

**NEBİVOLOL'ÜN FARMASÖTİK
PREPARATLARINDA YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE MİKTAR TAYİNİ**

Miray Kırıl
Yüksek Lisans Tezi

**NEBİVOLOL'ÜN FARMASÖTİK
PREPARATLARINDA YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE
MİKTAR TAYİNİ**

Miray Kıral

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Ağustos 2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK

Yardımcı Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Arın Gül DAL

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1203S047).



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Miray Kıral
Doğum tarihi ve yeri : 1987, Kayseri
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekâr
İletişim adresleri : Eskibağlar Mah. Akarcık Sk. No:29/1
ESKİŞEHİR
e-posta : mirayk@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul : Altıeylül İlköğretim Okulu, Balıkesir, 1998
Ortaokul : Balıkesir Karesi İlköğretim Okulu, Balıkesir, 2001
Lise : Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi, Balıkesir, 2005
Üniversite : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Eskişehir, 2011
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya ABD, Eskişehir, 2012
Yabancı dil : İngilizce

Yayımlar

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

Doğrukol-Ak, D., Ors, G., Kıral, M., Tunçel, T., Determination of nebivolol hydrochloride in tablets by reversed phase high performance liquid chromatography, Drug Analysis 2010, 21-24 Eylül 2010, Antwerp, Belçika.

Kıral, M., Doğrukol-Ak, D., Dal, A.G., Nebivolol Determination in Pharmaceutical Tablets by Flow Injection Analysis, 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 26-29 Haziran 2012, Ankara, Türkiye.

Bilimsel Etkinlikler

Projeler

Nebivolol'ün Farmasötik Preparatlarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Miktar Tayini, Proje Yöneticisi: Prof.Dr. Dilek Doğrukol-Ak, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Proje No:1203S047.

Hızlı ve Duyarlı Bir Analitik Yöntem İle Sıklıkla Kullanılan Antiepileptik İlaçların Kan-Beyin Dağılımları ve Sinir Kimyasalları Üzerine Etkilerinin Sıçanlar Üzerinde İn-Vivo İncelenmesi, Proje Yöneticisi: Yard.Doç.Dr. Erol Şener, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Proje No:1101S047.

Sözlü konferans veya seminerler

Kıral, M., Büdeyri, Ö., Bakılan, G., Kozmetikte yeni yaklaşımlar: Dermokozmetikler-Fitokozmetikler, 3. Her Yönüyle Eczacılık Sempozyumu, 21-23 Mayıs 2010, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir.

Organizasyonunda bulunulan toplantılar

3. Her Yönüyle Eczacılık Sempozyumu, 21-23 Mayıs 2010, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir.

Katılınan kurslar ve eğitim programları

2. Her Yönüyle Eczacılık Sempozyumu, 21-23 Mayıs 2009, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir.

Kromatografik Sistemler (HPLC, LC-MS, GC-MS, FPLC, İyon Kromatografisi) Teorik ve Uygulamalı Eğitim, 25-26 Eylül 2010, Anadolu Üniversitesi AÜBİBAM, Eskişehir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmasında, antihipertansif bir ajan olan nebivololün tabletlerinde miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirildi ve geçerliliği gösterildi. Diğer yöntemlerden farklı olarak doğrudan floresans dedektör ile tayin yapıldı. Bu sayede daha hassas ve seçici tayin olanağı sağlandı. Deneyler sırasında yöntemle iç standart bulunamaması dışında herhangi bir soruna rastlanmadı.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi basit, doğru, kesin, hassas ve seçici bir yöntemdir ve nebivololün tabletlerindeki miktar tayini için önerilmektedir.

Özgür ve laik bir Türkiye’de bilimsel araştırma olanağını bize kazandıran yüce önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK’e,

Bana her konuda yol gösteren, bilgisi, sabrı ve hoşgörüsüyle bana her zaman örnek olan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK’a,

Kendisinden çok şey öğrendiğim, desteği ve yardımlarını unutamayacağım hocam Yard. Doç. Dr. Erol ŞENER’e,

Tez çalışmalarım süresince desteği ve yardımlarından dolayı hocam Yard. Doç. Dr. Arın Gül DAL’a

Beni türlü fedakarlıklarla bugünlere getiren aileme,

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Latif KOŞU ve Melih Can TOYGU’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

NEBİVOLOLÜN FARMASÖTİK PREPARATLARINDA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE MİKTAR TAYİNİ

ÖZET

Bu çalışmada, nebivololün yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi uygulanarak floresans dedeksiyon ile tabletlerinde miktar tayini için hızlı, kolay, seçici ve hassas bir yöntem geliştirilmesi ve geçerliliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Nebivolol tayini için en uygun cihaz ve analitik koşullar olarak Gemini C₆ fenil kolon varlığında ACN:formik asit (50 mM) (25:75, h/h) hareketli faz sistemi, 0.9 mL/dak akış hızı, 10 µL enjeksiyon hacmi, 282 nm uyarma dalga boyu ve 310 nm yayma dalga boyu belirlenmiştir. Yöntem 1.03×10^{-6} - 5.15×10^{-6} M (0.42-2.09 µg/mL) derişim aralığında doğrusal bulunmuştur. Yöntemin doğrusal aralıkta doğru ve kesin sonuçlar ürettiği gösterilmiştir. Saptama ve tayin sınırı 18.5 ng/mL ve 55.9 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile ticari tabletlerde yapılan nebivolol içerik analizi sonucunda % nebivolol içeriğinin USP 29 (The United States Pharmacopeia, 2006) belirtilen içerik koşullarını sağladığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: nebivolol, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, floresans dedektör, tablet

DETERMINATION OF NEBIVOLOL IN PHARMACEUTICAL FORMULATION USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION

ABSTRACT

A rapid, simple, specific and sensitive high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection was developed and validated for the determination of nebivolol in tablets in this study. Optimum conditions were found to be as flow rate of 0.9 mL/min, injection volume of 10 μ L, detection wavelength of 282 nm for excitation and 310 nm for emission in a Gemini C₆ phenyl column using mobile phase of acetonitrile:formic acid (50 mM), (25:75, v/v). The method was linear over the concentration range of 1.03×10^{-6} - 5.15×10^{-6} M (0.42-2.09 μ g/mL). It was shown that the method was produced accurate and precise results in this concentration range. Limit of detection and limit of quantitation were calculated as 18.5 ng/mL and 55.9 ng/mL. It was determined that the nebivolol content of commercial tablets was in the limits of The United States Pharmacopeia, 2006 by using proposed high performance liquid chromatographic method.

Keywords: nebivolol, high performance liquid chromatography, fluorescence detector, tablet

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Hipertansiyon	3
B-Blokerlerin Sınıflandırılması	4
Nebivololün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
Nebivololün Farmakolojik Özellikleri	4
Nebivololün Farmakodinamik Özellikleri	5
Nebivololün Farmakokinetik Özellikleri	5
<i>Absorbsiyon</i>	6
<i>Dağılım</i>	6
<i>Metabolizma</i>	6
<i>İtrah</i>	6
<i>Biyoyararlanım</i>	6
<i>Proteinlere bağlanma</i>	6

Kullanılan Yöntemler	6
<i>Kromatografi</i>	6
YPSK	7
<i>YPSK donanımı</i>	7
<i>Floresans dedektörler</i>	8
<i>Floresans dedektörlerin üstünlükleri</i>	9
<i>Floresans dedektörün sınırlamaları</i>	9
GK ile YPSK karşılaştırılması	9
Kapiler elektroforez ve YPSK karşılaştırılması	10
Nebivolol Tayini ile İlgili Çalışmalar	10
<i>Ters-faz sıvı kromatografi çalışmaları</i>	10
<i>Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) çalışmaları</i>	13
<i>İnce tabaka kromatografisi çalışmaları</i>	14
<i>Absorpsiyon spektrofotometri çalışmaları</i>	14
GEREÇLER	16
Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
Kullanılan Cihazlar	17
YÖNTEMLER	18
<i>Nebivolol standart çözeltisi</i>	18
<i>Hareketli faz</i>	18
Kullanılan Cihazlar	19
YPSK	19
<i>Cihazla ilgili koşullar</i>	19
<i>Yıkama işlemleri</i>	20

Validasyon Çalışmaları	20
<i>Cihaz kesinliği</i>	20
<i>Doğrusallık</i>	20
<i>LOD-LOQ</i>	20
<i>Kesinlik ve doğruluk</i>	21
<i>Sağlamlık</i>	21
Tablet çözeltisi	22
BULGULAR VE TARTIŞMA	24
YPSK Yönteminin Validasyonu	30
<i>Doğrusal aralık</i>	30
<i>LOD ve LOQ</i>	31
<i>Kesinlik ve doğruluk</i>	31
<i>Spesifiklik</i>	32
<i>Sağlamlık (Robustness)</i>	33
Nebivolol İçeren Tabletlerde Miktar Tayini	34
SONUÇ ve ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1	Tablet Matriks Çözeltisini Hazırlamak İçin Kullanılan Yardımcı Maddeler ve Yüzdeleri 21
Çizelge 2	1.03x10 ⁻⁶ M Nebivolol Çözeltisi İçin Metanol ve Asetik Asit İçeren Hareketli Fazlarda Alıkonma Zamanı ve Pik Alanlarının İncelemesi 26
Çizelge 3	1.03x10 ⁻⁶ M Nebivolol Çözeltisi İçin Asteonitril ve Asetik Asit İçeren Hareketli Fazlarda Alıkonma Zamanı ve Pik Alanlarının İncelemesi 27
Çizelge 4	1.03x10 ⁻⁶ M Nebivolol Çözeltisi İçin Farklı Hareketli Fazlarda Alıkonma Zamanı ve Pik Alanlarının İncelemesi 28
Çizelge 5	Standart Nebivolol İçin Tekrar Edilebilirlik Sonuçları 29
Çizelge 6	YPSK Yöntemi ile Doğrusal Aralık İçin Elde Edilen Sonuçlar 30
Çizelge 7	Kalite Kontrol Standartları ile Elde Edilen Kesinlik ve Doğruluk Sonuçları 31
Çizelge 8	Matrix Ortamında Yöntemin Kesinliği ve Doğruluğu İçin Elde Edilen Sonuçlar 32
Çizelge 9	YPSK Yönteminin Sağlamlık Testi Sonuçları (3.09x10 ⁻⁶ M Nebivolol, n=3) 33
Çizelge 10	YPSK ile Tabletlerde Nebivolol Miktar Tayini Sonuçları 34

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	Nebivololün Kimyasal Formülü	4
Şekil 2	YPSK Cihazının Şematik Görünümü	8
Şekil 3	Nebivololün Uyarma Spektrumu	25
Şekil 4	Nebivololün Yayma Spektrumu	25
Şekil 5	3.093x10 ⁻⁶ M Nebivolol Standart Çözeltisinin Optimum Koşullarda Elde Edilmiş Kromatogramı	30
Şekil 6	Matriks Ortamında 3.09x10 ⁻⁶ M Nebivololün Kromatogramı	32
Şekil 7	Nebivolol İçermeyen Matriks Ortamının Kromatogramı	33
Şekil 8	Nebivolol Tablet Çözeltisinin Kromatogramı	34
Şekil 9	Nebivololün UV Spektrumu	35

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
ACN	: Asetonitril
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
cm	: Santimetre
dak	: Dakika
DPA	: Düzeltilmiş Pik Alanı
Em	: Emisyon (Yayma)
Ex	: Eksitasyon (Uyarma)
h	: Hacim
GK	: Gaz Kromatografisi
HCl	: Hidroklorik asit
IS	: İç standart
İSA	: İntrensek Sempatomimetik Aktivite
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
L-NMMA	: L-NG-monometil Arjinin
LC-MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi)
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
M	: Molar
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
n	: Deney sayısı
NaOH	: Sodyum hidroksit

NBV	: Nebivolol Hidroklorür
ng	: Nanogram
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
pg	: Pikogram
pKa	: Asitlik sabiti
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Döngü/dakika
R _f	: Ayrılma faktörü
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SH	: Standart hata
SS	: Standart sapma
USP	: Amerikan farmakopesi
UV	: Mor ötesi
YPİTK	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

GİRİŞ VE AMAÇ

Nebivolol hidroklorür, nitrik oksit (NO) salımını aktive etmesi ile karakterize oldukça seçici bir β -bloker, üçüncü nesil antihipertansif bir ilaçtır (Joshi, 2009). Nebivolol, hem NO salımının modülasyonu yoluyla vazodilatör etkisi, hem de β_1 -adrenoseptör antagonisti etkisiyle çift mekanizmalı bir antihipertansif ajandır (Güngör, 2006).

Nebivololün tabletlerdeki tayini için çoğunlukla ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi ve UV dedektör kullanılmıştır (Doshi ve ark., 2008; Dhandapani ve ark., 2008; Dhandapani ve ark., 2009; Joshi ve ark., 2008; Gowda ve ark., 2009; Sahoo ve ark., 2008; Shah ve ark., 2008a; Shah ve ark., 2008b; Kachhadia ve ark., 2008). Bu çalışmaların yanında nebivolol tayini için çeşitli analitik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur.

Geliştirilen bu yöntemlerden biri plazmada nebivolol tayini için tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografi yöntemidir (Ramakrishna ve ark., 2004; Selvan ve ark., 2007; Nuijs ve ark., 2010). Nebivololün tabletlerdeki miktar tayini için belirtilmiş diğer yöntemler arasında ince tabaka kromatografisi (Shirkhedkar ve ark., 2010; Reddy ve Devi, 2007), absorpsiyon spektrofotometri yöntemi (Önal, 2011; Rao ve ark., 2009; Subbayamma ve Rambabu, 2009; Meyyanathan ve ark., 2010) ve türevlendirme işlemi ile floresans spektrofotometri yöntemi (Önal, 2011) yer almaktadır.

YPSK, hareketli fazın yüksek basınç altında sabit faz (kolon) içerisinden geçerken kromatografik olarak ayırım yapıldığı bir yöntemdir. YPSK ile hem kalitatif hem de kantitatif bilgi elde edilebilir. Bu yöntemde karışımdaki her bileşen önceden belirlenen koşullar altında kendine ait bir alıkonma zamanına sahiptir ve her sinyalin hem alanı hem de yüksekliği ilgili bileşen miktarı ile doğru orantılıdır (Meyer, 2010).

Nebivololün YPSK ile yapılan miktar tayini çalışmalarında ayırım için çoğunlukla C_8 ve C_{18} kolonlar kullanılmıştır. Fakat bu tip kolonların nebivolol gibi sekonder amin yapısı içeren bileşiklerin tayininde pik morfolojisi ve alıkonması üzerinde olumsuz etkileri olduğu için bu çalışmada Phenomenex Gemini C_6 Fenil kolon tercih edilmiştir. Phenomenex Gemini C_6 Fenil kolon ile nebivololün kromatografik olarak miktar tayininde optimum sonuçlar elde edilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan kaynak araştırmasında nebivololün herhangi bir türevlendirme işlemine tabi tutulmadan doğrudan florimetrik tayinine dayanan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Floresans dedektör ile UV dedeksiyona oranla 1000 kata kadar daha hassas sonuçlar elde edilebilir. Bu çalışmada floresans dedektör kullanılarak yapılan ölçümlerin hassasiyetinin artırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, nebivololün YPSK yöntemi uygulanarak floresans dedeksiyon ile tabletlerinde nebivololün miktar tayini için hızlı, kolay, seçici ve hassas bir yöntem geliştirilmesi ve geçerliliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. YPSK

yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla doğruluk ve kesinlik, doğrusal aralık, saptama sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve sağlamlık gibi geçerlilik parametreleri incelenmiştir. Bulunan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Hipertansiyon

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar içinde en yaygın olanıdır. Arteriyel kan basıncının yükselmesi damar çeperlerinde patolojik değişikliklere ve sol ventrikülde hipertrofiye neden olur. Hipertansiyon inmelerin en temel nedenidir; koroner arter hastalığına yol açar, sonuçta miyokard infarktüsü ve ani kalp durmalarına neden olur; kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği ve dissekan aort anevrizması gibi patolojilerin gelişimine de katkıda bulunur (Bökesoy, 2000).

Hipertansiyonun nedeni çoğunlukla bilinmemektedir ve bu tip hipertansiyona “esansiyel hipertansiyon” denir. Nedeni bilinen hipertansiyona ise “non-esansiyel hipertansiyon” denir (Tunçel, 2000).

Esansiyel hipertansiyon sık görülmesi, mortalite ve morbidite oranının yüksek olması nedeni ile ciddi bir sağlık problemidir. Modern antihipertansif tedavisinde temel amaç, kan basıncının etkin bir şekilde kontrol edilmesi ve mortalite, morbidite nedeni olan hedef organların korunmasıdır. Hipertansiyon tedavisinde hedef organ hasarının önlenmesinde etkin kan basıncının kontrolünün yanında ilacın kendine özgü özelliklerinin de önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yeni bir antihipertansif ajan olan nebivololün; NO aracılığı ile oluşturduğu sistemik vazodilatasyon, selektif β_1 -blokör özelliği ile etkin kan basıncı kontrolü sağlamanın yanında hedef organda da koruyucu etki sağladığı ileri sürülmektedir (Dağlı ve Karaca,2006).

β -Adrenerjik agonistlerin (β -blokerler) klinik kullanımı 1964 yılında başlamıştır. Bundan altı yıl sonra ise β_1 -adrenoseptörlere seçici olarak bağlanıp etki gösteren metoprolol ve praktolol klinik kullanıma girmiş ve çok sayıda klinik çalışma ile kardiyolojide yerleri belirginleşmiştir. 1975 yılında ise ilk olarak selektif kalp yetersizliği tedavisinde kullanılmıştır. Klinik etkinlikleri ile önem kazanan β -blokerlerin, yan etki profilleri ise dikkat çekici noktalarından biridir. Bu nedenle etki profilleri artırılmış ve yan etkileri azaltılan 3. kuşak diye adlandırılan yeni kuşak ajanlar son 20 yıl içerisinde kullanılmaya başlanmıştır. (Mutlu, 2010).

β -Adrenerjik agonistler (β -blokerler), β -adrenoseptörlere seçici olarak bağlanıp, β -adrenojik uyarıların çeşitli organlar üzerindeki etkilerine, yarışmalı ve geri dönebilir bir antagonizma oluştururlar. Bu ilaçların farmakolojik etkileri, çeşitli dokularda bulunan bu reseptörlerin verdiği yanıtlara ve sempatik tonüs aktivitesine dayanılarak açıklanabilir. Buna göre, β -blokerlerin, kalp hızı ve kasılabilirliği üzerindeki etkileri az olmakla birlikte, bu ilaçlar, sempatik sinir sistemi aktive olduğunda (egzersiz veya stres sırasında), kalp hızını yavaşlatıp, kalbin kasılabilirliğini azaltırlar (Mutlu, 2010).

β-Blokerlerin Sınıflandırılması

β-blokerler, non-selektif yani hem β₁ hem de β₂ adrenerjik reseptörleri yarışmalı olarak bloke edenler ve genellikle β₁ seçici olarak adlandırılan ve β₁ reseptörlerine β₂ reseptörlerine göre daha fazla afinite gösterenler olmak üzere iki büyük gruba ayrılabilirler. Ancak, seçicilik doza bağımlı olup, yüksek dozlar kullanıldığında azalır veya kaybolur. Yukarıdakinin aksine, bazı β-blokerler zayıf bir agonist yanıt oluşturup (intrinsek semptomimetik aktivite-İSA), β-adrenoseptörü uyarır ve bloke ederler. Bazı β-blokerlerin, α₁-adrenoseptör blokajı (karvedilol, labetalol), β₂-adrenerjik reseptör agonizmi (seliprolol) yoluyla veya adrenoseptör blokajından bağımsız mekanizmalar (busindolol, nebivolol) aracılığıyla periferik vazodilatör etkileri vardır. Ayrıca, β-blokerler; lipofilik veya hidrofilik olarak da sınıflanabilirler.

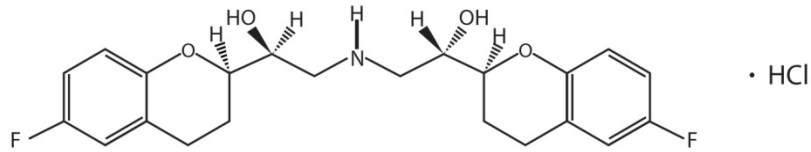
Bu özellikleri ve tarihsel gelişimleri ile β-blokerler;

1. İlk kuşak β-blokerler non-selektif grup
2. İkinci kuşak β₁-selektif grup
3. Üçüncü kuşak β₁-yüksek selektif ve vazodilatör grup olmak üzere üçe ayrılırlar (Mutlu, 2010).

Nebivololün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Nebivolol hidroklorür, beyaz ya da beyaza yakın bir tozdur. Metanol (MeOH), dimetil sülfoksit ve N,N-dimetil formamidde çözünür. Etanol, propilen glikol ve polietilen glikolde eser miktarda, hekzan, diklorometan ve metil benzende ise az çözünür (http-1). pKa değeri 8.22 olarak bildirilmiştir (Joshi ve ark, 2009).

Nebivolol tabletleri içindeki aktif bileşenin ismi (1RS,1'RS)-1,1'-[(2RS,2'SR)bis(6-floro-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-il)]-2,2'-iminodietanol hidroklorürdür. Nebivolol sırasıyla, [SRRR]-nebigolol ve [RSSS]-nebigolol stereokimyasal gösterimi ile d-nebigolol ve l-nebigololden oluşmuş bir rasematır. Nebivololün molekül formülü C₂₂H₂₅F₂NO₄•HCl'dır (http-1).



Şekil 1. Nebivololün Kimyasal Formülü

Nebivololün Farmakolojik Özellikleri

Nebivolol, l-nebigolol ve d-nebigolol enantiyomerlerinin rasematıdır. Muhtemelen L-arjinin/NO metabolik yoluna dayanarak az da olsa vazodilatör özellik gösteren, yarışmalı ve yüksek seçicilik gösteren bir β-reseptör antagonistidir. Hayvan deneylerinde; nebivololün, endotelial NO salımını uyararak doza bağlı olarak endotele bağlı arteriyal gevşemeye neden olduğu görülmüştür. NO, arter çeperlerinde üretilir ve damar düz kasları üzerinde

gevşetici etki gösterir. Aynı zamanda trombosit agregasyonunu ve bağlanmasını inhibe eder ve damar düz kas hücrelerinin poliferasyonu ile lökosit aktivasyonunu inhibe ederek damarlarda oluşabilecek hasara karşı koruyucu özellik gösterir (http-2).

Az sayıda sağlıklı gönüllünün katıldığı insan deneylerinde, 11 gönüllünün fenilefrin ile eldeki yüzeğe yakın damarları daraltılmış ve nebivolol infüzyon halinde verilmiştir. Ayrıca 8 gönüllü 5 gruba ayrılıp bronşiyal arter içerisine nebivolol yine infüzyon olarak verilmiştir. Bu çalışmalar nebivololün NO aracılığıyla vazodilatör etki gösterdiğini kanıtlamıştır (http-2).

Nebivololün Farmakodinamik Özellikleri

Nebivolol, hem NO salınımının modülasyonu yoluyla vazodilatör etki, hem de β_1 -adrenoseptör antagonisti etkisiyle, çift etki mekanizmalı bir antihipertansif ajandır (Güngör, 2006).

Nebivolol diğer β -adrenoseptör antagonistlerinden farklı olarak, koroner arterlerde endotelyuma bağlı gevşemeyi, NO sistemi yoluyla harekete geçirmektedir. Bu etkilerin incelendiği ve 40 sağlıklı insan gönüllüde yürütülen bir çalışmada, ön kol arterleri ve dorsal el venleri üzerinde nebivololün kan akımını arttırdığı ve damar direncini azalttığı gözlenmiştir. Yine bu çalışma ile nebivolol ile vasküler düz kas gevşemesinin, bir nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olan L-NG-monometil Arjinin (L-NMMA) koinfüzyonu ile bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca L-arjinin infüzyonu, L-NMMA'nın neden olduğu vazodilatör yanıt inhibisyonunu anlamlı düzeyde azaltmaktadır. Burada kan akım artışı ve damar direncinde azalmanın bir NOS inhibitörü olan L-NMMA ile bozulması ve sonra L-arjinin infüzyonu ile bu inhibisyonun ortadan kalkması, vazodilatasyonun L-arjinin/NO sistem aktivasyonu ile olduğu bulgularını desteklemektedir (Güngör, 2006).

Son yıllarda yapılan başka bir çalışma ile nebivololün hipertansif hastalarda endotelyuma bağlı L-arjinin/NO yolu aktivasyonu ile direnç gösteren damarlarda gevşeme ve kan akımı artışına neden olduğunu gösterilmiştir (Güngör, 2006).

Bütün bu çalışmalar nebivololün; L-arjinin/NO aktivasyonu yoluyla NO düzeylerini artırarak vazodilatasyona yol açtığını göstermektedir (Güngör, 2006).

Nebivololün Farmakokinetik Özellikleri

Nebivolol absorpsiyonu hızlıdır ve yenilen besinlerden etkilenmez. Geniş ölçüde metabolize olur ve kısmen de aktif hidroksi metabolitlerine dönüşür. Aromatik hidroksilasyon metabolizması CYP2D6 bağımlı genetik oksidatif polimorfizme bağlıdır. Nebivolol, fenotip olarak normal metabolizerlerde zayıf metabolizerlere 10'a 1 oranında daha baskındır. Zayıf ve normal metabolizerler arasında hemodinamik etkide hiçbir fark görülmemesine rağmen, zayıf metabolizerlerde doz ayarlamasına ihtiyaç duyulabilir (http-2).

Değişmemiş nebivololün idrarla atılımı dozun % 0.5'inden azdır fakat ilacın artmış plazma konsantrasyonu ve hidroksi metabolitlerinin ciddi böbrek

rahatsızlıklarına yol açabileceği bulunmuştur. Böbrek yetmezliğine bağlı olarak, önerilen başlangıç dozu günlük 2.5 mg olup gerekli görüldüğü hallerde 5 mg'a çıkarılabilir. Nebivolol, veri yetersizliğine bağlı olarak karaciğer yetmezliği ve azalmış karaciğer fonksiyonları durumlarında kontrendikedir (http-2).

Absorbsiyon

Ağızdan alındığında hızlı bir şekilde absorbe olur (http-2).

Dağılım

Nebivolol hayvanlarda anne sütüne geçer. Dağılımla ilgili herhangi seçici bir bilgi kayda geçmemiştir (http-2).

Metabolizma

Nebivololun ağırlıklı olarak uzatılmış karaciğer metabolizasyonu glukronidasyon yoluyla olur. Daha az bir oranda da, sitokrom P450 2D6 ile N-dealkilasyon ve oksidasyon yolu ile olur. CYP2D6 yoluyla gerçekleşen metabolizasyonda genetik polimorfizm gözlenmiştir. Hidroksi metabolitlerinin aktif olduğu bildirilmiştir (http-2).

İtrah

Tek oral dozun ardından, neredeyse nebivololun tamamı oksidatif metabolitleri ya da glukronit konjugatları olarak atılır (http-2).

İtrah; uzatılmış metabolizerlerde % 38'i idrarla, % 44'ü feçesle, zayıf metabolizerlerde % 67'si idrarla % 13'ü feçesle olur (http-2).

Biyoyararlanım

Tam biyoyararlanım kayda geçmemiştir. Doz 20 mg'a kadar çıktığında plazma konsantrasyonu da dozla doğru orantılı yükselmiştir (http-2).

Proteinlere bağlanma

In vitro testler boyunca, % 98 oranında proteinlere özellikle de albümine bağlandığı görülmüştür. Proteinlere bağlanma miktarı ilaç konsantrasyonundan bağımsızdır (http-2).

Kullanılan Yöntemler

Kromatografi

Kromatografi, kromatografik zeminde (kolon ya da yüzey) iki faz arasında dağılmış örnek karışımını ayırma işlemidir. Fazlardan biri, diğer faz kromatografik zeminin içinden geçerken sabit haldedir. Sabit faz; katı, poröz,

küçük partikül yapıda yüzey aktif madde olabileceği gibi katı destek ya da kolon duvarı üzerinde sıvı kaplı ince bir film tabakası da olabilir. Hareketli faz ise bir gaz ya da sıvıdır. Hareketli faz olarak gaz kullanılıyorsa bu işlem gaz kromatografisi (GK) olarak bilinir. İnce tabaka kromatografi türlerini de içeren her tür sıvı kromatografide hareketli faz her zaman sıvıdır (Meyer, 2010).

YPSK

Etkili bir ayırma metodu, birbirine benzer çok sayıda analitin bulunduğu karışımları analiz edebilmelidir. YPSK ile yapılmış çalışmalara bakıldığında, kromatogramlar bize doğrudan hem kalitatif hem de kantitatif bilgi sağlar, karışımdaki her bileşen önceden belirlenen koşullar altında kendine ait bir alıkonma zamanına (sinyalin ekranda görüldüğü zaman) sahiptir ve her sinyalin hem alanı hem de yüksekliği ilgili bileşen miktarı ile doğru orantılıdır (Meyer, 2010).

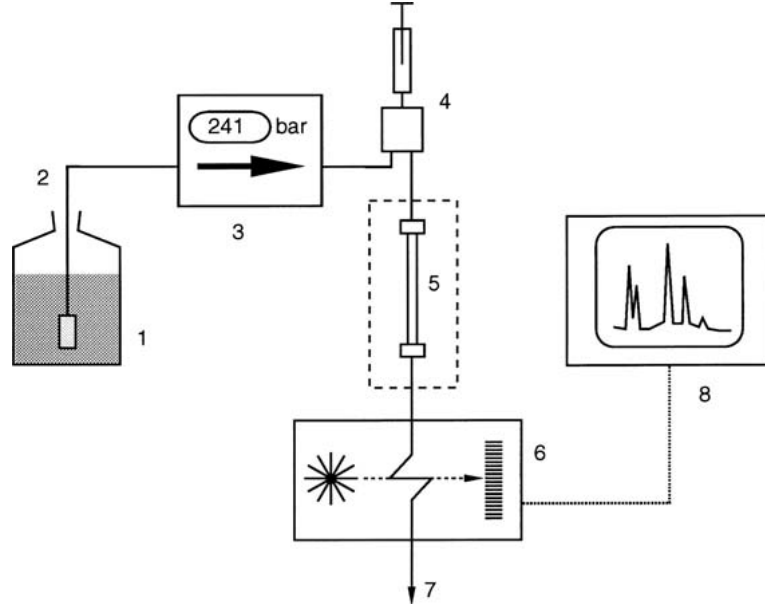
YPSK tekniği ile yapılmış çalışmalar, bu tekniğin oldukça etkili olduğunu göstermiştir. Diğer bir deyişle; bu teknik kısa zamanda mükemmel sonuçlara olanak sağlar. Martin ve Synge, teorik olarak; sabit fazın oldukça küçük partiküllere sahip olması gerektiğini bundan dolayı da hareketli fazın kolon içerisinde sürüklenebilmesi için yüksek bir basıncın gerekli olduğunu 1941'den de önce biliyorlardı. Sonuç olarak, YPSK yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak da anılır (Meyer, 2010).

YPSK donanımı

YPSK cihazı, çözücü dağıtıcı, numune girişi, ayırma ve saptama kısımlarını içerir ve verimlilik, doğruluk ve tekrar edilebilirlik açısından kromatografi işleminin kalitesini belirler. Her bileşenin işlevi ve çalışma biçiminin anlaşılması, bunların seçimi, etkin kullanımı ve gerekli olduğunda sorunların çözülmesi konularında yardımcıdır (Doğrukol-Ak, 2011).

Bir YPSK cihazı, birbirinden bağımsız parçalardan oluşturulabileceği gibi tek bir aparat şeklinde de dizayn edilmiş olabilir. Tek bir parçanın bozulma ihtimaline karşı bağımsız parçalardan oluşturma fikri daha kullanışlıdır; fakat bunun yanında her bir bağımsız parçanın aynı üretici tarafından üretilmiş olması gereklidir (Meyer, 2010).

En azından bir YPSK cihazında bulunması gereken parçalar **Şekil 2**'de gösterilmiştir. Bu parçalar: çözücü haznesi, çözücü taşıyan hat, yüksek basınç pompası, numune enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör ve çoğunlukla verileri değerlendiren kısmı ile birlikte veri toplayan ekipmandır (Meyer, 2010).



Şekil 2. YPSK Cihazının Şematik Görünümü 1:Çözücü Haznesi 2:Çözücü Taşıyan Hat 3:Yüksek Basınç Pompası 4:Numune Enjeksiyon Ünitesi 5:Kolon 6.Dedektör 7:Atık 8:Verileri Değerlendiren Ünite (Bilgisayar)

Kolon, sistemin genellikle en küçük parçası olmasına rağmen en önemli parçasıdır. Sıcaklık kontrollü ayırılmalar için kolon bir termostat içerisinde bulunmalıdır. Birden fazla çözücü ile çalışmak oldukça yaygın bir durumdur ve bunun için de cihaza karıştırıcı ve kontrol edici ünite dahil olur. Eğer veri toplama ve değerlendirme işi bir bilgisayar yardımı ile yapılıyorsa, bu bilgisayar tüm sistemi kontrol edebilir (Meyer, 2010).

Floresans dedektörler

Bu tip dedektörler, doğal floresansı olan bazı bileşiklerin uyarma dalga boyunda (λ_{ex}) uyarılması ve yayma dalga boyunda (λ_{em}) saptanması ile analizine olanak sağlar. (Doğrukol-Ak, 2011) Floresans özellikte maddeler ya da çeşitli türev ajanları ile floresans özellik kazandırılmış maddeler, floresans dedektör ile yüksek seçicilik ve hassasiyet ile analiz edilebilir. Hassasiyet düzeyi UV dedektöre oranla 1000 kata kadar artırılabilir. Uygun bir dalga boyuna ait ışık, hücre boyunca ilerler ve yüksek dalga boyunda radyasyon salarken dik açılı bir doğrultuda dedekte edilir (Meyer, 2010).

En basit dedektörlerde, uyarıcı ışık kaynağı olarak cıva lambası ve yayılan ışınların belli bir bandını izole etmek için bir veya birkaç filtre kullanılır. Daha gelişmiş cihazlarda, kaynak olarak ksenon lambası ve floresans ışınmasını izole etmek için ise optik ağ monokromatörler kullanılır (Skoog, 2000).

Doğal floresansı olan bileşiklerin en iyi örnekleri benzen ve türevleridir. Bir molekülün floresansı, halka süstitüsüyonu, çözücünün pH ve bileşimindeki değişimler ile değişir (Doğrukol-Ak, 2011).

Protein ve peptitler, yapılarındaki tirozin ve triptofan varlığı nedeniyle 220 veya 280 nm de uyarma ve 350 nm'de saptama dalga boyu kullanılarak floresans dedektörle tayin edilebilir (Doğrukol-Ak, 2011).

Yapısında triptofan ve tirozin bulunmayan peptitler türevlendirilerek tayin edilebilir. Örneğin; primer amin grubu taşıyan bileşenler normalde floresan olmadıkları halde dansil klorür, floreskamin ve *o*-ftalaldehit ile floresan türevleri oluşturabilir. Nükleik asitler ise etidyum bromür ile floresan türevi oluşturulduktan sonra florimetrik ölçülebilir (Doğrukol-Ak, 2011).

Floresans dedektörlerin üstünlükleri

- İki dalga boyu kullanılması nedeniyle yüksek seçicilik sağlar.
- Kırılma indisindeki değişikliklerden etkilenmez ve kuvvetli UV absorbansı olan çözücülerle ve gradient sürüklenme ile uyumludur.
- Duyarlılığı çok yüksektir. (< 1pg veya 10^{-12} g). Yüksek seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle gıda ve çevre numunelerindeki bulaşanların tayini için ideal bir tekniktir (Doğrukol-Ak, 2011).

Floresans dedektörün sınırlamaları

- Uyarma ve yayma için farklı dalga boyları gerektirir.
- Floresan olmayan bileşikler için türev hazırlanması zaman alıcı ve karmaşık işlemler gerektirir (Doğrukol-Ak, 2011).

GK ile YPSK karşılaştırılması

Tıpkı YPSK gibi GK de yüksek performanslı bir metottur. İkisi arasındaki en önemli fark; GK'nin sadece, uçucu ya da yüksek sıcaklıklarda buharlaştırılmış ya da türevlendirme yolu ile uçucu hale getirilmiş bileşenler için uygulanabilir bir yöntem oluşudur. Bilinen organik bileşenlerin yalnızca % 20'si ön işlem gerektirmeden GK ile analiz edilebilir. Sıvı kromatografi için ise, numune bir çözücüde çözünebilir ve bunun yanında çapraz bağlı, yüksek molekül ağırlığına sahip bileşenler, tüm organik ve iyonik inorganik ürünler bu koşulu sağlarlar (Meyer, 2010).

YPSK ile GK yöntemlerini karşılaştırdığımızda 3 önemli fark göze çarpar:

1. Hareketli faz içinde numunenin difüzyon katsayısı YPSK'de GK'ye göre çok daha küçüktür. (Kromatografik analizin hızını tayin ettiği için difüzyon katsayısı oldukça önemli bir faktördür. Bu nedenle bu durum bir dezavantajdır).
2. Hareketli fazın viskozitesi YPSK'de GK'ye göre daha yüksektir. (Yüksek viskozite, küçük difüzyon katsayısına ve hareketli fazın yüksek akış direncine yol açar. Bu nedenle bu durum da bir dezavantajdır.)
3. Yüksek basınç altında hareketli fazın sıkıştırılabilirliği YPSK'de ihmal edilebilir düzeyde küçüktür. Fakat GK'de aynı durum söz konusu değildir. (Bu durum bir avantajdır. Çünkü sonuç olarak hareketli fazın akış hızı tüm

kolon boyunca sabittir. Bu nedenle akış hızı doğru bir biçimde seçilirse, ideal kromatografik koşullar her yerde aynı şekilde var olur. Bunun yanında yüksek basınç altında sıvının sıkıştırılabilme özelliğinin olmayışı tehlike arz etmez (Meyer, 2010).

Kapiler elektroforez ve YPSK karşılaştırılması

Kapiler elektroforez, YPSK'ye göre çok daha yüksek ayırım performansı gösterir. (10^7 'ye kadar varan teorik plakalar). Kapiler elektroforez, DNA dizilimi ve peptit eşleştirme çalışmaları için oldukça faydalı bir yöntemdir. Bununla birlikte, aminoasitler veya inorganik iyonlar gibi küçük moleküller de aynı şekilde ayrılabilir. Enjekte edilebilen mutlak numune miktarları, kapilerin hacminin küçük oluşundan dolayı düşüktür. Düşük tekrar edilebilirlik (kesinlik), YPSK ile karşılaştırıldığında başlıca sınırlamalardan biridir. Preparatif ayrımlar için uygun değildir (Meyer, 2010).

Nebivolol Tayini ile İlgili Çalışmalar

Son yıllarda nebivolol tayinine yönelik çalışmalar aşağıda yer alan şekilde derlenmiştir.

Ters faz sıvı kromatografi çalışmaları

Doshi ve arkadaşları (2008), doğru ve tekrar edilebilir bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmiş ve bu yöntemin nebivolol ve valsartanın kapsül formlarında miktar tayinleri için geçerliliğini göstermişlerdir. Kapsül formunda nebivolol ve valsartan içeriğini belirlemek için ters faz sıvı kromatografik kolon ile tamponasetonitril (ACN) (55+45, h/h) hareketli fazı kullanılmıştır. Yöntemin özgünlük, doğruluk, LOD, LOQ, kesinlik, doğruluk ve sağlamlık bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Doğrusallık nebivolol için 2-8 µg/mL ve valsartan için 32-128 µg/mL olarak bulunmuştur. Her iki madde için de korelasyon katsayısı 0.9999 olarak hesaplanmıştır. Sistemin ve yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik değerleri belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğu nebivolol için % 100.66-102.58 aralığında, valsartan için % 101.17-101.85 aralığında belirlenmiştir. Önerilen yöntemin küçük ama planlı değişikliklerle sağlamlığı gösterilmiştir. Geliştirilen yöntemin nebivolol ve valsartanın kapsül formunda birlikte analizi için uygun olduğu bildirilmektedir.

Dhandapani ve ark. (2009), nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiyazidin eşzamanlı miktar tayini için UV spektroskopi, ters faz YPSK ve yüksek performanslı ince tabaka sıvı kromatografi (YPİTK) olmak üzere üç yöntem geliştirmişlerdir. UV spektroskopi metodu için eşzamanlı eşitlik yöntemi ve absorbans yöntemi kullanılarak nebivolol ve hidroklorotiyazidin miktar tayini yapılmıştır. Eşzamanlı eşitlik yöntemi için nebivolol ve hidroklorotiyazidin en yüksek absorbans yaptığı dalga boyu değerleri 282.5 nm ve 271.5 nm olarak belirlenmiştir. Absorbans oranı yönteminde ise nebivololün en yüksek absorbans yaptığı dalga boyu değeri 282.5 nm, hidroklorotiyazidin en yüksek absorbans yaptığı dalga boyu değeri 275 nm olarak belirlenmiştir. Absorbans oranı

yönteminde doğrusallık nebivolol için 10-50 µg/mL ($r = 0.9999$) ve hidroklorotiyazid için 1-5 µg/mL ($r = 0.9994$) olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri % 98.72-100.15 olarak bulunmuştur. Eşzamanlı eşitlik yönteminde korelasyon katsayıları nebivolol için $r = 0.9992$ ve hidroklorotiyazid için $r = 0.9999$ olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri % 99.41-100.75 olarak bulunmuştur. Ters faz YPSK yönteminde, hareketli faz olarak 30 mM fosfat tamponu (K_2HPO_4), ACN, ve trietilamin (50:50:0.1, h/h) sistemi kullanılmıştır. Hareketli faz pH'sı ortofosforik asit ile 5.5'e ayarlanmıştır. C_{18} -ODS-Phenomenex, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm kolonda, izokratik sitemde akış hızı 1 mL/dak olarak belirlenmiştir. Atorvastatin iç standart (IS) olarak kullanılmıştır. Hidroklorotiyazid, nebivolol ve atorvastatin için alıkonma zamanları sırasıyla 3.31, 4.30 ve 6.93 dak olarak tespit edilmiştir. Hidroklorotiyazid ve nebivolol için doğrusallık sırasıyla 12.5-62.5 µg/mL ($r = 0.9997$), 5-25 µg/mL ($r = 0.9994$) olarak tespit edilmiştir. Geri kazanım değerleri % 99.67-100.75 olarak bulunmuştur. YPİTK yönteminde ise, ayırım için silika jel G60F₂₅₄ sabit faz olarak seçilmiştir. Hareketli faz sistemi olarak, etil asetat:MeOH:amonyak (8.5:1:0.5, h/h) karışımı kullanılmıştır. Analiz 285 nm'de densitometrik olarak yürütülmüştür. Hidroklorotiyazid ve nebivolol hidroklorürün sırasıyla R_f değerleri 0.21 ve 0.41 olarak bulunmuştur. Doğrusallık sırasıyla 259-1250 ng/mL ($r = 0.9982$) ve 100-500 ng/mL ($r = 0.9954$) derişim aralığında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri % 98.88-102.41 olarak bulunmuştur.

Dhandapani ve ark. (2008), nebivolol ve hidroklorotiyazidin kombine tabletlerinde eşzamanlı analizine olanak sağlayan basit bir ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım, Phenomenex C_{18} ODS, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm kolonda, % 0.4 trietilamin tamponu (pH 3.0) ve ACN (70:30, h/h) hareketli faz ile, 1.4 mL/dak akış hızıyla, 282 nm'de yapılmıştır. Nebivolol ve hidroklorotiyazidin sırasıyla 5-25 µg/mL ($r = 0.9989$) ve 12.5-62.5 µg/mL ($r = 0.9992$) derişim aralıklarında yöntemin doğrusal olduğu gösterilmiştir. Atorvastatin, 10 µg/mL derişiminde IS olarak kullanılmıştır. Sistemin ve yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik değerleri belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğu nebivolol için % 99-101 aralığında, hidroklorotiyazid için % 100-101 aralığında belirlenmiştir. Nebivolol için LOD ve LOQ 5 ve 25 ng/mL, hidroklorotiyazid için 10 ve 50 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin nebivolol hidroklorür ve hidroklorotiyazidin kombine dozaj formlarında rutin analizler için kullanılabileceği belirtilmiştir.

Joshi ve ark. (2008), çift katmanlı tablet formülasyonu halinde ticari olarak bulunan nebivolol ve amlodipinin eşzamanlı analizine olanak sağlayan hızlı ve kolay bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Etkin kromatografik ayırım (USP L10) Hypersil BDS siyano, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm kolonda, izokratik sistemde basit bir hareketli faz bileşimiyle gerçekleştirilmiştir. Yöntemin nebivolol ve amlodipinin birlikte analizi için doğruluk, seçicilik, hassaslık, sağlamlık ve kesinlik bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Stres koşullarında parçalanma ürünlerinin nebivolol ve amlodipin pikleri ile girişim vermediği, nebivolol için % 99.0-100.2 arasında, amlodipin için % 99.3-100.3 geri kazanım elde edildiği bulunmuştur.

Gowda ve ark. (2009), nebivolol ve hidroklorotiyazidin farmasötik dozaj formlarında tayini için hızlı ve basit bir ters faz YPSK yöntemi ve kemometrik bir yöntem geliştirmişler ve geçerliliğini göstermişlerdir. Ters faz YPSK’de ayırım, Phenomenex-Luna RP-18(2), 5 µm, 250 mm × 4.6 mm kolonda, 1.0 mL/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak ACN-% 0.03 formik asit (65:35, h/h), pH 3.3 kullanılmıştır. 277 nm’de UV dedektör ile nebivolol ve hidroklorotiyazidin alıkonma zamanları sırasıyla 2.133 ve 2.877 dak olarak tespit edilmiştir. Yöntemin doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve stabilite bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Yöntemin doğruluğu hem kemometrik hem de ters faz YPSK’de nebivolol ve hidroklorotiyazid için sırasıyla 10-100 µg/mL ve 2-16 µg/mL olarak bildirilmiştir. Korelasyon katsayısı her ikisi için de $r = 0.9999$ olarak hesaplanmıştır.

Sahoo ve ark. (2008), nebivololün tabletlerindeki miktar tayini için ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz Hypersil ODS C₁₈ kolonunda, hareketli faz olarak MeOH-su (80:20, h/h) sisteminde, 1.0 mL/dak akış hızıyla, 282 nm’de gerçekleştirilmiştir. IS olarak klorzoksazon kullanılmıştır. Alıkonma zamanları nebivolol için 3.175 dak, klorzoksazon için 4.158 dak olarak bulunmuştur. Doğrusallık 1-400 µg/mL derişim aralığında elde edilmiştir. Yöntemin LOD 0.0779 µg/mL, LOQ ise 0.2361 µg/mL bulunmuştur. Ortalama nebivolol miktarı % 99.974 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin hassaslık, doğruluk ve kesinlik bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Yöntem tabletlerindeki nebivololün analizi için önerilmiştir.

Shah ve ark. (2008a), nebivolol ve hidroklorotiyazidin kombine dozaj formlarında miktar tayini için birinci dereceden türevlendirilmiş spektroskopi ile ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere basit ve doğruluğu yüksek iki yöntem geliştirmişlerdir. Nebivolol ve hidroklorotiyazid kombine dozaj formu halinde birinci dereceden türevlendirilmiş spektroskopi yöntemi ile sırasıyla 294.6 ve 334.6 nm’de tayin edilmişlerdir. Bu yöntemde nebivololün 8-40 µg/mL ($r = 0.9980$), hidroklorotiyazidin 10-60 µg/mL ($r = 0.9995$) kalibrasyon aralığında doğrusal olduğu gösterilmiştir. Geri kazanımlar nebivolol ve hidroklorotiyazid için sırasıyla, % 98.90-100.14 ve % 98.32-101.24 olarak bildirilmiştir. Sıvı kromatografi yönteminde ayırım, Phenomenex Gemini C₁₈, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm kolonda kolonda, 1 mL/dak akış hızında, 0.05 M potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), ACN ve MeOH (30:20:50, h/h/h) hareketli faz ile 220 nm’de yapılmıştır. Ezetimibe IS olarak kullanılmıştır. Alıkonma zamanları nebivolol için 5.1 dak, hidroklorotiyazid için 2.9 dak ve IS için 8.2 dak olarak bildirilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin nebivolol için 1-14 µg/mL ($r = 0.9980$), hidroklorotiyazid için 0.3-28 µg/mL ($r = 0.9995$) derişim aralıklarında doğrusal olduğu bildirilmiştir. Geri kazanım değerleri, nebivolol için % 98.03-99.45 ve hidroklorotiyazid için % 97.67-99.89 olarak gösterilmiştir. Her iki yöntemin de doğruluk, kesinlik ve seçicilik bakımından geçerliliği gösterilmiştir.

Shah ve ark. (2008b), nebivolol hidroklorürün tabletlerdeki miktar tayini için basit, seçici, yüksek doğruluk ve stabilite gösteren ters faz yüksek YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Etkin kromatografik ayırım Phenomenex Gemini C₁₈ 5 µm, 250 mm × 4.6 mm kolonda, 1 mL/dak akış hızında, MeOH, ACN ve 0.02 M KH₂PO₄

(60:30:10, h/h/h, pH 4.0) hareketli faz ile 280 nm dalga boyunda yapılmıştır. Alıkonma zamanı 2.6 dak olarak bildirilmiştir. Yöntemin doğruluğu 0.2-10 mg/mL aralığında gösterilmiştir. Geri kazanım % 98.68-100.86 olarak bildirilmiştir. LOD değeri 0.06 mg/mL, LOQ değeri ise 0.2 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Kachhadia ve ark. (2008), nebivololün katı farmasötik dozaj formlarında miktar tayinine olanak sağlayan basit, kesin ve doğru bir ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. İzokratik kromatografik ayırım, Phenomenex Luna C₈, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm kolonda, 1 mL/dak akış hızında, ACN, pH 3.5 fosfat tamponu (35:65, h/h) hareketli fazı ile 280 nm'de gerçekleştirilmiştir. Etken madde, oksidasyon, hidroliz, fotoliz ve ısı gibi stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Yöntemin doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık ve çözelti stabilitesi açısından geçerliliği gösterilmiştir. Yöntemin 40-160 µg/mL derişim aralığında 0.9999 korelasyon katsayısı değeri ile doğrusal olduğu belirtilmiştir. Tekrar edilebilirlik % 0.69, günler arası kesinlik % 1.39 bağıl standart sapma (BSS) ile bildirilmiştir. Geri kazanım % 98.57-99.55 olarak gösterilmiştir.

Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) çalışmaları

Ramakrishna ve ark. (2004), nebivololün insan plazmasındaki miktar tayini için elektrosprey tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografi yöntemi geliştirmiş ve geçerliliğini göstermişlerdir. Nebivololün plazmadan ekstraksiyonu için çözücü olarak dietil eter/diklorometanın (70/30) kullanıldığı tek basamaklı sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi önerilmektedir. Analiz C₁₈ ters faz analitik kolonda su:ACN:formik asit (30:70:0.03, h/h) hareketli faz sisteminde izokratik elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi 2 dak ve kalibrasyon eğrisi 50-10.000 pg/mL derişim aralığında doğrusal ölçülmüştür. Yöntemin doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve tekrar edilebilirliği bakımından geçerliliği gösterilmiştir. LOD ve LOQ 10 ve 50 pg/mL olarak bulunmuştur. Nebivolol ve IS olarak kullanılan tamsulosin için ortalama geri kazanım değerleri % 73.4 ± 3.7 ve % 72.1 ± 2.0 olarak bulunmuştur.

Selvan ve ark. (2007), nebivolol ve valsartanın eşzamanlı tayinine olanak sağlayan tandem kütle spektrometre detektörlü sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiş ve bunu farmakokinetik çalışmalara uygulamışlardır. Nebivolol ve valsartan plazmadan ACN kullanılarak ekstre edilmiş ve ayırımda C₁₈ kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz sistemi ACN ve 0.05 mM formik asit (50:50, h/h, pH 3.5) karışımından oluşmaktadır ve akış hızı 0.25 mL/dak olarak ayarlanmıştır. Nebivolol ve valsartan için doğrusalılık sırasıyla 0.01-50.0 ng/mL ve 1.0-2000.0 ng/mL derişim aralığında sağlanmıştır. Yöntemin LOQ değeri nebivolol için 0.01 ng/mL, valsartan için 1.0 ng/mL bulunmuştur. Bu yöntem, nebivolol ve valsartanın sabit doz kombinasyonlarının farmakokinetik çalışmalarına başarıyla uygulanmıştır.

İnce tabaka kromatografisi çalışmaları

Shirkhedkar ve ark. (2010), nebivolol hidroklorürün miktar tayinine olanak sağlayan YPİTK yöntemi geliştirmiş ve geçerliliğini göstermişlerdir. Yöntemde sabit faz olarak 60F254 silika jel kaplı kromatografik alüminyum plakaları kullanılmıştır. Hareketli faz olarak toluen: MeOH:triethylamin (3.8:1.2:0.2, h/h/h) sistemi kullanılmıştır. Analiz 281 nm'de gerçekleştirilmiştir. Nebivolol için R_f değeri 0.33 ± 0.02 olarak bulunmuştur. Doğrusallık, 500-3000 ng/spot derişim aralığında bulunmuş, korelasyon katsayısı 0.9994 ± 0.0002 olarak hesaplanmıştır. Eğim ve kesim noktası değerleri, 127.39 ± 19.53 ve 3.761 ± 0.017 bulunmuştur. Yöntemin LOD değeri 63.10 ng/spot, LOQ değeri ise 191.23 ng/spot olarak bulunmuştur. İstatiksel veriler, yöntemin ilaç analizinde uygulanması için tekrar edilebilir, seçici ve doğru bir yöntem olduğunu göstermiştir. Geliştirilen YPİTK yöntemi nebivololün teşhisi ve miktar tayini için önerilmektedir.

Reddy ve Devi (2007), nebivolol hidroklorürün tablet formülasyonlarında tayine olanak sağlayan bir YPİTK geliştirmişlerdir. Ayırım için silika jel G60F₂₅₄ sabit faz olarak seçilmiştir. Hareketli faz sistemi olarak, toluen:etilasetat:MeOH:formik asit (8:6:4:1, h/h) karışımı kullanılmıştır. Analiz 285 nm'de densitometrik olarak yürütülmüştür. Korelasyon katsayısı 0.9991, eğim 3.291 ve kesim 864.50 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin kesinlik, geri kazanım, sağlamlık ve seçicilik bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Nebivololün LOD ve LOQ değerleri her bant için 18.65 ve 62.18 ng olarak bulunmuştur. Yöntemin farmasötik analizler için seçici ve spesifik bir yöntem olarak uygulanabilirliği bildirilmiştir.

Absorpsiyon spektrofotometri çalışmaları

Önal (2011), sekonder amin grubu taşıyan bazı ilaçları (pramipeksol, nebivolol, karvedilol ve eletriptan) farmasötik dozaj formlarındaki tayini için spektrofotometrik ve spektroflorimetrik olmak üzere iki yöntem geliştirmiştir. Sekonder amin grupları, 7-kloro-4-nitrobenzofurazon ile borat tamponu içerisinde türevlendirilmiş ve oluşan sarı renkli ürünler spektrofotometrik ve spektroflorimetrik olarak ölçülmüştür. Çalışma pH'sı deneyler boyunca 7-10 arasında tutulmuştur. Uyarma dalga boyu değerleri pramipeksol için 470 nm, nebivolol için ise 473 nm olarak belirlenmiştir. Yayma dalga boyu değerleri ise; pramipeksol için 529 nm ve nebivolol için 530 nm olarak belirlenmiştir. Doğrusallık, sırasıyla pramipeksol ve nebivolol için 0.9983 ve 0.9999 korelasyon katsayılarıyla 0.3-3 µg/mL ve 0.1-1.2 µg/mL derişim aralıklarında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri % 98.2-101.27 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin nebivolol ve pramipaksolün birlikte analizi için doğruluk, sağlamlık ve kesinlik bakımından geçerliliği gösterilmiştir.

Meyyanathan ve ark. (2010), nebivolol hidroklorür ile valsartan ve nebivolol hidroklorür ile hidroklorotiyazidin farmasötik formülasyonlarında eşzamanlı tayinine olanak sağlayan bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Ölçümler nebivolol ve valsartan için 246.6 nm, 280.2 nm ve 275 nm'de yapılmıştır. Nebivolol ve hidroklorotiyazid için ise ölçümler, 270.4 nm, 280.2 nm ve 270 nm'de yapılmıştır. Nebivolol, valsartan ve hidroklorotiyazid için

belirlenen doğrusal aralık sırasıyla, 0.5-2.5 µg/mL, 1.0-20 µg/mL ve 0.5-2.5 µg/mL olarak bildirilmiştir.

Rao ve ark. (2009), nebivololün tabletlerindeki miktar tayini için basit, duyarlı ve yüksek doğrulukta bir spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Nebivololün maksimum absorbans yaptığı değer 281 nm olarak tespit edilmiştir. Doğrusallığı 0.99984 korelasyon katsayısı ile 4-60 µg/mL derişim aralığında sağlamıştır. Geri kazanım %98.4-100.3 bulunmuştur.

Subbayamma ve Rambabu (2009), oksidatif birleştirme reaksiyonu ile nebivolol ve trandolaprilin spektrofotometrik olarak tayinine olanak sağlayan basit ve hassas üç yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemlerin ilkinde, nebivolol Brucine ile birleştirme reaksiyonuna tabi tutulup 520 nm'de miktar tayini için ölçüm yapılmıştır. İkinci yöntemde, nebivolol MBTH ile birleştirme reaksiyonunun prosedürü ile 620 nm'de ölçüm yapılmıştır. Üçüncü yöntem ise, trandolaprilin Brucine ile reaksiyona girmesi ve 520 nm'de ölçüm yapılmasına dayanmaktadır. Bahsedilen bu üç yöntemde sırasıyla 6-36 µg/mL, 2-12 µg/mL ve 6-36 µg/mL derişim aralıklarında doğrusal sonuçlar elde edilmiştir. Her bir yöntem için LOD ve LOQ değerleri ile geri kazanım sonuçları bildirilmiştir.

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Glasiyel asetik asit	: Merck, Almanya
Formik asit	: Merck, Almanya
HCl	: Merck, Almanya
KH ₂ PO ₄	: Merck, Almanya
MeOH	: Merck, Almanya
ACN	: Merck, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
Nebivolol hidroklorür (% 99.9)	: Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye

Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazi	: Ohaus, E12140, İsviçre
pH Metre	: Electro-mag, M822, Türkiye
Ultra Saf Su Cihazı	: Millipore, Amerika
Ultrasonik Banyo	: Ultrasonic, LC30, Almanya
Vorteks Karıştırıcı	: Nuvemix, NM110, Türkiye, Jeitech, Kore
Santrifüj	: Hettich EBA 20, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	: Nuvemix NM110, Türkiye
Buzdolabı	: Arçelik Nofrost, Türkiye
UV-Spektrofotometre	: Shimadzu UV-2401PC, Japonya
YPSK	: Shimadzu LC 10A pompa, RF-10A _{XL} model floresans dedektör, CBM-10A iletişim modülü, Class-LC10 veritabanı, Japonya
	Agilent 1290 Infinity Series Pompa, degaser, oto-örnekleyici, floresans dedektör, ChemStation LC System, Almanya
Kolon	: Phenomenex Gemini (C ₆ -fenil, 5 µm, 150 × 3.0 mm, 110 Å), Amerika

YÖNTEMLER

Nebivolol standart çözeltisi

Deneysel çalışmalarda kullanılan nebivolol hidroklorür (NBV) referans standart maddesi Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş (İstanbul, Türkiye) firmasından hediye olarak temin edilmiştir.

Standart NBV'den 10 mg dolayında tartılmış ve 25 mL balon joje içerisinde bir miktar MeOH ile çözüldükten sonra 10 dak ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra banyodan alınan çözelti MeOH ile 25 mL'ye dikkatli bir şekilde tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan çözeltinin derişimi yaklaşık 1.0×10^{-3} M'dir. Hazırlanan bu çözelti 4°C sıcaklıkta buzdolabında alüminyum folyo ile kuşatılarak saklanmış ve stok çözelti olarak kullanılmıştır. Gerekli bütün seyreltme işlemlerinde söz edilen stok NBV çözeltisi kullanılmıştır.

Hareketli faz

MeOH ve asetik asit içeren hareketli fazların hazırlanmasında gerekli MeOH miktarı bir mezür kullanılarak alınmış ve glasiyel asetik asitin gerekli miktarı bir pipet ile ilave edildikten sonra gerekli hacme bir balon joje kullanılarak tamamlanmıştır. Örneğin; MeOH:asetik asit (% 1.0, h/h), (40:60, h/h) hareketli fazının hazırlanması için 40 mL MeOH alınmış, üzerine 100 µL glasiyel asetik asit eklenmiş ve 100 mL'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır. MeOH:asetik asit (% 1.0) karışımından oluşan hareketli faz çözeltileri 40:60, 35:65, 45:55, (h/h) oranlarında kullanılmıştır. Ayrıca MeOH:asetik asit oranı 40:60, (h/h) olmak üzere asetik asit derişimleri % 0.5, 1.0 ve 1.5 olacak şekilde hareketli faz çözelti bileşimleri değiştirilmiştir.

ACN ve asetik asit içeren hareketli fazların hazırlanmasında aynı yol izlenmiştir. 40:60 (h/h) oranında ACN:asetik asit içeren çözeltilerde asetik asit derişimi %1.0 ve 1.5 olacak şekilde değiştirilmiştir.

% 0.03 formik asit çözeltisi hazırlamak için 30 µL formik asit (% 100, 1.22 g/mL) çözeltisi alınarak 100 mL'lik bir balon jøjeye aktarılmış ve gerekli hacme ultra saf su ile tamamlanmıştır.

ACN:formik asit (% 0.03, h/h) (25:75, h/h) çözeltisini hazırlamak için 25 mL ACN alınmış ve % 0.03 formik asit çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Oranları farklı olan diğer hareketli faz çözeltileri aynı yol izlenerek hazırlanmıştır.

MeOH:formik asit (% 0.03, h/h) (30:70, h/h) çözeltisini hazırlamak için 30 mL MeOH alınmış ve % 0.03 formik asit çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Oranları farklı olan diğer hareketli faz çözeltileri aynı yol izlenerek hazırlanmıştır.

50 mM formik asit çözeltisi hazırlamak için 190 µL formik asit (% 100, 1.22 g/mL) alınarak ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

ACN:formik asit (50 mM) (25:75, h/h) çözeltisini hazırlamak için 25 mL ACN alınmış ve 50 mM formik asit çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Optimum hareketli fazı bulmak için yapılan çalışmalarda en uygun hareketli faz bileşimi olarak ACN:formik asit (50 mM) (25:75, h/h) olarak belirlenmiştir. Yöntemin validasyonun gösterilmesi ve nebivolol içeren tabletlerde miktar tayini uygulaması çalışmalarının tamamında aynı hareketli faz bileşimi kullanılmıştır.

Her bir hareketli fazın pH değeri ölçülerek kaydedilmiştir.

Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin pH'sı Electro-mag M822 model (Türkiye) pH metre kullanılarak ölçülmüştür. Cihaz kullanılmadan önce pH değerleri 4.00, 7.00 ve 10.00 olan standart tampon çözeltileriyle kalibre edilmiştir.

Bütün çözeltilerdeki çözünmüş gazlar Ultrasonic LC30, Almanya ürünü olan ultrasonik banyo kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

Analize hazırlanan örnekler sisteme verilmeden Nuvemix, NM110, Türkiye ürünü olan vorteks karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır.

Deneylede kullanılan ultra saf su Millipore, Amerika ürünü olan ultra saf su cihazı ile üretilmiş ve kullanılmıştır.

Çözeltisi hazırlanacak ve hassas tartım gerektiren maddeler Ohaus, E12140, İsviçre ürünü hassas terazi ile tartılmış ve ölçümler kaydedilmiştir.

YPSK

Cihazla ilgili koşullar

Deneysel çalışmaların optimizasyon sürecinde kullanılan YPSK cihazı her biri Shimadzu (Japonya) marka olan 5 µL loop hacmine sahip manuel bir enjektör taşıyan LC-10A model pompa ve RF-10A_{XL} model floresans dedektör, CBM-10A iletişim modülünden oluşmaktadır. Elde edilen veriler Class-LC10 model veritabanı ile kontrol edilmektedir. Floresans dedektör 282 nm uyarma ve 310 nm yayma dalga boylarına ayarlanarak ayrılan pikler saptanmıştır. Hareketli faz akış hızı 0.9 mL/dak olarak uygulanmıştır. Ayırma işlemlerinin gerçekleştirildiği kolon 5.0 µm partikül büyüklüğünde Gemini C₆-fenil bağlı silika dolgusuna sahip 150 × 3.0 mm boyutlarında olup Phenomenex (Amerika) firmasından sağlanmıştır.

Validasyon işlemleri sırasında Agilent 1290 Infinity Series (Almanya) marka YPSK cihazı bileşenleri olan 1290 model termostat, 1260 model pompa, 1260 model degaser, 1260 model oto-örnekleyici ve 1260 model floresan dedektörden oluşan sisteme aynı ayırma kolonu bağlanarak deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Verilerin işlenmesinde Agilent ChemStation LC System veritabanı kullanılmıştır. Bu cihazda da floresans dedektör 282 nm uyarma ve 310

nm yayma dalga boylarına ayarlanarak ayrılan pikler saptanmıştır. Hareketli faz akış hızı 0.9 mL/dak olarak uygulanmıştır. Kolon fırını termostatu 30°C'ye, oto örnekleycinin termostatu ise +4°C'ye ayarlanmıştır. Hareketli faz binary pompa sistemi ile (A:50 mM formik asit, B: ACN olmak üzere) iki kanaldan karıştırılarak sisteme verilmiştir. Ayırma işlemlerinin gerçekleştirildiği kolon 5.0 µm partikül büyüklüğünde Gemini C₆-fenil bağlı silika dolgusuna sahip 150 × 3.0 mm boyutlarında olup Phenomenex (Amerika) firmasından sağlanmıştır.

Yıkama işlemleri

YPSK cihazı ve kolon günlük deneysel çalışmalara başlamadan önce ACN:su (65:35, h/h) ile yıkanarak kararlı bir zemin gürültüsü elde edilmiştir. Daha sonra kullanılacak hareketli faz çözeltisi cihazdan 30 dak süreyle geçirilerek kolonun koşullanması sağlanmıştır.

Validasyon Çalışmaları

Optimizasyonu gerçekleştirilen YPSK yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla seçicilik, kesinlik ve doğruluk, doğrusal aralık, LOD, LOQ ve sağlamlık gibi validasyon parametreleri ICH kriterlerine dayanarak incelenmiştir (ICH, 2005).

Cihaz kesinliği

Yöntemin kesinliğini belirlemek için NBV için alıkonma zamanı ve pik alanı tekrar edilebilirlikleri incelenmiştir. Üç farklı derişimdeki (1.55×10^{-6} M, 3.09×10^{-6} M ve 4.64×10^{-6} M) nebirolol çözeltisi 6 defa YPSK cihazına verilmiş ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Pik alanlarının değerlendirilmesinde yöntemin kesinliğini arttırmak amacıyla düzeltilmiş pik alanı (DPA) değerleri de hesaplanmıştır.

Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığını belirlemek için nebirolol derişimine doğrusal yanıt üreten çalışma aralığı incelenmiştir. Bunun için 1.03×10^{-6} M ile 5.15×10^{-6} M derişim aralığında nebirololün 5 farklı derişimde çözeltileri hazırlanmıştır (1.03×10^{-6} , 2.06×10^{-6} , 3.09×10^{-6} , 4.12×10^{-6} ve 5.15×10^{-6} M). Bu çözeltiler, 3 set halinde hazırlanarak üç ayrı günde cihaza verilmiştir. Elde edilen sonuçlar en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilerek kalibrasyon eğrilerine ait eğim, kesim noktası, korelasyon katsayısı, eğim ve kesimin standart hata (SH) değerleri hesaplanmıştır.

LOD-LOQ

Yöntemin LOD ve LOQ hesaplamalarında kalibrasyon eğrisinin kesim değerlerinin standart sapması (SS), kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünerek elde edilen oran kullanılmıştır. LOD, bu oranın 3.3 ile çarpılmasıyla, LOQ ise aynı

oranın 10 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. İlgili hesaplamalar bulgular kısmında verilmektedir.

Kesinlik ve doğruluk

Yöntemin kesinliğini ve doğruluğunu belirlemek için öncelikle kalite kontrol standardı olarak hazırlanan ve kalibrasyon eğrisinin hazırlandığı derişim aralığında bulunan üç farklı derişimdeki (1.55×10^{-6} M, 3.09×10^{-6} M ve 4.64×10^{-6} M) standart nebivolol çözeltileri, üç gün boyunca 6 defa YPSK cihazına verilmiş ve pik alanı olarak elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Yöntemin matriks ortamında doğruluğunu ve kesinliğini araştırmak için, tableti oluşturan etkin madde dışındaki maddelerden oluşan bir matriks ortamı hazırlanması, etkin maddenin bu matrikse eklenmesi ve yapılan ölçüm sonunda matriks ortamındaki % geri kazanım belirlenmesi yolu izlenmiştir. **Çizelge 1**'de verilen yardımcı maddeler; ortalama tablet ağırlığı ve nebivolol içeriği göz önüne alınarak belirtilen oranlarda karıştırılmış ve tablet matriks çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 1. Tablet Matriks Çözeltisini Hazırlamak İçin Kullanılan Yardımcı Maddeler ve Yüzdeleri

Kullanılan Yardımcı Maddeler	Yüzdeleri (%)
Hidroksi Propil Metil Selüloz	7
Laktoz Monohidrat	60
Magnezyum Stearat	1
Polietilen Glikol 4000	5
Nişasta	5
Povidon	5
Talk	1
Titanyum Dioksit	1

Doğrusallık aralığında yer alan derişimlere karşılık gelecek şekilde seçilen 3 farklı nebivolol derişimi (1.90×10^{-6} , 3.77×10^{-6} ve 5.66×10^{-6} M) matriks ortamına eklenerek hazırlanan ve nebivolol içeren matriks çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmış ve cihaza verilmiştir. Her bir derişim için üç ayrı günde 6 kez analiz yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar için % geri kazanım, % bağıl hata (BH) ve % BSS değerleri hesaplanmıştır.

Sağlamlık

Tüm parametrelerin incelenmesi için analizde kullanılan standart nebivolol çözeltisi 3.09×10^{-6} M olarak hareketli faz içinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Yöntemin sağlamlığının incelenmesi için optimum deneysel parametrelerde küçük ve planlı değişiklikler yapılmıştır. Her deneysel parametre için yukarıda belirtilen nebivolol çözeltisi cihaza 3 defa enjekte edilerek pik alanı yanıtları elde edilmiş ve optimum koşullarda aynı derişimdeki nebivolol çözeltisinin yanıtları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan akış hız değeri olan 0.9 mL/dak \pm 0.1 birim değiştirilerek 0.8 mL/dak ile 1.0 mL/dak akış hızında her bir değer için yapılan üç nebivolol enjeksiyonu için pik alanı yanıtları incelenmiştir.

ACN:formik asit (50 mM) (25:75, h/h) hareketli faz bileşimi \pm 2 birim değiştirilerek ACN:formik asit (50 mM) (27:73, h/h) hareketli faz bileşimi ve ACN:formik asit (50 mM) (23:77, h/h) hareketli faz bileşimi her bir değer için yapılan üç nebivolol enjeksiyonu için pik alanı yanıtları incelenmiştir.

Ayırma kolonunun içinde bulunduğu termostat ünitesi 30°C'de çalıştırılmıştır. Bu parametre \pm 1.0°C değiştirilerek 29 ve 31°C'de yürütülen deneylerde her bir değer için yapılan üç nebivolol enjeksiyonu için pik alanı yanıtları incelenmiştir.

Dalga boyu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda uyarma dalga boyu 282 nm ve yayma dalga boyu 312 nm değerleri \pm 2 birim değiştirilerek dört farklı şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmada uyarma ve yayma dalga boyları sırasıyla 280-308 nm, 280-312 nm, 284-308 nm ve 284-312 nm olmak üzere değiştirilmiş ve her bir değer için yapılan üç nebivolol enjeksiyonu için pik alanı yanıtları incelenmiştir.

Tablet çözeltisi

Geliştirilen YPSK yönteminin nebivolol analizi için uygulanabilirliğini göstermek amacıyla farmasötik preparatında nebivolol miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için yerel eczanelerden sağlanan İbrahim Ethem Ulagay (İstanbul, Türkiye) firmasının üretimi olan ve etken madde olarak 5 mg nebivolol içerdiği bilinen Vasoxen® tablet analiz edilmiştir. Tablet numunelerinin hazırlanması için 5 mg nebivolol içeren 10 adet tablet ağırlığı tam olarak tartıldıktan sonra ortalama tablet ağırlığı 223.26 mg olarak bulunmuştur. Daha sonra tabletler havanda toz edilmiş ve ağız sıkı kapanan koyu renkli cam bir şişeye konulmuştur. Bir tabletin ortalama ağırlığına karşılık gelen miktar tam olarak tartıldıktan sonra 10 mL MeOH ile çözülmüş ve 10 dak süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Bu şekilde hazırlanan tablet stok çözeltisi analize hazırlanmak üzere seyreltilmeden önce 5000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir. YPSK yöntemi ile yapılacak tayinlerde, tablet stok çözeltisi kullanılarak nebivolol son derişimi belirtilen doğrusal aralıkta olacak şekilde üç farklı derişimde seyreltmeler yapılmış ve örnek çözeltileri analiz edilmiştir.

Karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan UV-Spektrofotometri yönteminde MeOH içerisinde hazırlanmış 1.03×10^{-3} M nebivolol çözeltisi hacimce % 10 MeOH içerisinde 5.16×10^{-5} M derişime seyreltilerek 200-600 nm dalga boyu aralığında 1 cm'lik kuartz hücreler içinde UV spektrumu kaydedilmiştir. Kör olarak hacimce % 10 MeOH kullanılmıştır. En yüksek absorbansın olduğu dalga boyu değeri 280.5 nm olarak belirlenmiştir. Doğrusal aralığı belirlemek ve kalibrasyon eğrisini oluşturmak için absorbans değerleri 0.2-0.8 aralığında olacak şekilde hazırlanması gerekli nebivolol derişimleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için 5.16×10^{-5} ve 1.55×10^{-4} M derişim aralığında beş farklı derişimde nebivolol çözeltisi hazırlanmış ve 280.5 nm de absorbansları ölçülmüştür. Korelasyon

katsayısı yüksek doğrusal eşitlikler elde edilmesinin ardından tablet numunelerinde nebivolol tayinine geçilmiştir.

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmış stok tablet numunesi çözeltileri hacimce % 10 MeOH ile gerekli derişime seyreltilerek 280.5 nm dalga boyunda aborbansları ölçülmüştür. Tablet numune çözeltilerinin nebivolol yanıtları kalibrasyon eşitliğinde çözümlenerek tabletlerin nebivolol içeriği ve yüzde nebivolol miktarları hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

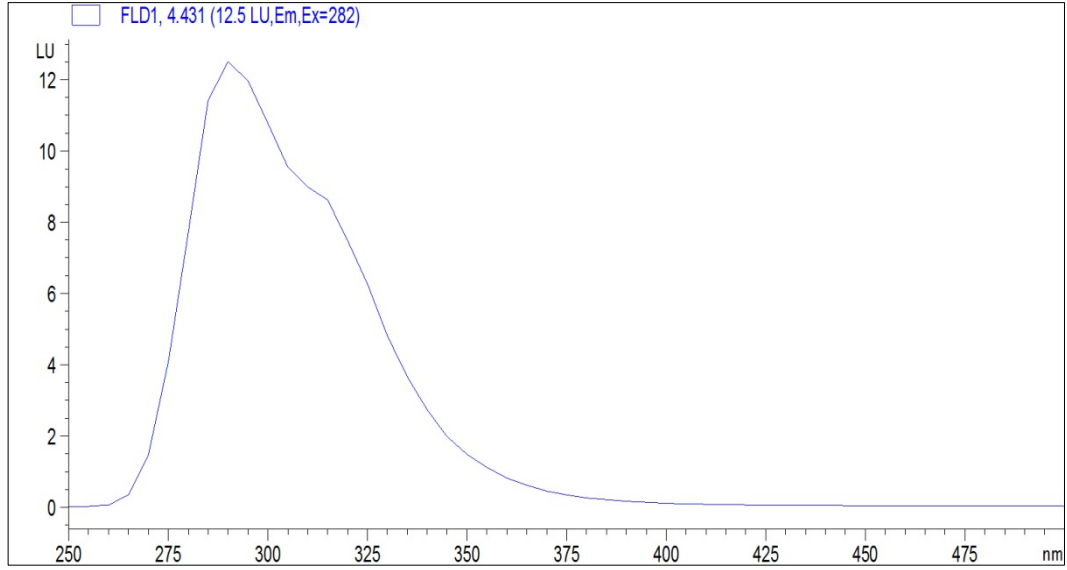
Bu çalışmada YPSK kullanılarak doğal floresansa sahip olduğu tarafımızdan belirlenen nebivolol için miktar tayinine olanak sağlayan bir yöntem geliştirme ve farmasötik formu olan tabletlerinde nebivolol tayini yapılması hedeflenmiştir.

YPSK ile yapılan ayırmalarda, bazik numunelerin tayininde silika bazlı kolonların kullanılması durumunda silanol etkileşimleri pik şekillerinin bozulmasına ve kolon verimliliğinin azalmasına neden olur. Asidik pH değerinde hazırlanan hareketli fazlar bu tip numuneler için daha iyi kolon performansı sağlayabilir. Düşük pH'lı yöntem genellikle daha kararlı (rugged) bir ortam sağlar, çünkü bazik bileşikler pH'daki küçük değişikliklerden daha az etkilenirler. Yöntem geliştirme çalışmalarında ayırmanın sağlanması için farklı pH değerlerinin gerekliliği konusunda bir bilgi bulunmuyorsa başlangıç için en iyi yol $pH < 3$ olan hareketli fazlar ile çalışmaktır. Asidik ters faz kolonlar ve $pH > 6$ durumunda bir silika bazlı kolonlar için herhangi bir pH değerinde silanol gruplarının iyonize olma olasılığı vardır. Bu iyonize silanoller protonlanmış bazları veya diğer katyonları iyon değişimi işlemi ile kuvvetle alıkoyabilirler. Tampon derişiminin artırılması, tampon katyonlarının artan yarışmasına bağlı olarak numunedeki bütün katyonik numune iyonlarının alıkonmasını azaltabilir. Silanol etkileşimi bazik numuneler için dizayn edilmiş bir kolon seçilerek de azaltılabilir. Bu tip kolon dolguları için kullanılan silika çok asidik silanollerin sayısını azaltmak için üretilir. Bütün silika temelli kolonlar yüzeylerinde aktif silanoller içerir ancak bunların numune alıkonması üzerine etkisi iyonize silanol derişimini azaltmak için düşük pH değerindeki ($2 < pH < 3.5$) hareketli fazlar kullanılarak azaltılabilir (Synder ve ark, 1997).

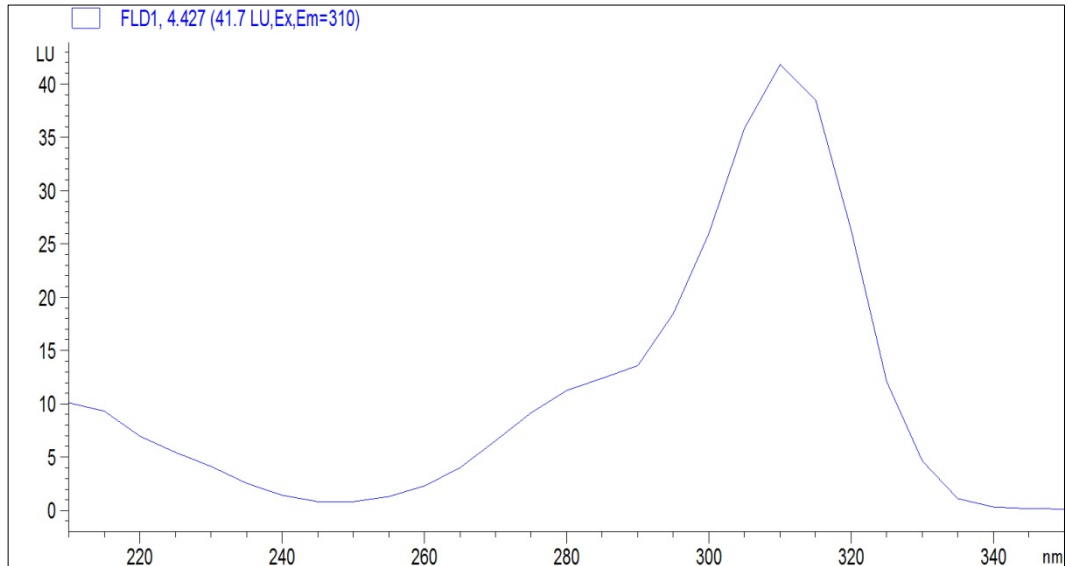
Bu çalışmada yukarıda söz edilen bilgilerden hareketle asidik bir hareketli faz seçilmesi, bazik numuneler için dizayn edilmiş bir kolon kullanılması ve nebivolol için floresan karakteristiklerinin belirlenmesi başlangıç noktasını oluşturmaktadır.

Yapılan literatür araştırmasında, nebivolol tayini ile ilgili çalışmalar, genellikle çeşitli hareketli faz ortamları ve ters faz kolon tipleri ile YPSK yöntemi kullanılarak alıkonmanın gerçekleştirilmesi ve UV detektör kullanılarak saptama ile kolondan çıkan maddenin tayinini içermektedir (Doshi ve ark., 2008; Dhandapani ve ark., 2008; Dahndapani ve ark., 2009; Joshi ve ark., 2008; Gowda ve ark., 2009; Sahoo ve ark., 2008; Shah ve ark., 2008a; Shah ve ark., 2008b; Kachhadia ve ark., 2008). Kolon tipleri olarak C_8 ve C_{18} kolonlar çeşitli boyutlarda kullanılmıştır. Hareketli faz olarak ACN, MeOH, fosfat tamponu veya formik asiti çeşitli oranlarda içeren sulu asidik ortam çözelti karışımları kullanılmıştır. Nebivolol için pKa değeri 8.22 (Joshi ve ark., 2009) olarak bildirilmektedir. Asidik ortam sekonder amin grubu taşıyan bileşiğin protonlanarak daha polar bir yapıya kavuşmasına katkı sağlaması bakımından önemlidir. ACN ve MeOH gibi organik çözücüler ise ters faz sıvı kromatografi uygulamalarında yaygın kullanılan hareketli faz bileşenleridir.

Floresans dedektörün spektrum alma fonksiyonu kullanılarak yapılan çalışmalarda nebivololün MeOH içeren ve asetik asitli çözücü ortamlarında uyarma dalga boyu 282 nm, yayma dalga boyu 310 nm olan spektrumları cihazın floresans dedektörü yardımı ile gözlenmiştir. ACN:formik asit (50 mM) (25:75, h/h) içeren hareketli faz içerisinde hazırlanmış 3.09×10^{-6} M nebivolol için kaydedilen absorpsiyon ve emisyon spektrumları **Şekil 3 ve 4**'te verilmektedir. Görüldüğü gibi söz edilen hareketli faz bileşiminde de 282 nm'de bir absorpsiyon maksimumu, 310 nm'de ise bir emisyon maksimumu bulunmaktadır. YPSK çalışmalarında söz edilen bu dalga boyları tüm deneysel süreçte piklerin saptanması sırasında kullanılmıştır.



Şekil 3. Nebivololün Uyarma Spektrumu, 282 nm



Şekil 4. Nebivololün Yayma Spektrumu, 310 nm

Mevcut literatür bilgilerinden hareketle azotlu polar bileşiklere daha kolay analiz olanağı sağlayan bir kolon tipi olan C₆-fenil dolgusuna sahip bir kolon

kullanılması zorunlu görülmüştür. Bu amaçla Gemini C₆-fenil kolon sağlanarak yöntem geliştirme çalışmalarının bu kolon ile yürütülmesi uygun görülmüştür. Asidik ortamı sağlamak için asetik asit içeren bir hareketli faz hazırlanması düşünülerek % 1 asetik asit içeren MeOH ve ACN içeren sulu çözelti ortamı ile deneysel çalışmalara başlanmıştır.

MeOH içerisinde hazırlanan 1.03×10^{-6} M nebivolol çözeltisi kullanılarak yapılan çalışmalarda çeşitli oranlarda MeOH -asetik asit karışımından oluşan hareketli faz sistemleri incelenmiştir (**Çizelge 2**). MeOH:asetik asit (% 1.0, h/h), h/h olmak üzere 40:60, 35:45 ve 45:55 oranlarında kullanılarak kromatogramlar kaydedilmiştir. Ayrıca asetik asit miktarının etkisini değerlendirmek için asetik asit yüzdesi % 0.5-1.5 aralığında değiştirilmiştir. Bu çözeltilerin pH değerleri 3.2-3.4 aralığında ölçülmüştür. Her bir hareketli faz bileşimi için nebivolol çözeltisi 3 defa enjekte edilerek alıkonma zamanları ve pik alanları tekrar edilebilirliği değerlendirilmiştir.

Çizelge 2. 1.03×10^{-6} M Nebivolol Çözeltisi İçin MeOH ve Asetik Asit İçeren Hareketli Fazlarda Alıkonma Zamanı ve Pik Alanlarının İncelemesi

Hareketli faz	pH	Alıkonma Zamanı* (dak) (Ortalama ± SS)	Pik Alanı* (Ortalama ± SS)
MeOH:Asetik asit (% 1.0) (45:55, h/h)	3.33	2.939 ± 0.022	696389 ± 10191
MeOH:Asetik asit (% 1.0) (40:60, h/h)	3.29	3.091 ± 0.607	667261 ± 1289
MeOH:Asetik asit (% 1.0) (35:65, h/h)	3.22	12.805	810092
MeOH:Asetik asit (% 0.5) (40:60, h/h)	3.41	5.352 ± 0.0113	1187196 ± 23400
MeOH:Asetik asit (% 1.5) (40:60, h/h)	3.20	5.860 ± 0.0819	1340801 ± 92010

*n= 3

Alıkonma zamanları üzerinde organik çözücü oranı etkili olmuştur. Asetik asit miktarının artırılması alıkonma zamanında artışa neden olmuştur. 40:60 oranında MeOH:asetik asit içeren karışımın alan tekrar edilebilirliği iyi olmakla birlikte (% BSS = 0.193) alıkonma zamanı için tekrar edilebilirlik oldukça yüksek (% BSS = 19.63) bulunmuştur. İncelenen hareketli faz ortamlarının tamamında solvent front piki çok geniş bir şekilde belirlemektedir. Ayrıca daha geç alıkonma zamanlarında nebivolol pikleri oldukça geniş tabanlı olarak tekrar edilebilir alan değeri vermeyen koşullarda elde edilmektedir.

Çeşitli oranlarda ACN-asetik asit karışımından oluşan hareketli faz sistemlerinin incelenmesi amacıyla MeOH içerisinde hazırlanan 1.03×10^{-6} M nebivolol çözeltisi kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (**Çizelge 3**). ACN:asetik asit (% 1.0, h/h), h/h olmak üzere 40:60 ve 30:70 oranları ve asetik asit miktarının etkisini değerlendirmek için asetik asit yüzdesi % 1.5 olacak şekilde ACN:asetik asit 40:60 oranı kullanılarak kromatogramlar kaydedilmiştir. Bu çözeltilerin pH değerleri 3.2-3.3 aralığında ölçülmüştür. Her bir hareketli faz bileşimi için nebivolol çözeltisi 3 defa enjekte edilerek alıkonma zamanları ve pik alanları tekrar edilebilirliği değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. 1.03×10^{-6} M Nebivolol Çözeltisi İçin Asteonitril ve Asetik Asit İçeren Hareketli Fazlarda Alıkonma Zamanı ve Pik Alanlarının İncelemesi

Hareketli faz	pH	Alıkonma Zamanı* (dak) (Ortalama \pm SS)	Pik Alanı* (Ortalama \pm SS)
ACN:Asetik asit (% 1.0) (40:60, h/h)	3.33	$1.129 \pm 6.43 \times 10^{-3}$	445955 ± 88175
ACN:Asetik asit (% 1.5) (40:60, h/h)	3.22	1.139 ± 0.0182	564396 ± 7012
ACN:Asetik asit (% 1.0) (30:70, h/h)	3.20	1.358 ± 0.0228	634097 ± 8087

*n= 3

ACN-asetik asit karışımında nebivolol pikleri oldukça erken alıkonma zamanlarında ve dar tabanlı elde edilmiştir. Ancak bu hareketli faz sisteminde MeOH kullanılarak yapılan kör enjeksiyonlarda nebivolol alıkonma zamanına karşılık gelen zamanda hayalet pikler her enjeksiyonda gözlenmektedir. Alan değeri nebivolol alanlarının yaklaşık % 6'sına karşılık gelmektedir. Hayalet pikler MeOH:asetik asit (% 1.0, h/h), (40:60, h/h) hareketli faz sisteminde yapılan kontrollerde de gözlenmiştir ve MeOH pik alanı nebivolol için elde edilen pik alanının yaklaşık % 6'sına karşılık gelmektedir.

Hayalet pik kaynağı olabilecek cihaz aksamı olarak loop'dan gelen kirlilik olasılığı göz önüne alınarak loopda bulunan kirlilikleri temizlemek ve hayalet pik gözlenme olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla kolon çıkarıldıktan sonra loop bölümü 1 N nitrik asit çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra sıcak sodyum dodesil sülfat (SDS) (50 mM) çözeltisi ile kolona kadar olan aksam 1.5 saat yıkanmıştır. Sonrasında sıcak su ile 1 saat daha yıkama yapılarak loop ve kolona kadar olan aksamın temizlenmesi sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra yine kolona kadar olan kısım % 80 ACN ile 30 dak yıkanmıştır. Ancak tüm çabalara karşın hayalet pikler gözlenmeye devam etmiştir.

Gowda ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada % 0.03 formik asit sulu çözeltisi ilavesinin pik simetrisini iyileştirdiği ve hayalet pikleri uzaklaştırdığı belirtilmektedir. Söz konusu çalışmada ACN-% 0.03 formik asit (pH 3.3) (65+35, h/h) hareketli faz ortamının kullanıldığı ve Luna C₁₈ kolon ile ayırmaların uygun şekilde sağlandığı bildirilmektedir. Benzer hareketli faz bileşimi hazırlanarak yapılan çalışmalarda C₆-fenil kolonda alıkonma gözlenmemiş, olasılıkla nebivolol hareketli faz ile birlikte kolonu terk etmiştir.

ACN:formik asit (% 0.03) (25:75, h/h) içeren daha polar bir hareketli faz sistemi hazırlanarak nebivolol kromatogramları kaydedilmiştir. Ayrıca MeOH:formik asit (% 0.03, h/h), ACN:asetik asit (% 0.03, h/h) ve ACN:fosfat tamponu (5.0 mM, pH 3.02) hareketli fazları da nebivolol yanıtlarının değerlendirilmesi için incelenmiştir.

Çizelge 4. 1.03×10^{-6} M Nebivolol Çözeltisi İçin Farklı Hareketli Fazlarda Alıkonma Zamanı ve Pik Alanlarının İncelemesi

Hareketli faz	pH	Alıkonma Zamanı* (dak) (Ortalama \pm SS)	Pik Alanı* (Ortalama \pm SS)
ACN:Formik asit (% 0.03) (25:75, h/h)	3.03	2.635 \pm 0.0339	776959 \pm 22686
MeOH:Formik asit (% 0.03) (30:70, h/h)	3.62	Pik gözlenmedi.	
MeOH:Formik asit (% 0.03) (40:60, h/h)	3.20	6.289 \pm 0.0987	815746 \pm 28501
ACN:Asetik asit (% 0.03) (25:75, h/h)	3.06	2.415 \pm 0.0473	869452 \pm 73739
ACN:fosfat tamponu (5.0 mM) (25:75, h/h)	3.06	8.288 \pm 0.123	1418924 \pm 28340

*n= 3

ACN:formik asit (% 0.03) (25:75, h/h) içeren hareketli faz sisteminde hayalet pikler oldukça azalmış, bazı enjeksiyonlarda kaybolmuştur. Alıkonma zamanı ve pik alanı tekrar edilebilirliği (% BSS değerleri alıkonma zamanı için 1.28, pik alanı için 2.92) oldukça iyi görünmektedir. Bu sistemde daha dar tabanlı pikler elde edilmiştir. Alıkonma zamanı erken olmasına karşın miktar tayinine izin verecek koşullara yakın sonuçlara ulaşıldığına karar verilmiştir.

Olası hareketli faz araştırmaları MeOH:formik asit (% 0.03, h/h) 30:70 ve 40:60 oranları için değerlendirilmiştir (**Çizelge 4**). 30:70 MeOH:formik asit içeriğinde nebivolol piki elde edilememiştir. 40:60 oranındaki bileşim için ise alıkonma zamanı ve pik alanı tekrar edilebilirliği (% BSS alıkonma zamanı için 1.57 ve pik alanı için 3.49) uygun değildir ve pikler oldukça geniş tabanlı olarak elde edilmiştir. MeOH ile yapılan kör enjeksiyonlarda hayalet pikler gözlenmiştir.

Asidik ortam sağlamak amacıyla pH 3.02 olan 5.0 mM fosfat tamponu hazırlanmış ve ACN:fosfat tamponu (25:75, h/h) hareketli faz sisteminde nebivolol yanıtları incelenmiştir (**Çizelge 4**). Yaklaşık 8.3 dak'da beliren ve çok geniş tabanlı pikler elde edilmiştir. MeOH ile yapılan kör enjeksiyonlarda hayalet pikler gözlenmiştir.

ACN:formik asit (% 0.03, h/h) (25:75, h/h) içeren hareketli faz sistemine geri dönülerek ardışık beş enjeksiyon için alıkonma zamanı ve pik alanı tekrar edilebilirliği araştırılmıştır. Alıkonma zamanı için 2.454 ± 0.0357 dak, pik alanı için 840294 ± 10733 değerleri elde edilmiştir.

YPSK yönteminde kesinliği arttırmak için IS yaygın olarak kullanılmaktadır. ACN:formik asit (% 0.03, h/h) (25:75, h/h) içeren hareketli faz sisteminde nebivolol tayininde yöntem kesinliğinin artırılmasına olanak sağlayacak IS bulmak için çeşitli standart maddeler yaklaşık 1.0×10^{-6} M derişimde cihaza verilmiş ancak ya IS madde için pik gözlenmemiş veya nebivolol piki ile çakışan pikler elde edilmiştir.

IS olarak incelenen maddeler arasında metoprolol, karbamazepin, naproksen, betoksolol, dihidroksibenzil amin ve metil paraben nebivolol ile aynı alıkonma zamanında pikler vermiş ve hareketli faz bileşiminde yapılan değişiklikler belirtilen IS adaylarının nebivolol pikinden ayrılmasına olanak vermemiştir. IS bulunması ile ilgili çalışmalara daha fazla devam edilmemiştir.

Silanol etkileşimini azaltmak, hayalet piklerin var olmadığı tekrar edilebilir alıkonma zamanı ve pik alanı elde etmek amacıyla formik asit derişiminin artırıldığı koşullarda nebivolol yanıtları incelenmesi düşünülmüştür. Formik asit derişimi 50 mM değerine artırılarak ACN:formik asit (25:75, h/h) içeren hareketli faz sisteminde nebivolol için uygun sonuçlar elde edilmiştir. Formik asit derişiminin artırılması nebivolol alıkonma zamanının artmasına neden olmakla birlikte 4 dak dolayında alıkonma zamanı analiz için uygun bir süredir. Ayrıca kolon fırın termostatu, yaz mevsimi sıcaklık koşullarına uyum göstermesi amacı ile 30°C'ye ayarlanmıştır. Bu koşullar altında teorik plaka sayısı metrede 22306.67, kuyruklanma faktörü 1.14 ve kapasite faktörü 3.96 olarak belirlenmiştir.

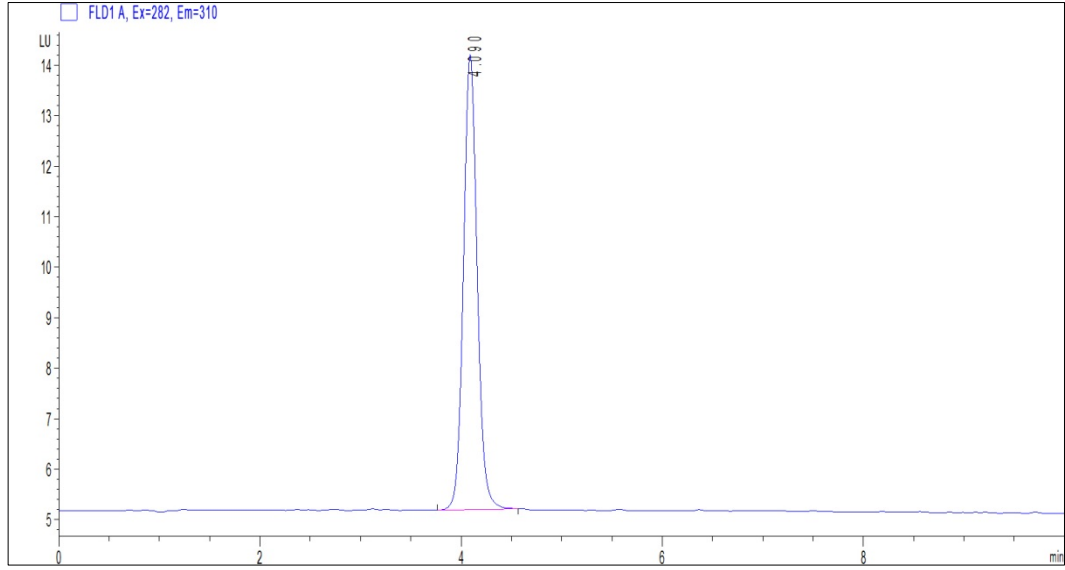
Ayrılmanın sağlanmasının ardından, yöntemin cihaz kesinliğini belirlemek amacıyla nebivolol için tekrar edilebilirlik değerleri incelenmiştir. Bu amaçla, standart nebivolol (1.55×10^{-6} , 3.09×10^{-6} ve 4.64×10^{-6} M) çözeltileri, altı defa YPSK cihazına verilerek elde edilen alıkonma zamanları ve pik alanları değerlendirilmiştir. Pik alanlarının ve yöntemin kesinliğinin değerlendirilmesinde düzeltilmiş pik alanları da dikkate alınmıştır ($\text{Alan}_{\text{NEBİVOLOL}}/\text{Alıkonma zamanı}_{\text{NEBİVOLOL}}$). Nebivolol için üretilen yanıt değerleri kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır ve sonuçlar **Çizelge 5**'te verilmektedir.

Çizelge 5. Standart Nebivolol İçin Tekrar Edilebilirlik Sonuçları

Nebivolol Derişimi (M)	Alıkonma zamanı (dak)		Pik Alanı		DPA	
	Ortalama \pm SS	% BSS	Ortalama \pm SS	% BSS	Ortalama \pm SS	% BSS
1.55×10^{-6} (n = 6)	4.185 \pm 0.003	0.071	42.4 \pm 0.2	0.47	10.12 \pm 0.045	0.444
3.09×10^{-6} (n = 6)	4.183 \pm 0.004	0.095	85.9 \pm 0.4	0.47	20.54 \pm 0.088	0.431
4.64×10^{-6} (n = 6)	4.170 \pm 0.008	0.192	131.7 \pm 0.3	0.26	31.58 \pm 0.139	0.442

Pik alanı ve DPA değerlerinin eşdeğer yanıtlar ürettiği görülmektedir. Azotlu bileşiklerde yaygın olarak karşılaşılan alıkonma zamanı kayma problemi kullanılan deneysel koşullar için bir sorun oluşturmamaktadır. Deneysel çalışmanın bundan sonraki kısmında nebivolol yanıtıyla ilgili değerlendirmelerde pik alanı değerleri kullanılmıştır.

Nebivolol tayini için en uygun cihaz ve analitik koşullar olarak Gemini C₆ fenil kolon varlığında ACN:formik asit (50 mM) (25:75, h/h) hareketli faz sistemi, 0.9 mL/dk akış hızı, 10 mL enjeksiyon hacmi, 282 nm uyarma dalga boyu ve 310 nm yayma dalga boyu belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen nebivolol kromatogramı **Şekil 5**'te verilmektedir.



Şekil 5. 3.093×10^{-6} M Nebivolol Standart Çözeltisinin Optimum Koşullarda Elde Edilmiş Kromatogramı

YPSK Yönteminin Validasyonu

Optimizasyonu gerçekleştirilen YPSK yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla seçicilik, kesinlik ve doğruluk, doğrusal aralık, LOD, LOQ ve sağlamlık gibi validasyon parametreleri ICH kriterlerine dayanarak incelenmiştir (ICH, 2005).

Doğrusal aralık

Doğrusal aralığının incelenmesi için, 1.03×10^{-6} M ile 5.15×10^{-6} M derişim aralığında beş farklı derişimdeki nebivolol çözeltisi, YPSK cihazına verilerek üç ayrı günde kromatogramları kaydedilmiş, elde edilen pik alanı değerleri derişim değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu görülmüş ve sonuçlar en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilmiştir. Yöntemin belirtilen derişim aralığında elde edilen yüksek korelasyonlu doğrusallığını gösteren sonuçlar **Çizelge 6**'da verilmektedir.

Çizelge 6. YPSK Yöntemi ile Doğrusal Aralık İçin Elde Edilen Sonuçlar

	Gün İçi			Günler Arası (n = 15)
	1. Gün (n = 5)	2. Gün (n = 5)	3. Gün (n = 5)	
Eğim	34470000	34370000	34080000	34310000
Kesim	-2.180	-1.820	-1.240	-1.747
r	0.9996	0.9997	0.9999	0.9965
Eğimin SH değeri	633500	605300	543900	290800
Kesimin SH değeri	2.166	2.070	1.860	0.9945

LOD ve LOQ

Nebivololün YPSK yöntemi ile LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi için LOD, kalibrasyon eğrisinin kesim değerlerinin SS'si kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünerek elde edilen değer 3.3 ile çarpımı kullanılarak 4.56×10^{-8} M olarak hesaplanmıştır. LOQ ise, aynı oranın 10 ile çarpımı kullanılarak 1.38×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır.

Keskinlik ve doğruluk

Yöntemin keskinliğini ve doğruluğunu belirlemek için öncelikle kalite kontrol standardı olarak hazırlanan ve kalibrasyon eğrisinin hazırlandığı derişim aralığında bulunan üç farklı derişimdeki (1.55×10^{-6} M, 3.09×10^{-6} M ve 4.64×10^{-6} M) standart nebivolol çözeltisi, üç gün boyunca 6 defa YPSK cihazına verilmiş ve pik alanı olarak elde edilen yanıtlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 7. Kalite Kontrol Standartları ile Elde Edilen Keskinlik ve Doğruluk Sonuçları

Günler	Nebivolol derişimi	Ortalama \pm SS (n = 6)	% BSS	% BH	% Geri Kazanım
1	1.55×10^{-6} M	$1.53 \times 10^{-6} \pm 5.94 \times 10^{-9}$	0.388	-1.29	98.95
2		$1.55 \times 10^{-6} \pm 5.52 \times 10^{-9}$	0.356	0	99.96
3		$1.58 \times 10^{-6} \pm 1.50 \times 10^{-8}$	0.951	1.93	102.09
1	3.09×10^{-6} M	$3.10 \times 10^{-6} \pm 1.36 \times 10^{-8}$	0.438	0.32	100.37
2		$3.09 \times 10^{-6} \pm 1.45 \times 10^{-8}$	0.469	0	99.99
3		$3.10 \times 10^{-6} \pm 1.13 \times 10^{-8}$	0.364	0.32	100.40
1	4.64×10^{-6} M	$4.76 \times 10^{-6} \pm 1.25 \times 10^{-8}$	0.263	2.58	102.57
2		$4.63 \times 10^{-6} \pm 1.15 \times 10^{-8}$	0.248	-0.21	99.82
3		$4.78 \times 10^{-6} \pm 5.64 \times 10^{-9}$	0.118	3.02	103.10

Çizelge 7'e göre, incelenen nebivolol çözeltilerinin pik alanları gün içi tekrar edilebilirlik değerleri % 2'nin oldukça altındaki % BSS değeri ile tekrar edilebilirlik kriterlerine oldukça uygun görülmektedir. 4.64×10^{-6} M nebivolol derişimi için BH değerleri biraz yüksek olmakla birlikte yöntemin gün içi ve günler arası ölçümlerde doğru sonuçlar ürettiği söylenebilir (Shah ve ark., 1992).

Yöntemin matriks ortamında doğruluğunu ve keskinliğini araştırmak için, tableti oluşturan etkin madde dışındaki maddelerden oluşan bir matriks ortamı hazırlanması, etkin maddenin bu matrikse eklenmesi ve yapılan ölçüm sonunda matriks ortamındaki % geri kazanımın belirlenmesi yolu izlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki nebivolol çözeltisinin (1.90×10^{-6} , 3.77×10^{-6} ve 5.66×10^{-6} M) matriks çözeltisine eklenerek karıştırılması, her bir derişim için 6 defa YPSK yöntemi ile analiz edilmesi ve nebivolol içeriğine karşılık gelen pik alanı değerlerinin kalibrasyon eşitliğinde çözülmesi ile hesaplanan % geri kazanım ve % BH değerleri ve keskinlik için % BSS değerleri **Çizelge 8'**de verilmektedir.

Çizelge 8. Matrix Ortamında Yöntemin Kesinliği ve Doğruluğu İçin Elde Edilen Sonuçlar

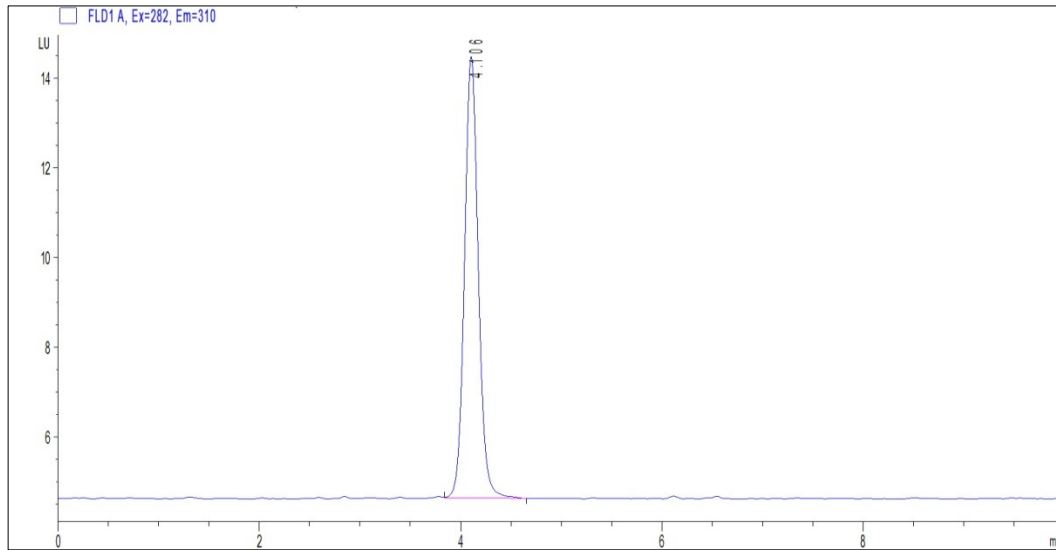
Günler	Nebivolol derişimi	Ortalama \pm SS (n = 6)	% BSS	% BH	% Geri Kazanım
1	1.90×10^{-6} M	$1.96 \times 10^{-6} \pm 1.30 \times 10^{-8}$	0.661	3.16	103.49
2		$1.85 \times 10^{-6} \pm 1.88 \times 10^{-8}$	1.016	-2.63	97.58
3		$1.89 \times 10^{-6} \pm 1.59 \times 10^{-8}$	0.843	-0.53	99.69
1	3.77×10^{-6} M	$3.95 \times 10^{-6} \pm 1.04 \times 10^{-8}$	0.263	4.77	104.64
2		$3.69 \times 10^{-6} \pm 8.52 \times 10^{-9}$	0.231	-2.12	97.82
3		$3.67 \times 10^{-6} \pm 2.35 \times 10^{-8}$	0.640	-2.65	97.40
1	5.66×10^{-6} M	$5.99 \times 10^{-6} \pm 1.64 \times 10^{-8}$	0.275	5.83	105.87
2		$5.62 \times 10^{-6} \pm 1.45 \times 10^{-8}$	0.258	-0.71	99.27
3		$5.54 \times 10^{-6} \pm 2.19 \times 10^{-8}$	0.396	-2.12	97.89

Çizelge 8'de görüldüğü gibi yöntemin doğruluğunu gösteren % BH ve kesinliği gösteren % BSS değerleri 1. gün dışında elde edilen değerlere göre % 2 ve altındadır ve validasyon kriterlerine uygun bulunmaktadır (ICH, 2005). Bu sonuçlara göre tablet içindeki yardımcı maddelerin nebivolol tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı söylenebilir.

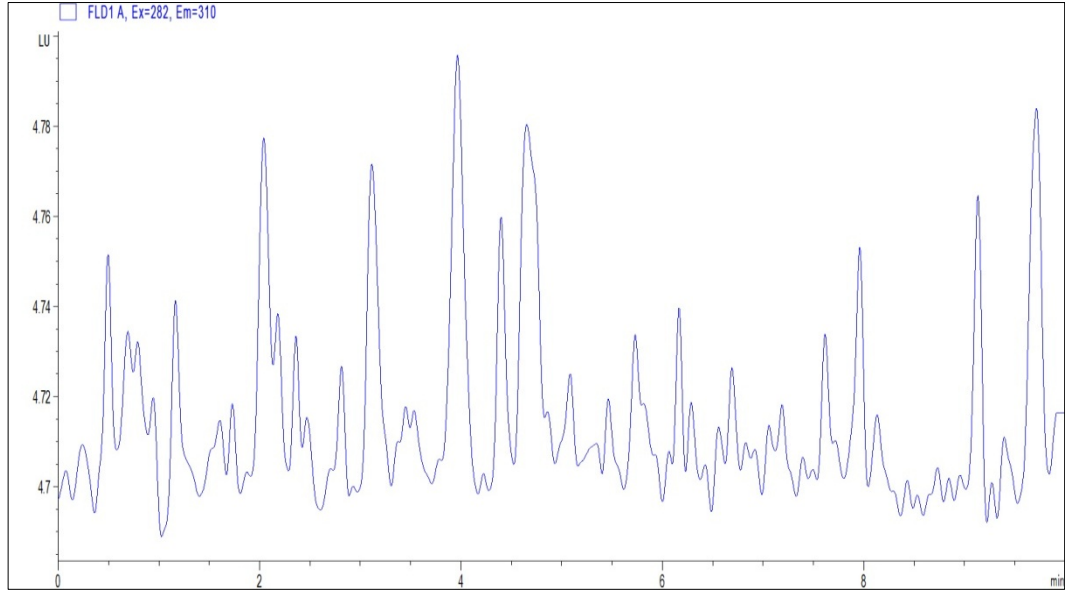
Spesifiklik

Spesifiklik bütün validasyon işlemlerinde bir yöntemin geçerli kılınması için en önemli parametredir. Kromatografik yöntemler için bir ayırma işleminin geliştirilmesi spesifikliğin yani bütün potansiyel numune bileşenlerinin varlığında uygulanan yöntemin analitin yanıtını doğru ölçme kapasitesinin gösterilmesini içerir.

Matriks ortamı olarak Gereçler kısmında aktif olmayan tablet içeriği bileşimi hazırlanmış ve kromatogramı alınmıştır (**Şekil 7**). Matriks ortamında hazırlanan nebivolol çözeltisinin kromatogramı (**Şekil 6**) ile karşılaştırıldığında önerilen yöntemin sadece nebivolol için spesifik kabul edilebilecek yanıtlar ürettiği görülmektedir.



Şekil 6. Matriks Ortamında 3.09×10^{-6} M Nebivololün Kromatogramı



Şekil 7. Nebivolol İçermeyen Matriks Ortamının Kromatogramı

Sağlamlık (Robustness)

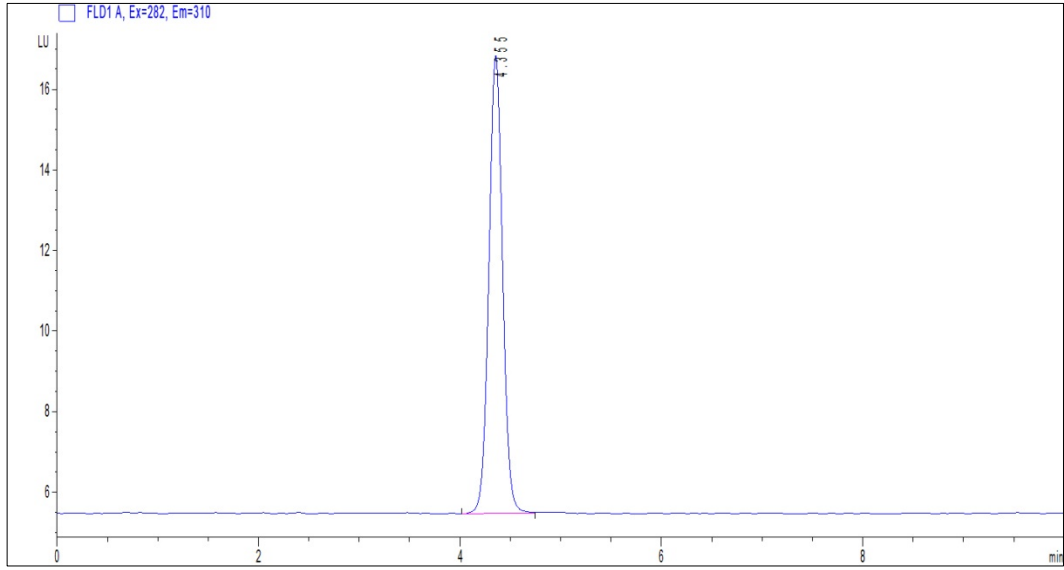
Sağlamlık, yöntem parametrelerinde küçük değişkenliklerle ilgili olarak analit yanıtının güvenilirliğini gösterir. YPSK yönteminin sağlamlığının test edilmesi için optimum deneysel parametrelerde küçük değişiklikler yapılarak kaydedilen nebivolol çözeltilerinin (3.09×10^{-6} M) pik alanı değerlerinin % BSS değerleri hesaplanmış ve Çizelge 9'da sunulmuştur. Elde edilen düşük % BSS değerleri (<2) yöntemin sağlamlığını göstermektedir.

Çizelge 9. YPSK Yönteminin Sağlamlık Testi Sonuçları (3.09×10^{-6} M Nebivolol, n=3)

Değiştirilen Parametre	% BSS
Akış Hızı 0.8 mL/dak 1.0 mL/dak	0.37 1.29
Hareketli faz bileşimi ACN:Formik asit (50 mM) (27:73, h/h) ACN:Formik asit (50 mM) (23:77, h/h)	0.40 0.27
Kolon fırını sıcaklığı 29°C 31°C	0.35 0.11
Dalga Boyu (nm) Ex: 280 nm Em: 308 nm Ex: 280 nm Em: 312 nm Ex: 284 nm Em: 308 nm Ex: 284 nm Em: 312 nm	0.13 0.26 1.32 0.87

Nebivolol İçeren Tabletlerde Miktar Tayini

YPSK yönteminin uygulaması, 5.0 mg nebivolol içerdiği bilinen ticari tabletlerde miktar tayini yapılarak gösterilmiştir (**Şekil 8**). Deneysel kısımda tarif edildiği şekilde hazırlanan tablet numuneleri optimum koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, doğrusallık bölümünde verilen günler arası eşitlikte çözülerek nebivolol içeren tabletlerdeki miktarlar ve karşılık gelen yüzdeleri hesaplanmıştır. Tablet bileşenlerinden kaynaklanan ve ölçümleri etkileyecek düzeyde girişim gözlenmemiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler, **Çizelge 10**'da sunulmaktadır.



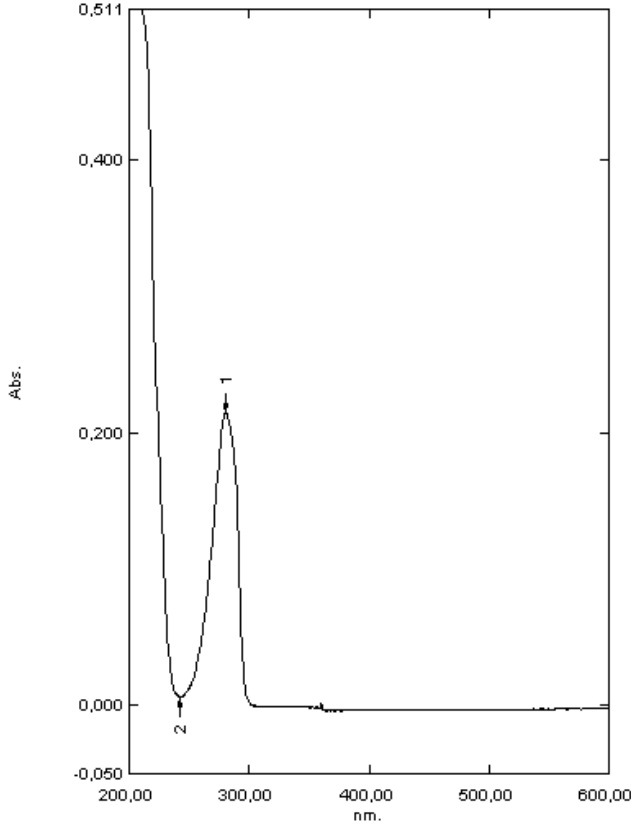
Şekil 8. Nebivolol Tablet Çözeltisinin Kromatogramı

Çizelge 10. YPSK ile Tabletlerde Nebivolol Miktar Tayini Sonuçları

	YPSK		UV-Spektrofotometri	
	Nebivolol (mg)	% Nebivolol	Nebivolol (mg)	% Nebivolol
Ortalama (n= 8)	4.99	99.76	4.95	98.99
SS	0.017	0.344	0.029	0.574
% BSS	0.345	0.345	0.580	0.580

UV-Spektrofotometri yöntemi tabletlerde nebivolol miktar tayini için karşılaştırma yöntemi olarak değerlendirilmiştir. % 10 MeOH (h/h) kör olarak kullanılmış ve bu ortamda 5.16×10^{-5} M derişimdeki nebivolol çözeltisinin 200-600 nm dalga boyu aralığında 1 cm'lik kuartz hücreler içinde kaydedilen UV spektrumu **Şekil 9**'da verilmektedir. En yüksek absorbandsın olduğu dalga boyu değeri 280.5 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için 5.16×10^{-5} ve 1.55×10^{-4} M derişim aralığında beş farklı derişimde nebivolol çözeltisi hazırlanmış ve 280.5 nm'de absorbandsları ölçülmüştür. Kalibrasyon

eşitliği en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilerek $A = 5966.77 C (M) - 0.0887$, $r = 0.9998$ eşitliği elde edilmiştir. Burada A, 280.5 nm de ölçülen absorbans değerine, C ise molarite olarak nebivolol derişimine karşılık gelmektedir.



Şekil 9. Nebivololün UV spektrumu, 280.5 nm

Gereçler bölümünde tarif edildiği şekilde hazırlanan stok tablet numunesi çözeltileri hacimce % 10 MeOH ile gerekli derişime seyreltilerek 280.5 nm dalga boyunda aborbansları ölçülmüştür. Tablet numune çözeltilerinin nebivolol yanıtları kalibrasyon eşitliğinde çözümlenerek tabletlerin nebivolol içeriği ve % nebivolol miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 10**'da verilmektedir.

USP (Amerikan farmakopesi) 29 farmakopesinde, birim etken madde içeriği için sağlanması gerekli bulunan koşullar bildirilmektedir (The United States Pharmacopeia, 2006). Farmakopeye göre, 10 adet tablet ölçümü yapılmasının ardından etkin madde içeriğinin % 90-110 aralığında bulunması ve ölçümün % BSS değerinin ise % 6'dan az veya eşit olması gereklidir. Geliştirilen yöntemle yapılan ölçümlerde, 5.0 mg nebivolol içerdiği bilinen Vasoxen® tablet içeriği farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur. Ölçümlerin % BSS değeri % 6'dan oldukça azdır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

YPSK, kolay otomasyonu, duyarlılığı, yüksek tekrar edilebilirliği, kısa analiz süresi, basitliği, hızı, az miktarda numune gerektirmesi gibi nedenlerle analitik kimyada önem kazanmış bir yöntemdir. Doğruluk ve kesinlik gerektiren ilaç analizi laboratuvarlarının vazgeçilmez cihazlarından en önemlisi YPSK cihazıdır. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kantitatif amaçla en fazla kullanılan yöntemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada, öncelikle nebivolol tayini için önerilen YPSK kromatografisi yöntemi için en uygun cihaz ve analitik koşullar belirlenmiştir. Bu koşulların belirlenmesi için Gemini C₆ fenil kolon ile ayrılması planlanan nebivolol için saptama dalga boyları belirlendikten sonra hareketli faz ve bileşimi, incelenerek nebivolol alıkonma zamanı ve pik alanına olan etkileri değerlendirilmiştir. Nebivolol tayini için en uygun cihaz ve analitik koşullar Gemini C₆ fenil kolon varlığında ACN:formik asit (50 mM) (25:75, h/h) hareketli faz sistemi, 0.9 mL/dak akış hızı, 10 mL enjeksiyon hacmi, 282 nm uyarma dalga boyu ve 310 nm yayma dalga boyu olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda nebivolol piki 4 dak'da görülmektedir.

Nebivolol analizi için en uygun koşullar belirlendikten sonra doğrusalık, LOD, LOQ, doğruluk ve kesinlik, seçicilik ve sağlamlık gibi geçerlilik parametreleri incelenerek yöntemin geçerliliği gösterilmiştir. Tüm geçerlilik parametreleri için % BSS değerlerinin % 2'nin oldukça altında olduğu % BH için ise kabul edilebilir sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir.

Geliştirilen YPSK yöntemi ile ticari tabletlerde yapılan nebivolol içerik analizi sonucunda % nebivolol içeriğinin USP 29 (The United States Pharmacopeia, 2006) belirtilen içerik koşullarını sağladığı belirlenmiştir.

Önerilen yöntemin doğrusal aralığı 0.42-2.09 µg/mL olarak belirlenmiş, LOD ve LOQ 18.5 ng /mL ve 55.9 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemle duyarlı, spesifik, kesin ve doğru sonuçlar üretildiği gösterilmiştir. İlerideki çalışmalarda uygun bir IS varlığında biyolojik örneklerde yapılacak tayinlerde uygulanabilir olacağı umulmaktadır.

KAYNAKLAR

Bökesoy, A., Çakıcı, İ., Melli, M., Farmakoloji Ders Kitabı, Gazi Kitabevi, 393-401, 2000.

Dağlı, N., Karaca, I., Hipertansif Olgularda Nebivolol ve Telmisartan'ın Kan Basıncı, Diyastolik Fonksiyonlar, Lipid ve Glukoz Metabolizması Üzerine Etkileri, Fır. Tıp Der., 11 (4), 201-209 (2006).

Dhandapani, B., Kumar, K.S., Dharuman, J., Geetha, K., Simultaneous Estimation of Nebivolol Hydrochloride and Hydrochlorothiazide in Tablets, Asian Journal of Chem., 20 (2), 1648-1650, (2008).

Dhandapani, B., Thirumoorthy, N., Prakash, D.J., Development and Validation for the Simultaneous Quantification of Nebivolol Hydrochloride and Hydrochlorothiazide by UV Spectroscopy, RP-HPLC and HPTLC in Tablets, E-Journal of Chem., 7 (2), 341-348, (2010).

Doğrukol-Ak, D., Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Kromatografik Sistemler, L.Genç, Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi Yayınları, Anadolu Üniversitesi Basımevi Tesisleri, Eskişehir, 9-18, (2011).

Doshi, A.S., Bhagwan, S.S., Mehta, T.N., Gupta, V.K., Subaiah, G., Determination of Nebivolol and Valsartan in Fixed-Dose Combination by Liquid Chromatography, Journal of AOAC International, 91 (2), 292-298, (2008).

Gowda, N., Panghal, S., Vipul, K., Rajshree, M., Validation and Application of High-Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Nebivolol and Hydrochlorothiazide: A Novel Approach to Multivariate Calibrations by R-Software Environment, Journal of AOAC International, 92 (5), 1356-1365, (2009).

Güngör, G., Hipertansif Erkek Hastalarda Nebivololün Erektile Fonksiyonlar Üzerine Etkisi, Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Isparta, Türkiye (2006).

http-1 <http://www.rxlist.com/bystolic-tablets-drug.htm>

http-2 <http://www.ukmi.nhs.uk/NewMaterial/html/docs/nebivolo.pdf>

ICH Steering Committee, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline (2005).

Joshi, S.J., Karbhari, P.A., Bhoir, S.I., RP-LC Simultaneous Determination of Nebivolol Hydrochloride and Amlodipine Besilate in Bi-Layer Tablets, Chrom.A, 70 (3-4), 557-561 (2009).

Kachhadia, P.K., Doshi, A.S., Joshi, H.S., Development and Validation of a Stability-Indicating Column High-Performance Liquid Chromatographic Assay Method for Determination of Nebivolol in Tablet Formulation, *Journal of AOAC International*, 91 (3), 557-561, (2008).

Meyer, V., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley and Sons Ltd., Chichester U.K., 5-17, 2010.

Meyyanathan, S.N., Birajdar, A.S., Suresh, B., Simultaneous Estimation of Nebivolol Hydrochloride and Valsartan and Nebivolol Hydrochloride and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Formulations by UV Spectrophotometric Methods, *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, 44 (2), 156-159 (2010).

Mutlu, B., *Kardiyovasküler Hastalıklarda Vazodilatatör Beta Blokörler*, Trakya Üniv. Tıp Fak. Der., 27 (1), 26-30, (2010).

Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Simons, W., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., Neels, H., Covaci, A., Optimization and Validation of a Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of 13 Top Prescribed Pharmaceuticals in Influent Wastewater, *Anal Bioanal Chem.*, 398 (5), 2211-2222 (2010).

Önal, A., Spectrophotometric and Spectrofluorimetric Determination of Some Drugs Containing Secondary Amino Group in Bulk Drug and Dosage Forms via Derivatization with 7-Chloro-4-Nitrobenzofuran, *Quim. Nova*, 34 (3), 677-682, (2011).

Rao, A.L., Rajeswari, K.A., Sankar, G.G., Spectrophotometric Method for the Determination of Nebivolol Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Formulations, *E-Journal of Chem.*, 7 (2), 445-448, (2010).

Reddy, T.S., Devi, P.S., Validation of a High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method, with Densitometric Detection, for Quantitative Analysis of Nebivolol Hydrochloride in Tablet Formulations, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 20 (2), 149-152, (2007).

Sahoo, M.K., Giri, R.K., Barik, C.S., Kanungo, S.K., Ravi Kumar, V.V., RP-HPLC Method for the Estimation of Nebivolol in Tablet Dosage Form, *E-Journal of Chem.*, 6 (3), 915-919, (2009).

Selvan, P.S., Gowda, K.V., Mandal, U., Solomon, S., Pal, T.K., Simultaneous Determination of Fixed Dose Combination of Nebivolol and Valsartan in Human Plasma by Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometry and Its Application to Pharmacokinetic Study, *Journal of Chrom. B*, 858 (1-2), 143-150, (2007).

Shah, D.A., Bhatt, K.K., Mehta, R.S., Baldania, S.L., Gandhi, T.R., Stability Indicating RP-HPLC Estimation of Nebivolol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations, *Indian Journal of Pharm. Sciences*, 70 (5), 591-595, (2008).

Shah, D.A., Bhatt, K.K., Mehta, R.S., Baldania, S.L., Determination of Nebivolol Hydrochloride and Hydrochlorothiazide in Tablets by First-Order Derivative Spectrophotometry and Liquid Chromatography, *Journal of AOAC International*, 91 (5), 1075-1082, (2008).

Shirkhedkar, A.A., Bugdane, P.M., Surana, S.J., Stability-Indicating TLC-Densitometric Determination of Nebivolol Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form, *Journal of Chrom. Science*, 48 (2), 109-113, (2010).

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık, Ankara, 735-736, (2000).

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., *Practical HPLC Method Development Second Edition*, John Wiley and Sons Inc., New York U.K., 1997.

Subbayamma, A.V., Rambabu, C., Spectrophotometric Determination of Oxidative Coupling Reactions of Nebivolol and Trandolapril, *Asian Journal of Chem.*, 21 (6), 4280-4284 (2009).

Tunçel, N., Aydın, S., Zeytinoğlu, M., Dolaşım Sistemi (Kardiyovasküler Sistem) ve Önemi, *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi*, S. Aydın, Anadolu Üniversitesi Web-Ofset Tesisleri, Eskişehir, 163-165, (2006).