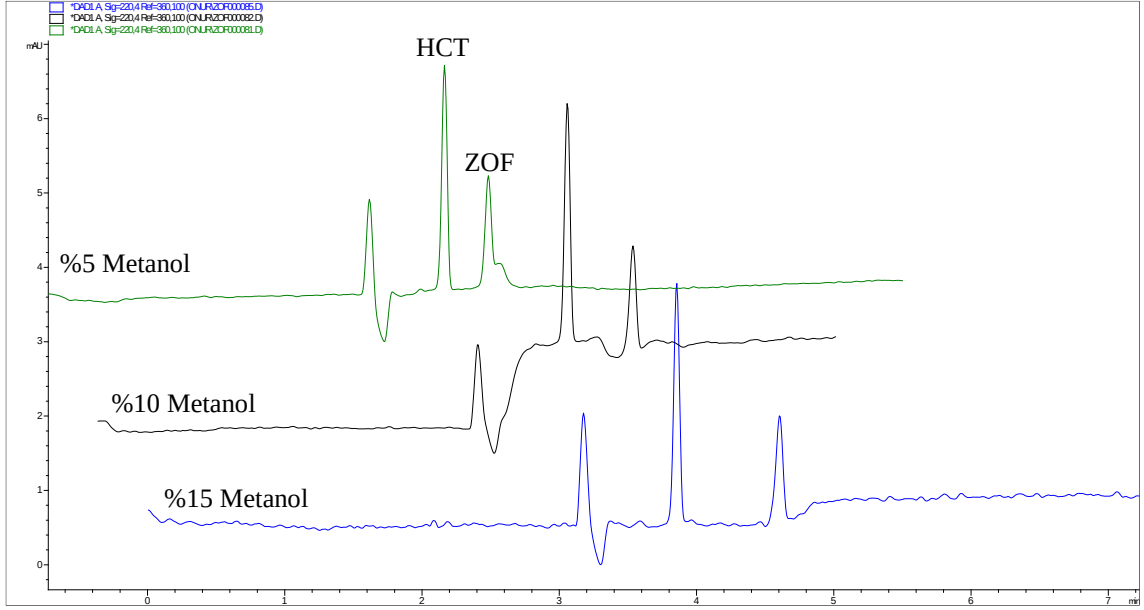


Şekil 5.2. Çalışma tamponu pH incelemesi

pH'ı 9,50 olan çalışma tamponu ile yapılan analizlerde HCT'nin pKa'sına bağlı olarak göç zamanının arttığı ve elektroferogramda ZOF'tan daha sonra belirdiği gözlenmiştir. Ayrıca bu pH'ta maddelerin ayrılması için yeterli Rs değeri sağlanamamıştır. pH 8,50'de ise HCT elektroozmozdan tam olarak ayırlamamış ve ZOF'un pik morfolojisinde bozulma gözlenmiştir. Bu veriler ışığında çalışma tamponunun pH'ı 9,00 olarak seçilmiştir.

5.1.1.3. Organik çözücü

Çalışma tamponunda organik çözücü bulunması ile ayrımın iyileştirilmesi amacı ile sırasıyla %5, %10, %15 (h/h) oranında metanol içeren 10 mM borat tamponu (pH 9,00) hazırlanmış ve 3'er analiz gerçekleştirilmiştir. Bu tampon ile 25 kV potansiyel altında analiz edilen ZOF ve HCT'ye ait elektroferogramlar Şekil 5.3.'te sunulmuştur.

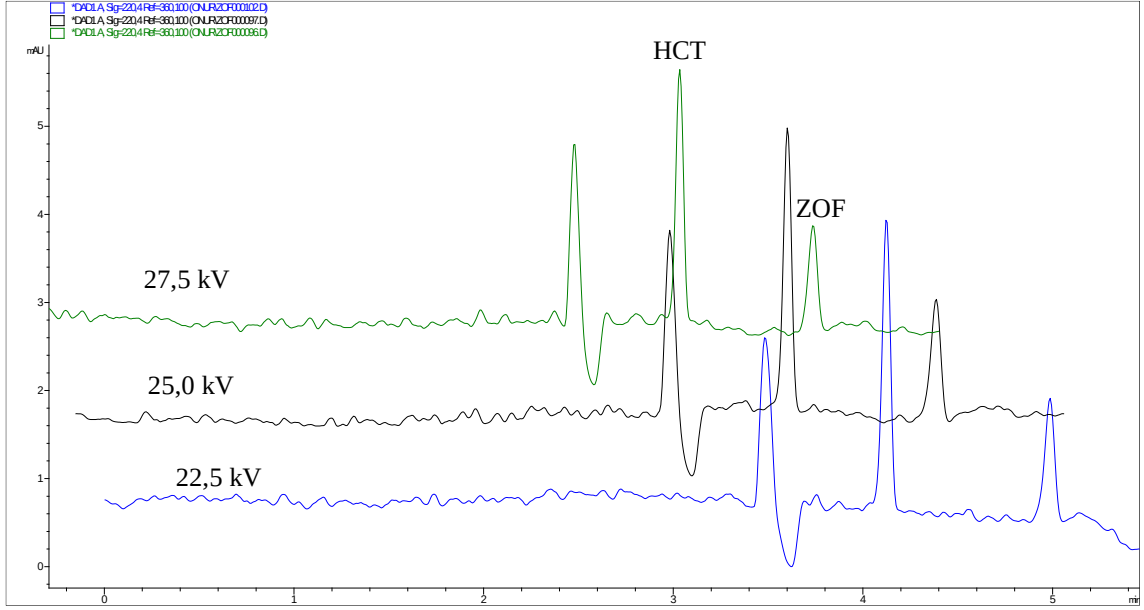


Şekil 5.3. Çalışma tamponundaki organik çözücü oranı incelemesi

Çalışma tamponunda organik çözücü bulunması ile analiz süresinin artmasına rağmen ZOF pikiinde gözlenen kuyruklanmanın ve zemin gürültüsünün azaldığı gözlenmiştir. Pik morfolojileri ve göç zamanları değerlendirildiğinde çalışma tamponunda %15 oranında metanol bulunmasına karar verilmiştir.

5.1.1.4. Uygulanan potansiyel

Aletsel parametrelerden olan uygulanan potansiyelin optimizasyonu için ZOF ve HCT'nin 22,5 kV, 25,0 kV ve 27,5 kV potansiyel altında %15 oranında metanol içeren 10 mM borat tamponu (pH 9,00) ile 3'er kez analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.4.'te bu analizlere ait elektroferogramlar verilmiştir.

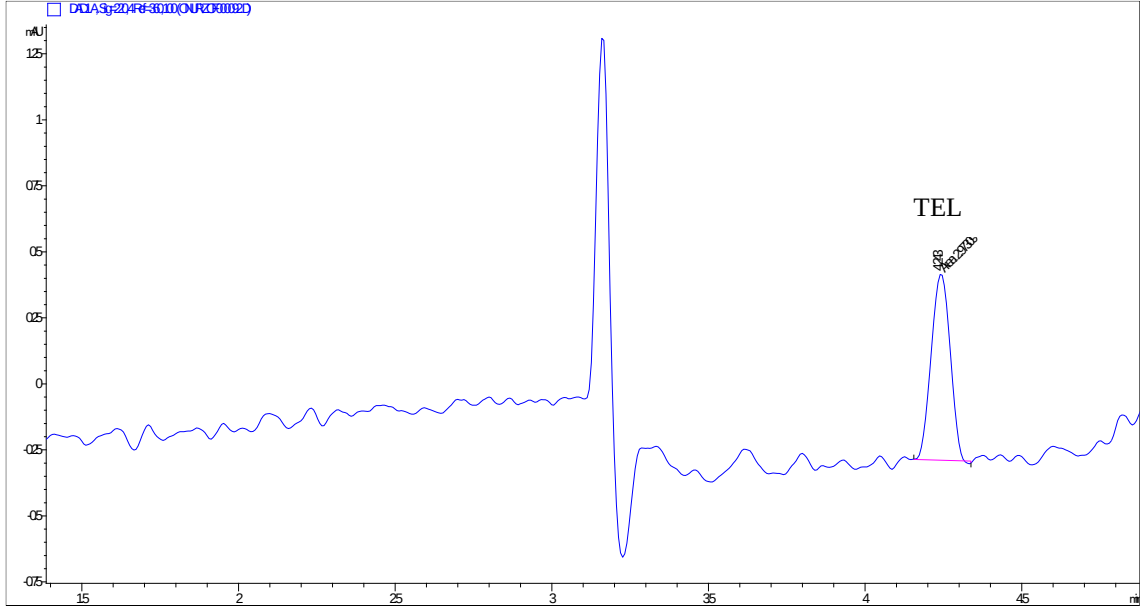


Şekil 5.4. Uygulanan potansiyelin incelemesi

KE’de mümkün olan en yüksek potansiyelin uygulanması ile en kısa sürede ayrımlar sağlanabilir. Yapılan analizlerde de potansiyelin artması ile birlikte analiz sürelerinin kısaldığı görülmüştür. Yüksek potansiyel uygulanması ile doğabilecek Joule ısınması sorunlarından kaçınmak amacı ile çalışmanın 25,0 kV potansiyelde yürütülmesine karar verilmiştir.

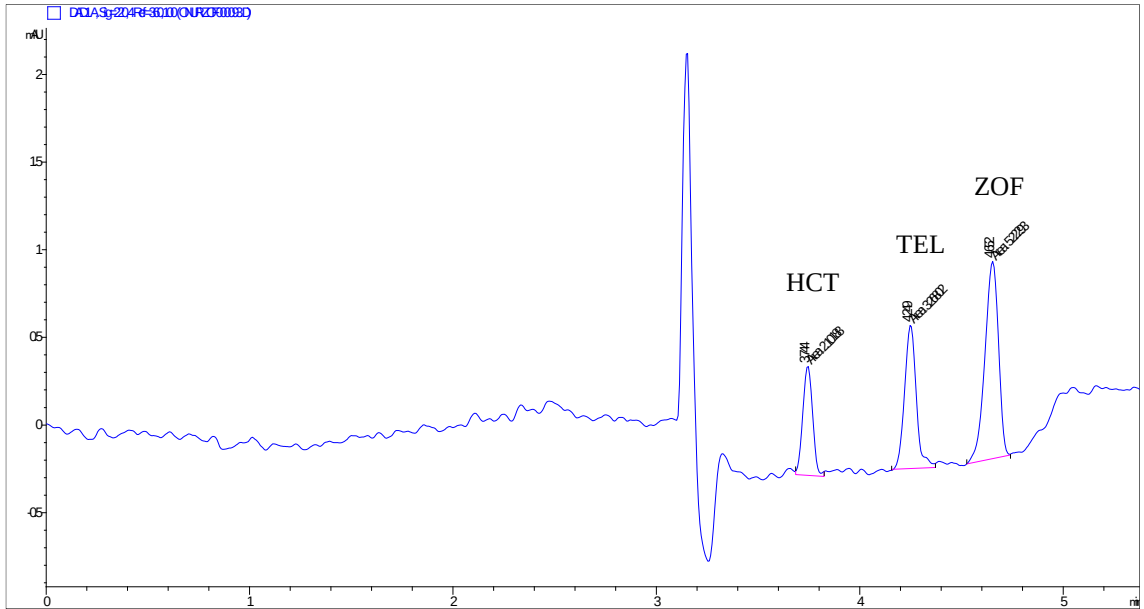
5.1.1.5. İç standart

İncelenen parametreler sonucunda ZOF ve HCT’nin %15 metanol içeren 10 mM borat tamponu (pH 9,00) ve 25 kV potansiyel altında analiz edilmesi ile en uygun koşulların sağlandığı görülmüştür. Deneyin optimum koşulları belirlendikten sonra yöntemin güvenilirliğini arttırmak amacı ile bir IS araştırılmıştır. İncelenen maddeler arasında en makul göç zamanı ve pik morfolojisi TEL ile elde edilmiştir. Şekil 5.5.’te optimum koşullarda analiz edilen TEL’e ait elektroferogram görülmektedir.



Şekil 5.5. Optimum koşullar altında analizi gerçekleştirilen TEL ait elektroferogram

Bu şekilde IS'ye ait pik gözlemlendikten sonra IS'nin ZOF ve HCT ile bir karışımı hazırlanmış ve optimum koşullarda analiz edilmiştir. Şekil 5.6.'da bu analize ait elektroferogram verilmiştir.



Şekil 5.6. Optimum koşullar altında ZOF-HCT-TEL'e ait elektroferogram

Şekil 5.6.'dan da görüldüğü gibi kullanılan IS, elektroferogramda ZOF ve HCT pikleri arasında yer almış ve maddeler arasında hesaplanan Rs değerlerinin 2'nin

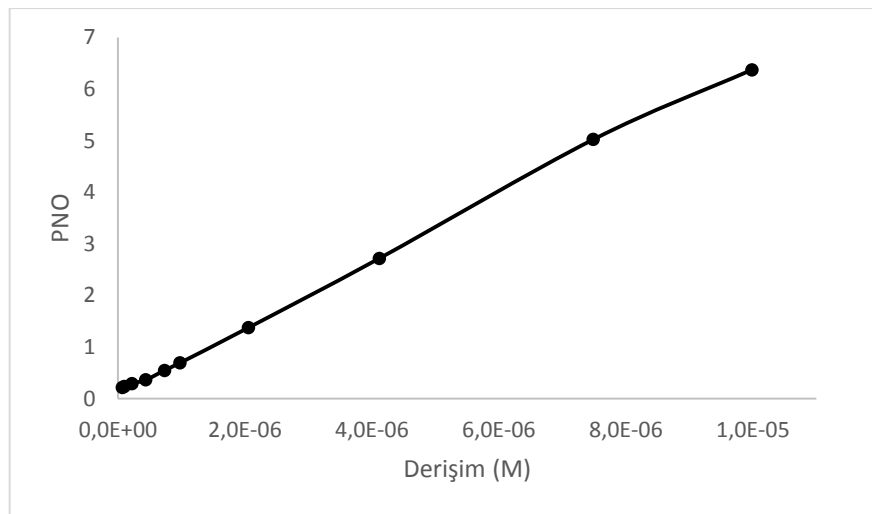
üzerinde olduğu bulunmuştur. Bu koşullar altında göç zamanları HCT, TEL ve ZOF için sırasıyla $3,38 \pm 0,05$ dk, $4,25 \pm 0,12$ dk ve $4,67 \pm 0,13$ dk olarak gözlenmiştir. ZOF ve HCT için elektroforetik hareketlilikler ise sırasıyla $2,77 \times 10^{-4}$ ve $3,42 \times 10^{-4}$ cm²/Vs olarak hesaplanmıştır.

5.1.2. Validasyon

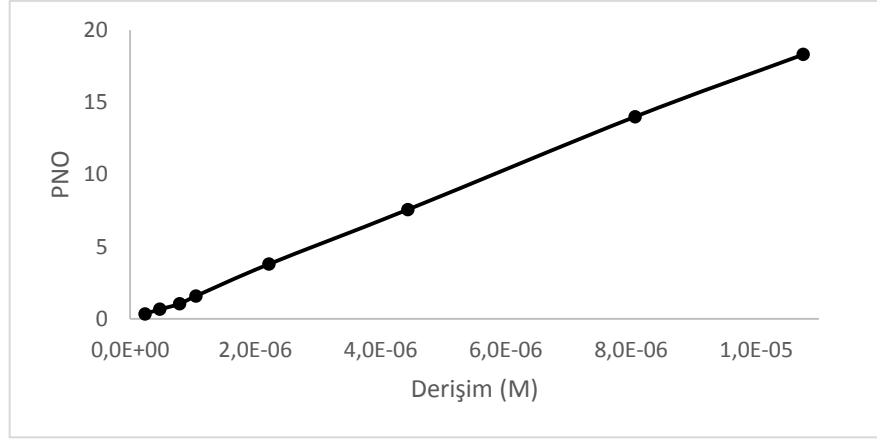
Optimum koşullar belirlendikten sonra geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla yöntemin doğrusallık, kesinlik, doğruluk, spesifiklik, duyarlılık ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Hesaplamalarda PNO değerleri kullanılmıştır. Ayrıca yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile tabaka sayısı (N), Rs ve asimetri faktörü (As) parametreleri hesaplanmıştır.

5.1.2.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenmesi amacı ile ZOF'un $3,46 \times 10^{-8}$ M- $3,12 \times 10^{-5}$ M ve HCT'nin $3,72 \times 10^{-8}$ M- $3,36 \times 10^{-5}$ M aralığında 12 farklı çözeltilerinin analizi sonucunda yöntemin ZOF için $9,98 \times 10^{-6}$ M- $6,92 \times 10^{-8}$ M aralığında ve HCT için $1,07 \times 10^{-5}$ M- $2,36 \times 10^{-7}$ M aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. Yöntemde ZOF için $y = 618809x + 0,065$ eşitliğine sahip ($r = 0,9994$) ve HCT için $y = 16613135x - 0,172$ eşitliğine sahip ($r = 0,9979$) doğrular elde edilmiştir. Şekil 5.7. ve 5.8.'de elde edilen bu doğrular sunulmuştur.



Şekil 5.7. KE yöntemi ile ZOF'un doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi



Şekil 5.8. KE yöntemi ile HCT'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel gösterimi

Yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten ZOF için $2,20 \times 10^{-7}$ M- $4,11 \times 10^{-6}$ M ve HCT için $2,36 \times 10^{-7}$ M- $4,43 \times 10^{-6}$ M aralığında 6 farklı derişime sahip çözelti kalibrasyon noktaları olarak seçilmiştir. Çözeltilerin gün içi ve günler arası yapılan analizlerine ait istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.1. ve 5.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. ZOF'un KE yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	680611,41	714283,32	725517,47	706804,07
b	-0,015	-0,025	-0,035	-0,025
r	0,9990	0,9995	0,9991	0,9986

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelge 5.2. HCT'nin KE yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
a	1714983,54	1658593,36	1677896,37	1683824,42
b	-0,126	0,0006	0,020	-0,034
r	0,9997	0,9976	0,9942	0,9970

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelgelerden de görüldüğü gibi gün içi ve günler arası yapılan istatistiksel değerlendirmelerde hem sifıra oldukça yakın kesim noktaları hem de yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edilmiştir.

5.1.2.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliğini göstermek amacı ile hazırlanan $9,77 \times 10^{-7}$ M ZOF ve $1,05 \times 10^{-6}$ M HCT çözeltisi gün içi ve günler arası olacak şekilde analiz edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.3. ve 5.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.3. ZOF'un KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	0,6244	0,6298	0,6223	0,6255
Ss	0,011	0,009	0,009	0,010
%BSS	1,84	1,43	1,52	1,60
GA (%95)	$\pm 0,05$	$\pm 0,44$	$\pm 0,47$	$\pm 0,07$

Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Çizelge 5.4. ZOF'un KE yöntemi ile tekrarlanabilirlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	1,7052	1,6489	1,6666	1,6736
Ss	0,023	0,017	0,018	0,030
%BSS	1,38	1,05	1,39	1,82
GA (%95)	$\pm 0,11$	$\pm 0,08$	$\pm 0,09$	$\pm 0,22$

Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Değerlendirmeler sonucunda tüm %BSS değerleri %2'nin altında bulunmuş ve geliştirilen yöntemin her iki maddenin analizi açısından da kesin olduğu gösterilmiştir.

5.1.2.3. Doğruluk

Yöntemin doğruluk çalışmasının gerçekleştirilmesi için $4,735 \times 10^{-7}$ M, $7,893 \times 10^{-7}$ M ve $2,216 \times 10^{-6}$ M HCT ve $4,398 \times 10^{-7}$ M, $7,331 \times 10^{-7}$ M ve $2,058 \times 10^{-6}$ M ZOF içeren derişimlerde 3 ayrı set çözelti hazırlanmıştır. Bu setlerin gün içi ve günler arası olmak üzere analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.5. ve 5.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 5.5. ZOF'un KE yöntemi ile doğruluk verileri

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$9,75 \times 10^{-7}$	$7,33 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,05 \times 10^{-6} \pm 3,59 \times 10^{-8}$	$9,72 \times 10^{-7} \pm 1,83 \times 10^{-8}$	$7,44 \times 10^{-7} \pm 1,34 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	99,74	99,53	101,59
	%BH	-0,25	-0,46	1,59
	%BSS	1,75	1,88	1,81
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$7,54 \times 10^{-8}$	$7,33 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,06 \times 10^{-6} \pm 3,06 \times 10^{-8}$	$9,59 \times 10^{-7} \pm 1,27 \times 10^{-8}$	$7,43 \times 10^{-7} \pm 1,38 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	100,14	98,15	101,48
	%BH	0,14	-1,84	1,48
	%BSS	1,48	1,33	1,86
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$7,54 \times 10^{-8}$	$7,33 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,10 \times 10^{-6} \pm 2,14 \times 10^{-8}$	$9,69 \times 10^{-7} \pm 1,85 \times 10^{-8}$	$7,37 \times 10^{-7} \pm 8,10 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	102,32	99,18	100,55
	%BH	2,32	-0,81	0,55
	%BSS	1,02	1,91	1,09
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$7,54 \times 10^{-8}$	$7,33 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,07 \times 10^{-6} \pm 3,70 \times 10^{-8}$	$9,67 \times 10^{-7} \pm 1,68 \times 10^{-8}$	$7,41 \times 10^{-7} \pm 1,19 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	100,73	98,96	101,20
	%BH	0,73	-1,03	1,20
	%BSS	1,78	1,73	1,60

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Çizelge 5.6. HCT'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,21 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-6}$	$7,89 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,24 \times 10^{-6} \pm 3,42 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^{-6} \pm 1,40 \times 10^{-8}$	$7,91 \times 10^{-7} \pm 1,26 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	101,01	98,23	100,17
	%BH	1,01	-1,76	0,17
	%BSS	1,53	1,35	1,60
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,21 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-6}$	$7,89 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,27 \times 10^{-6} \pm 4,13 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^{-6} \pm 8,45 \times 10^{-9}$	$7,92 \times 10^{-7} \pm 1,36 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	102,51	98,07	100,28
	%BH	2,51	-1,92	0,28
	%BSS	1,81	0,81	1,72

Çizelge 5.6. (Devam) HCT'nin KE yöntemi ile doğruluk verileri

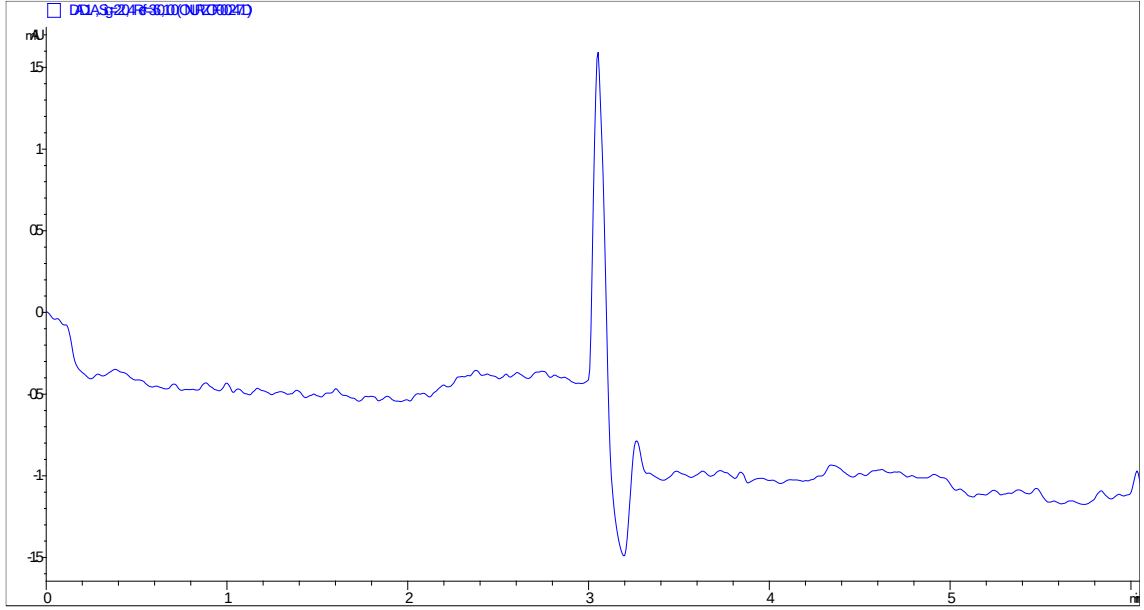
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,21 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-6}$	$7,89 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort$\pm$Ss)	$2,22 \times 10^{-6} \pm 3,32 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^{-6} \pm 1,16 \times 10^{-8}$	$8,08 \times 10^{-7} \pm 1,02 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	100,21	97,88	102,37
	%BH	0,21	-2,11	2,37
	%BSS	1,49	1,12	1,26
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$2,21 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-6}$	$7,89 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort$\pm$Ss)	$2,24 \times 10^{-6} \pm 4,06 \times 10^{-8}$	$1,03 \times 10^{-6} \pm 1,10 \times 10^{-8}$	$7,96 \times 10^{-7} \pm 1,41 \times 10^{-8}$
	%Geri Kazanım	101,25	98,06	100,94
	%BH	1,25	-1,93	0,94
	%BSS	1,80	1,06	1,77

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda %geri kazanım değerleri her iki maddenin tüm derişim düzeyleri için %97,88 ile %102,51 aralığında bulunmuştur. Ayrıca elde edilen %BSS değerlerinin de %2'nin altında olduğu görülmüştür. Böylelikle geliştirilen yöntemin incelenen maddeler için iyi bir kesinlik ve doğruluğa sahip olduğu kanıtlanmıştır.

5.1.2.4. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğini göstermek amacıyla yöntemin uygulanacağı farmasötik preparatların matriks ortamı analiz edilmiştir. Ayrıca yöntemin optimizasyonu aşamasında DAD detektörün farklı dalga boyları ile yapılan analizlerde herhangi bir girişim sinyaline rastlanmamıştır. Şekil 5.9.'da tablet matriks ortamına ait elektroferogram verilmiştir.



Şekil 5.9. Tablet matriksine ait elektroferogram

Elektroferogramdan da görüldüğü gibi maddelerin göç zamanları ile girişim yapan herhangi bir kirlilik saptanamamıştır. Yöntemin ZOF ve HCT için seçici olduğu gösterilmiştir.

5.1.2.5. Duyarlılık

Çalışmanın duyarlılığının belirlenebilmesi için S/N oranları kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Yöntemin LOD değeri ZOF ve HCT için sırasıyla $2,76 \times 10^{-8}$ M (12,38 ng/mL) ve $2,10 \times 10^{-8}$ M (6,26 ng/mL) olarak bulunmuştur. Yöntemdeki LOQ değerleri ise ZOF ve HCT için sırasıyla $8,28 \times 10^{-8}$ (37,15 ng/mL) ve $6,31 \times 10^{-8}$ M (18,80 ng/mL) olarak hesaplanmıştır.

5.1.2.6. Kararlılık

Yöntemin kararlılık çalışması için -18°C 'ta karanlıkta 1 ay bekletilmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'ta karanlıkta 24 saat bekletilmiş ZOF ve HCT çözeltileri analiz edilerek sonuçlar, taze hazırlanmış ZOF ve HCT çözeltilerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.7. ve 5.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.7. ZOF'un KE yöntemi ile kararlılık verileri

	Taze çözelti	24 saat	1 ay
Ort (n=3)	1,426	1,434	1,441
Ss	0,023	0,017	0,012
%BSS	1,64	1,24	0,83
%Geri	100,52	100,94	101,49

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma

Çizelge 5.8. HCT'nin KE yöntemi ile kararlılık verileri

	Taze çözelti	24 saat	1 ay
Ort (n=3)	3,689	3,695	3,696
Ss	0,017	0,056	0,067
%BSS	0,47	1,52	1,83
%Geri	99,38	99,55	99,56

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma

Hesaplanan %geri kazanım ve %BSS değerleri sonucunda ZOF ile HCT'nin kısa ve uzun dönemde kararlı olduğu anlaşılmıştır. Deneyler süresince ZOF ve HCT'nin ana stokları -18°C'ta ve karanlıkta saklanmıştır.

5.1.2.7. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile hesaplanan parametreler ve kabul sınırları Çizelge 5.9.'da verilmiştir.

Çizelge 5.9. ZOF ve HCT'nin KE yöntemi ile sistem uygunluk verileri

	N		Rs		As	
	ZOF	HCT	ZOF-TEL	HCT-TEL	ZOF	HCT
Hesaplanan Değer	38769	25376	2,77	3,16	1,007	0,996
Kabul Sınırı	>2000		>1,5		0,95<As<1,2	

N: Tabaka sayısı, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü

Yapılan hesaplamalarla geliştirilen yöntemin her iki madde için de kabul kriterlerini yakaladığı ve sistem uygunluğunu sağladığı gösterilmiştir.

5.2. YPSK Yöntemi

Geliştirilen KE yöntemini karşılaştırmak amacı ile ZOF ve HCT için bir sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde de deteksiyon DAD detektör kullanılarak yapılmıştır. Ayrım için C8 kolon (3,0×150 mm, 3,5 µm i.d.) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı tüm analizlerde 40°C’ta sabit tutulmuştur. KE yönteminde IS olarak kullanılan TEL bu yöntemde de IS olarak seçilmiştir. YPSK yönteminin de optimizasyonu ve validasyonu sağlandıktan sonra geliştirilen yöntem ZOF’un tek ve HCT ile kombine preparatlarına uygulanmıştır.

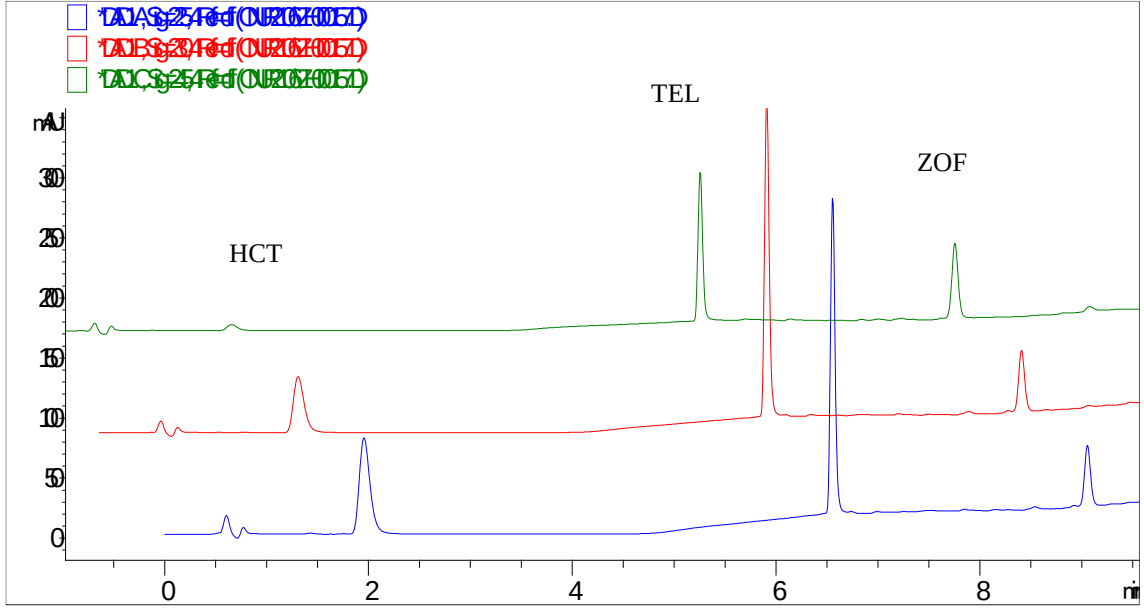
5.2.1. Optimizasyon

YPSK yönteminde ayırım için öncelikle 3,0×150 mm boyutlarında 3,5 µm partikül boyutuna sahip C18 kolon kullanılmıştır. Bu kolon ile yapılan analizlerde bozuk pik morfolojileri ve uzun analiz süreleri ile karşılaşmış ve sonuç olarak maddelerin yeterli ayrımları sağlanamamıştır. Aynı boyutlarda fakat C18 kolona göre daha az apolar özellikte olan C8 kolon ile ilk denemelerden sonuç alınınca çalışmada bu kolonun kullanılmasına karar verilmiştir.

YPSK yönteminde optimum koşulları belirlemek için dalga boyu, hareketli faz bileşimi ve akış hızı parametreleri incelenmiştir.

5.2.1.1. Dalga boyu

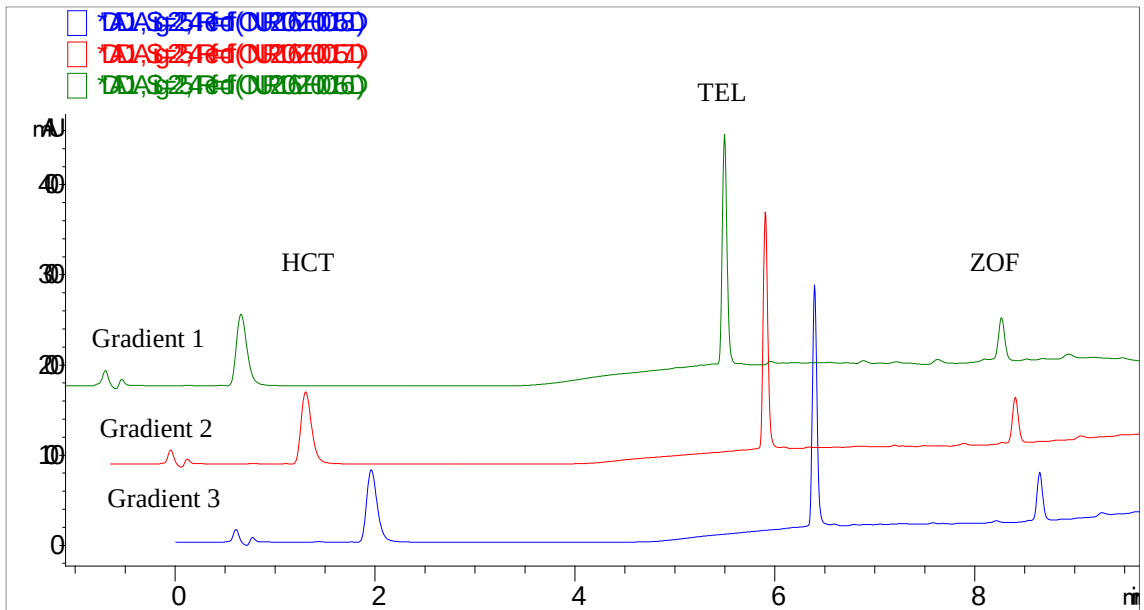
KE yönteminde olduğu gibi bu yöntemde de DAD detektör kullanıldığı için hem etkin maddeler hem de IS için farklı dalga boylarında analizler gerçekleştirilmiştir. Analizlerde gradient sistemle kullanılan A ve B hareketli fazlarının akış hızı 1 mL/dk akış hızında sabit tutulmuştur. Tüm maddeler için en uygun pik alanları ve morfolojileri 225 nm’de gözlenmiştir. Şekil 5.10.’da 225 nm’de elde edilen bir kromatogram verilmiştir.



Şekil 5.10. Maddelerin 225 nm'deki kromatogramı

5.2.1.2. Hareketli faz bileşimi

Yöntemde hareketli faz olarak kullanılan A ve B (%1 fosforik asit içeren %10 asetonitril ve %1 fosforik asit içeren asetonitril) çözeltilerinin oranları analiz süresince değiştirilerek hareketli fazdaki organik çözücü oranının ayırma katkısı araştırılmıştır. Analiz süresince akış hızı 1 mL/dk'da sabit tutulmuştur. Çizelge 4.1.'e göre uygulanan gradient programlar ile elde edilen kromatogramlar Şekil 5.11.'de sunulmuştur.



Şekil 5.11. Hareketli faz bileşimi incelemesi

Yapılan analizler sonunda pik morfolojileri, alıkonma zamanları ve Rs değerleri incelenmiş ve hareketli faz bileşimi için gradient 2 seçilmiştir.

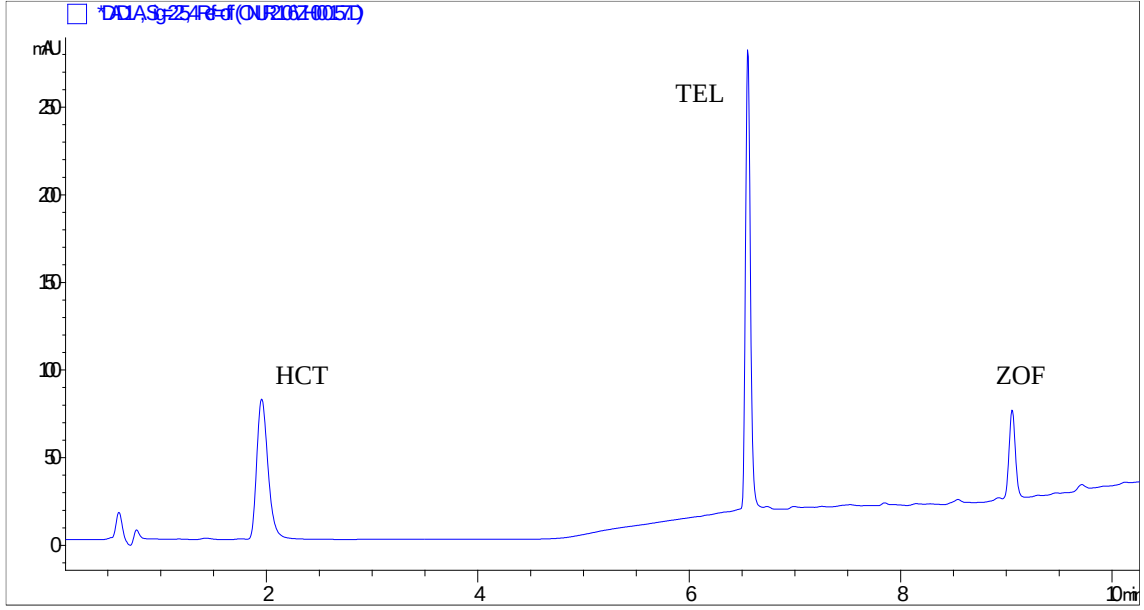
5.2.1.3. Akış hızı

Belirlenen gradient programla kullanılan hareketli fazın uygun akış hızının belirlenmesi amacıyla ZOF ve HCT'nin farklı akış hızlarında analizleri gerçekleştirilmiştir. 1 mL/dk akış hızından daha yüksek akış hızlarından artan basınç problemleri ile karşılaşıldığından daha yüksek akış hızları denenmemiştir. 1 mL/dk'dan daha düşük akış hızlarında ise beklenildiği gibi pik taban genişlikleri artmış ve analiz süreleri uzamıştır. Kullanılan akış hızında herhangi bir sorunla karşılaşılmadığı için çalışmada akış hızı 1 mL/dk olarak kullanılmıştır.

5.2.1.4. pH

Yöntemde kullanılan hareketli fazın pH'ı pH 1,60 düzeyinde ölçülmüştür. İncelenen parametreler sonucunda elde edilen kromatogramlarda yeterli Rs değeri, uygun pik morfolojisi ve alıkonma zamanları gözlemlendiği için hareketli fazın pH'ı ile ilgili daha detaylı bir inceleme yapılmamıştır.

İncelenen parametreler sonucunda YPSK yöntemi için uygun çalışma koşulları; deteksiyonun 225 nm dalga boyunda gerçekleştirilmesi, hareketli faz olarak %1 H₃PO₄ içeren %10 asetonitril ve %1 H₃PO₄ içeren asetonitril çözeltilerinin gradient uygulanması ve hareketli fazın 1 mL/dk akış hızında olması şeklinde belirlenmiştir. Şekil 5.12.'de optimum koşullarda analizi yapılan ZOF ve HCT'nin kromatogramı gösterilmiştir.



Şekil 5.12. Optimum koşullar altında analiz edilen ZOF, HCT ve TEL'e ait kromatogram

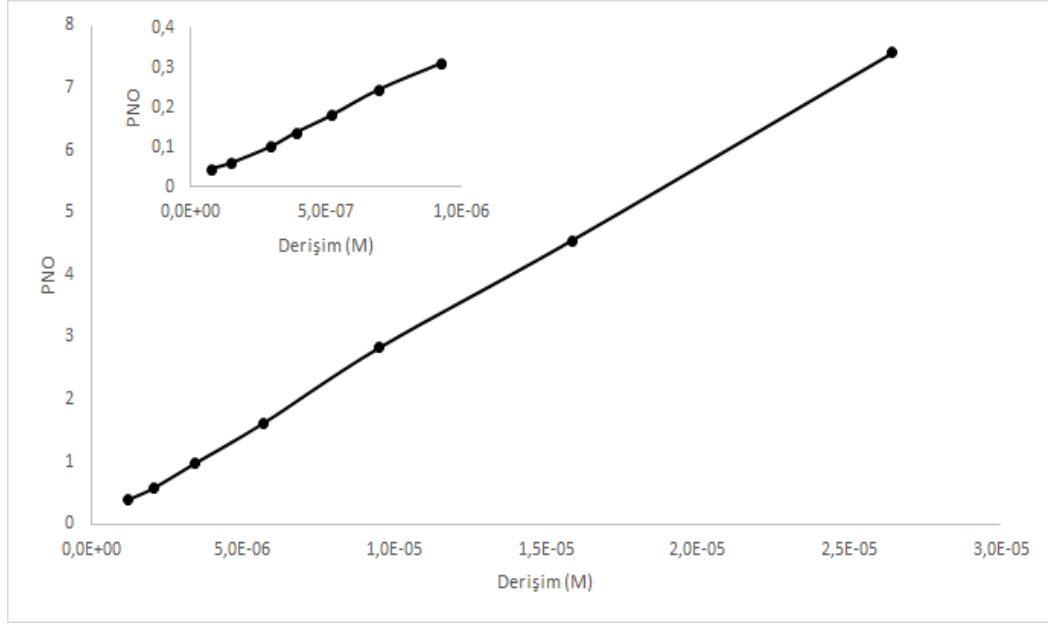
Bu koşullar altında HCT, TEL ve ZOF için alıkonma zamanları sırasıyla $1,89 \pm 0,0007$ dk, $6,53 \pm 0,0017$ dk ve $9,05 \pm 0,0006$ dk olarak gözlenmiştir.

5.2.2. Validasyon

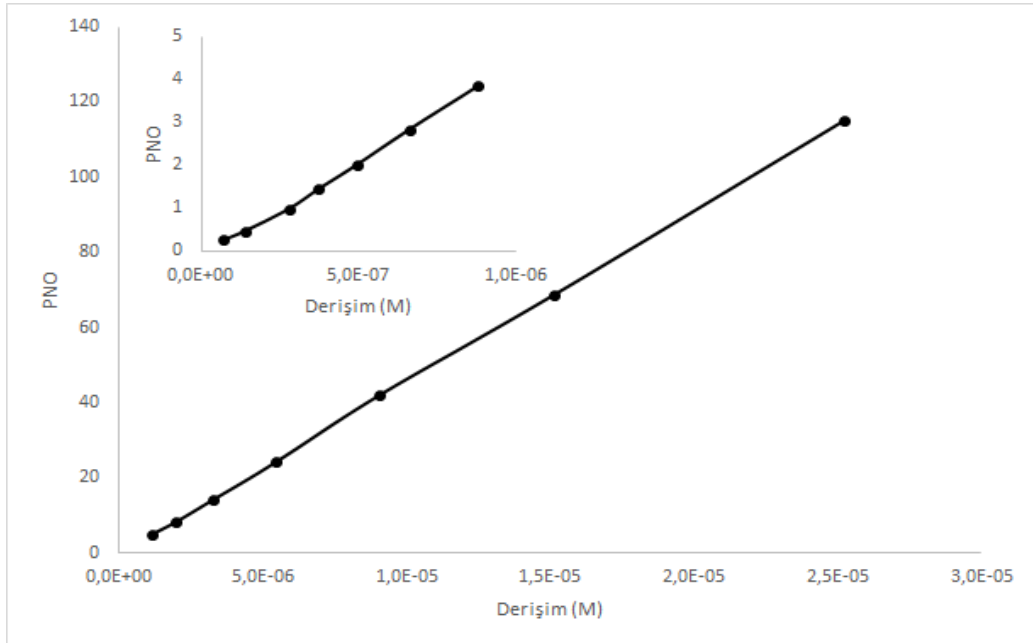
Optimizasyon koşulları belirlenen YPSK yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık ve kararlılık parametreleri incelenmiştir. Yöntemin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile ise N, Rs, As, kapasite faktörü (k') ve seçicilik faktörü (α) parametreleri hesaplanmıştır

5.2.2.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusalılık çalışması için ZOF ve HCT'nin sırasıyla $2,64 \times 10^{-5}$ - $3,65 \times 10^{-8}$ M ve $2,52 \times 10^{-5}$ - $3,48 \times 10^{-8}$ M aralığında 15 farklı derişimi hazırlanarak YPSK ile analizleri gerçekleştirilmiştir. PNO kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda yöntemin ZOF için $2,64 \times 10^{-5}$ - $7,32 \times 10^{-8}$ M aralığında ve HCT için $2,52 \times 10^{-5}$ - $6,97 \times 10^{-8}$ M doğrusal olduğu bulunmuştur. Yöntemde ZOF ve HCT için sırasıyla $y = 285560x + 0,02$ ($r = 0,9998$) ve $y = 4575412x - 0,30$ ($r = 0,9999$) şeklinde eşitliklere sahip yüksek korelasyonlu doğrular elde edilmiştir. Şekil 5.13. ve 5.14.'te yöntemin doğrusal aralığını gösteren doğrular sunulmuştur.



Şekil 5.13. YPSK yönteminde ZOF'un doğrusal olduğu aralığın grafiksel görünümü



Şekil 5.14. YPSK yönteminde HCT'nin doğrusal olduğu aralığın grafiksel görünümü

Yöntemin doğrusal olduğu aralığı baz alarak $2,41 \times 10^{-8}$ ve $3,40 \times 10^{-7}$ M arasında değişen 7 farklı derişimde kalibrasyon setleri oluşturulmuştur. Bu derişimlerin gün içi ve günler arası yapılan analizleri sonucu elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5.10. ve 5.11.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.10. ZOF'un YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=21)
	Gün I (n=7)	Gün II (n=7)	Gün III (n=7)	
A	284253	279247	279546	281015
B	0,017	0,028	0,023	0,023
R	0,9994	0,9994	0,9994	0,9992

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Çizelge 5.11. HCT'nin YPSK yöntemi ile kalibrasyon verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=21)
	Gün I (n=7)	Gün II (n=7)	Gün III (n=7)	
A	4372732,14	4467143,93	4502929,74	4447601,94
B	-0,075	-0,143	-0,176	-0,131
R	0,9991	0,9987	0,9995	0,9990

a: Eğim, b: Kesim, r: Korelasyon katsayısı

Kalibrasyon setlerinin analizi sonucunda kesim noktaları sıfıra yakın ve yüksek korelasyon katsayısına sahip doğrular elde edilmiştir

5.2.2.2. Kesinlik

YPSK yönteminin kesinliğinin gösterilebilmesi amacı ile $6,61 \times 10^{-7}$ M HCT ve $6,93 \times 10^{-7}$ M ZOF'un 3 ardışık günde 6'şar defa analizi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 5.12. ve 5.13.'te analiz sonuçlarına ait istatistiksel değerlendirmeler verilmiştir.

Çizelge 5.12. ZOF'un YPSK yöntemi ile kesinlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	0,223	0,224	0,224	0,224
Ss	0,002	0,003	0,002	0,002
%BSS	1,18	1,64	0,99	1,24
GA (%95)	±0,013	±0,018	±0,011	±0,020

Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı

Çizelge 5.13. HCT'nin YPSK yöntemi ile kesinlik verileri

	Günler arası			Tüm Günler (n=18)
	Gün I (n=6)	Gün II (n=6)	Gün III (n=6)	
Ort	2,782	2,773	2,791	2,782
Ss	0,017	0,023	0,022	0,021
%BSS	0,61	0,84	0,81	0,76
GA (%95)	±0,084	±0,115	±0,112	±0,157
Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA (%95): %95 olasılıkla güven aralığı				

Gün içi ve günler arası olmak üzere yapılan istatistiksel değerlendirmelerde analiz sonuçlarının %2'nin altında %BSS değerlerine sahip olduğu ve incelenen aralıkta yöntemin tekrarlanabilir olduğu bulunmuştur.

5.2.2.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmaları için ZOF ve HCT'nin sırasıyla $2,05 \times 10^{-6}$, $9,24 \times 10^{-7}$ ve $5,20 \times 10^{-7}$ M ve $1,95 \times 10^{-6}$, $8,81 \times 10^{-7}$ ve $4,95 \times 10^{-7}$ M derişim düzeyindeki çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin gün içi ve günler arası olmak üzere 6'şar kez analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 5.14. ve 5.15.'te verilmiştir.

Çizelge 5.14. ZOF'un YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$9,24 \times 10^{-7}$	$5,2 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,04 \times 10^{-6} \pm 4,36 \times 10^{-9}$	$9,10 \times 10^{-7} \pm 1,53 \times 10^{-8}$	$5,15 \times 10^{-7} \pm 5,55 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	99,46	98,38	98,91
	%BH	-0,53	-1,61	-1,08
	%BSS	0,21	1,68	1,07
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$9,24 \times 10^{-7}$	$5,2 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,05 \times 10^{-6} \pm 1,30 \times 10^{-8}$	$9,24 \times 10^{-7} \pm 1,46 \times 10^{-8}$	$5,14 \times 10^{-7} \pm 5,79 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	99,96	99,86	98,87
	%BH	-0,03	-0,13	-1,12
	%BSS	0,63	1,58	1,51

Çizelge 5.14. (Devam) ZOF'un YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$9,24 \times 10^{-7}$	$5,2 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,07 \times 10^{-6} \pm 1,79 \times 10^{-8}$	$9,23 \times 10^{-7} \pm 1,45 \times 10^{-8}$	$5,20 \times 10^{-7} \pm 8,11 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	100,83	99,80	99,88
	%BH	0,83	-0,19	-0,11
	%BSS	0,86	1,57	1,56
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$2,05 \times 10^{-6}$	$9,24 \times 10^{-7}$	$5,2 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$2,06 \times 10^{-6} \pm 1,72 \times 10^{-8}$	$9,19 \times 10^{-7} \pm 1,54 \times 10^{-8}$	$5,16 \times 10^{-7} \pm 7,24 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	100,08	99,35	99,22
	%BH	0,08	-0,64	-0,77
	%BSS	0,83	1,67	1,40

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Çizelge 5.15. HCT'nin YPSK yöntemi ile doğruluk verileri

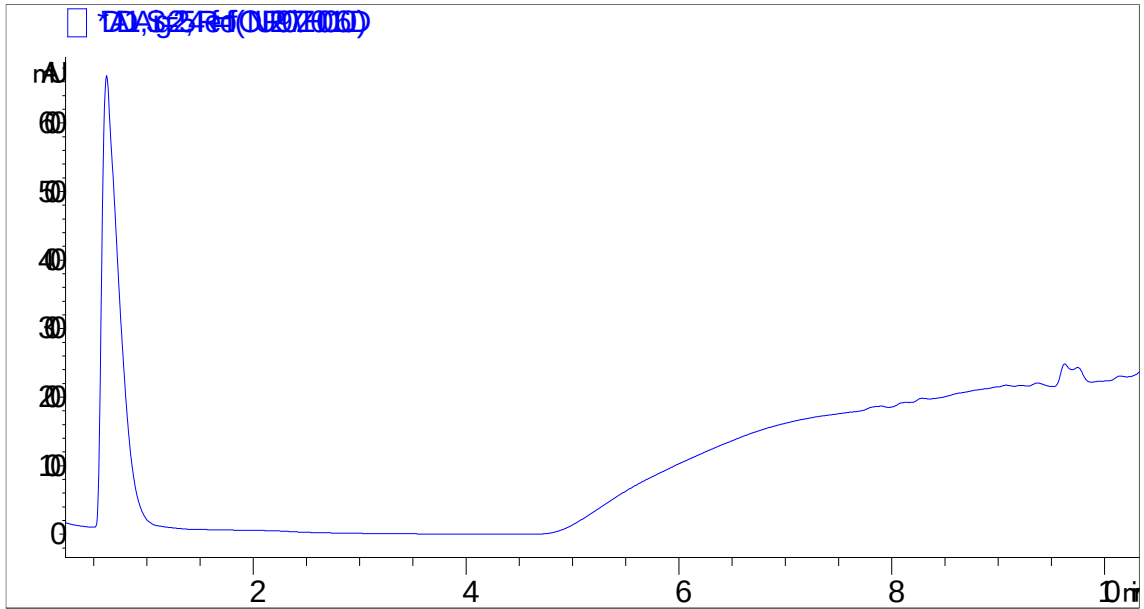
I. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,96 \times 10^{-6}$	$8,28 \times 10^{-7}$	$4,96 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$1,89 \times 10^{-6} \pm 2,58 \times 10^{-8}$	$8,64 \times 10^{-7} \pm 2,38 \times 10^{-9}$	$4,8 \times 10^{-7} \pm 3,44 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	96,65	98,03	98,08
	%BH	-3,34	-1,96	-1,91
	%BSS	1,36	0,27	0,70
II. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,96 \times 10^{-6}$	$8,28 \times 10^{-7}$	$4,96 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$1,87 \times 10^{-6} \pm 1,58 \times 10^{-8}$	$8,64 \times 10^{-7} \pm 2,38 \times 10^{-9}$	$4,87 \times 10^{-7} \pm 4,00 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	95,62	98,04	98,25
	%BH	-4,37	-1,95	-1,74
	%BSS	0,84	1,03	0,81
III. gün (n=6)	Eklenen (M)	$1,96 \times 10^{-6}$	$8,28 \times 10^{-7}$	$4,96 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$1,90 \times 10^{-6} \pm 1,29 \times 10^{-8}$	$8,81 \times 10^{-7} \pm 1,02 \times 10^{-8}$	$4,86 \times 10^{-7} \pm 7,56 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	97,08	99,9	98,07
	%BH	-2,91	-0,09	-1,92
	%BSS	0,67	1,15	1,55
Tüm günler (n=18)	Eklenen (M)	$1,96 \times 10^{-6}$	$8,28 \times 10^{-7}$	$4,96 \times 10^{-7}$
	Bulunan (Ort±Ss)	$1,89 \times 10^{-6} \pm 2,17 \times 10^{-8}$	$8,70 \times 10^{-7} \pm 1,09 \times 10^{-8}$	$4,87 \times 10^{-7} \pm 5,02 \times 10^{-9}$
	%Geri Kazanım	96,45	98,66	98,13
	%BH	-3,54	-1,33	-1,86
	%BSS	1,14	1,25	1,03

n: Deney sayısı, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, BH: Bağıl hata, BSS: Bağıl standart sapma

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde tüm gün içi ve günler arası sonuçlarda %100 düzeyinde %geri kazanım değerleri ve %2'nin altında %BSS değerleri elde edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemin de çalışılan aralıktaki incelenen maddeler için iyi bir kesinlik ve doğruluğa sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2.2.4. Seçicilik

Miktar tayininin yapılacağı tabletlerin matriks ortamından kaynaklı herhangi bir girişim yapan sinyal varlığını araştırmak için yöntemin optimum koşullarında tablet matriks ortamı analiz edilmiştir. şekil 5.15.'te bu analizlerden birine ait bir kromatogram sunulmuştur.



şekil 5.15. YPSK yöntemi ile tablet matriks ortamına ait kromatogram

Kromatogramdan da görüldüğü gibi tablet matriks ortamında incelenen maddelerin analizlerini etkileyecek herhangi bir girişim sinyali ile karşılaşılmamıştır. Geliştirilen YPSK yönteminin de analitler için seçici olduğu gösterilmiştir.

5.2.2.5. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığının belirlenebilmesi için kullanılan S/N oranları ile ZOF ve HCT için LOD değerleri sırasıyla $2,31 \times 10^{-8}$ M (10,37 ng/mL) ve $1,46 \times 10^{-8}$ M (4,37

ng/mL) olarak bulunmuştur. LOQ değerleri ise ZOF ve HCT için sırasıyla $6,93 \times 10^{-8}$ M (31,11 ng/mL) ve $4,40 \times 10^{-8}$ M (13,12 ng/mL) olarak hesaplanmıştır.

5.2.2.6. Kararlılık

YPSK yönteminin kararlılık çalışması için ZOF ve HCT'nin -18°C'de karanlıkta 1 ay bekletilmiş ve +4°C'de karanlıkta 24 saat bekletilmiş çözeltileri ile taze hazırlanmış ZOF ve HCT çözeltileri analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.16. ve 5.17.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.16. ZOF'un YPSK yöntemi ile kararlılık verileri

	Taze çözelti	24 saat	1 ay
Ort (n=3)	0,322	0,325	0,321
Ss	0,0006	0,0044	0,0025
%BSS	0,21	1,35	0,79
%Geri kazanım	99,46	100,28	99,25

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma

Çizelge 5.17. HCT'nin YPSK yöntemi ile kararlılık verileri

	Taze çözelti	24 saat	1 ay
Ort (n=3)	5,118	5,101	5,047
Ss	0,080	0,008	0,078
%BSS	1,57	0,15	1,55
%Geri kazanım	100,42	100,10	99,05

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma

Yapılan analizlerde KE yöntemi ile uyumlu sonuçlar elde edilmiş ve ZOF ile HCT'nin kısa dönemde ve uzun dönemde kararlı olduğu anlaşılmıştır.

5.2.2.7. Sistem uygunluk testleri

Geliştirilen YPSK yönteminin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile incelenen maddeler için N, Rs, As, k' ve α parametreleri hesaplanmıştır. Çizelge 5.18. ve 5.19.'da sırasıyla ZOF ve HCT için hesaplanan parametreler ve kabul sınırları verilmiştir.

Çizelge 5.18. ZOF'un YPSK yöntemi ile sistem uygunluk verileri

	N	Rs	As	k'	α
Hesaplanan Değer	34946	5,03	0,991	17,10	1,41
Kabul Sınırı	>2000	>1,5	0,95<As<1,2	1-5	>1

N: Tabaka sayısı, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü, k': Kapasite faktörü, α : Seçicilik faktörü

Çizelge 5.19. HCT'nin YPSK yöntemi ile sistem uygunluk verileri

	N	Rs	As	k'	α
Hesaplanan Değer	3107	10,92	0,956	2,77	4,34
Kabul Sınırı	>2000	>1,5	0,95<As<1,2	1-5	>1

N: Tabaka sayısı, Rs: Ayrım gücü, As: Asimetri faktörü, k': Kapasite faktörü, α : Seçicilik faktörü

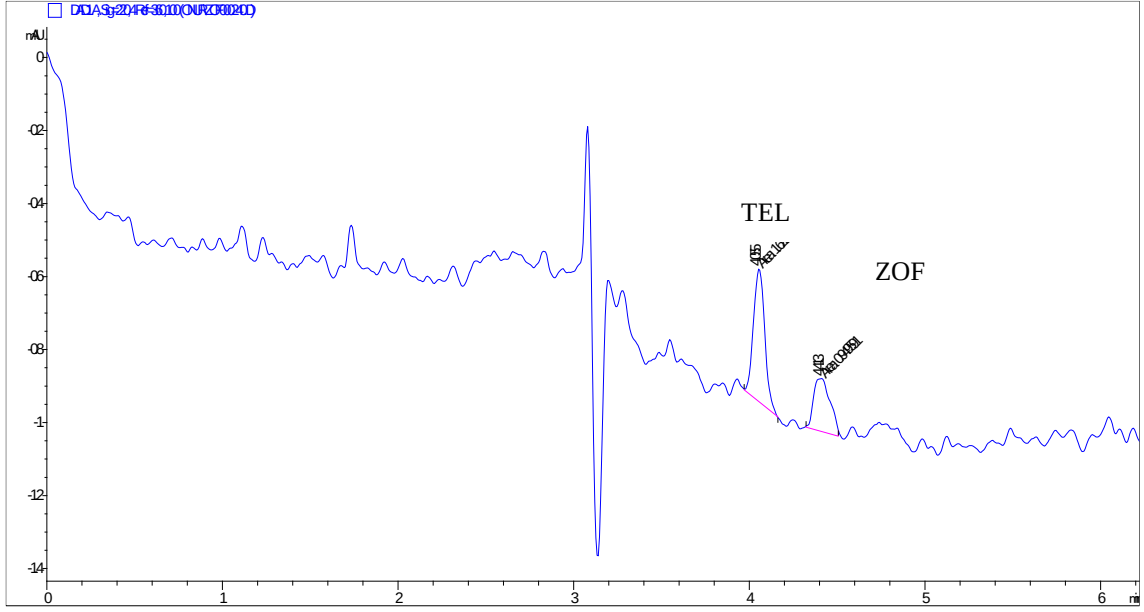
Yapılan hesaplamalar sonucunda tüm sistem uygunluk parametrelerinin gerekli kriterleri sağladığı bulunmuş ve bu şekilde geliştirilen yöntemin sistem uygunluğu gösterilmiştir.

5.3. Yöntemlerin Uygulanması

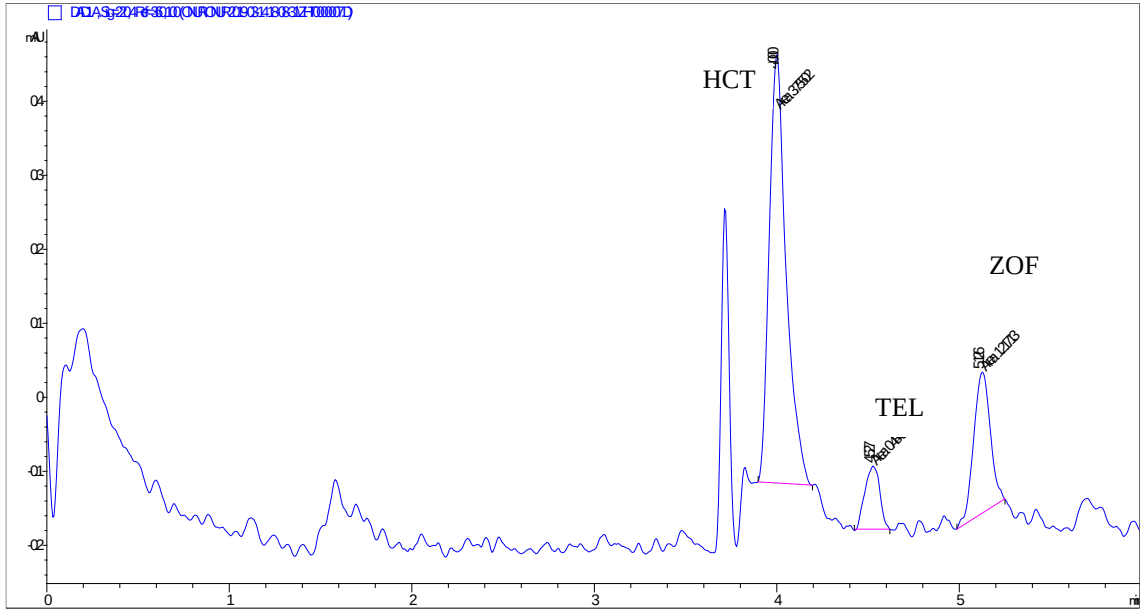
Geliştirilen ve valide edilen yöntemlerin uygulaması ZOF'un piyasadaki farmasötik preparatlarında gösterilmiştir. Bu amaçla yerel eczaneden satın alınan ve 30 mg ZOF içerdiği bildirilen Zoprotec® tablet ve 30 mg/12,5 mg ZOF/HCT içerdiği bildirilen Zoprotec Plus® tablet kullanılmıştır.

Her iki yöntemde de ZOF ve HCT'nin kalibrasyon aralığına denk gelecek şekilde 3 farklı derişimde tablet çözeltileri hazırlanmış ve her derişimin 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan son derişimler ZOF için $1,67 \times 10^{-6}$ M, $1,17 \times 10^{-6}$ M ve $5,85 \times 10^{-7}$ M ve HCT için $1,05 \times 10^{-6}$ M, $7,35 \times 10^{-7}$ M ve $3,67 \times 10^{-7}$ M'dir.

KE yöntemi ile ZOF'un tek ve kombine tabletlerinin analizleri sonucunda elde edilen elektroferogramlar sırasıyla Şekil 5.16. ve 5.17.'de verilmiştir.



Şekil 5.16. ZOF tablet analizine ait elektroferogram



Şekil 5.17. ZOF ve HCT içeren tablet analizine ait elektroferogram

Yapılan tablet analizlerinde geliştirilen KE yöntemindeki standart maddelerin pik karakteristiklerini taşıyan elektroferogramlar elde edilmiştir. KE yöntemi ile ZOF ve HCT'nin tabletlerden miktar tayinine yönelik istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.20. ve 5.21.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.20. ZOF tabletlerinin KE yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M)	$1,67 \times 10^{-6}$	Ort Bulunan (n=3)	$1,68 \times 10^{-6}$ M
		Ss	1,31
		%BSS	1,30
		%Geri Kazanım	100,34
	$1,17 \times 10^{-6}$	Ort Bulunan (n=3)	$1,17 \times 10^{-6}$ M
		Ss	1,03
		%BSS	1,03
		%Geri Kazanım	100,40
	$5,85 \times 10^{-7}$	Ort Bulunan (n=3)	$5,84 \times 10^{-7}$ M
		Ss	1,40
		%BSS	1,41
		%Geri Kazanım	99,91

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma

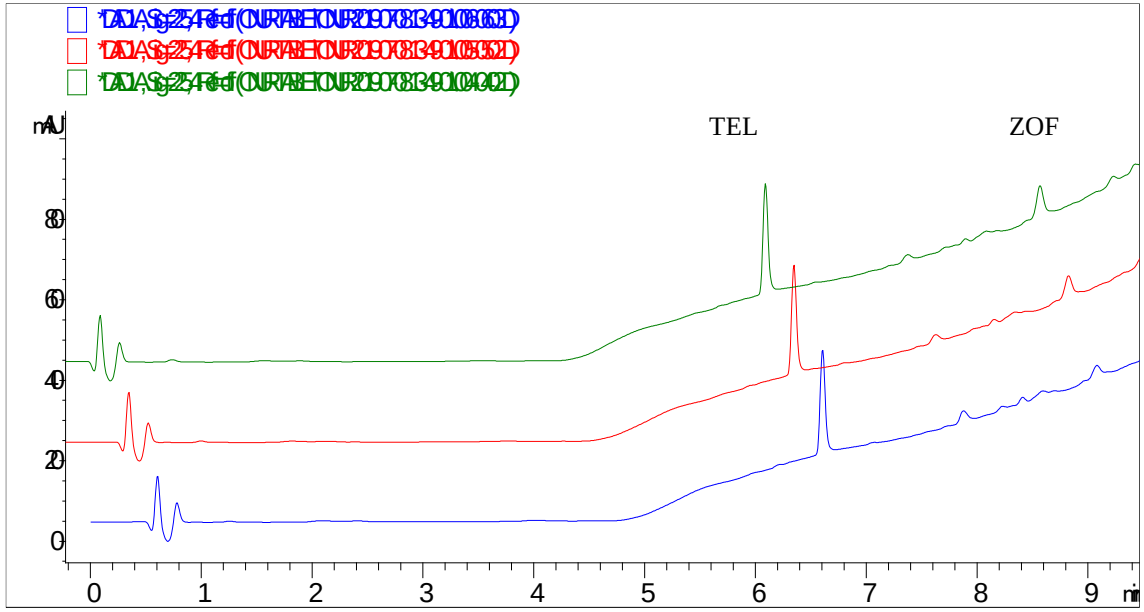
Çizelge 5.21. ZOF ve HCT tabletlerinin KE yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M) ZOF	$1,67 \times 10^{-6}$	Ort Bulunan (n=3)	$1,70 \times 10^{-6}$ M
		Ss	1,02
		%BSS	1,00
		%Geri Kazanım	101,78
	$1,17 \times 10^{-6}$	Ort Bulunan (n=3)	$1,16 \times 10^{-6}$ M
		Ss	1,42
		%BSS	1,44
		%Geri Kazanım	98,92
	$5,85 \times 10^{-7}$	Ort. Bulunan (n=3)	$5,98 \times 10^{-7}$ M
		Ss	1,24
		%BSS	1,21
		%Geri Kazanım	102,30
Derişim (M) HCT	$1,05 \times 10^{-6}$	Ort Bulunan (n=3)	$1,07 \times 10^{-6}$ M
		Ss	1,29
		%BSS	1,27
		%Geri Kazanım	102,00
	$7,35 \times 10^{-7}$	Ort Bulunan (n=3)	$7,43 \times 10^{-7}$ M
		Ss	1,52
		%BSS	1,50
		%Geri Kazanım	101,13
	$3,67 \times 10^{-7}$	Ort Bulunan (n=3)	$3,67 \times 10^{-7}$ M
		Ss	0,62
		%BSS	0,62
		%Geri Kazanım	99,78

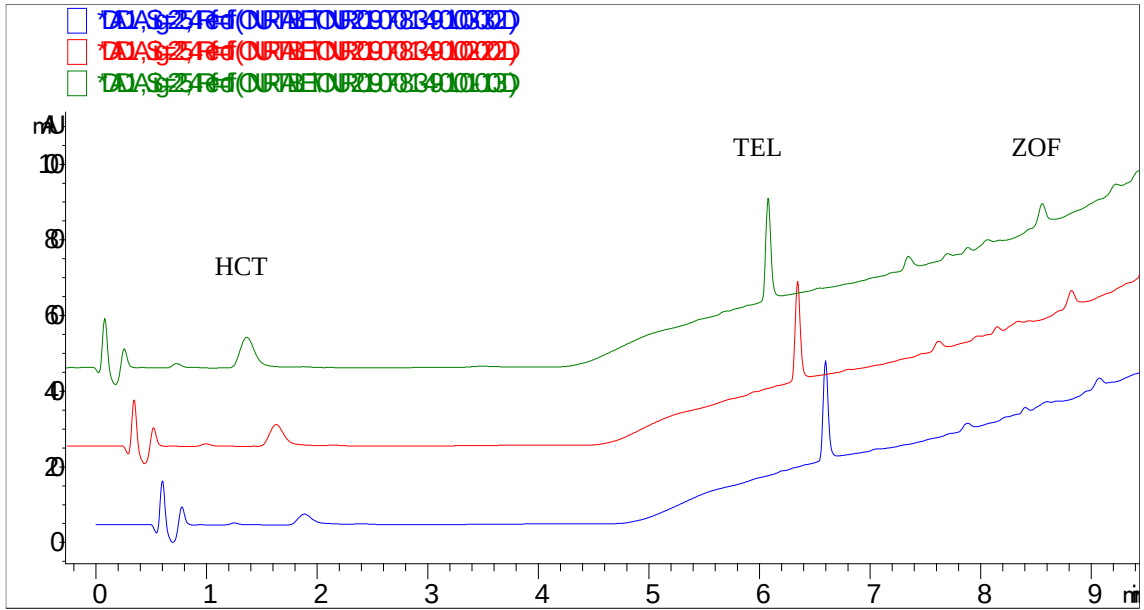
Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma

Yapılan değerlendirmelerde her iki tabletin derişim düzeyleri için %geri kazanım değerlerinin yaklaşık %100 düzeyinde olduğu bulunmuştur. Bu şekilde geliştirilen KE yöntemin ZOF'un tabletlerinden miktar tayini için kullanılabileceği gösterilmiştir.

YPSK yönteminde de her iki tablet için 3 farklı derişim düzeyinde hazırlanan çözeltiler 3'er tekrarlı şekilde analiz edilmiştir. Şekil 5.18. ve 5.19.'da bu analize ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 5.18. ZOF tablet analizine ait kromatogramlar



Şekil 5. 19. ZOF ve HCT içeren tablet analizine ait kromatogramlar

YPSK yöntemi ile yapılan tablet analizlerinde standart maddeler ile aynı pik karakteristiklerine sahip pikler elde edilmiş ve geliştirilen yöntemin ZOF ve HCT'nin tabletlerinden miktar tayini için uygulanabileceği gösterilmiştir. YPSK yöntemi ile yapılan tablet analizlerine ait istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 5.22. ve 5.23.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.22. ZOF tabletlerinin YPSK yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M)	1,67×10⁻⁶	Ort Bulunan (n=3)	1,71×10 ⁻⁶ M
		Ss	0,79
		%BSS	0,77
		%Geri Kazanım	102,35
	1,17×10⁻⁶	Ort Bulunan (n=3)	1,18×10 ⁻⁶ M
		Ss	1,23
		%BSS	1,21
		%Geri Kazanım	101,57
	5,85×10⁻⁷	Ort Bulunan (n=3)	5,81×10 ⁻⁷ M
		Ss	0,76
		%BSS	0,76
		%Geri Kazanım	99,44

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma

Çizelge 5.23. ZOF ve HCT tabletlerinin YPSK yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M) ZOF	1,67×10⁻⁶	Ort Bulunan (n=3)	1,69×10 ⁻⁶ M
		Ss	0,73
		%BSS	0,72
		%Geri Kazanım	101,30
	1,17×10⁻⁶	Ort Bulunan (n=3)	1,17×10 ⁻⁶ M
		Ss	0,44
		%BSS	0,43
		%Geri Kazanım	100,34
	5,85×10⁻⁷	Ort Bulunan (n=3)	5,73×10 ⁻⁷ M
		Ss	0,85
		%BSS	0,87
		%Geri Kazanım	98,03

Çizelge 5.23. (Devam) ZOF ve HCT tabletlerinin YPSK yöntemi ile miktar tayininin istatistiksel değerlendirilmesi

Derişim (M) HCT	$1,05 \times 10^{-6}$	Ort Bulunan (n=3)	$1,04 \times 10^{-6}$ M
		Ss	0,91
		%BSS	0,92
		%Geri Kazanım	99,556
	$7,35 \times 10^{-7}$	Ort Bulunan (n=3)	$7,47 \times 10^{-7}$ M
		Ss	1,28
		%BSS	1,25
		%Geri Kazanım	101,64
	$3,67 \times 10^{-7}$	Ort Bulunan (n=3)	$3,77 \times 10^{-7}$ M
		Ss	1,67
		%BSS	1,63
		%Geri Kazanım	102,58

Ort: Ortalama, n: Deney sayısı, Ss: Standart sapma, % BSS: % Bağlı standart sapma

Bu yöntemde de elde edilen %geri kazanım değerleri yaklaşık %100 düzeyinde bulunmuş ve geliştirilen yöntemin ZOF'un tabletlerinden tayini için uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

5.4. Yöntemlerin Karşılaştırılması

Geliştirilen ve valide edilen KE ve YPSK yöntemlerinin ortalama ve kesinlikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemini belirleyebilmek amacı ile t ve F testleri kullanılmıştır.

Yöntemlerin ortalamalarının t testi ile karşılaştırılabilmesi için yöntemlerin uygulandığı farmasötik preparatların (ZOF ve HCT içeren tabletler) analizlerinden hesaplanan %geri kazanım değerleri kullanılmıştır.

Yöntemlerin kesinliklerinin karşılaştırılabilmesi için ise yöntemlerin hem ZOF hem de HCT için yapılan kesinlik deneylerinde hesaplanan standart sapma değerleri kullanılmıştır.

Yöntemler için hesaplanan değerler ve tablodan bulunan değerler Çizelge 5.24.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.24. Yöntemlerin karşılaştırılması

t_{tablo} (SD = n₁+n₂-2 = 16)	1,746
t_{hesap} (ZOF)	1,343
t_{hesap} (HCT)	0,388
F_{tablo} (SD = n-1 = 17)	2,271
F_{hesap} (ZOF)	2,053
F_{hesap} (HCT)	1,963

SD: Serbestlik derecesi, n: Deney sayısı

Çizelge 5.24.'ten de görüldüğü gibi hem ZOF hem de HCT için hesaplanan t değerleri, tablodan bulunan t değerinden küçüktür. Böylelikle %95 güven düzeyinde geliştirilen yöntemlerin ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu söylenebilir. Yöntemlerin kesinliklerini karşılaştırmak için hesaplanan F değerleri de tablodan bulunan F değerinden küçüktür. %95 güven düzeyinde geliştirilen yöntemlerin kesinlikleri arasında istatistiksel olarak fark önemsizdir.

6. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, ZOF'un farmasötik preparatlarından miktar tayini için basit, hızlı ve duyarlı bir KE yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemi karşılaştırmak amacı ile bir YPSK yöntemi ile geliştirilmiştir. Her iki yöntemin de validasyonu ve tabletlerden tayine uygulanabilirliği gösterilmiş ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

KE yönteminde deteksiyon 220 nm'de DAD ile sağlanmıştır. Ayrım 40 cm efektif (48,5 cm toplam) uzunluğa ve 75 µm iç çapa sahip balon hücreli kapiler ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda ZOF ve HCT %15 metanol içeren 10 mM borat tamponu (pH 9,00) ve 25 kV potansiyel altında analiz edilmiştir. Yöntemde bu koşullara uygun IS olarak TEL seçilmiştir. Bu koşullar altında göç zamanları HCT, TEL ve ZOF için sırasıyla $3,38 \pm 0,05$ dk, $4,25 \pm 0,12$ dk ve $4,67 \pm 0,13$ dk olarak gözlenmiştir.

YPSK yönteminde ise deteksiyon 225 nm'de DAD ile gerçekleştirilmiştir. Ayrım $3,0 \times 150$ mm boyutlarında ve 3,5 µm partikül boyutuna sahip C8 kolon ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak %1 H₃PO₄ içeren %10 asetonitril ve %1 H₃PO₄ içeren asetonitril çözeltileri Çizelge 4.1.'de belirtilen gradient 2 programı ile kullanılmıştır. Hareketli fazın akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında HCT, TEL ve ZOF için alıkonma zamanları sırasıyla $1,89 \pm 0,0007$ dk, $6,53 \pm 0,0017$ dk ve $9,05 \pm 0,0006$ dk olarak gözlenmiştir.

Her iki yöntemin de validasyonu Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) tarafından belirlenen kriterler doğrultusunda doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, duyarlılık ve kararlılık parametreleri ile incelenmiştir. Daha sonra her iki yöntem için sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır.

Yapılan validasyon çalışmalarında ZOF ve HCT'nin incelenen uzun dönemde dahi kararlı oldukları bulunmuştur. Yöntemlerin ZOF ve HCT için doğrusal oldukları aralıklar belirlendikten sonra kesinlik ve doğrulukları gösterilmiştir. Yöntemlerin seçiciliği açısından hem optimizasyon hem de validasyon aşamalarında DAD detektörün farklı dalga boyları ile çalışılabilme özelliğinden yararlanılmış ve girişim yapan herhangi bir sinyale rastlanmamıştır. Ayrıca tablet matrikslerinin analizleri her iki yöntemle de yapılmış ve matriks ortamlarının ZOF ve HCT analizlerini etkilemediği gösterilmiştir.

KE yönteminde kullanılan balon hücreli kapiler sayesinde duyarlılık arttırılmış ve LOD değeri ZOF ve HCT için sırasıyla $2,76 \times 10^{-8}$ M (12,38 ng/mL) ve $2,10 \times 10^{-8}$ M (6,26 ng/mL) olarak bulunmuştur. Yöntemdeki LOQ değerleri ise ZOF ve HCT için sırasıyla $8,28 \times 10^{-8}$ (37,15 ng/mL) ve $6,31 \times 10^{-8}$ M (18,80 ng/mL) olarak hesaplanmıştır. YPSK yönteminde ise ZOF ve HCT için LOD değerleri sırasıyla $2,31 \times 10^{-8}$ M (10,37 ng/mL) ve $1,46 \times 10^{-8}$ M (4,37 ng/mL) olarak bulunmuştur. LOQ değerleri ise ZOF ve HCT için sırasıyla $6,93 \times 10^{-8}$ M (31,11 ng/mL) ve $4,40 \times 10^{-8}$ M (13,12 ng/mL) olarak hesaplanmıştır. Daha sonra geliştirilen yöntemlerin sistem uygunluğunu göstermek amacı ile N, Rs, As gibi çeşitli parametreler hesaplanmış ve kabul edilen sınırlar içerisinde oldukları gösterilmiştir.

Geliştirilen ve valide edilen yöntemlerin uygulaması ZOF'un piyasadaki farmasötik preparatlarında gösterilmiştir. Bu amaçla yerel eczaneden satın alınan ve 30 mg ZOF içerdiği bildirilen Zoprotec® tablet ve 30 mg/12,5 mg ZOF/HCT içerdiği bildirilen Zoprotec Plus® tablet kullanılmıştır. Her iki yöntemde de 3 farklı derişim düzeyi ile çalışılmış ve hesaplanan % geri kazanım değerleri %100 düzeyinde bulunmuştur.

ZOF ve HCT'nin miktar tayini için geliştirilen yöntemlerin doğrulukları ve kesinlikleri t ve F testleri ile karşılaştırılmış ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur.

ZOF'un miktar tayinine yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde literatürde KE yöntemi ile tek çalışma (Fayed, vd., 2018, s.461) bulunduğu görülmüştür. Çalışmada HCT'nin iki ana kirliliği, HCT ve ZOF'un farmasötik preparatlardan eş zamanlı tayini gerçekleştirilmiş ve yöntem valide edilmiştir. Çalışmada kullanılan analiz koşulları ve sonuçları bu tez kapsamında geliştirilen yönteme benzerlikler göstermektedir. Araştırmacılar karşılaştırma yöntemi olarak literatürdeki bir YPSK yöntemini kullanırken bu tez çalışmasında yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Burada geliştirilen KE yönteminin literatürdeki bu KE yöntemine en önemli üstünlüğü duyarlılığıdır. Literatürde LOQ değeri ZOF için 7,15 µg/mL olarak bildirilmişken bu çalışmada hesaplanan LOQ değeri 37,15 ng/mL'dir.

Geliştirilen KE yönteminin duyarlılığı literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında spektrofotometrik (Carlucci, Di Federico ve Iuliani, 2009, s.2609; Kurbanoglu, Gumustas ve Ozkan, 2014, s.935; Stolarczyk, vd., 2015, s.66; Sbarcea, vd., 2012, s.562) ve sıvı kromatografik (Carlucci, Di Federico ve Iuliani, 2010, s.1717;

Devika, Sudhakar ve Venkateshwara, 2012, s.999; Kurbanoglu, Gumustas ve Ozkan, 2013, s.198; Sağlık Aslan, 2011, s.259; Bouaissi ve Hamida, 2015, s.271) tüm yöntemlerden daha düşük duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür. Literatür araştırmasında burada önerilen KE yönteminden daha duyarlı olan yöntemlerin ya LC-MS/MS (Dal Bo, Mazzucchelli ve Marzo, 2000, s.287; Ramesh, Nageswara ve Nageswara, 2014, s.209; Tian, vd., 2014, s.253; Jiand, vd., 2011, s.527; Kwok, vd., 2016, s.41; Kwok, vd., 2017, s.89) ya da elektrokimyasal yöntemler (Taşdemir, Ece ve Kılıç, 2012, s.339) olduğu görülmüştür.

Geliştirilen YPSK yönteminin duyarlılığı literatür ile karşılaştırıldığında spektrofotometrik ve sıvı kromatografik tüm yöntemlerden daha düşük duyarlılığa sahip olduğu fakat LC-MS/MS ve elektrokimyasal yöntemlerle yapılan çalışmaların bu çalışmadan daha düşük duyarlılığa sahip oldukları görülmüştür.

Önerilen KE yöntemi ZOF'un analiz süresi açısından, literatürdeki pek çok çalışmadan (Carlucci, Di Federico ve Iuliani, 2010, s.1717; Devika, Sudhakar ve Venkateshwara, 2012, s.999; Kurbanoglu, Gumustas ve Ozkan, 2013, s.198; Sağlık Aslan, 2011, s.259) daha hızlı bir yöntemdir. Geliştirilen YPSK yönteminin ise ZOF'un analizi açısından literatürdeki bazı kromatografik yöntemlere (Carlucci, Di Federico ve Iuliani, 2010, s.1717; Sağlık Aslan, 2011, s.259) göre daha hızlı olduğu görülmüştür.

Burada geliştirilen yöntemlerde kullanılmış olan IS ile çalışmanın güvenilirliği artırılmış ve olası bazı hataların önüne geçilmiştir. Bu açıdan literatürde IS kullanılmamış olan çalışmalara (Devika, Sudhakar ve Venkateshwara, 2012, s.999; Sağlık Aslan, 2011, s.259; Bouaissi ve Hamida, 2015, s.271) göre daha güvenilir yöntemler geliştirilmiştir. Ayrıca yöntemlerin her ikisi de günümüzde geçerli kılavuzların gerektirdiği şekilde valide edilmiştir. Yöntemlerin uygulanması görece daha az karmaşık olan farmasötik preparatlarda yapıldığı için tabletlerin çözeltilerinin hazırlanması aşamasında santrifüj ve filtrasyondan başka bir aşamaya gerek duyulmamıştır.

Bu tez çalışması ile geliştirilen her iki yöntem de basit, ucuz, duyarlı ve hızlı olmaları nedeni ile ZOF'un hem tek başına hem de HCT ile birlikte eş zamanlı tayinleri için önerilmektedir. Ayrıca burada önerilen yöntemlerin ZOF ve HCT'nin çeşitli biyolojik sıvılardan tayini için de bir temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Aslan, S. S. (2011). Validated RP-LC Method for Simultaneous Determination of Zofenopril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Chromatographic Science*, 259-263.
- Baker, D.R. (1995). *Capillary electrophoresis*. New York: John Wiley&Sons Inc
- Bouaissi, W., Hamida, N. B. (2015). Development and validation of HPLC method to quantify zofenopril in tablet. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 4(6), 271-181.
- Carlucci, G., Di Federico, L., Iuliani, P. (2010). HPLC-DAD method for the simultaneous determination of zofenopril and hydrochlorothiazide in oral pharmaceutical formulations. *Journal of Separation. Science*, (33), 1717–1722.
- Carlucci, G., Di Federico, L., Iuliani, P. (2009). Simultaneous Determination of Zofenopril and Hydrochlorothiazide in Tablets Using Derivative UV Spectrophotometry. *Analytical Letters*, 2609-2617.
- Dal Bo, L., Mazzucchelli, P., Marzo, A. (2000). Assay of zofenopril and its active metabolite zofenoprilat by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 749, 287–294.
- Devika, G.S., Sudhakar, M., Venkateshwara Rao, J. (2012). Isocratic RP- HPLC Method for Simultaneous Separation and Estimation of Zofenopril and Hydrochlorthiazide in Pharmaceutical Dosage Forms. *E-Journal of Chemistry* 9(2), 999-1006.
- Fayed, A. S., Rezk, M. R., Marzouk, H. M., Abbas, S. S. (2018). A Capillary Zone Electrophoresis Method with Multiresponse Chemometric Optimization for the Simultaneous Determination of Zofenopril Calcium and Hydrochlorothiazide in Presence of Hydrochlorothiazide Major Impurities. *Journal of Chromatographic Science*, 56(5), 461–471.
- Gündüz, T. (2002). *İnstrümental analiz (6)*. Ankara: Gazi Kitabevi.
- Hamilton, R.J., Sewel, P.A. (1998). *Introduction to high performance liquid chromatography*. New York: Chapman and Hall. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2 (6), 443-449.
- ICH Steering Committee (2005) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline.

- Jiang, Y., Yan, F., Dia, B., Feng, F., You, L., Huang, L., Lu, J. (2011). Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of zofenopril and its active metabolite zofenoprilat human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (55), 527–532.
- Kayaalp, S.O., (2009). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji (12)*. Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- Kurbanoglu, S., Gümüştas, M., Özkan, S. A. (2014). Simultaneous Determination and Validation of Some Binary Mixtures of Antihypertensive Drugs Using Ratio Derivative Spectrophotometric Method. *Journal of Analytical Chemistry*, (69) (10), 935–941.
- Kurbanoglu, S., Gumustas, M., Ozkan, S. A. (2013). Simultaneous estimation and validation of some binary mixtures of antihypertensive drugs by RP-LC methods using two new generation silica columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (72), 198– 201.
- Kwok, W. H., Choi, T. L. S., Kwok, K. Y., Chan, G. H. M., Wong, J. K. Y., Wan, T. S. M. (2016). Doping control analysis of 46 polar drugs in horse plasma and urine using a ‘dilute-and-shoot’ ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry approach. *Journal of Chromatography A*, (1451) 41–49.
- Kwok, W. H., Choi, T. L. S., Tsoi, Y. Y. K., Leung, G. N. W., Wan, T. S. M. (2017). Screening of over 100 drugs in horse urine using automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for doping control. *Journal of Chromatography A*, (1490), 89–101.
- Ramesh, T., Nageswara Rao, P., Nageswara Rao, R. (2014). LC–MS/MS characterization of forced degradation products of zofenopril. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (88), 609–616.
- Rx-MediaPharma® İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı (2019).
- Sbarcea, L., Udrescu, L., Dragan, L., Trandafirescu, C., Bojita, M. (2012). Validated UV Spectrophotometric Method for Quantification of Zofenopril in Pharmaceutical Formulations. *Revista de Chimie*, (63), 562-564.
- Skoog, D.A., West, D.M. ve Holler, F.J. (1999). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. (Çev: E. Kılıç ve F. Köseoğlu) Ankara: Bilim Yayınları.

- Stolarczyk, M., Mas'łanka, A., Apola, A., Rybak, W., Krzek, J. (2015). Derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of zofenopril and fluvastatin in mixtures and pharmaceutical dosage forms. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (148), 66–71.
- Taşdemir, İ. H., Ece, A., Kılıç, E. (2012). Experimental and Theoretical Study on the Electrochemical Behavior of Zofenopril and its Voltammetric Determination. *Current Pharmaceutical Analysis*, (8), 339-348
- Tian, Y., Cao, J., Luo, L., Zhang, Z., Ma, P. (2014). Determination of Zofenopril and Its Active Metabolite in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography Combined With a Triple-Quadruple Tandem Mass Spectrometer. *Journal of Chromatographic Science*, 253–262.
- U.S. Pharmacopeia National Formulation 39 (2016). *The National Formulary* 34 (2.baskı). Rockville: United States Pharmacopoeial Convention.
- Wyszomirska, E., Czerwinska, K., Mazurek, A. P. (2010). Identification and determination of antihypertensives from the group of angiotensin-converting inhibitors by densitometric method in comparison with HPLC method. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, (67), (2), 137-143.
- http-1:**<http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/259.pdf> (Erişim tarihi: 06.06.2019)
- http-2:**http://yunus.hacettepe.edu.tr/~enemutlu/belgeler/CE_ (Erişim tarihi: 05.06.2019)
- http-3:**<http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/259.pdf> (Erişim tarihi: 06.06.2019)
- http-4:** <https://slideplayer.biz.tr/slide/12645634/> (Erişim tarihi: 05.06.2019)
- http-5:**<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zofenopril> (Erişim tarihi: 05.06.2019)
- http-6:**<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrochlorothiazide> (Erişim tarihi: 05.06.2019)