

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN KANI SERUMUNDA KARVEDİLOL İLAÇ ETKEN MADDESİNİN
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ
İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALIDASYONU**

Kemal KAPLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN KANI SERUMUNDA KARVEDİLOL İLAÇ ETKEN MADDESİNİN
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ
İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALIDASYONU**

Kemal KAPLAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2015-417 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2016



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN KANI SERUMUNDA KARVEDİLOL İLAÇ ETKEN MADDESİNİN
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ
İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU

Kemal KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 23/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel TUNÇ 
Prof. Dr. Erol AYRANCI 
Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY 

ÖZET

İNSAN KANI SERUMUNDA KARVEDİLOL İLAÇ ETKEN MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU

Kemal KAPLAN

**Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sibel TUNÇ
Aralık 2016, 66 sayfa**

Bu çalışmada, hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsünü takip eden sol ventriküler bozukluklarda etkili üçüncü nesil bir beta-bloklayıcı olan karvedilolun insan kanı serumunda izokratik ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile analizi incelenmiştir. Karvedilol analizi için sabit faz olarak Supelco Discovery C18 (5 µm partikül büyüklüğünde, 4,6 mm iç çapında ve 150 mm uzunluğunda) ters faz kolonu, hareketli faz olarak asetonitril : %1 trietilamin (TEA) sulu çözeltisi (pH = 3,50 ± 0,01 değerine H₃PO₄ ile ayarlanmış) (30:70 (v/v)) karışımı kullanılmıştır. Karvedilol standart çözeltisi, Diyot Dizi (Array) Dedektörü (DAD) kullanılarak 210 nm, 240 nm ve 254 nm dalga boylarında analiz edilmiş ve karvedilolun 240 nm dalga boyunda maksimum absorbanans verdiği gözlenmiştir. Band genişliği (bw) olarak 4, 8 ve 16 değerleri denenmiş ve en iyi sonuçlar bw değerinin 4 olduğu durumda elde edilmiştir. Referans dalga boyu olarak 360 nm belirlenmiştir. Akış hızı olarak 0,1 mL/dk, 0,2 mL/dk, 0,3 mL/dk, 0,5 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,5 mL/dk denenmiştir. Analiz süresinin en kısa olduğu 1,5 mL/dk'lık akış hızı miktarı, optimum akış hızı olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı optimizasyonu için 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C olmak üzere 6 farklı sıcaklık denenmiştir. Optimum kolon sıcaklığı olarak kolonun en verimli olduğu, kuyruklanmanın en az olduğu ve pik alanının en fazla olduğu 25 °C'lik sıcaklık değeri seçilmiştir. Enjeksiyon hacmi olarak 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL'lik hacimler denenmiş ve 50 µL'lik enjeksiyon hacminde pik şekli bozulduğundan enjeksiyon hacmi için optimum olarak 40 µL'lik enjeksiyon hacim değeri belirlenmiştir. İç standart olarak yine bir beta-bloklayıcı olan propranolol kullanılmıştır. Analizler sonucunda karvedilol için tespit limiti (LOD) 45,38 ng/mL ve kantitatif tayin limiti (LOQ) 137,50 ng/mL olarak bulunmuştur. Yüzde geri kazanım miktarı 99,83 ± 0,84 olarak belirlenmiştir.

Metot için doğruluk, doğrusallık, seçicilik, kantitatif tayin limiti (LOQ), gün içi ve günler arası kesinlik, tekrarlanabilirlik ile kısa ve uzun dönem kararlılık parametreleri belirlenerek metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Karvedilol, Katı Faz Ekstraksiyonu, Beta-Bloklayıcı, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

JÜRİ: Prof. Dr. Sibel TUNÇ
Prof. Dr. Erol AYRANCI
Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

ABSTRACT

METHOD OPTIMIZATION AND VALIDATION FOR THE DETERMINATION OF CARVEDILOL IN HUMAN BLOOD SERUM BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Kemal KAPLAN

MSc Thesis in Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Sibel TUNÇ
December 2016, 66 pages

In this study, the analysis of carvedilol which is an effective third generation beta-blocker in hypertension, congestive heart failure and left ventricular dysfunction following myocardial infarction was investigated in human blood serum by isocratic reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method. For the analysis of carvedilol, Supelco Discovery C18 (particle size: 5µm, inner diameter: 4.6 mm and length: 150 mm) reversed phase column as stationary phase and the mixture of acetonitrile : 1% triethylamine (TEA) aqueous solution (pH = 3.50 ± 0.01 adjusted with H₃PO₄) (30:70 (v/v) mixture) as mobile phase were used. Carvedilol standard solution was analyzed at 210 nm, 240 nm and 254 nm wavelengths by using Diode Array Detector (DAD) and it was observed that carvedilol had a maximum absorbance value at the wavelength of 240 nm. The values of 4, 8 and 16 were tried as bandwidth (bw) and the best results were obtained when bw value was 4. Reference wavelength was determined to be 360 nm. Flow rates of 0.1 mL/min, 0.2 mL/min, 0.3 mL/min, 0.5 mL/min, 1.0 mL/min and 1.5 mL/min were tried as flow rates. The lowest analysis time was obtained at the flow rate of 1.5 mL/min, therefore optimum flow rate was determined to be 1.5 mL/min. Six different temperatures of 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C and 50 °C were tried to optimize column temperature. The temperature value of 25 °C was chosen as optimum column temperature because of high column efficiency, reduced peak tailing and high peak area. The volumes of 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL and 50 µL were tried as injection volumes and the volume of 40 µL was chosen as optimum injection volume because the injection volume of 50 µL caused a peak fronting. Propranolol, another beta-blocker, was used as internal standard. As a result of analyses, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were found to be 45.38 ng/mL and 137.50 ng/mL, respectively. The amount of % recovery was determined to be 99.83 ± 0.84.

Method was validated by the determination of accuracy, linearity, selectivity, limit of quantification (LOQ), intra-day and inter-day precision, repeatability and short-term and long-term stability parameters.

KEYWORDS: Carvedilol, Solid Phase Extraction, Beta-Blocker, High Performance Liquid Chromatography

COMMITTEE: Prof. Dr. Sibel TUNÇ
Prof. Dr. Erol AYRANCI
Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

ÖNSÖZ

Kalp hastalıkları, günümüzde oldukça yaygın, önemli ve giderek artış gösteren bir sağlık sorunudur. Dünyada yaşlı nüfus oranının artmasıyla birlikte kalp hastalıklarının görülme oranı da artmaktadır. Genç insanlarda da görülebilen kalp hastalıkları son derece tehlikelidir. Erken tanı konulmaz ve etkin tedavi uygulanmazsa sonuçları ölümcül olabilmektedir. Kalp hastalıkları ülkemizdeki ölüm nedenlerinin en başındadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, 2009-2014 yılları arasında meydana gelen ölümlerin başlıca nedeni dolaşım sistemi hastalıklarıdır. Bilim insanları, bu nedenle kalp hastalıklarının tedavisi amacıyla yıllardır çalışmalarını sürdürmekte ve yeni nesil kalp ilaçları sentezlemektedir. Karvedilol, üçüncü nesil, üç önemli adrenerjik reseptörü (α_1 , β_1 ve β_2) de etkileyen, vazodilatör ve antioksidan özelliği olan bir beta-bloklayıcıdır. Hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsünü takip eden sol ventriküler bozukluklarda etkili olmaktadır. Diğer beta-bloklayıcılara karşı daha avantajlı ve etkili olan karvedilolun kullanımı dikkatli bir şekilde ve doktor kontrolünde yapılmalıdır. Doz aşımı durumlarında, karvedilol öldürücü etkiye sahiptir. Ülkemizde karvedilol zehirlenmesi ile ilgili çok fazla adli olgu olmamakla birlikte, yurt dışında karvedilol zehirlenmesine ülkemize oranla daha çok rastlanmaktadır. Bu nedenle, adli tıp vakalarında karvedilolun miktarsal tayini önem taşımaktadır.

Literatürde, karvedilolun tayin edilmesine yönelik farklı cihaz ve yöntemlerle yapılmış birçok araştırma bulunmaktadır. Yapılan bu araştırmalarda iç standart olarak pahalı maddeler olan dötero izotopların kullanılması, fazla çözgen harcayan yüksek maliyetli cihazların kullanılması, hidroliz basamağı gibi uzun süren analiz basamaklarının yer alması ve zaman gerektiren ön hazırlık işlemlerinin bulunması nedeniyle alternatif yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, bu yüksek lisans tez çalışmasında, literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak ekonomik, kısa sürede gerçekleştirilebilen ve pratik yeni bir karvedilol tayin metodu geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne "İnsan kanı serumunda karvedilol ilaç etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metod optimizasyonu ve validasyonu" başlığı ile sunulmuş ve aynı birim tarafından FYL-2015-417 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışmam boyunca beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen, bilgisi, deneyimleri ve hoşgörüsü ile bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel TUNÇ'a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi), bu çalışmayı yapabilmem için izin veren Adli Tıp Kurumu Başkanı Doç. Dr. Yalçın Büyük'e, başta Antalya Grup Başkanı Uzm. Dr. Özgür CİN, Prof. Dr. Sema DEMİRÇİN ve Kimya İhtisas Dairesi Başkanı Dr. Kimyager İsmail KAHVECİ olmak üzere tüm Adli Tıp Kurumu Antalya Grup Başkanlığı personeline ve tez çalışmam süresince bana inanan, destekleyen ve moral veren eşim Özlem KAPLAN ve oğlum Batuhan KAPLAN başta olmak üzere aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Projemi destekleyen Adli Tıp Kurumu Antalya Grup Başkanlığı ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kalp Hastalıkları.....	1
1.2. Karvedilol ve Özellikleri.....	2
1.2.1. Karvedilolun β -bloklayıcı özellikleri.....	2
1.2.2. Karvedilolun α_1 -bloklayıcı özellikleri.....	2
1.2.3. Karvedilolun diğer özellikleri.....	3
1.3. Karvedilolun Analiz Yöntemleri.....	4
1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	4
1.4.1. Normal faz ve ters faz HPLC.....	5
1.4.1.1. Normal faz HPLC.....	5
1.4.1.2. Ters faz HPLC.....	5
1.4.2. HPLC cihazında karvedilol analizinde kullanılan dedektörler.....	6
1.4.3. DAD dedektörün çalışma prensibi.....	7
1.4.4. DAD dedektörün avantajları.....	7
1.5. Metot Validasyonu.....	7
1.6. Çalışmanın Amacı.....	8
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	9
2.1. Karvedilol İlaç Etken Maddesinin Tayini Konusunda Literatürde Yapılan Çalışmalar.....	9
3. MATERYAL VE METOT.....	14

3.1. Materyal	14
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve reaktifler.....	14
3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar	15
3.2. Metot	17
3.2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması.....	17
3.2.1.1. Karvedilol stok çözeltisinin hazırlanması	17
3.2.1.2. Karvedilol ara stok çözeltisinin hazırlanması	17
3.2.1.3. İç standart çözeltisinin hazırlanması	17
3.2.2. Metot optimizasyonu.....	18
3.2.2.1. Mobil faz bileşiminin belirlenmesi	18
3.2.2.2. Akış hızının belirlenmesi	18
3.2.2.3. Kolon sıcaklığının belirlenmesi	18
3.2.2.4. Enjeksiyon hacminin belirlenmesi	18
3.2.2.5. Numune hazırlama-katı faz ekstraksiyon (SPE) işlemi	19
3.2.2.6. Numunelerin cihaza verilmesi.....	19
3.2.2.7. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi	19
3.2.3. Metot validasyonu	23
3.2.3.1. Kesinlik parametresinin belirlenmesi.....	23
3.2.3.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi.....	23
3.2.3.3. Seçicilik parametresinin belirlenmesi	23
3.2.3.4. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi	23
3.2.3.5. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi	24
3.2.3.6. Kararlılık parametresinin belirlenmesi.....	24
3.2.3.7. Sistem uygunluk testlerinin yapılması	24
3.2.3.8. Sağlamlık testlerinin yapılması	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Cihazında Kullanılacak Mobil Faz Bileşiminin Tespit Edilmesi	25

4.2. Optimum Metot Parametreleri	32
4.2.1. Optimum dalga boyu	32
4.2.2. Optimum band genişliği	33
4.2.3. Optimum akış hızı	35
4.2.4. Optimum kolon sıcaklığı	40
4.2.5. Optimum enjeksiyon hacmi	44
4.3. Metot Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	44
4.3.1. Doğruluk parametresi	45
4.3.2. Seçicilik parametresi	45
4.3.3. Kesinlik parametresi	49
4.3.3.1. Gün içi kesinlik değeri	49
4.3.3.2. Günler arası kesinlik değeri	49
4.3.4. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi	51
4.3.5. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması	53
4.3.6. Kısa ve uzun dönem kararlılık testleri	54
4.3.6.1. Kısa dönem kararlılık testi sonuçları	54
4.3.6.2. Uzun dönem kararlılık testi sonuçları	54
4.3.7. Sağlamlık testleri	55
4.3.8. Sistem uygunluk testleri	57
5. SONUÇ	58
6. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Å	Angström
bw	Band genişliği
C	Derişim
⁰ C	Santigrat derece cinsinden sıcaklık birimi
C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	Propranolol
C18	Karbon 18
C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	Karvedilol
CH ₃ CN	Asetonitril
CH ₃ COOH	Asetik asit
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
H	Plaka yüksekliği
HCl	Hidroklorik asit
HCOOH	Formik asit
H ₂ O	Su
H ₃ PO ₄	Ortofosforik asit
L	Kolonun milimetre cinsinden uzunluğu
k'	Kapasite faktörü
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
m	Eğim
M	Molarite, konsantrasyon birimi
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
N	Teorik plaka sayısı, normal
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
Na ₂ B ₄ O ₇	Sodyum tetraborat
n	Kayım
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	H ⁺ iyonunun eksi logaritması
ppb	Milyarda bir
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikadaki devir sayısı
R (+)	Dekstro
Rs	Ayırma gücü
r ²	Korelasyon katsayısı
s	Saniye
S (-)	Levo
S/N	Sinyal/gürültü oranı

t_0	Kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanı
t_R	Alıkonma zamanı
v/v	Hacim/hacim cinsinden yüzde
$w_{h/2}$	Pik yarı yüksekliğindeki pik genişliği
α	Alfa, seçicilik faktörü
β	Beta
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre, mikron
%	Yüzde

Kısaltmalar

AA	Asetik asit
ACN	Asetonitril
AH	Amonyum hidroksit
CV	Değişim katsayısı
DAD	Diyot dizi (array) dedektörü
DEA	Dietilamin
ESI	Elektrosprey iyonlaştırma
FA	Formik asit
GC	Gaz kromatografisi
HILIC	Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC	Sıvı kromatografisi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOD	Tespit limiti
LOQ	Kantitatif tayin limiti
MRM	Çoklu reaksiyon izleme
ODS	Oktadesilsilil
OPA	Ortofosforik asit
RP-HPLC	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RP-HPLC-FLD	Floresans dedektörün kullanıldığı ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RSD	Bağıl standart sapma
RT	Alıkonma zamanı
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
SRM	Seçici reaksiyon izleme
TEA	Trietilamin
TFA	Trifloroasetik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UHPLC-ESI-MS/MS	Ultra-performanslı sıvı kromatografisi ile elektrosprey iyonlaştırmaya sahip tandem kütle spektrometresi
USP	Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
UV/Visible	Ultraviyole/görünür
3D	Üç boyutlu
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karvedilolun kimyasal yapısı.....	2
Şekil 1.2. HPLC sisteminin şematik gösterimi.....	5
Şekil 1.3. HPLC ayırma tekniklerinin şematik gösterimleri (a) normal faz HPLC ve (b) ters faz HPLC.....	6
Şekil 1.4. Diyot dizi (array) dedektörün çalışma şeklinin şematik gösterimi	7
Şekil 3.1. Çalışmalarda kullanılan Agilent marka 1200 model HPLC cihazı	16
Şekil 3.2. Rekonstitüsyon (geri sulandırma) işlemi metanolle yapıldığında elde edilen karvedilol ve propranolole ait kromatogram.....	20
Şekil 3.3. Rekonstitüsyon (geri sulandırma) işlemi mobil fazla yapıldığında elde edilen karvedilol ve propranolole ait kromatogram.....	20
Şekil 3.4. Karvedilolun UV spektrumu.....	21
Şekil 3.5. Karvedilol etken maddesinin üç boyutlu (3D) UV spektrumu	21
Şekil 3.6. Propranololun (iç standart maddenin) UV spektrumu	22
Şekil 3.7. Propranolol etken maddesinin üç boyutlu (3D) UV spektrumu	22
Şekil 4.1. 1 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	26
Şekil 4.2. 2 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	26
Şekil 4.3. 3 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	27
Şekil 4.4. 4 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	27
Şekil 4.5. 5 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	28
Şekil 4.6. 6 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	28
Şekil 4.7. 7 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	29
Şekil 4.8. 8 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	29
Şekil 4.9. 9 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	30
Şekil 4.10. 10 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	30
Şekil 4.11. 11 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	31

Şekil 4.12. Karvedilol ve propranololun 210 nm, 240 nm ve 254 nm dalga boylarındaki UV absorbanslarının karşılaştırılması.....	32
Şekil 4.13. Karvedilolun 210, 240 ve 254 nm dalga boylarına ait UV absorbansları.....	33
Şekil 4.14. Propranolol (iç standart) için band genişliği değerlerinin karşılaştırılması..	34
Şekil 4.15. Karvedilol için band genişliği değerlerinin karşılaştırılması.....	34
Şekil 4.16. Akış hızının 0,1 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	35
Şekil 4.17. Akış hızının 0,2 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	36
Şekil 4.18. Akış hızının 0,3 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	36
Şekil 4.19. Akış hızının 0,5 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	37
Şekil 4.20. Akış hızının 1,0 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	37
Şekil 4.21. Akış hızının 1,5 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı.....	38
Şekil 4.22. Karvedilol için elde edilen Van Deemter eğrisi	39
Şekil 4.23. Kolon sıcaklığının 25 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	40
Şekil 4.24. Kolon sıcaklığının 30 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	41
Şekil 4.25. Kolon sıcaklığının 35 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı.....	41
Şekil 4.26. Kolon sıcaklığının 40 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	42
Şekil 4.27. Kolon sıcaklığının 45 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	42
Şekil 4.28. Kolon sıcaklığının 50 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı	43

Şekil 4.29. Enjeksiyon hacminin 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL olduğu durumlarda elde edilen karvedilol piklerinin karşılaştırılması	44
Şekil 4.30. Chemstation yazılımının pik saflığı özelliği kullanılarak numune saflığının tespiti.....	46
Şekil 4.31. Seçicilik çalışmasında kullanılan kör numunenin kromatogramı	47
Şekil 4.32. Seçicilik çalışmasında kullanılan karvedilol standardının kromatogramı.....	48
Şekil 4.33. Seçicilik çalışmasında kullanılan karvedilol içeren serum numunesinin kromatogramı	48
Şekil 4.34. Karvedilol analizinde kullanılan doğrusallık grafiği	51
Şekil 4.35. 100 ppb karvedilol numunesinin HPLC kromatogramı	52
Şekil 4.36. 1000 ppb karvedilol numunesinin HPLC kromatogramı.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. TÜİK verilerine göre 2013-2014 yılları arasında görülen ölüm nedenlerinin dağılımı	1
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal ve reaktiflerin isimleri, molekül yapıları, molekül ağırlıkları, saflık yüzdeleri ve temin edildiği firmalar	14
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların isimleri, markaları ve kullanım amaçları.....	15
Çizelge 3.3. Kullanılan HPLC cihazı üzerindeki modüller ve modelleri.....	17
Çizelge 4.1. Kullanılan mobil faz bileşimleri ve elde edilen sonuçlar.....	25
Çizelge 4.2. Akış hızlarına karşılık elde edilen plaka yükseklikleri ve teorik plaka sayıları.....	39
Çizelge 4.3. Kolon sıcaklığının optimizasyonu için kullanılan sıcaklık değerlerinin karşılaştırılması.....	43
Çizelge 4.4. Doğruluk parametresi ile ilgili analiz sonuçları.....	45
Çizelge 4.5. Seçicilik çalışması.....	47
Çizelge 4.6. Gün içi kesinlik ile ilgili analiz sonuçları.....	49
Çizelge 4.7. Günler arası kesinlik ile ilgili analiz sonuçları.....	50
Çizelge 4.8. Karvedilolün doğrusallık grafiği için regresyon istatistikleri.....	53
Çizelge 4.9. Kısa dönem kararlılık testi sonuçları.....	54
Çizelge 4.10. Uzun dönem kararlılık testi sonuçları.....	55
Çizelge 4.11. Karvedilol için sağlamlık testi sonuçları.....	56
Çizelge 4.12. Karvedilol için sistem uygunluk testlerinin sonuçları.....	57

1. GİRİŞ

1.1. Kalp Hastalıkları

Kalp, besin maddelerini ve oksijeni vücuttaki organlara taşıyan ve metabolizma artıklarını doku hücrelerinden uzaklaştıran kardiyovasküler sistemin önemli bir parçasıdır. Bu verimli ve uzun ömürlü pompa, bir saniye bile dinlenmeden 100 yıldan fazla kan pompalayabilmektedir. Kalp de herhangi bir elektromanyetik aygıt gibi zamanla işlevini yitirebilir veya verimi azalabilir. Kalbin düzensiz çalışması sonucunda damar sertliği, kalp krizi, hipertansiyon (yüksek kan basıncı), kalp yetmezliği ve aritmi gibi kalp hastalıkları meydana gelmektedir (Zaret vd 1992).

Bu hastalıklar doğuştan olabileceği gibi bireyler bu hastalıklara sonradan da yakalanabilmektedir. Hipertansiyona sahip genç sayısı oldukça fazladır (Gregson 2001). Kalp hastalıkları, ağırlıklı olarak yaşlı bireylerde görülmesine rağmen, genç bireyleri de tehdit eden son derece tehlikeli hastalıklardır. Her yıl çok sayıda insan kalp hastalıkları nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Kalp hastalıkları ülkemizdeki ölüm nedenlerinin en başındadır. 2009 yılı Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, ölümlerin % 39,9'u dolaşım sistemi hastalıklarından kaynaklanmaktadır (<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=10713>). Ölüme sebebiyet veren hastalıkların 2010, 2011 ve 2012 yılları oranlarına bakıldığında, en fazla ölüm nedeninin dolaşım sistemi hastalıkları olduğu görülmektedir (<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15847>). Çizelge 1.1'e göre, ölüm vakalarının 2013 yılında % 39,6'sını, 2014 yılında ise % 40,4'ünü dolaşım sistemi hastalıkları oluşturmaktadır (<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855>).

Çizelge 1.1. TÜİK verilerine göre 2013–2014 yılları arasında görülen ölüm nedenlerinin dağılımı

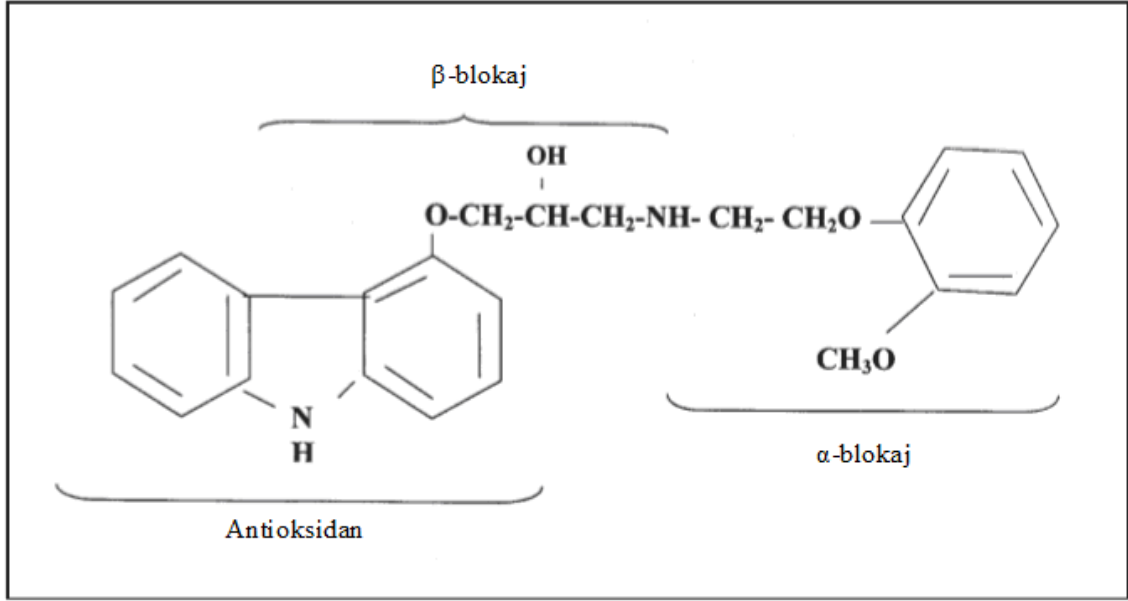
Ölüm Nedeni	2013 ¹		2014	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Dolaşım sistemi hastalıkları	143.084	39,6	151.696	40,4
İyi huylu ve kötü huylu tümörler (malign ve benign neoplazmlar)	76.534	21,2	77.587	20,7
Solunum sistemi hastalıkları	35.364	9,8	40.258	10,7
Endokrin (iç salgı bezi), beslenme ve metabolizmayla ilgili hastalıklar	20.095	5,6	19.288	5,1
Dışsal yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler	20.409	5,7	16.018	4,3
Sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları	14.708	4,1	16.517	4,4
Diğer (enfeksiyon ve parazit hastalıkları, mental ve davranışsal bozukluklar, kas-iskelet sistemi ve bağ dokusunun hastalıkları vb.)	50.679	14,0	53.927	14,4
Toplam	360.873	100	375.291	100

¹ 2013 yılı verileri idari kayıtların güncellenmesi nedeniyle revize edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, bazı kardiyovasküler bozuklukların tedavisinde kullanılan karvedilol ilaç etken maddesi incelenmiştir. α_1 , β_1 ve β_2 adrenerjik reseptör bloklayıcı olan karvedilol; hipertansiyon (yüksek kan basıncı), konjestif kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsünü (kalp krizi) takip eden sol ventriküler bozukluklarda etkili olmaktadır (Ommaty 2006).

1.2. Karvedilol ve Özellikleri

Karvedilolun kimyasal yapısı Şekil 1.1'de görülmektedir.



Şekil 1.1. Karvedilolun kimyasal yapısı

1.2.1. Karvedilolun β -bloklayıcı özellikleri

Beta bloklayıcılar, β_1 ve β_2 reseptörlerine bağlanıp norepinefrin ve epinefrinin etkisini engelleyerek kalp atış hızını yavaşlatmaktadır. Bu maddeler, aynı zamanda, kalp damarlarını genişleterek kan basıncını düşürmektedir ve hava yollarını çevreleyen kasları uyarak kasılmalarını sağlamaktadır. Hipertansiyon tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan beta-bloklayıcılar, bağlandıkları beta reseptörlerine göre selektif (β_1) veya non-selektif (β_1 , β_2) olabilirler. β_1 -selektif maddeler, hipertansiyonu veya anjini olan veya miyokard enfarktüsü geçirmiş hastalarda birinci basamak tıbbi tedavi olarak kullanılmaktadır (Moscou ve Snipe 2013). Karvedilolun β_1 : β_2 : α_1 blokaj oranı sırasıyla 10:10:1'dir. Güçlü bir beta bloklayıcı olan karvedilolun β_1 ve β_2 blokaj oranlarının aynı olması, selektif olmadığını göstermektedir (Book 2002).

1.2.2. Karvedilolun α_1 -bloklayıcı özellikleri

Arterlerde bol miktarda bulunan α_1 -reseptörleri, kan damarlarının daralmasını sağlamaktadır. α_1 -Bloklayıcı kullanımı, periferik direnci azaltır ve kan basıncını

düşürerek vasküler gevşemeyi sağlar. α_1 -Bloklayıcılar, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL kolesterol veya kötü kolesterol) seviyesini düşürerek iskemik kalp hastalığı tedavisinde de faydalı olmaktadır (Moscou ve Snipe 2013).

Karvedilolun α_1 antagonist özelliği, β_1 ve β_2 reseptör antagonist özelliğinden 10 kat daha az tesirlidir. Karvedilol, α_2 adreno reseptörleriyle de çok zayıf bir etkileşime sahiptir (Book 2002).

1.2.3. Karvedilolun diğer özellikleri

- Klinik denemeler, karvedilolun kalp yetmezliği olan hastalarda kullanımının hastalığın ilerlemesini durdurduğunu ve hastalık nedeniyle ölümleri azalttığını göstermiştir (Book 2002).
- Karvedilol, güçlü antioksidan ve antiproliferatif (hücre büyümesini engelleyen) özelliklere sahiptir (Book 2002).
- Karvedilol, ağız yoluyla alındıktan 1–2 saat sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. Karvedilol, oldukça lipofiliktir ve ekstrasvasküler dokularda kolaylıkla dağılır. Ayrıca, plazmada % 95 oranında proteine bağlı durumdadır (Book 2002).
- Karvedilol, öncelikle karaciğerde metabolize olur. Karvedilol metabolitlerinin başlıca eliminasyonu safra atılımı ile gerçekleşir. Karvedilolun o-desmetil, p-hidroksil ve m-hidroksil metabolitleri karvedilolden 10 kat daha düşük konsantrasyonlarda bulunur. Aynı β -adreno reseptör bloke edici özelliğe sahip olmalarına rağmen, etkileri klinik olarak önemli değildir. Metabolitlerin vasodilatör özelliği yoktur. Hipertansiyon hastalarında karvedilolun medyan yarı ömrü 6–8 saattir (Book 2002).
- Karvedilolun antioksidan özellikleri, yapısındaki karbazol grubundan kaynaklanmaktadır. Karvedilol, güçlü bir antioksidandır ve E vitamininden 10 kat daha etkilidir. Metabolitleri, karvedilolden 30–80 kat ve E vitamininden 1000 kat daha etkilidir. Karvedilol, α_1 -blokaj özellikleri ve antioksidan etkisi nedeniyle benzersizdir (Book 2002).
- Karvedilol ve metabolitleri, serbest radikal oluşumunu engelleyerek kronik kalp yetmezliğinde faydalı olmaktadır (Book 2002).
- Karvedilol, diğer beta bloklayıcılarla benzer şekilde kalp hızını ve kasılmasını azaltarak miyokardın oksijen ihtiyacını düşürmektedir (Book 2002).
- Karvedilolun kan, plazma veya serumdaki iyileştirici (terapötik) konsantrasyonu yaklaşık 0,02–0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir (Schulz ve Schmoldt 2003).

- Karvedilol, ağız yoluyla vücuda alındıktan sonra hızlı bir şekilde ve tamamen absorplanmaktadır ve vücut içerisinde ilaç birikimi gözlenmemektedir (Moffat vd 2004).

1.3. Karvedilolun Analiz Yöntemleri

Literatür taraması sonucunda, karvedilolun insan plazmasında (De Nucci vd 2005, Gomes vd 2009, Lamprecht ve Stoschitzky 2004), insan serumunda (Gannu vd 2007), adli tıp vakalarından elde edilen ölüm sonrası tam kan örneklerinde (Kristoffersen vd 2007), idrarda (Magiera vd 2013), insan kalp dokusunda (Laer vd 2001), vücut sıvılarında (Reiff 1987), köpek plazmasında (McIntosh vd 2007), tablette (Elezovic vd 2015, Naidu vd 2014) ve farmasötik formülasyonlarda (Basaveswara vd 2012, Bechara vd 2015, Ketema ve Sankar 2012, Naidu vd 2014, Pal vd 2013, Rani vd 2013, Rele 2015, Sripalakit vd 2010, Dey vd 2010) analiz edildiği birçok çalışmanın var olduğu görülmektedir. Biyolojik sıvılarda karvedilolun tayini için genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılmaktadır. Karvedilol analizlerinde HPLC yönteminin yanı sıra, voltmetri (Jouyban vd 2011, Yılmaz ve Ekinci 2011), amperometri (Jouyban vd 2011), potansiyometri (Soleymanpour ve Ghasemian 2015), kapiler elektroforez (Blaschke vd 2001, McErlane ve Clohs 2001, Saad vd 2015), Raman spektroskopisi (Marosi vd 2016), kemilüminesans (Santos vd 2005), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) (Myung ve Jo 2005), yüksek performanslı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (HPLC-MS-MS) (De Nucci vd 2005, Gomes vd 2009), ultra-performanslı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (UPLC-MS-MS) (Furlong vd 2012, Patel vd 2013, Ge vd 2015, Xu vd 2016) ve hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (HILIC-MS-MS) (Lee vd 2007) gibi yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır.

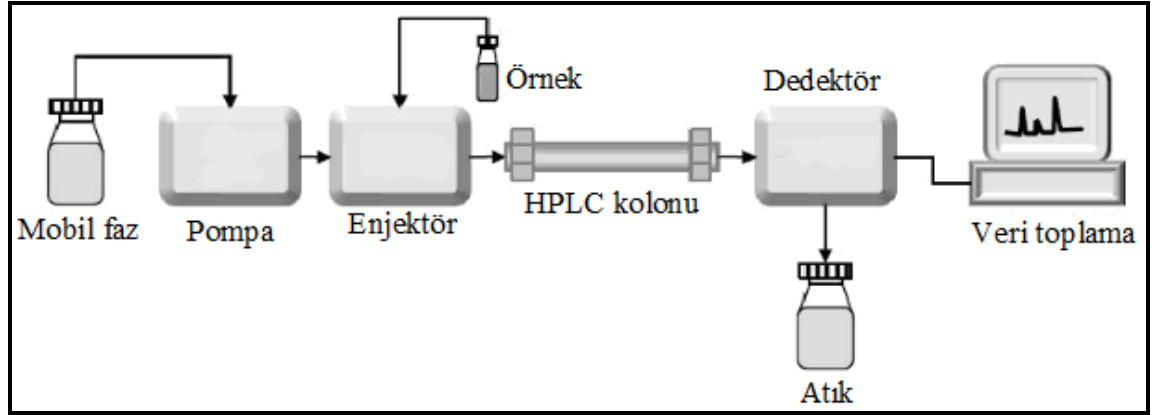
Bu tez çalışmasında, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır.

1.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bir karışımdaki farklı bileşiklerin ayrılmasını sağlayan tekniklere kromatografi denir. Karışımın ilgilendiğimiz kısma analit, geri kalan kısma ise matris denir. Kromatografik ayırma için, numune sabit bir faz boyunca akmakta olan mobil faz içerisine enjekte edilir. Karışım içerisinde bulunan farklı türlerin sabit fazla etkileşimi de farklı olacağından dolayı bu türler sabit fazdan farklı zamanlarda çıkarlar ve bu şekilde karışımı oluşturan bileşenler birbirinden ayrılmış olur. Mobil faz gaz ise, gaz kromatografisi (GC); sıvı ise sıvı kromatografisi (LC) adını alır (Moldoveanu ve David 2013).

HPLC; gıda analizlerinde, tıbbi ve zirai ilaç analizlerinde vb. analizlerde endüstride geniş kullanım alanı olan bir tekniktir. HPLC tekniği, adından da anlaşılacağı gibi karışımdaki bileşenleri ayırmak için sıvı bir hareketli faz kullanır. Karışımı oluşturan bileşenler önce bir solventte çözünür, oto enjektör yardımıyla mobil faz içerisine gönderilir ve bileşenlerin mobil faz yardımıyla yüksek basınç altındaki sabit faz boyunca ilerlemesi sağlanır. Karışımı oluşturan bileşenlerin mobil faz ve sabit fazla

etkileşimine göre kromatografik ayırma gerçekleşir (Ho ve Stuart 2003). HPLC sisteminin parçaları Şekil 1.2'de gösterilmiştir (<http://laboratoryinfo.com/hplc/>).



Şekil 1.2. HPLC sisteminin şematik gösterimi

1.4.1. Normal faz ve ters faz HPLC

1.4.1.1. Normal faz HPLC

Normal faz HPLC, sabit fazın polar, mobil fazın ise apolar olduğu HPLC çeşididir. Bir karışımdaki bileşenlerden polaritesi yüksek olan analitler, polaritesi düşük olan analitlere göre polar sabit fazda (kolonda) daha fazla alıkonulur. Dolayısıyla, kolondan ilk olarak en fazla apolar bileşen çıkar. Normal faz HPLC'deki çekim kuvvetleri daha çok dipol-dipol ve hidrojen bağı (polar) etkileşimleridir (McPolin 2009).

Bu HPLC yöntemi, analitin polar sabit faz (genellikle silika veya alümina) üzerindeki adsorpsiyonuna/desorpsiyonuna dayalı geleneksel ayırma yöntemidir. Sabit fazın üzerinde ve gözeneklerinde bulunan silanol (Si-OH) grupları ile polar analitler arasındaki kuvvetli etkileşim nedeniyle, polar analitler kolon içerisinde daha yavaş hareket etmektedir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, polar yüzeylerin numune bileşenlerince kolaylıkla kirletilebilmesidir. Bu dezavantaj, silanol gruplarına, amino ve siyano fonksiyonel grupları ilave edilerek azaltılmıştır (Dong 2006). Normal faz HPLC yöntemi, cis/trans, orto/meta/para ve sterik izomerler gibi izomerlerin ayırma işlemleri için uygundur (Hanai 1999).

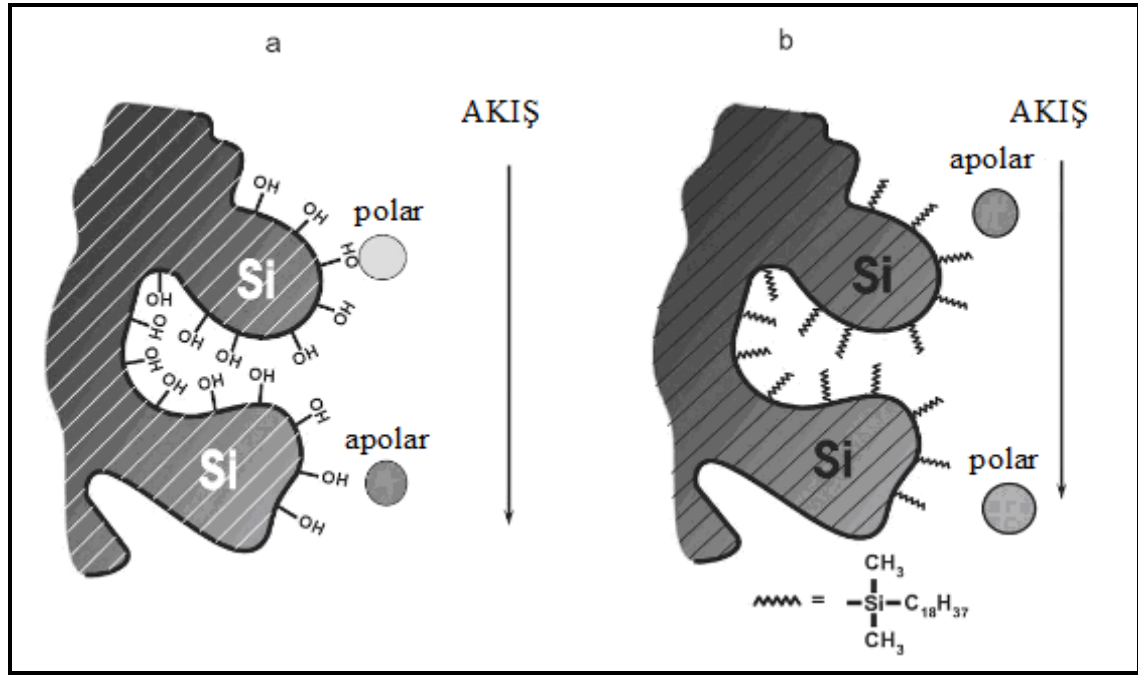
1.4.1.2. Ters faz HPLC

Sabit fazın apolar, mobil fazın ise polar olduğu yüksek performanslı sıvı kromatografisi çeşididir (Moldoveanu ve David 2013). Ters faz HPLC'de çekim kuvveti olarak daha çok spesifik olmayan hidrofobik etkileşimler bulunmaktadır (McPolin 2009).

Ayırma, analitlerin polar mobil fazla hidrofobik (apolar) sabit faz arasındaki partiyon katsayılarına bağlı olarak gerçekleşir. Sabit faz olarak, silika üzerine oktadesil

(C18) gruplarının bağlandığı sistemler kullanılır. Apolar analitler, hidrofobik C18 gruplarıyla daha güçlü etkileşime girdiklerinden sabit fazdan (kolondan) ilk olarak polar analitler çıkarlar. Önce polar bileşiklerin sonra apolar bileşiklerin ayrılması, normal faz HPLC yönteminin tam tersi yönde gerçekleştiği için ters faz HPLC olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntem, çok sayıda organik bileşiği ayırabilme yeteneğinden dolayı kullanılan en yaygın HPLC yöntemidir. Bütün HPLC analizlerinin % 70'inden fazlasında kullanılır. Bu HPLC çeşidi, polar (suda çözünen), orta polaritedeki ve bazı apolar analitlerin analizi için uygundur (Dong 2006).

Normal faz ve ters faz HPLC tekniklerinin şematik gösterimleri Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



Şekil 1.3. HPLC ayırma tekniklerinin şematik gösterimleri (a) normal faz HPLC ve (b) ters faz HPLC.

Bu tez çalışmasında analizler, ters faz HPLC (RP-HPLC) tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.4.2. HPLC cihazında karvedilol analizinde kullanılan dedektörler

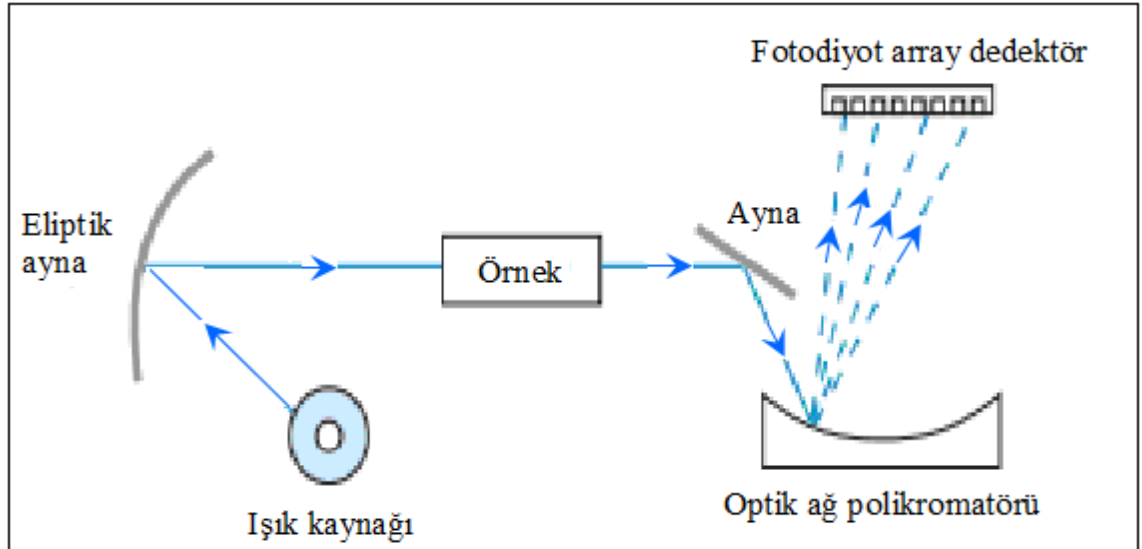
HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda daha çok floresans dedektörü kullanılmaktadır (Hokama vd 1999, Ptacek vd 2003, Wang vd 2005, Saito vd 2006, Padh vd 2007, Masi vd 2008, Sriyalakit vd 2010). Bununla birlikte, karvedilol miktarını tespit etmek için aralarında ultraviyole (UV)/görünür bölge dedektörüne (Baranowska ve Kowalski 2010, Gannu vd 2007, Stojanovic vd 2007, Ketema ve Sankar 2012) ve diyet dizi (array) dedektörüne (DAD'ye) (Belal vd 2013, Baranowska vd 2009) sahip yüksek performans sıvı kromatografi cihazının kullanıldığı çalışmalara da literatürde rastlanmaktadır. Literatür taraması sonucunda, DAD'ye sahip yüksek

performans sıvı kromatografi cihazının kullanıldığı çalışmaların daha az olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, HPLC cihazında diyot dizi (array) dedektör (DAD) kullanılmıştır.

1.4.3. DAD dedektörün çalışma prensibi

DAD dedektöre sahip spektrometrelerde, tüm dalga boylarına sahip beyaz ışık numuneden geçerek bileşimini oluşturan dalga boylarına tekrar ayrıldığı polikromatöre (çok kanallı) girer ve ışık polikromatörden diyot dizisine gönderilir. Her bir diyotun farklı dalga boyunu almasıyla tüm dalga boyları eş zamanlı olarak ölçülmüş olur (Harris 2007). DAD dedektör sayesinde, karışımdaki bileşenlere ait elektronik sinyaller kromatografik pik olarak bilgisayara kaydedilir. Piklere karşılık gelen spektrumlar, cihazda kayıtlı standart spektrumlarla karşılaştırılarak hangi maddeye ait oldukları belirlenir (Lindsay 1992). DAD dedektörün çalışma şekli Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Diyot dizi (array) dedektörün çalışma şeklinin şematik gösterimi

1.4.4. DAD dedektörün avantajları

Fotodiyot dizi (array) dedektörün avantajları şunlardır (Harris 2007):

- Tüm dalga boylarını aynı anda ölçmesi
- Sinyal/gürültü oranının daha yüksek olması
- Analizin daha hızlı gerçekleşmesi (~ 1 sn)
- Hareketli parçasının olmaması nedeniyle daha sağlam olması

1.5. Metot Validasyonu

Metot validasyonu, metodun performans özelliklerinin istenilen analitik uygulamanın gereksinimlerini karşılayıp karşılamadığını belirlememize yarayan

işlemler bütünü olarak tanımlanır. Validasyon işlemi, kullanım boyunca laboratuvar çalışmalarının güvenilirliğinin teminatı olduğu gibi metodun belirlenen amaçlara uygunluğunun yazılı delillerle ortaya konulmasını sağlamaktadır. Denetime tabi olan laboratuvarların, denetim kurumları ile uyum içerisinde olabilmeleri için metod validasyon işlemlerini gerçekleştirmeleri zorunludur. İyi tanımlanmış ve yazılı hale getirilmiş bir metod validasyon işlemi, denetimsel uyumluluk gereksinimlerini karşılamakla kalmayıp aynı zamanda metodun istenilen kullanım amaçlarına uygunluğunu kanıtlamamıza yardımcı olmaktadır (Swartz ve Krull 2012).

Oluşturulan metodun laboratuvarda ilk defa uygulanması, kullanılmakta olan metotta değişiklik yapılması, metodun performansında zamanla bir değişme olması vb. durumlarda validasyon işlemlerinin uygulanması gereklidir. Validasyon işlemi, metodun kullanım amacına uygun olarak doğruluk, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik, seçicilik, tespit limiti (LOD), kantitatif tayin limiti (LOQ), sağlamlık, doğrusallık, geri kazanım, doğrusallık aralığı ve kararlılık gibi parametreler kullanılarak gerçekleştirilir.

Bu tez çalışmasında validasyon işlemi, doğruluk, gün içi kesinlik, günler arası kesinlik, seçicilik, tespit limiti (LOD), kantitatif tayin limiti (LOQ), doğrusallık, geri kazanım, doğrusallık aralığı, kısa dönem kararlılık, uzun dönem kararlılık, sistem uygunluk ve sağlamlık parametreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.6. Çalışmanın Amacı

İnsan kanı serumunda, kalp hastalıkları üzerinde etkinliği kanıtlanmış üçüncü nesil bir beta-bloklayıcı olan karvedilol ilaç etken maddesinin iç standart yöntemiyle ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği kullanılarak tayini için kısa analiz süresine sahip yeni bir metod oluşturmak için metod optimizasyonu yapmak ve validasyon parametrelerini belirlemektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Karvedilol İlaç Etken Maddesinin Tayini Konusunda Literatürde Yapılan Çalışmalar

Hokama vd (1999) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; 20 erkek Sprague-Dawley faresi üzerinde deneyler yapılarak fare plazmasında karvedilol tayini için HPLC cihazında spektrofotometrik yöntemin kullanıldığı hızlı ve hassas bir metot geliştirilmiştir. Sabit faz olarak Shim-pack CLC-ODS (150 x 6,0 mm, 5 µm tanecik boyutlu) ters faz kolonu, mobil faz olarak pH'sı 2,5 olan 50 mM KH₂PO₄ ve metanol (60:40, h/h) ikili karışımı kullanılmıştır. Ekstraksiyon için, Bond Elut (1 mL, Lot No. 062217, Varian) oktilsilika içeren SPE kartuşu kullanılmıştır. Akış hızının 1,0 mL/dk olduğu ve kolon sıcaklığının 40 °C olduğu metot için, uyarılma ve saçılma dalga boyları sırasıyla 247 ve 344 nm'dir. Karvedilolun fare plazmasındaki tespit limiti 3,6 ng/mL ve kör plazmaya ilave edilen karvedilolun ortalama geri kazanımı % 94,2 olarak bulunmuştur. Gün içi tekrarlanabilirlik % 2,7 – 7,5 aralığında; günler arası kesinlik ise % 2,6–7,4 aralığında bulunmuştur (Hokama vd 1999).

Ptacek vd (2003), yaptıkları çalışmada insan plazmasındaki karvedilolun miktarsal analizi için bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, floresans dedektöre sahip bir HPLC cihazı; sabit faz olarak Develosil (100 x 4,6 mm, 3 µm) ODS kolonu ve Phenomenex (4 x 3 mm) C18 ön kolonu ve mobil faz olarak da asetoneitril ve 30 mM KH₂PO₄ tamponundan (bu tampon, % 1 TEA ve 50 mg/L sodyum azid içermektedir ve tamponun pH değeri derişik orto fosforik asitle 2 olarak ayarlanmıştır) (30:70, h/h) oluşan bir karışım kullanılmıştır. Akış hızı 1,5 mL/dk ve kolon sıcaklığı 35 °C olan metodun uyarılma ve saçılma dalga boyları sırasıyla 238 ve 350 nm'dir. Kantitatif tayin limiti 1,3 ng/mL olarak bulunmuştur ve iç standart olarak dihidroergokristin mesilat kullanılmıştır. Metot seçiciliği için sağlıklı gönüllülerden alınan 6 plazma örneği kullanılmış ve hiç bir girişim olmadığı gözlenmiştir. Geliştirilen metodun 1,303 – 142 ng/mL aralığında doğrusal olduğu görülmüştür. % RSD cinsinden gün içi ve günler arası kesinlik değerinin sırasıyla % 3 ve % 6'dan daha az olduğu hesaplanmıştır. Kullanılan numunelerin oda sıcaklığında en az 5 gün ve -18 °C'de en az 1 ay kararlı oldukları bulunmuştur (Ptacek vd 2003).

Wang vd (2005) tarafından tabletlerdeki karvedilolun tayini amacıyla floresans dedektörün kullanıldığı bir HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu çalışmada, organik çözücülerin karvedilolun floresans spektrumu üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Uyarılma ve saçılma dalga boyları sırasıyla 254 nm ve 356 nm olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda metodun 0,50 – 270 ng/mL aralığında doğrusal olduğu, tespit limitinin 0,19 ng/mL olduğu ve geri kazanım oranının % 98,7 ile % 102,1 arasında değiştiği gözlenmiştir. Tekrarlanabilirlik, numunenin 10 defa çalışılması sonucunda % RSD cinsinden % 2,31 olarak hesaplanmıştır (Wang vd 2005).

Saito vd (2006), yaptıkları çalışmada insan tam kan ve plazmasındaki karvedilolun enantiyo seçici tayini için floresans dedektörlü yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC-FLD) cihazı ile hassas bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, plazma örneklerine, iç standart olarak S-karazolol ve Kolthoff-tamponu (pH 8,0, 0,1 M KH₂PO₄, 0,05 M Na₂B₄O₇) ilave edilmiştir. Enantiyo seçici ayırma,

Chiralpak AD kolon (4,6mm x 250mm) kullanılarak hiçbir kiral türevlendirme olmadan gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak hekzan:izopropanol:dietilamin (78:22:1, v/v/v) kullanılmıştır. Uyarılma ve saçılma dalga boyları sırasıyla 284 ve 343 nm olarak tespit edilmiştir. Tayin sınırı (LOQ), hem plazma hem de tam kan örneklerinde S(-) ve R(+) – karvedilol enantiyomerleri için 0,5 ng/mL olarak saptanmıştır. 1 – 50 ng/mL derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Gün içi ve günler arası değişimler % 5,9'dan daha küçük olarak tespit edilmiştir. Karvedilol verilen konjestif kalp rahatsızlığı bulunan 15 hastadan alınan plazma ve tam kan örneklerinde karvedilol enantiyomerlerinin tayini bu metotla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Saito vd 2006).

Zarghi vd (2007)'nin çalışmasında, insan plazmasında karvedilol tayini için floresans dedektörün kullanıldığı ters faz yüksek performans sıvı kromatografi (RP-HPLC-FLD) cihazı ile izokratik bir metot geliştirilmiş ve metot validasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada, ayırma işlemi, Chromolith Performance (RP-18e, 100mm x 4,6 mm) kolonda pH'ı 3,5'e ayarlanmış 0,01 M Na₂HPO₄ tamponu-asetonitril (40:60, v/v)'den oluşan izokratik bir mobil fazda gerçekleştirilmiştir. Zarghi vd (2007), insan plazmasına iç standart olarak letrozol ekledikten sonra, asetonitrille protein çöktürme işlemi uygulamışlardır. Örnekler karıştırılıp santrifüj edildikten sonra, üst fazın 20 µL'si cihaza enjekte edilmiştir. Hiçbir girişim tespit edilmemiştir. Karvedilol için LOQ, 1 ng/mL olarak bulunmuştur. Uyarılma ve saçılma dalga boyları sırasıyla 240 ve 340 nm olarak rapor edilmiştir. Zarghi vd (2007) tarafından geliştirilen metodun, 1 – 80 ng/mL aralığında doğrusal olduğu bildirilmiştir. Gün içi ve günler arası değişim katsayısının kabul edilebilir düzeyde olduğu (%8'den düşük olduğu) bulunmuştur (Zarghi vd 2007).

Adli tıp otopsi vakalarından alınan ölüm sonrası tam kan örneklerinde beta-bloklayıcılar atenolol, sotalol, metoprolol, bisoprolol, propranolol ve karvedilol, kalsiyum kanal antagonistleri diltiazem, amlodipine ve verapamil, anjiyotensin-II antagonistleri losartan, irbesartan, valsartan ve telmisartan ve anti-aritmik ilaç flecainide etken maddesinin eş zamanlı tayini için yapılan başka bir çalışmada; Kristoffersen vd (2007), ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve pozitif elektrosprey iyonlaştırmaya sahip kütle spektrometresi cihazı (HPLC-MS) kullanmışlardır. Kromatografik ayırmayı, tampon pH'sının 2,7, 3,0 ve 3,3, tampon iyonik şiddetinin 8, 10 ve 12 mM ve kolon sıcaklığının 23, 25 ve 27 °C olduğu durumlarda incelemiş ve pH'ın ayırmada kritik öneme sahip olduğunu tespit edilmiştir. Analitlerin alıkonma sırasının pH 2,7 ve 3,3 iken tampon iyonik şiddeti ve kolon sıcaklığı değiştirildiğinde değiştirdiği ve irbesartan, telmisartan ve valsartanın birlikte elüsyona uğradıkları bulunmuştur. pH 3,0'te ise; alıkonma sırasında bir değişiklik meydana gelmemiş ve elüsyon olayı da gerçekleşmemiştir. pH 3,0 – 3,1, tampon iyonik şiddeti 10 ± 2 mM ve kolon sıcaklığı 25 ± 2 °C iken sağlam bir HPLC metodu elde edilmiştir. Diazepam-d₅, iç standart olarak tam kan örneklerine eklenerek - 20 °C'de saklanan asetonitril:metanol çözeltisi (85:15, v/v) ile protein çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama işlemi, katı faz ekstraksiyon (SPE) yöntemiyle OASIS ® MCX kolonu ve Aspec XL robotu kullanılarak yapılmıştır. Analitlerin asidik, bazik ve amfoterik özellikte olmaları, asidik ve bazik olmak üzere iki basamaklı bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirmeyi zorunlu kılmıştır. Ancak; bu işlem zaman alıcı olacağından çöktürme, seyreltme ve SPE adımlarını içeren bir numune hazırlama tercih edilmiştir (Kristoffersen vd 2007).

İnsan plazmasındaki karvedilolun tayini için yapılan bir başka çalışmada Padh vd (2007); floresans dedektörüne sahip bir HPLC cihazı kullanarak analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, kolon olarak Lichrosphere R CN kolonu, mobil faz olarak asetonitril ve 20 mM amonyum asetat tamponunun (bu tampon, % 0,1 TEA içermektedir ve tamponun pH'sı 4,5'e ayarlanmıştır) hacimce 40:60 oranındaki karışımı kullanılmıştır. Uyarılma ve saçılma dalga boyları sırasıyla 282 nm ve 340 nm olarak hesaplanmıştır. Domperidon iç standart olarak kullanılmıştır. Numune analizi için sıvı - sıvı ekstraksiyon diklormetanla gerçekleştirilmiştir. Metodun, 1 – 128 ng/mL aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinliğin % 15'ten daha az olduğu gözlenmiştir. Doğruluk değeri % 87,3 – 100,88 aralığında belirtilmiştir. Karvedilolun geri kazanımı % 69,90 olarak hesaplanmıştır. Kararlılık çalışmaları sonucunda, karvedilolun kısa dönem için kararlı olduğu görülmüştür. Ağız yoluyla 12,5 mg'lık tablet verilen deneklerden alınan insan plazmasında bu metodun rahatlıkla kullanılabilceği belirtilmiştir (Padh vd 2007).

İnsan serumundaki karvedilolun tayini için Gannu vd (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, UV-visible dedektöre sahip bir ters faz HPLC cihazı kullanılmış ve hassas bir metot geliştirilmiştir. UV tespit dalga boyu olarak 238 nm belirlenmiştir. Analitler, serum örneklerinden n-hekzan ve diklormetanın hacimce 7:3 oranındaki karışımına 300 µL 0,1 M NaOH ilave edilmesiyle elde edilen karışım kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutularak ayrılmışlardır. Asetonitril ve 15 mM ortofosforik asit çözeltisinin hacimce 37:63 oranındaki karışımı (bu karışıma % 0,25 TEA ilave edilmiş ve karışımın pH değeri 2,5'e orto fosforik asitle ayarlanmıştır) metotta kullanılacak mobil faz olarak belirlenmiştir. Metotta akış hızı 1,0 mL/dk'ya ayarlanmış ve iç standart olarak amitriptilin kullanılmıştır. Sabit faz olarak C8 Kromasil KR 100 5C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm) kolonu kullanılmış ve karvedilolun alıkonma zamanı 6,10 dakika olarak bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin % RSD cinsinden % 5'ten daha az olduğu tespit edilmiştir. Karvedilol geri kazanımının % 75'ten fazla olduğu ve 5–500 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir. Kromatogramda herhangi bir girişim tespit edilmemesi nedeniyle geliştirilen metodun seçiciliğinin yüksek olduğu rapor edilmiştir. Gannu vd (2007) tarafından geliştirilen metot, ağız yoluyla karvedilol verilen gönüllülerdeki karvedilol analizi için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. (Gannu vd 2007)

Dey vd (2010) yaptıkları çalışmada, farmasötik dozaj formlarındaki karvedilolun tayini için doğru ve kesin bir HPLC metodu oluşturmuşlardır. 1,77 g KH₂PO₄'ün suda çözülerek 650 mL'ye tamamlanması ve fosforik asitle pH'sının 2'ye ayarlanmasından sonra üzerine 350 mL asetonitril eklenmesiyle elde edilen karışım mobil faz olarak kullanılmıştır. Sabit faz olarak, (250 x 4,6 mm, 5µm) boyutlarında C8 kolon kullanılmış ve karvedilol analizi 240 nm dalga boyu, 1 mL/dk akış hızı ve 55 °C kolon sıcaklığı şartlarında gerçekleştirilmiştir. Metodun 806–1202 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve hiçbir girişim gözlenmediği için seçici olduğu saptanmıştır (Dey vd 2010).

Sripalakit vd (2010); gerçekleştirdikleri çalışmada Roche firmasının ürettiği Dilatrend marka tabletlerde (6,25 mg, 12,5 mg ve 25 mg) bulunan etken madde olan karvedilolun tayini için floresans dedektörüne sahip bir HPLC cihazı kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada, kolon sıcaklığı olarak oda sıcaklığı (25 °C), kolon olarak Alltima C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) ters faz kolonu ve koruyucu kolon olarak Phenomenex (4 x 3

mm) C18 ön kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak, 0,01 M Na₂HPO₄'ün sudaki çözeltisi ve asetonitrilin hacimce 30:70 oranındaki karışımı (karışımın pH'sı orto fosforik asitle 3,0'a ayarlanmıştır) kullanılmıştır. Metodun akış hızı 1,0 mL/dk ve uyarılma ve saçılma dalga boyları sırasıyla 300 nm ve 343 nm'dir. Metot süresinin 4 dakika ve karvedilolun alıkonma zamanının 2,8 dakika olduğu rapor edilmiştir. Tablette bulunan yardımcı maddelerin hiç bir girişimi olmadığından dolayı, metodun oldukça seçici olduğu görülmüştür. Geliştirilen metodun, 1–40 µg/mL aralığında doğrusal olduğu, lineer regresyon katsayısının 0,99'dan büyük olduğu ve doğruluk değerinin % 95 – 105 aralığında değiştiği bulunmuştur. Gün içi kesinliğin % RSD cinsinden değerinin % 6,67'den daha az olduğu gözlenmiştir. Bu metotla, piyasada satılan karvedilol ilaçlarının analizlerinin yapılabilceği saptanmıştır (Sripalakit vd 2010).

Magiera vd (2012), çalışmasında β-bloklayıcılar, polifenoller ve onların metabolitlerinden oluşan 52 bileşiğin standart karışımının insan idrarına ilavesinden sonraki eşzamanlı tayini için hassas bir ultra-performanslı sıvı kromatografisi ile elektrosprey iyonlaştırmaya sahip tandem kütle spektroskopisi (UHPLC-ESI-MS/MS) metodu geliştirmişlerdir. İnsan idrarına iç standart olarak sotalol ve krisin ekledikten sonra, asetonitril ve metanolle protein çöktürme işlemi uygulamışlardır. Bu örnekler karıştırma, santrifüj, inkübasyon ve süzme işlemlerinden geçirilmiştir. β-bloklayıcı kullanan hastalardan alınan idrar örnekleri UHPLC-ESI-MS/MS ile analiz edilmiştir. Kromatografik ayırma, Hypersil GoldTM (100mm x 2,1mm, 1,9 µm) kolonda 10 dakikalık bir gradiyent elüsyon programı ile gerçekleştirilmiştir. Gradyent program için % 0,1'lik sudaki formik asit çözeltisi ve asetonitrilden oluşan ikili mobil faz sistemi kullanılmıştır. MS sistemi SRM (seçici reaksiyon izleme) modunda çalıştırılmış ve analitlerin her biri için bir kantitatif ve bir doğrulama geçişi yapılmıştır. Kantitatif metodun, seçicilik, doğrusallık, kantitatif tayin limiti (LOQ), doğruluk, kesinlik, geri kazanım, matriks etkisi ve analit kararlılığı açısından validasyonu gerçekleştirilmiştir. LOQ değeri, β-bloklayıcılar için 0,01 – 0,40 ng/mL ve polifenoller için 0,05 – 40 ng/mL aralığında bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinlik değerleri % 8'den küçük bulunmuştur ve tüm analitler için doğruluk değerleri % - 4,40 ile % 2,23 aralığında hesaplanmıştır. Bu çalışmada, tüm analitler için ortalama geri kazanım değerlerinin % 90'dan fazla olduğu belirlenmiş ve geliştirilen metodun β-bloklayıcı kullanan hastaların idrar örneklerindeki kardiyovasküler ilaçları belirlemede başarılı olduğu rapor edilmiştir (Magiera vd 2012).

Basaveswara vd (2012), çalışmasında farmasötik formülasyondaki karvedilolun hızlı tayini için bir ters faz HPLC metodu geliştirmiş ve metodun validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, kromatografik ayırma, oda sıcaklığında (25 °C) Chromosil C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) analitik kolon kullanılarak 1 ml/dk akış hızında izokratik elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Metanol:asetonitril:%1 ortofosforik asitin 80:18:2 (v/v/v) oranındaki karışımı mobil faz olarak kullanılmıştır. UV dedektörde dalga boyu 240 nm olarak belirlenmiştir ve numunenin 20 µL'si cihaza enjekte edilmiştir. 6 dakikalık bir metot oluşturulmuş ve karvedilolun alıkonma zamanı 2,1 dakika olarak tespit edilmiştir. Metodun kesinlik ve doğruluk için yüzde bağıl standart sapması (%RSD) % 0,179 olarak bulunmuştur (Basaveswara vd 2012).

Farmasötik tablet formülasyonundaki karvedilolun tayini için yapılan bir başka çalışmada Ketema vd (2012); hızlı ve spesifik bir ters faz HPLC metodu

geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma için, kolon olarak Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm tanecik boyutlu) ve mobil faz olarak fosfat tamponu, asetonitril ve metanolün 30:45:25 (v/v/v) oranındaki karışımının ortofosforik asit ile pH'sının 4,8'e ayarlanması sonucu elde edilen mobil faz kullanılmıştır. Elde edilen mobil faz, 0,45 µm selüloz nitrat filtreyle süzülerek bir süre ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 1 mL/dk'lık akış hızında sistemden geçirilmiştir. Oda sıcaklığında (25 °C) ve 241 nm dalga boyunda gerçekleştirilen metot için doğrusal, 0,999 korelasyon katsayısı (r^2) ile 30–130 µg/mL derişim aralığında elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,08 ve 3,24 µg/mL olarak bulunmuştur (Ketema vd 2012).

Magiera vd (2013), karvedilol ve 5-hidroksifenil karvedilol enantiyomerlerinin analizi için floresans dedektörün kullanıldığı yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC-FLD) cihazı ile tandem kütle spektrometri cihazından oluşan HPLC-FLD-MS/MS sistemi kullanarak spesifik bir metot geliştirmişlerdir. Magiera vd (2013) tarafından yapılan bu çalışmada, hastalardan alınan idrar örneklerine 1,5 mL asetonitril ve 1,5 mL metanol eklenerek protein çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj edilen örnekler, 6 mL metanol ve 6 mL % 0,1'lik formik asitin sudaki çözeltisi ile önceden şartlandırılmış ticari ismi OASIS HLB olan katı faz ekstraksiyon kartuşuna (6 mL, 500 mg) yüklenerek oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir. Metanol:aseton:formik asitin hacimce (4,5:4,5:1) oranındaki karışımı ile elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Lux-Amylose 2, Lux Cellulose-2 ve CHIRALCEL® OD-RH kiral kolonlar denenmiş ve enantiyo ayırma sadece CHIRALCEL® OD-RH kolonda gerçekleşmiştir. Çalışmada, elüsyon işleminde asetonitril ve metanol denenmiş ve pik simetrisi ve ayırma gücü bakımından asetonitril daha iyi ayırma sağlamıştır. Pik şeklinin optimizasyonu, mobil faza trifloroasetik asit (TFA), formik asit (FA), asetik asit (AA) veya amonyum hidroksit (AH), dietilamin (DEA) ve trietilamin (TEA) eklenerek gerçekleştirilmiştir. En iyi sonuçlar, % 0,05 trifloroasetikasit ve % 0,05 dietilaminin sudaki çözeltileri ve asetonitrilin gradiyent elüsyonu sayesinde elde edilmiştir. Metot, analitler için 25,0 – 200 ng/mL derişim aralığında valide edilmiştir. Tayin sınırı (LOQ), 14,2 ng/ml - 24,2 ng/ml aralığında bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik ve günler arası kesinlik değerlerinin % 10'un altında; doğruluğun ise % - 13,2 ile % 3,77 aralığında değiştiği belirlenmiştir. Geri kazanım değerlerinin % 79,2 ile % 108 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Magiera vd 2013).

Farmasötik dozaj formlarındaki karvedilolun tayini için Naidu vd (2014) tarafından yapılan çalışmada; basit, seçici, doğrusal, kesin ve doğru bir RP-HPLC metodu geliştirilmiş ve metodun validasyonu yapılmıştır. Mobil faz olarak KH_2PO_4 - K_2HPO_4 tamponu ve asetonitrilin hacimce 50:50 oranında karıştırılıp orto fosforik asitle pH'sının 3,0'a ayarlanması ile hazırlananan karışım kullanılmıştır. Sabit faz olarak, Hypersil ODS C18 (150 x 4,6 mm, 5µm) kolon kullanılmış ve mobil faz izokratik olarak 1 mL/dk akış hızında kolondan geçirilmiştir. UV tespit dalga boyu 240 nm olarak belirlenmiştir. Metodun validasyonu; doğrusal, kesinlik, doğruluk ve sağlamlık parametreleri belirlenerek gerçekleştirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,835 µg/mL ve 2,529 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Naidu vd 2014).

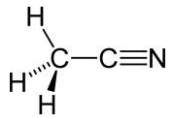
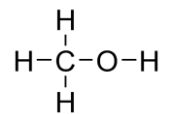
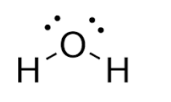
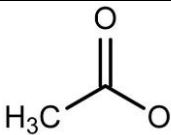
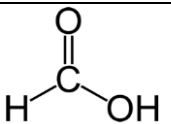
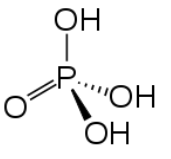
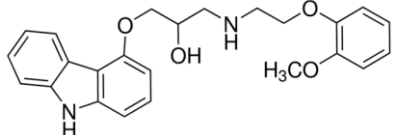
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve reaktifler

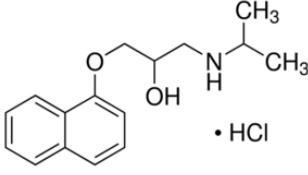
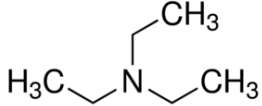
Çalışmada kullanılan olan kimyasallar arasında ilaç etken maddesi olarak karvedilol, çözügen olarak metanol, mobil faz bileşimi olarak asetonitril, trietilamin, glasiyal asetik asit, formik asit, orto fosforik asit ve HPLC saflıkta saf su ve iç standart madde olarak propranolol yer almaktadır. Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar ve reaktiflerin bazı özellikleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal ve reaktiflerin isimleri, molekül yapıları, molekül ağırlıkları, saflık yüzdeleri ve temin edildiği firmalar

Kimyasal İsmi ve Molekül Formülü	Molekül Yapısı	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Saflık Yüzdesi (%)	Üretici Firma
Asetonitril C ₂ H ₃ N		41,05	≥ 99,9	Merck
Metanol CH ₄ O		32,04	≥ 99,9	Merck
Saf su H ₂ O		18,02		Merck
Glasiyal asetik asit C ₂ H ₄ O ₂		60,05	99,8–100,5	Riedel-de Haen
Formik asit CH ₂ O ₂		46,03	98–100	Merck
Ortofosforik asit H ₃ PO ₄		98,00	85–88	Sigma-Aldrich
Karvedilol C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄		406,474	≥ 98	Sigma-Aldrich

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.1'in Devamı

d,l-Propranolol. HCl C ₁₆ H ₂₁ NO ₂ · HCl		295,80	> 98,5	Lipomed
Trietilamin C ₆ H ₁₅ N		101,19	≥ 99,5	Sigma-Aldrich

3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Deneysel çalışmalarda dolgu materyali silika olan C₁₈ Supelco Discovery marka (15 cm x 4,6 mm, 5µm) analitik kolon kullanılmıştır. Küresel yapılı olan dolgu malzemesinin gözenek boyutu 175 Å, spesifik yüzey alanı 203 m²/g ve gözenek hacmi 1 mL/g'dır.

Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar, markaları ve hangi amaçla kullanıldıkları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazların isimleri, markaları ve kullanım amaçları

Cihazın adı	Cihazın markası	Çalışmalardaki kullanım amacı
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Tec	Mobil fazın pH'sı ayarlanırken karıştırma işleminde kullanılmıştır.
pH metre	Inolab pH 720	Mobil fazın pH'sını ayarlamak amacıyla kullanılmıştır.
HPLC cihazı	Agilent 1200	Karvedilol analizinin optimizasyonu ve validasyonu amacıyla kullanılmıştır.
Hassas terazi	Shimadzu SAUW-220D	Tartım işlemlerinde kullanılmıştır.
Ultrasonik banyo	Elma Sonic-S60H	Numune ve çözeltileri homojen hale getirmek amacıyla kullanılmıştır.
Pozitif basınç SPE manifold sistemi	Biotage PRESSURE+ 48	Numunelerin katı faz ekstraksiyonu (SPE) işleminde kullanılmıştır.

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.2'nin devamı

Azot evaporatörü	TAB-40 WEL	Numune hazırlamada çözücü etkisini gidermek amacıyla kurutma işleminde kullanılmıştır.
- 20 °C buzdolabı	Liebherr	Metot validasyonu esnasında kararlılık testlerinde kullanılmıştır.
Santrifüj	Nüve Nf 200	Numunelerin ön hazırlık aşamasında çöktürme amacıyla kullanılmıştır.
Vortex	IKA Genius 3	Numunelerin ön hazırlık aşamasında karıştırma amacıyla kullanılmıştır.
+ 4 °C buzdolabı	Uğur	Serum örneklerinin ve stok çözeltilerin saklanması amacıyla kullanılmıştır.

Çalışmalarda kullanılan HPLC cihazı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmalarda kullanılan Agilent marka 1200 model HPLC cihazı

Kullanılan Agilent 1200 Serisi HPLC cihazı üzerinde bulunan modüller ve modelleri Çizelge 3.3'te verilmiştir. Kullanılan tüm modüller Agilent markasına aittir. Yazılım olarak Chemstation yazılımının Rev.B.04.02 [96] versiyonu kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Kullanılan HPLC cihazı üzerindeki modüller ve modelleri

Kullanılan modül	Modeli
Pompa (İkili pompa)	G1312B Bin pump SL
Oto örnekleyici (Autosampler)	G1329B ALS SL, Rheodyne
Mikro vakumlu gaz giderici	G1379B
Termostatlı kolon kompartmanı	G1316A TCC
Diyot array dedektör	G1315 D DAD
Floresans dedektörü	G1321A FLD

3.2. Metot

3.2.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması

3.2.1.1. Karvedilol stok çözeltisinin hazırlanması

10 mg katı karvedilol standardı, 0,01 mg hassasiyetle Shimadzu SAUW-220D marka hassas terazide tartılarak 100 mL'lik balon jöjeye aktarılmış ve bir miktar metanolde çözüldükten sonra çözeltinin üzerine çözeltinin toplam hacmi 100 mL oluncaya kadar metanol ilave edilmiştir. Ardından, çözelti 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Böylelikle, 100 ppm'lik karvedilol stok çözeltisi hazırlanmıştır. Karvedilol stok çözeltisi, oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra kullanılmıştır.

3.2.1.2. Karvedilol ara stok çözeltisinin hazırlanması

100 ppm'lik karvedilol stok çözeltisinden 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlanmış ve 10 ppm'lik karvedilol ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stok çözelti, 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hazırlanan karvedilol ara stok çözeltisi, 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanılmaya başlanmıştır.

3.2.1.3. İç standart çözeltisinin hazırlanması

1 mg/mL (1000 ppm) olarak sıvı halde temin edilen 1 mL iç standart çözelti (propranolol) üzerine metanol ilave edilerek çözeltinin toplam hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 100 ppm'lik iç standart çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti önce ultrasonik banyoda 15 dakika ve daha sonra oda sıcaklığında 1 saat

bekletilmiştir. Hazırlanan bu çözeltinin 100 µL'si metanolle 10 mL'ye tamamlanmış ve 1 ppm'lik iç standart çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti önce ultrasonik banyoda 15 dakika ve daha sonra oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra kullanılmaya başlanmıştır.

3.2.2. Metot optimizasyonu

3.2.2.1. Mobil faz bileşiminin belirlenmesi

Karvedilol ilaç etken maddesi metanolde çözülerek bir stok çözelti ve bu stok çözeltinin seyreltilmesiyle bir ara stok karvedilol çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stok karvedilol çözeltisi, çözgen olarak metanol, asetonitril ve su; pH'yı ayarlamak için asetik asit, formik asit ve ortofosforik asit; pik şeklini düzeltmek için ise trietilamin (TEA)'in kullanıldığı çok sayıda mobil faz bileşimiyle denenmiştir. Çalışmalar sonucunda, alıkonma zamanı kısa olan ve pik kuyruklanması olmayan mobil faz bileşimi belirlenmiştir.

Mobil faz belirlenirken, ayırma işleminin pH'ya bağlı olduğu göz ardı edilmemelidir. Amino grupları söz konusu olduğunda, pH'nın 5,5'in altına düşürülmesi önemlidir. Bunun nedeni, kalıntı silanol grupları ve amino grupları arasındaki güçlü etkileşim yüzünden meydana gelen pik kuyruklanmalarında mobil faz pH'sı 5,5'in altına düşürüldüğünde pik şekillerinde ciddi anlamda düzelme sağlanabilmesidir. Bu pH değerinin üzerindeki durumlarda pik şekli önemli ölçüde bozulur (Berthod ve Garcia-Alvarez-Coque 2000). Pik şeklini daha fazla düzeltmek için, trietilamin gibi polarite düzenleyici bir madde ilavesi gereklidir. Trietilamin, bileşikteki bu amino grupları yerine kalıntı silanol gruplarına bağlanmak için ters faz mobil fazlara eklenir. Asetonitril, metanole göre daha iyi seçicilik sağladığından organik modifiyer olarak tercih edilmektedir (Jong vd 1993).

3.2.2.2. Akış hızının belirlenmesi

Deneysel çalışmalarda, 0,1 mL/dk, 0,2 mL/dk, 0,3 mL/dk, 0,5 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,5 mL/dk olmak üzere 6 farklı akış hızı denenmiştir. Akış hızı belirlenirken, karvedilolun alıkonma zamanı ve Van Deemter eğrisinden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. Kolon sıcaklığının belirlenmesi

Kolon sıcaklığını belirlemek için 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C olmak üzere 6 farklı sıcaklık denenmiştir.

3.2.2.4. Enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Çalışmalar sırasında, enjeksiyon hacmi olarak 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL denenmiştir. Enjeksiyon hacmi, karvedilole ait pikteki kuyruklanma ve karvedilolun pik alanı göz önüne alınarak belirlenmiştir.

3.2.2.5. Numune hazırlama-katı faz ekstraksiyon (SPE) işlemi

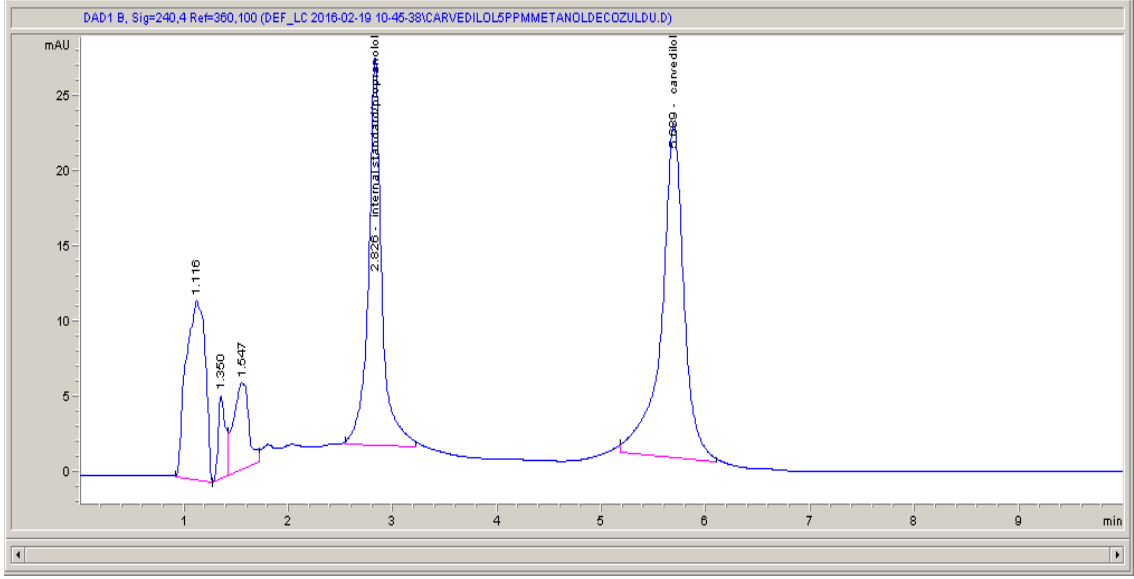
Karvedilol içermediği tespit edilmiş serum örneklerine, stok çözeltilerden belirli miktarlarda eklenerek toplamda 1 mL'lik çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilere 5'er mL saf su ilave edilerek yavaşça karıştırıldıktan sonra numuneler 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek SPE işlemine hazır hale getirilmiştir. Bu çözeltilerin herbiri, ticari ismi Oasis HLB olan katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşu (3 mL, 60 mg) kullanılarak katı-faz ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Bunun için ilk olarak kartuştan sırasıyla 2 mL metanol ve 2 mL HPLC saflığında saf su geçirilerek kartuşun şartlandırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, önceden hazırlanan çalışma çözeltileri kartuştan geçirilerek numune ekleme işlemi yapılmıştır. Numunelere 1 µg/mL (1 ppm) derişimindeki propranolol iç standardından 100 µL ilave edilmiş ve numune - iç standart karışımı kartuştan geçirildikten sonra kartuşta kalabilecek girişim ve kirliliğe neden olabilecek maddeler yıkama işlemiyle uzaklaştırılmıştır. Bunun için 2 mL % 5 (v/v)'lik metanol çözeltisi kullanılmıştır. Yıkama basamağından sonra, kullanılan SPE kartuşları boş polipropilen tüplere konularak 5000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek kurutulmuş ve kartuşta su kalmaması sağlanmıştır. Daha sonra, kartuşta tutunan etken maddeyi geri kazanmak için 2 mL metanol ile elüsyon yapılmıştır.

3.2.2.6. Numunelerin cihaza verilmesi

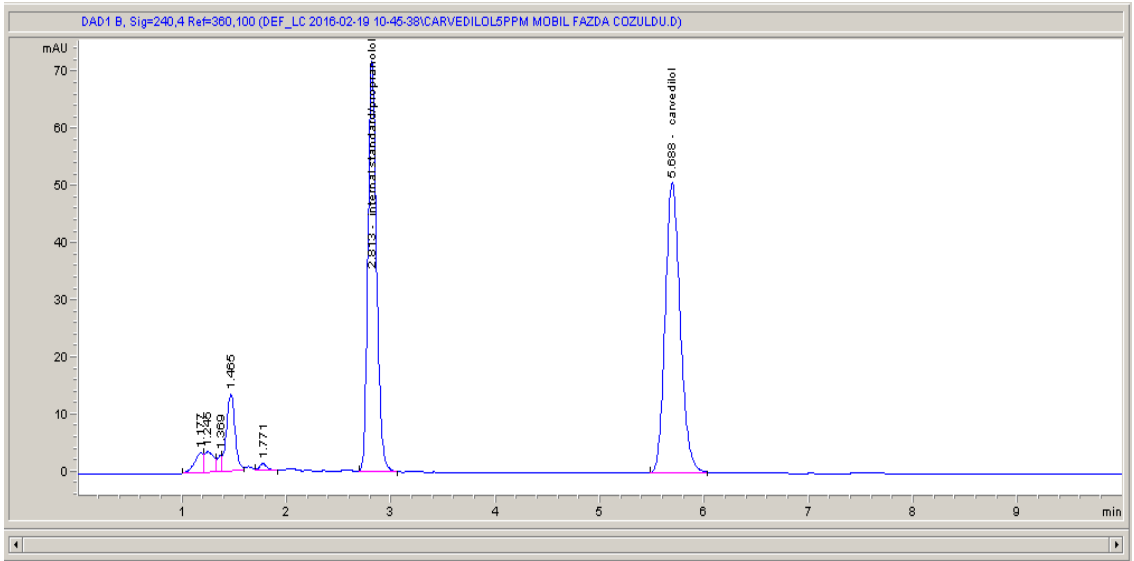
Geri kazanılan kısım oda sıcaklığında azot altında uçurulmak suretiyle çözen etkisi giderildikten sonra numune, 1 mL mobil faz ve 1 mL metanol içerisinde çözülüp 0,22 µm'lik filtre ile süzülerek HPLC sisteminde analiz edilmiştir.

3.2.2.7. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

Katı faz ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan karvedilol numunelerinin HPLC cihazına enjeksiyonu, ayrı ayrı 1 mL metanol ve 1 mL mobil faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metanolla hazırlanan numunenin kromatogramı incelendiğinde, hem karvedilole hem de iç standart olarak kullanılan propranolole ait piklerde kuyruklanma meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 3.2). Mobil faz ile hazırlanan numuneye ait kromatogram incelendiğinde ise, herhangi bir kuyruklanmanın olmadığı ve pik şeklinin düzgün olduğu görülmüştür (Şekil 3.3). Bu nedenle, optimizasyon ve validasyon basamaklarında HPLC cihazında analiz edilen numunelerin tamamı mobil faz içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

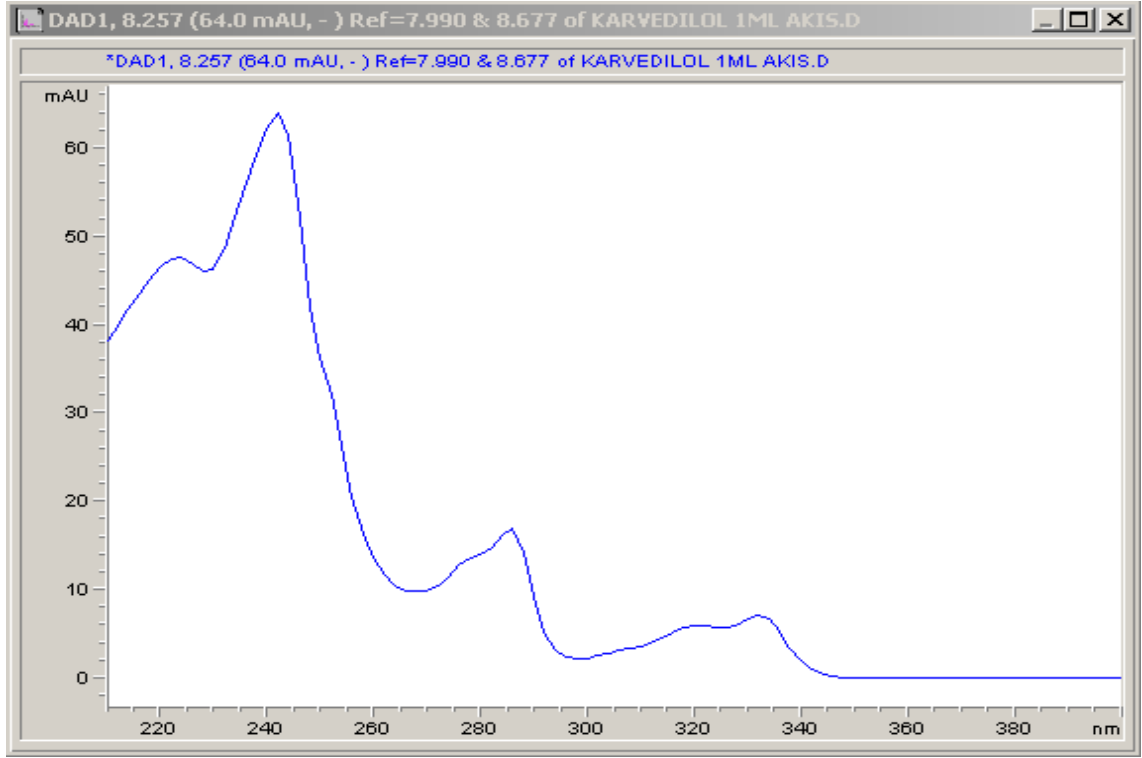


Şekil 3.2. Rekonstitüsyon (geri sulandırma) işlemi metanolle yapıldığında elde edilen carvedilol ve propranolole ait kromatogram

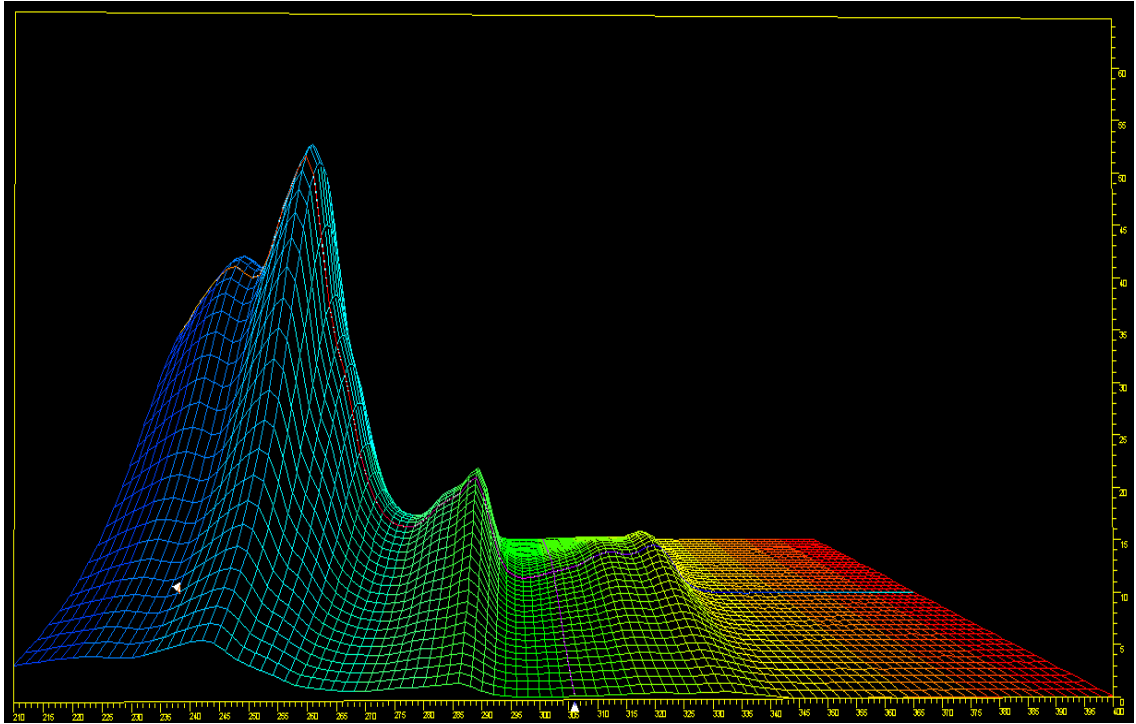


Şekil 3.3. Rekonstitüsyon (geri sulandırma) işlemi mobil fazla yapıldığında elde edilen carvedilol ve propranolole ait kromatogram

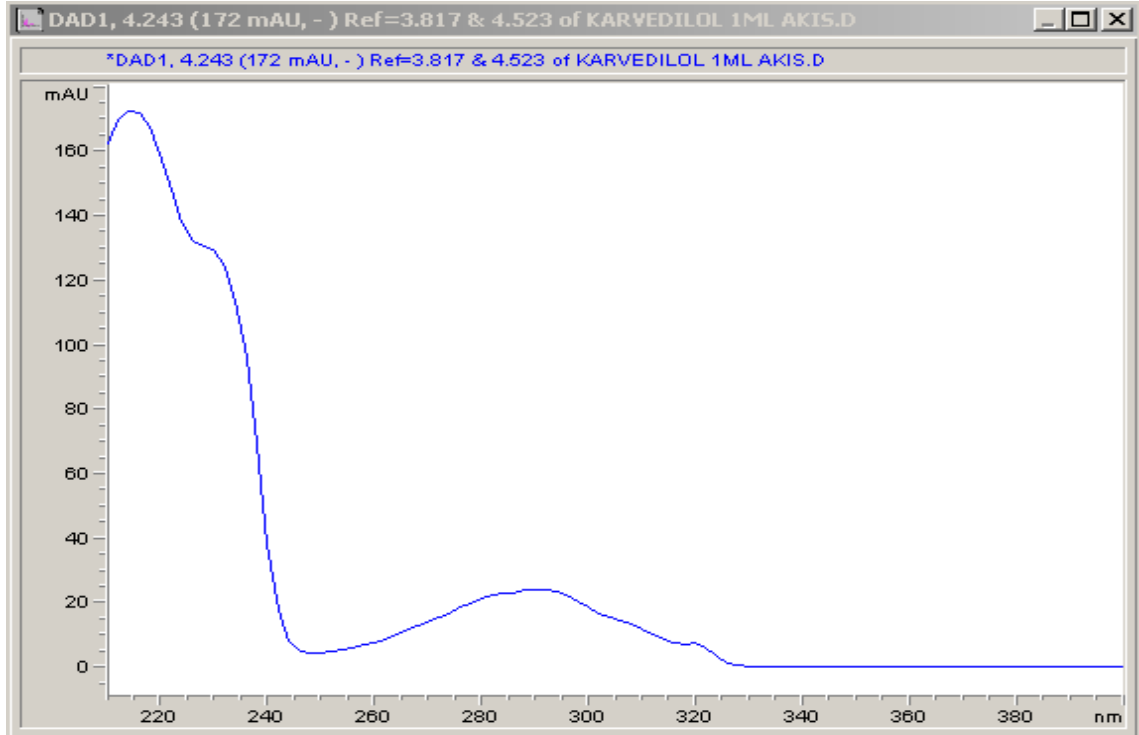
Propranolol ve carvedilolün alıkonma zamanları sırasıyla 2,81 ve 5,69 dakika olarak bulunmuştur. Bu alıkonma zamanlarında, carvedilol ve propranololün hem normal hem de üç boyutlu UV spektrumları alınmıştır. Carvedilolün UV spektrumu Şekil 3.4'te, carvedilolün üç boyutlu UV spektrumu Şekil 3.5'te; propranololün UV spektrumu Şekil 3.6'da ve propranololün üç boyutlu UV spektrumu Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



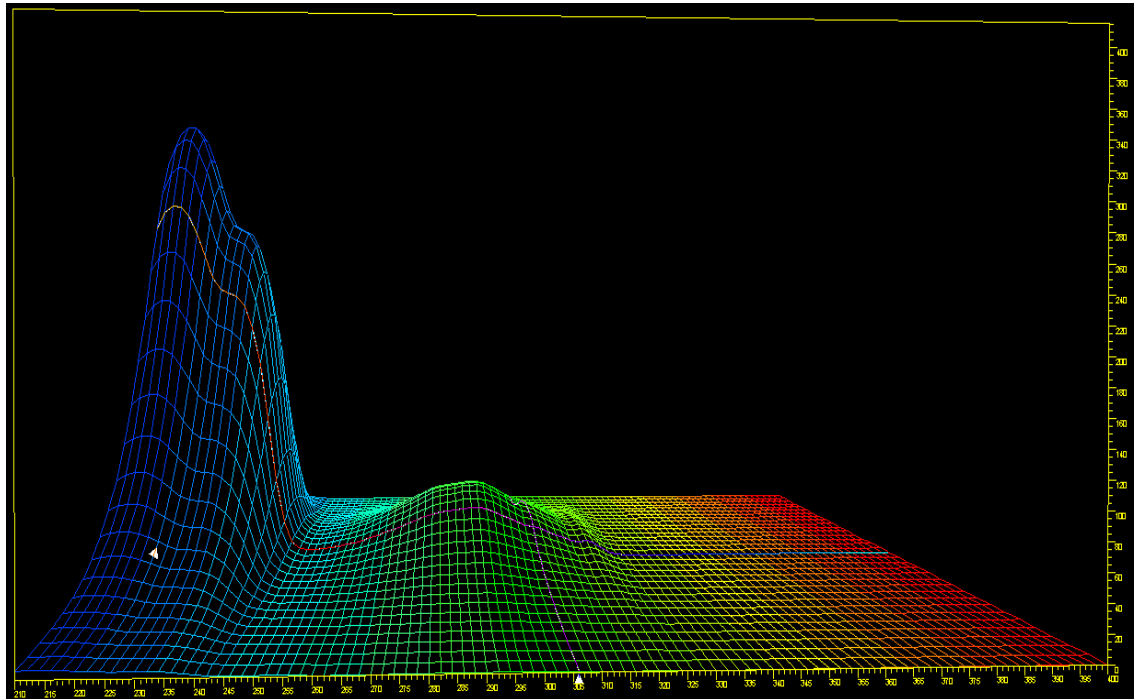
Şekil 3.4. Karvedilolun UV spektrumu



Şekil 3.5. Karvedilol etken maddesinin üç boyutlu (3D) UV spektrumu



Şekil 3.6. Propranololun (iç standart maddenin) UV spektrumu



Şekil 3.7. Propranolol etken maddesinin üç boyutlu (3D) UV spektrumu

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 ppb'lik karvedilol çözeltileri için pik alanı değerleri hesaplanmış ve bu pik alanı değerlerine karşı konsantrasyon grafiği çizilerek bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

3.2.3. Metot validasyonu

Optimizasyon işlemi tamamlanmış olan metot için kesinlik, doğruluk, seçicilik, kantitatif tayin limiti (LOQ), doğrusallık, kararlılık vb. parametrelerin belirlenmesi ile metot validasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Kesinlik parametresinin belirlenmesi

Kesinliği belirlemek için, yüzde bağıl standart sapma (% RSD) değerleri hesaplanmıştır. Serum örneklerinin içerisine belirli miktarlarda karvedilol çözeltisi ilave edilerek düşük, orta ve yüksek seviyede olmak üzere üç farklı derişime sahip numuneler hazırlanmıştır. Her bir seviye için 3 tekrar yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik için bu 3 tekrar, farklı 3 günde gerçekleştirilmiştir. Düşük, orta ve yüksek derişimdeki kalite-kontrol örnekleri, gün içi ve günler arası çalışılarak kesinlik testleri yapılmıştır.

3.2.3.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi

Doğruluk, yüzde geri kazanım oranı cinsinden aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Geri Kazanım Oranı} = (C_2/C_1) \times 100 \quad (3.1)$$

Eşitlik (3.1)'deki C_1 , bilinen madde derişimini ve C_2 de oluşturulan metoda göre ilaçla yüklenen örnekteki hesaplanan madde derişimini ifade etmektedir.

3.2.3.3. Seçicilik parametresinin belirlenmesi

Seçicilik için kör numune, karvedilol standart çözeltisi ve karvedilol içeren insan serum numuneleri cihaza verilmiştir. Chemstation programıyla numunenin saflığı teyit edilmiştir.

3.2.3.4. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi

Tespit limiti (LOD), analitin tespit edilebilir bir yanıt verdiği en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır. Kantitatif tayin limiti (LOQ), belirli bir doğruluk ve kesinlik ile miktarlandırılabilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır (De Bievre ve Günzler 2003). LOD ve LOQ, doğrusallık parametresini belirlemek amacıyla kullanılan 10 farklı konsantrasyona sahip numunenin, her bir konsantrasyon seviyesinde 3 tekrar yapılarak analiz edilmesi sonucunda belirlenmiştir. ICH (Uluslararası Uyum Konferansı) kılavuzuna göre LOD ve LOQ değerleri, numunelerin pik alanlarının standart sapmasının, eğimlerin ortalamasına bölünmesiyle elde edilen oran kullanılarak hesaplanmıştır. Bu oranın 3,3 ile çarpımıyla LOD değeri ve 10 ile çarpımıyla LOQ değeri belirlenmiştir (Ketema ve Sankar 2012, Şanlı vd 2012).

3.2.3.5. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi

Doğrusallık testleri için, 10 farklı derişimdeki numuneye aynı miktarda iç standart eklenerek pik alanlarına göre bir kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Aynı alıkonma zamanında başka bir girişimin olup olmadığı kontrol edilmiştir.

İç standart ekleme metodu, numune ve standart çözeltilerinin her birine numunedeki bileşenlerden farklı bir k' değerine sahip miktarı belli bir madde ilave edilerek yapılmaktadır. İç standart ilavesi titizlikle yapıldıktan sonra, geriye kalan işlemler numunenin verdiği dedektör yanıtının iç standart pikinin dedektör yanıtına oranı ile alakalıdır.

$$\text{Alan oranı} = \frac{\text{Numune pikinin alanı}}{\text{İç standart pikinin alanı}} \quad (3.2)$$

Numune çözeltilisinin derişimi, alan oranlarından yararlanılarak Eşitlik (3.3) ile hesaplanmaktadır:

$$\text{Numune derişimi} = \frac{\text{Numuneye ait pik alanı oranı}}{\text{Standarda ait pik alanı oranı}} \times \text{Standartın derişimi} \quad (3.3)$$

Numune çözeltilisinin hacminde veya enjeksiyon hacminde meydana gelebilecek küçük farklılıklar, numuneyi ve iç standardı aynı oranda etkileyeceğinden, analiz sonuçlarını etkilememektedir. HPLC'de iç standart metodu kullanılırken en önemli sorun uygun iç standardın seçimidir. İç standardın kullanışlı olması için, numune bileşenlerinden farklı bir k' değerine sahip olması ve kolonda uygun bir anda ayrımının gerçekleşmesi gerekmektedir (Schirmer 1991).

3.2.3.6. Kararlılık parametresinin belirlenmesi

Kısa dönem kararlılık testleri için, kontrol numunesinin 0., 18., 24., 42. ve 48. saatlerdeki pik alanları kıyaslanmıştır. Uzun dönem kararlılık testleri için, numune 48 saat oto-örnekleyicide 24 °C'de bekletilmiş, sonra -20 °C'de 28 gün boyunca bekletilmiş ve 3 defa dondur-çöz zincirine maruz bırakıldıktan sonra taze hazırlanmış numuneye pik alanı bakımından kıyaslanmıştır.

3.2.3.7. Sistem uygunluk testlerinin yapılması

Sistem uygunluk testleri, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı incelenerek yapılmıştır. Ayrıca, metodun tüm aşamalarında analitin pik alanının % RSD değerleri de incelenmiştir.

3.2.3.8. Sağlamlık testlerinin yapılması

Sağlamlık testleri, mobil fazın pH'sında, mobil faz bileşiminde, metodun akış hızında ve sistem sıcaklığında küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. HPLC Cihazında Kullanılacak Mobil Faz Bileşiminin Tespit Edilmesi

Çalışmalar sırasında çözen olarak metanolün, asetonitrilin ve suyun; pH ayarlamak için asetik asitin, formik asitin ve ortofosforik asitin; pik şeklini düzenlemek için ise trietilaminin kullanıldığı çok sayıda bileşim denenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

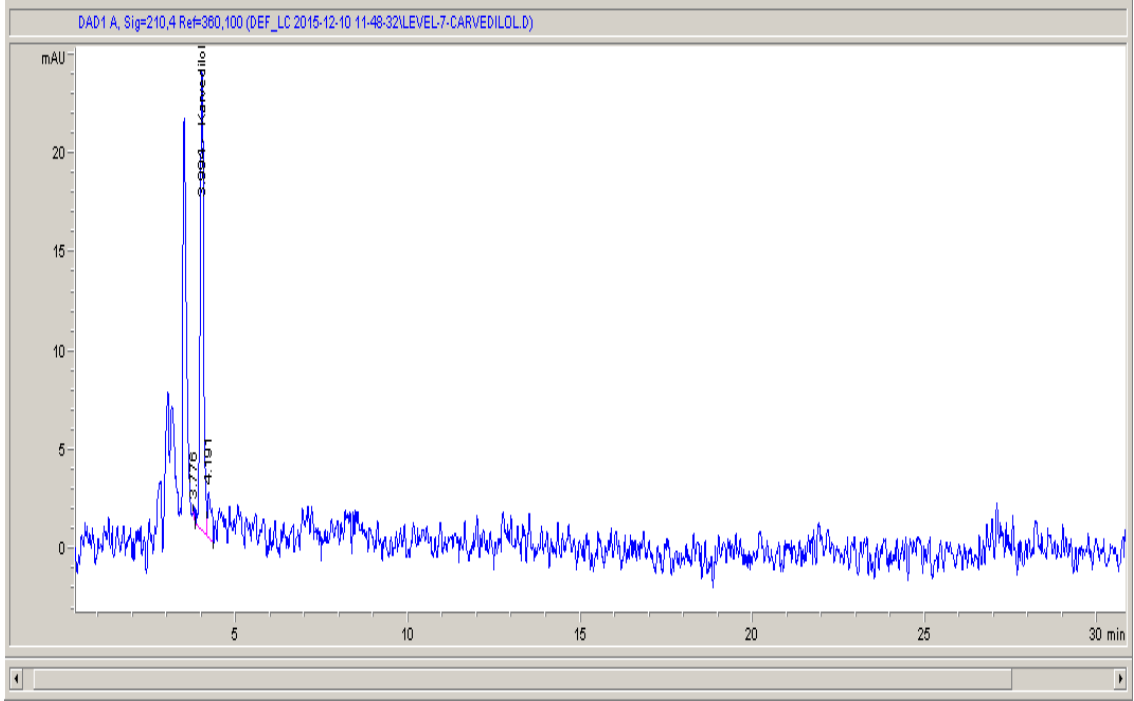
Çizelge 4.1. Kullanılan mobil faz bileşimleri ve elde edilen sonuçlar

Sistem no	Kullanılan mobil faz bileşimi	Sonuç
1	ACN:Su:TEA (50:49:1) (pH 4'e AA ile ayarlanmıştır)	İç standart piki yok. Temel hat çizgisi çok gürültülü.
2	MeOH:ACN:%1 OPA (80:18:2)	Temel hat çizgisi düzgün değil. İç standart piki düzgün değil. Karvedilol piki yok.
3	ACN:Su (25:75) (pH 4'e FA ile ayarlanmıştır)	Analiz süresi uzun. Piklerde kuyruklanma var.
4	ACN:15 mM OPA:TEA (30:70:0,25)	İç standart pikinde kuyruklanma var. Karvedilol piki yok
5	ACN:Su:Formik asit (30:70:0,1)	Piklerde az miktarda kuyruklanma var.
6	ACN:Su:Formik asit:TEA (30:70:0,1:0,1)	5 sistem nolu mobil faz bileşimine TEA ilavesi pik şeklinin düzelmesini sağlamıştır.
7	MeOH:ACN:%1 OPA (80:18:5)	2 sistem nolu mobil faz bileşimindeki OPA miktarının artırılması iç standart pikini daha belirgin hale getirmiştir. Karvedilol piki yok.
8	ACN:Su (50:50) (pH 4'e FA ile ayarlanmıştır)	Karvedilol piki görülmemiştir. İç standart piki düzgün değil ve yanıtı çok düşük.
9	ACN:MeOH:Su:TEA:OPA (25:20:54,8:0,1:0,1)	Pik şekilleri düzgün. Analiz süresi kısa.
10	ACN:MeOH:Su:TEA:OPA (40:20:40:0,1:0,1)	Karvedilol ve iç standart piklerinin ayrımı sağlanamamıştır.
11	%1 TEA (pH 3,5'e OPA ile ayarlanmış):ACN (70:30)	Pik şekli düzgün. Analiz süresi kısa.

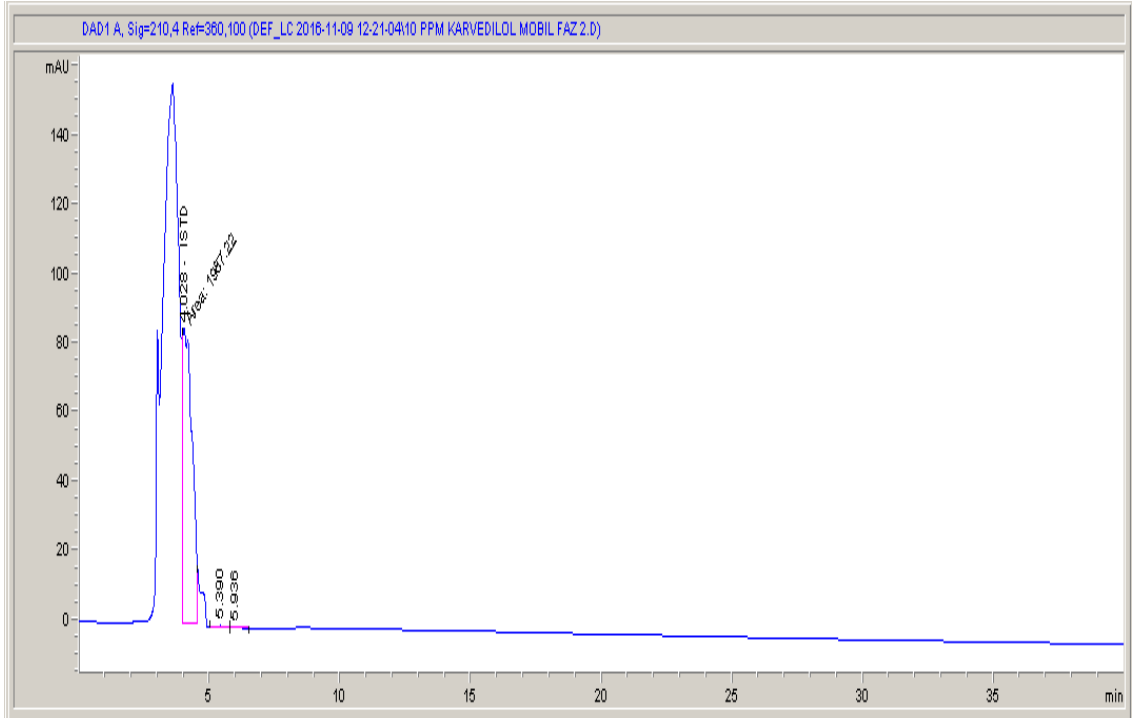
Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi, pik şekli düzgün, analiz süresi kısa ve hazırlanışı kolay olduğu için 11 nolu sistem %1 TEA (pH=3,5 OPA ile ayarlanmış):ACN (70:30) bileşimi mobil faz olarak belirlenmiştir.

Mobil faz sistemlerinin tamamı, 210 nm dalga boyunda, 25 °C sıcaklıkta ve 0,6 mL/dk akış hızında analiz edilmiştir. Analiz süresi 40 dakika ve enjeksiyon hacmi 50 µL olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.1'de belirtilmiş olan 11 adet mobil faz sistemine ait

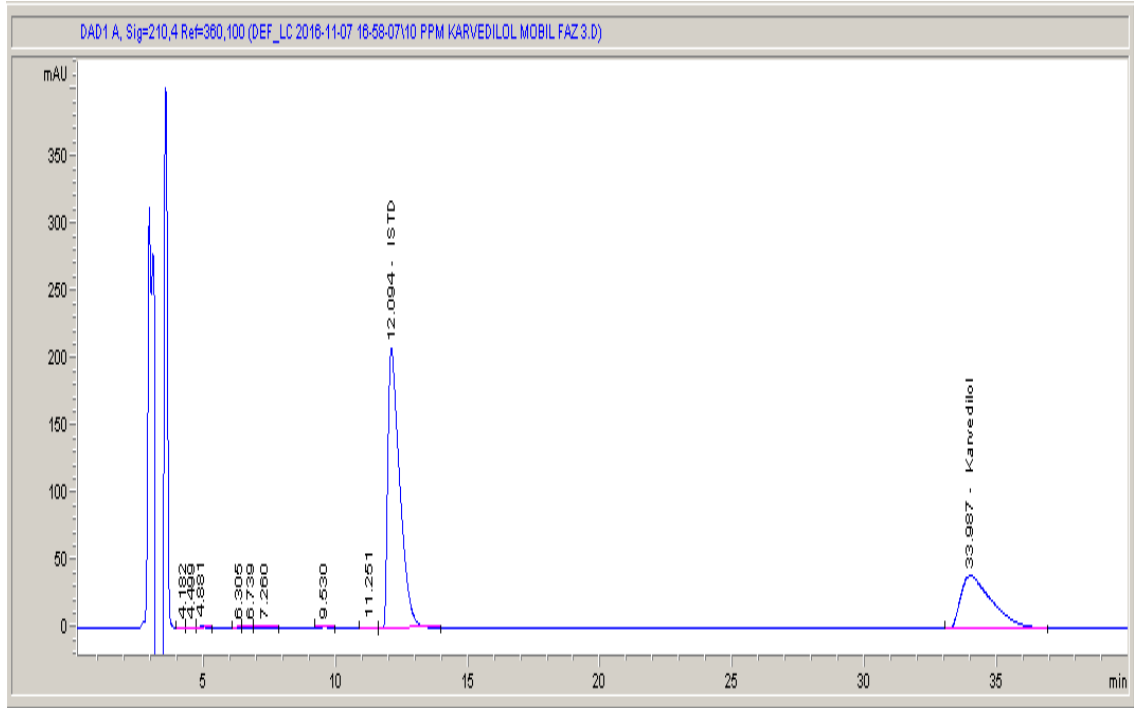
HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 4.1’de, Şekil 4.2’de, Şekil 4.3’te, Şekil 4.4’te, Şekil 4.5’te, Şekil 4.6’da, Şekil 4.7’de, Şekil 4.8’de, Şekil 4.9’da, Şekil 4.10’da ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



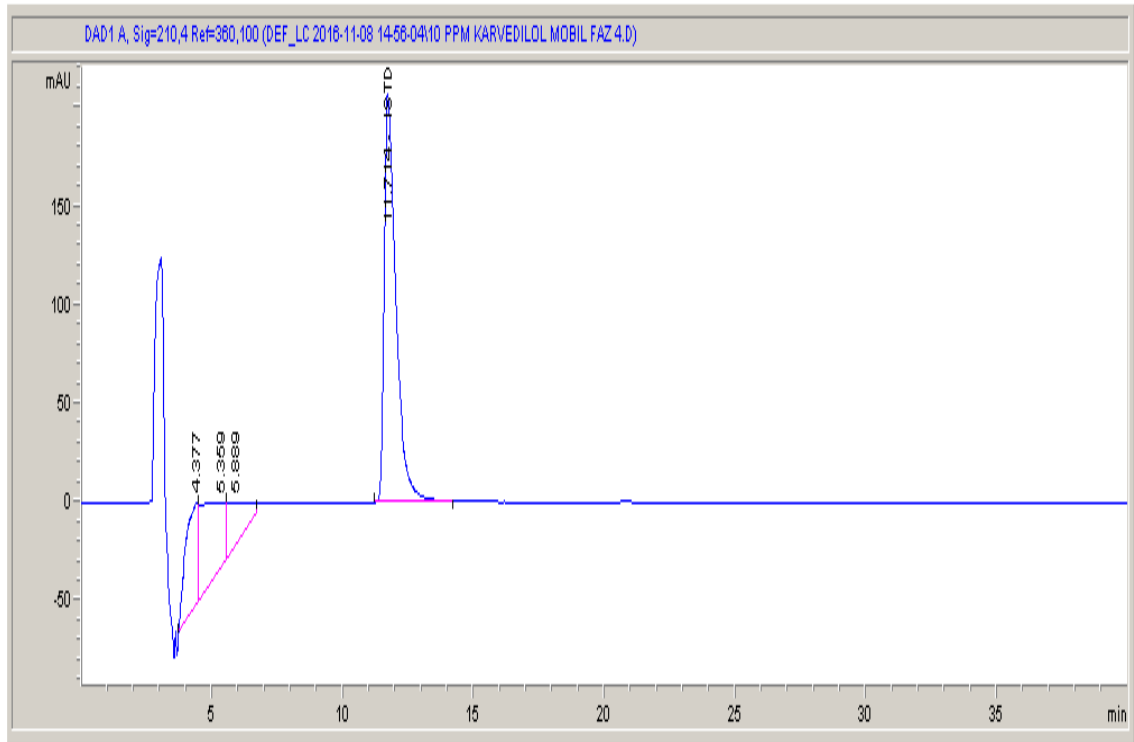
Şekil 4.1. 1 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



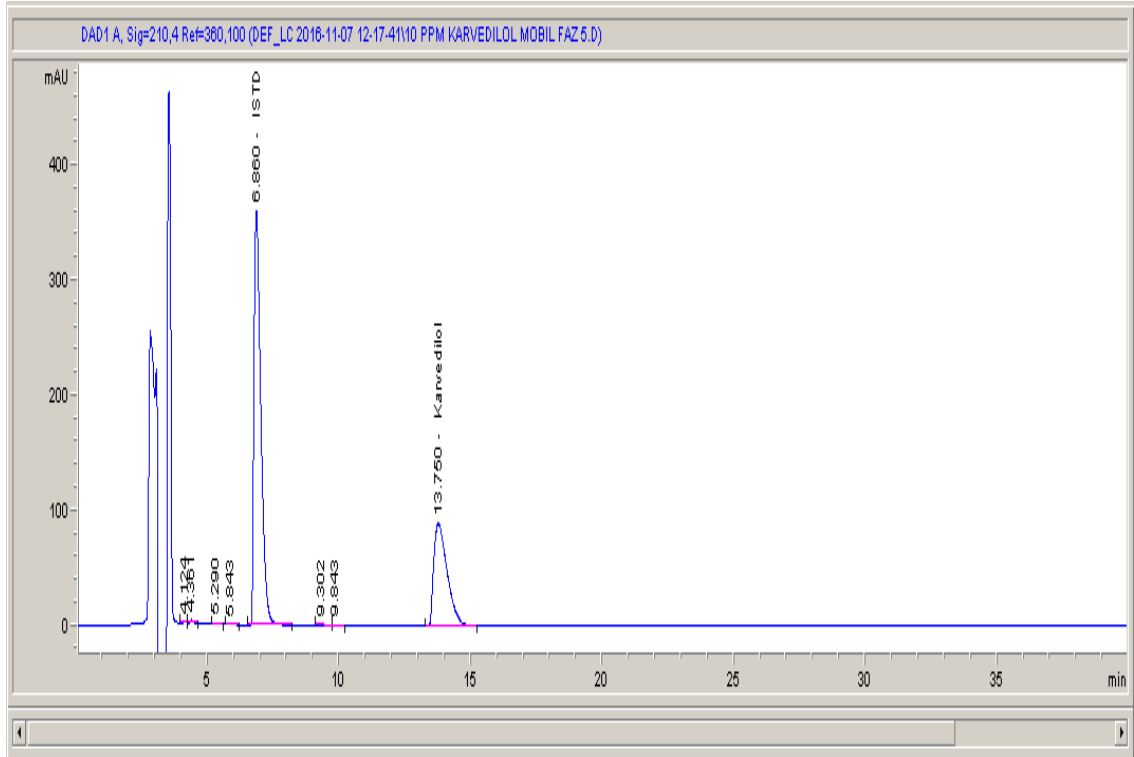
Şekil 4.2. 2 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



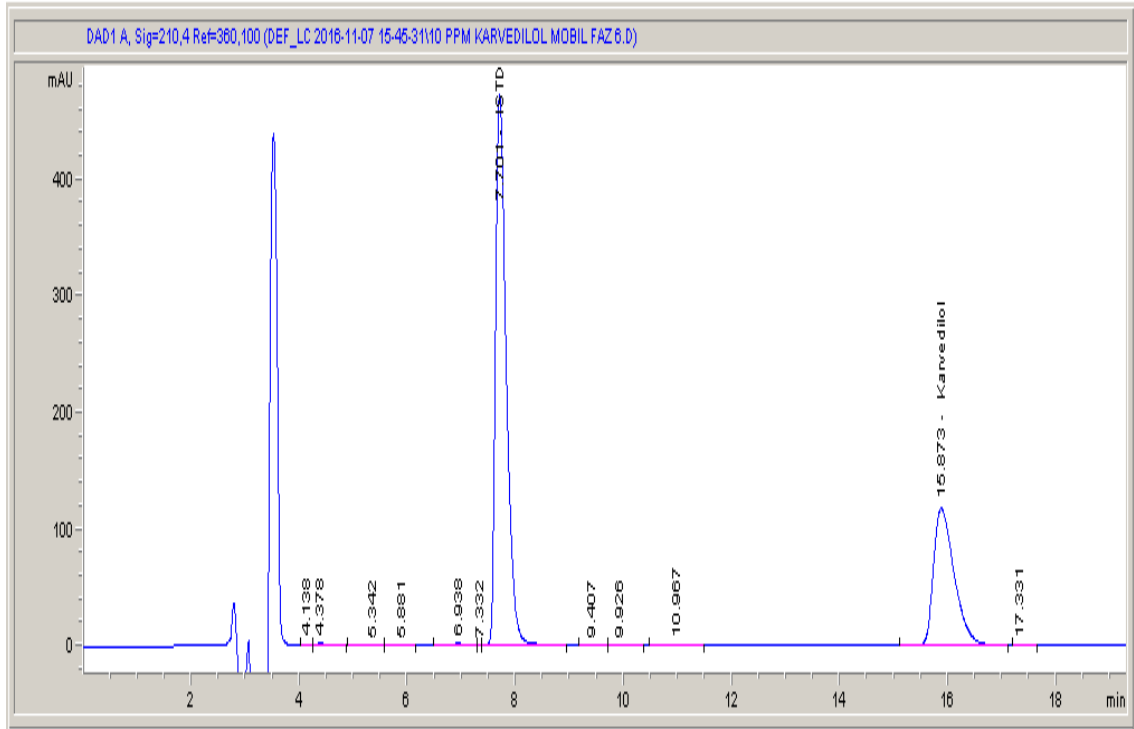
Şekil 4.3. 3 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



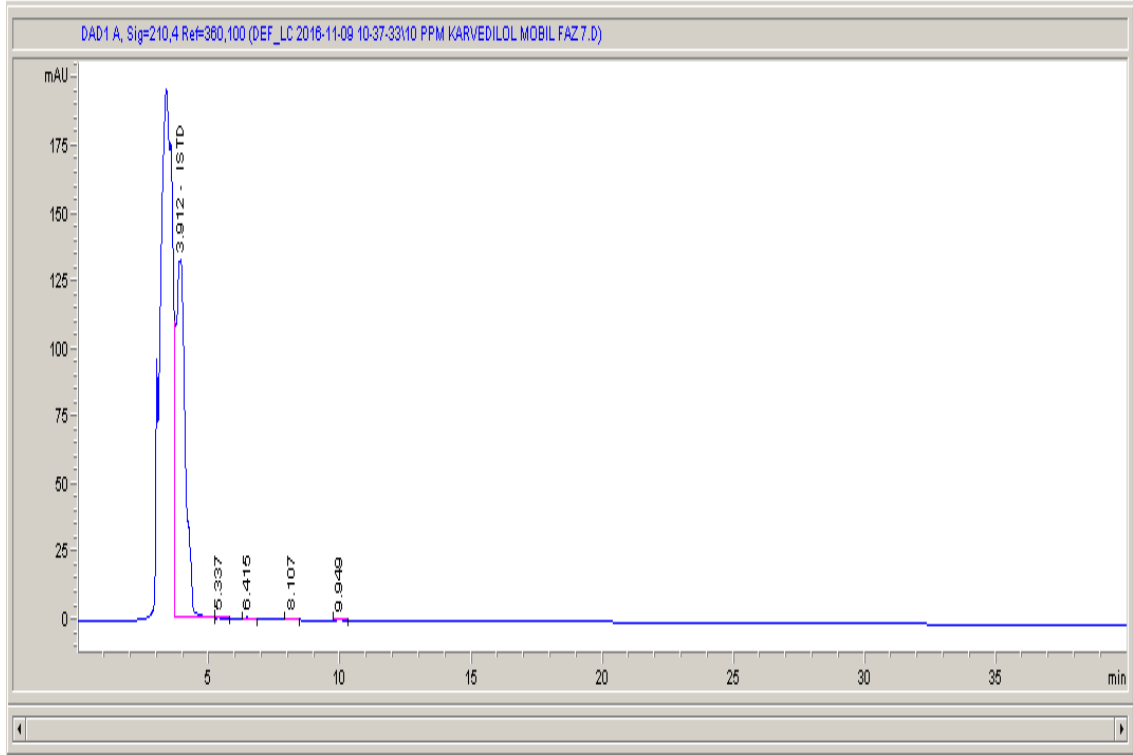
Şekil 4.4. 4 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



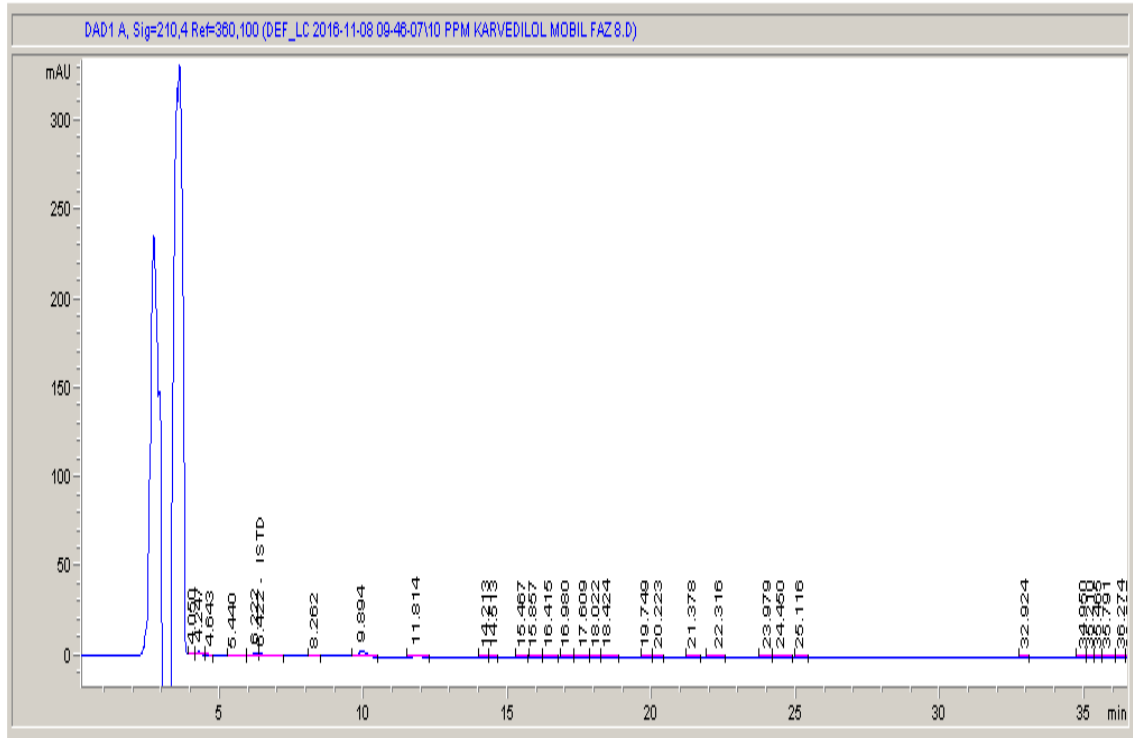
Şekil 4.5. 5 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



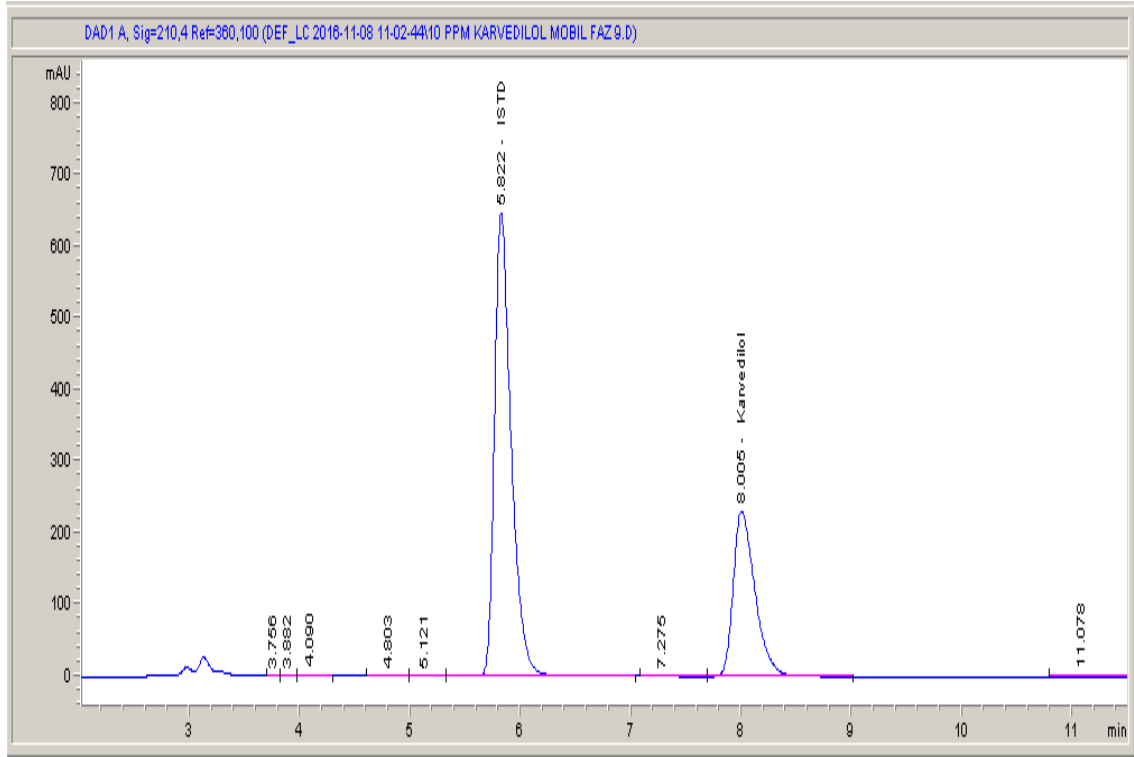
Şekil 4.6. 6 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



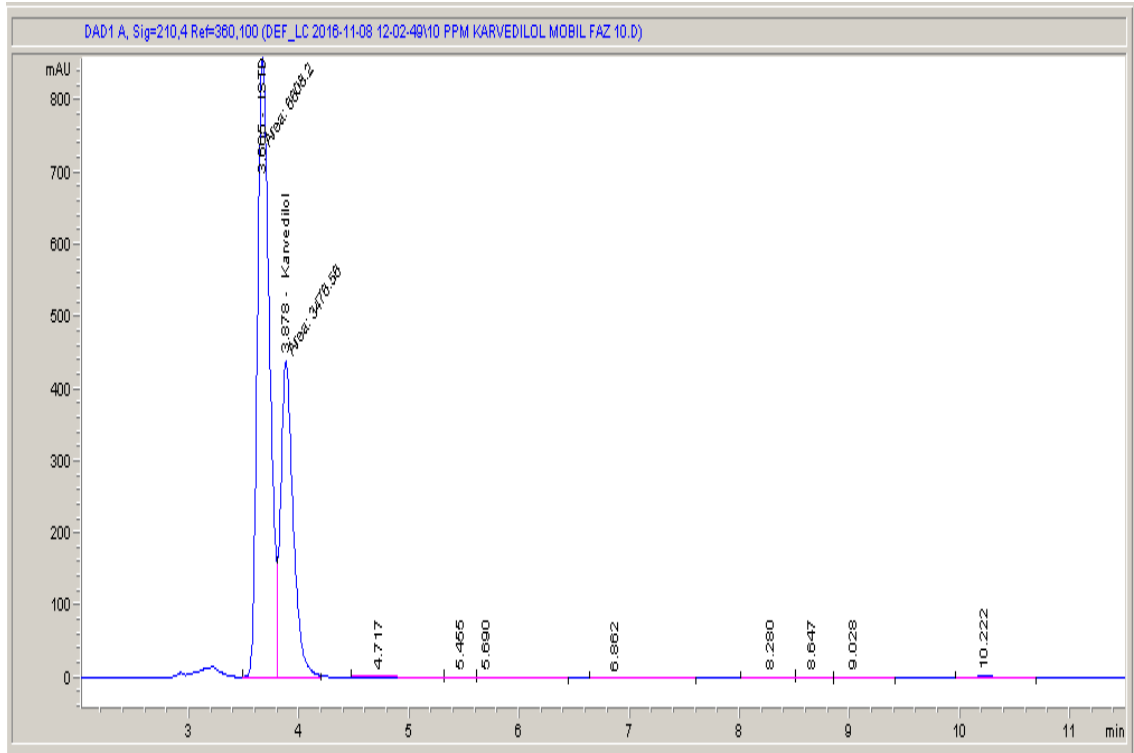
Şekil 4.7. 7 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



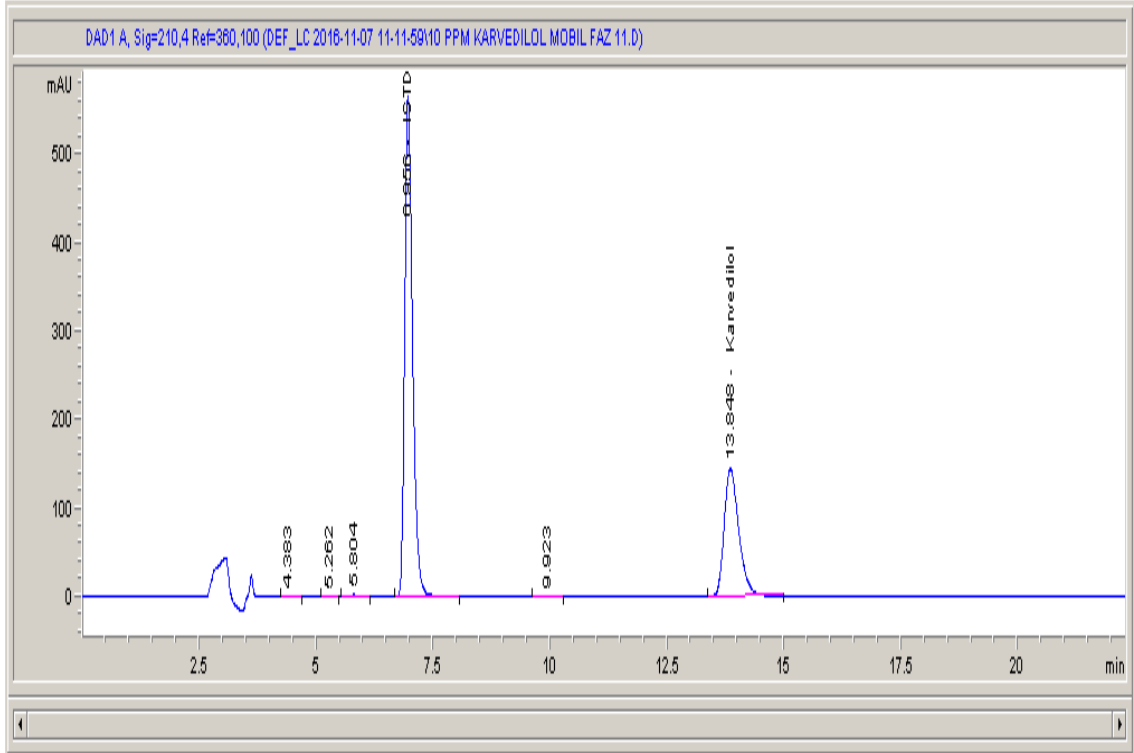
Şekil 4.8. 8 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.9. 9 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.10. 10 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.11. 11 sistem nolu mobil faz bileşimine ait HPLC kromatogramı

Çalışmalar sonucunda 1 nolu mobil faz sisteminde iç standart piki; 2, 4 ve 7 nolu sistemlerde ise karvedilol piki tespit edilememiştir (Bkz. Şekiller 4.1, 4.2, 4.4 ve 4.7). 8 nolu sistemde karvedilol veya iç standart piki tespit edilememiştir (Bkz. Şekil 4.8). 3, 4 ve 5 nolu sistemlerde piklerde kuyruklanma saptanmıştır (Bkz. Şekiller 4.3-4.5). 1 ve 2 nolu mobil faz sistemlerinde sabit bir temel hat çizgisi elde edilememiştir (Bkz. Şekiller 4.1 ve 4.2). 5 nolu sisteme TEA ilavesiyle elde edilen 6 nolu sistemde pik şekillerinin bir miktar düzeldiği gözlenmiştir (Bkz. Şekiller 4.5 ve 4.6). 10 nolu mobil faz sisteminde karvedilol ve iç standart piklerinin ayırımı sağlanamamıştır (Bkz. Şekil 4.10). Kısa analiz sürelerinin ve düzgün pik şekillerinin 9 ve 11 sistem nolu mobil faz bileşimleri kullanılarak elde edildiği tespit edilmiştir (Bkz. Şekiller 4.9 ve 4.11). Çalışmanın amacına uygun olarak analiz süresi kısa ve hazırlanışı daha kolay olan 11 nolu mobil faz sistemi uygun mobil faz olarak belirlenmiştir.

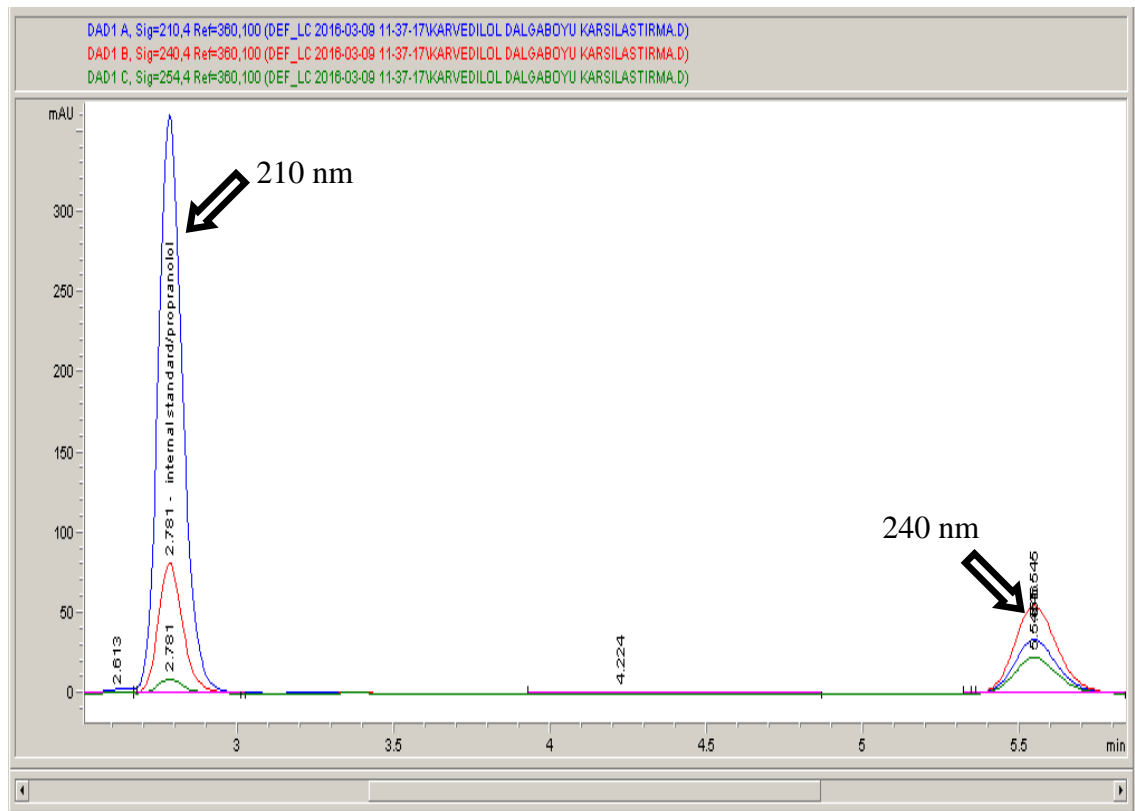
Literatür taraması sonucunda, mobil fazın pH'sını ayarlamak için tüm çalışmalarda ortofosforik asit kullanıldığı görülmektedir. Karvedilol analizlerinde ideal pik şeklini elde etmek için TEA'nın kullanıldığı çok sayıda çalışma vardır (Gannu vd 2007, Padh vd 2007, Ptacek vd 2003 ve Magiera vd 2013).

4.2. Optimum Metot Parametreleri

Metot parametrelerinin optimizasyonu ve validasyon basamaklarının her birinde herhangi bir taşıma (carryover) olmaması için iğne yıkama çözeltisi olarak su ve asetonitrilin hacimce 75:25 oranındaki karışımı kullanılmıştır.

4.2.1. Optimum dalga boyu

Çalışmalar sırasında karvedilol analizi için dedektör olarak DAD kullanılmış ve 210 nm, 240 nm ve 254 nm olmak üzere üç dalga boyu incelenmiştir. Karvedilol ve iç standart olarak kullanılan propranololun 210 nm, 240 nm ve 254 nm dalga boylarındaki kromatogramları Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

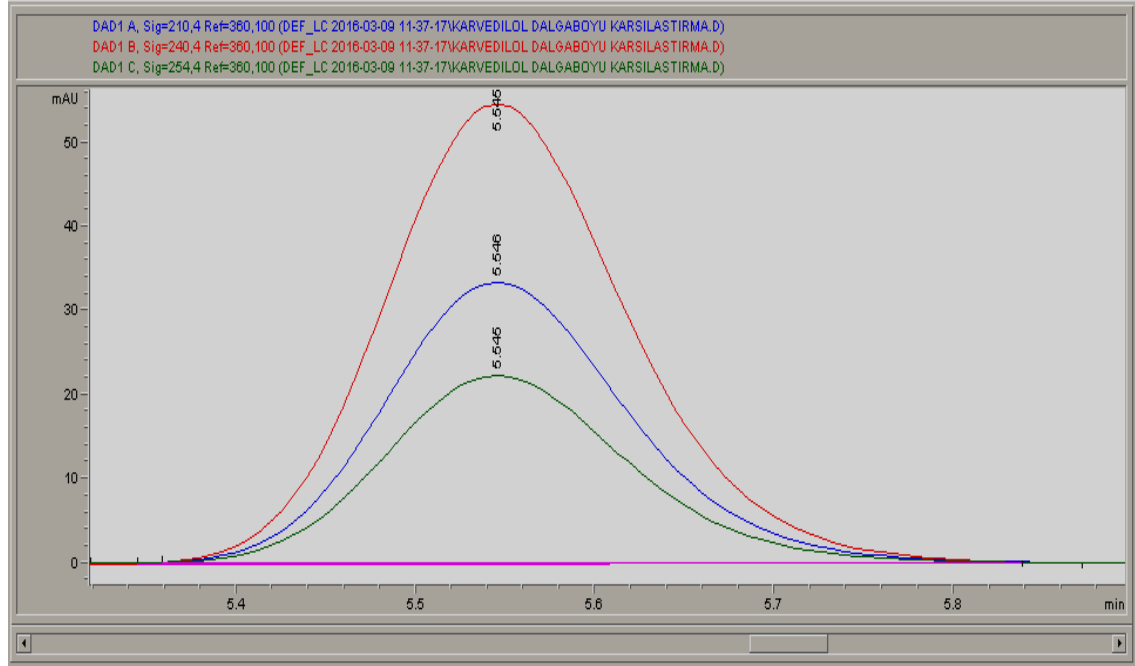


Şekil 4.12. Karvedilol ve propranololun 210 nm, 240 nm ve 254 nm dalga boylarındaki UV absorbanslarının karşılaştırılması

Şekil 4.12 incelendiğinde, iç standartın (propranololun) 210 nm’de, karvedilolun ise 240 nm’de maksimum absorbans verdiği tespit edilmiştir. Metotta kullanılacak dalga boyu Şekil 4.12’den 240 nm olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.12’ye göre, propranolol ve karvedilolun alıkönma zamanları sırasıyla 2,78 ve 5,56 dakikadır.

Karvedilole ait 210 nm, 240 nm ve 254 nm dalga boylarındaki absorban değerlerinin karşılaştırılması Şekil 4.13 'teki kromatogramda gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Karvedilolun 210, 240 ve 254 nm dalga boylarına ait UV absorbanları

Şekil 4.13'te görüldüğü gibi, karvedilolun absorbanının maksimum olduğu dalga boyu 240 nm'dir.

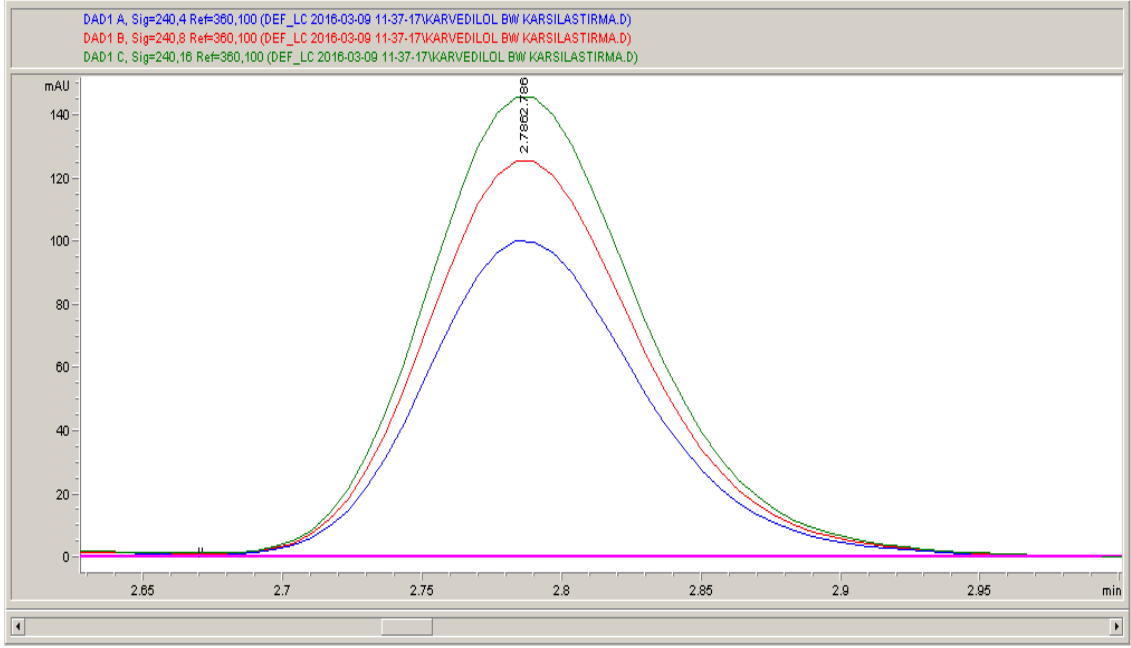
Literatür taraması sonucunda, HPLC cihazında UV dedektörün kullanıldığı çalışmalarda aşağıdaki sonuçların elde edildiği gözlenmiştir:

Elezovic vd (2015) ve Madishetty vd (2015) tarafından yapılan benzer çalışmalarda, tespit dalga boyu 242 nm olarak gözlenmiştir. Ketema ve Sankar (2012) tarafından yapılan bir başka çalışmada da benzer şekilde tespit dalga boyu 241 nm olarak belirlenmiştir. Gannu vd (2007)'nin gerçekleştirmiş olduğu çalışmada tespit dalga boyu 238 nm olarak bulunmuştur. Basaveswara vd (2012), Naidu vd (2014), Pal vd (2013), Rele (2015) ve Dey vd (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda ise tespit dalga boyu, bu çalışmada elde edilen dalga boyuyla aynı (240 nm) olarak rapor edilmiştir.

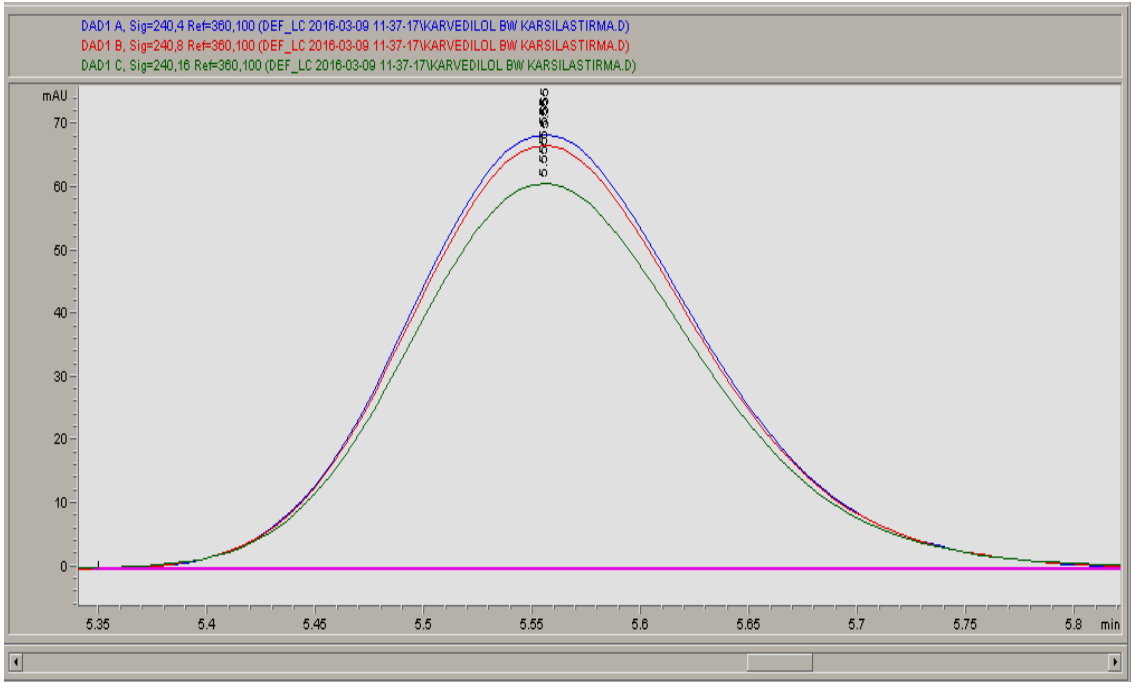
4.2.2. Optimum band genişliği

Band genişliği (bw), ortalama absorbanın alınacağı dalga boyunu ifade etmektedir. Örneğin; dalga boyu 254 nm ve band genişliği 4 olarak ayarlanırsa; cihaz 252 ve 256 nm dalga boyları arasındaki ortalama absorbanı değerlendirmektedir.

Band genişliği olarak 4, 8 ve 16 değerleri denenmiştir. Kullanılan iç standarda ait sonuçlar Şekil 4.14'te ve karvedilole ait sonuçlar ise Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Propranolol (iç standart) için band genişliği değerlerinin karşılaştırılması



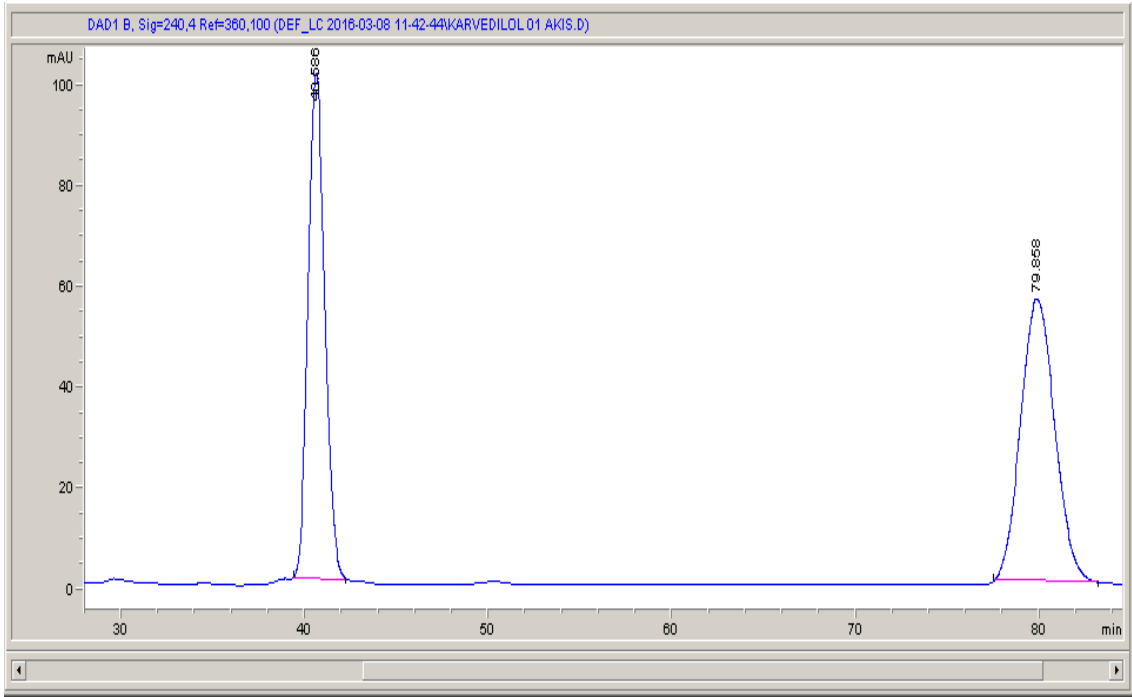
Şekil 4.15. Karvedilol için band genişliği değerlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 incelendiğinde, 240 nm dalga boyunda propranolol için en iyi sonuç band genişliğinin 16 olduğu durumda; karvedilol için ise band genişliğinin 4 olduğu durumda elde edilmiştir. Karvedilol için band genişliği arttıkça absorbans değerlerinde azalma, iç standart (propranolol) için ise tam aksine, band genişliği arttıkça

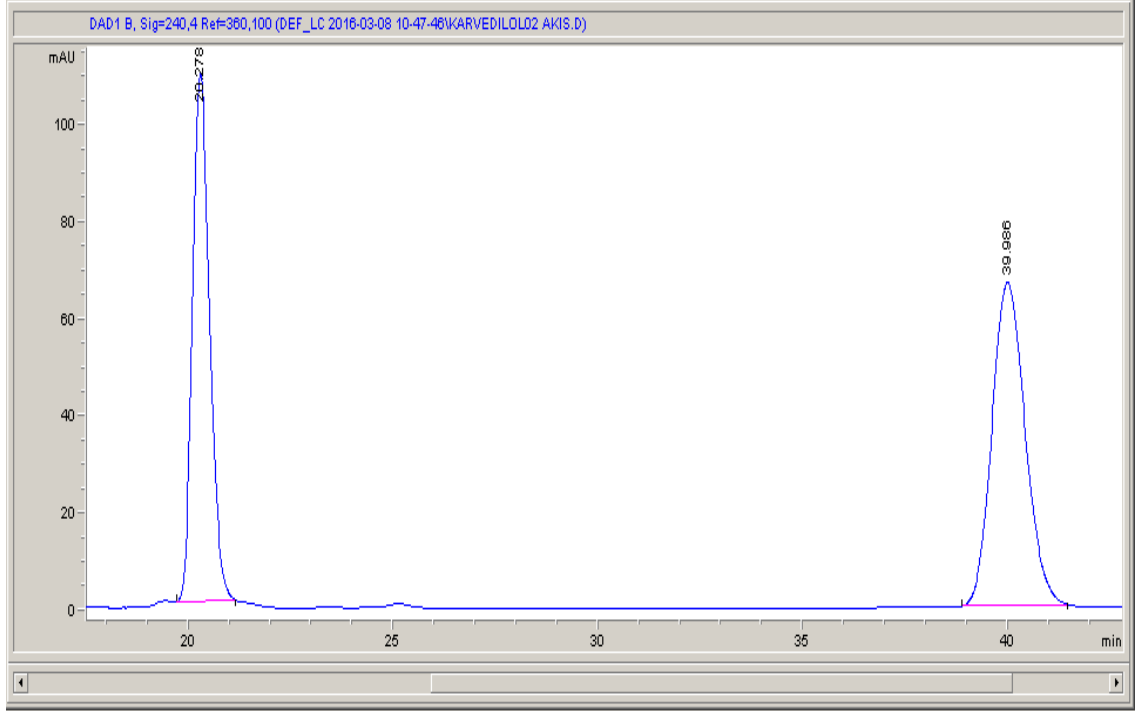
absorbans değerlerinde bir artma görülmektedir. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 incelendiğinde, metot optimizasyonunda band genişliğinin de önemli olduğu ve maddelerin absorbanslarını etkiledikleri görülmektedir.

4.2.3. Optimum akış hızı

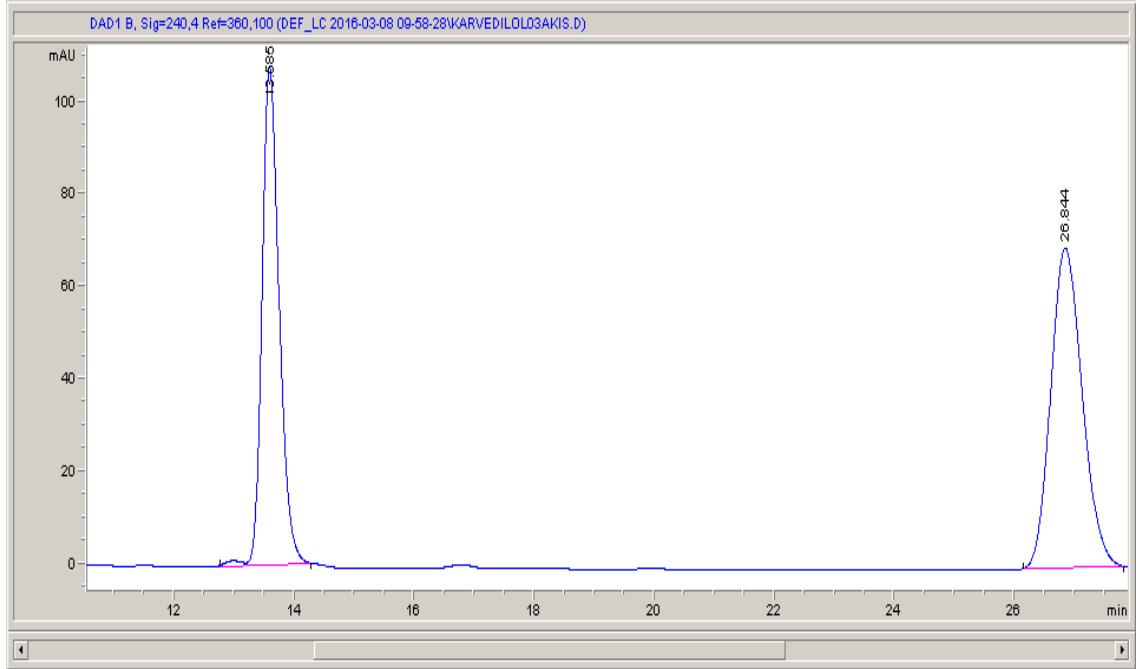
İkili bir pompanın A kanalı izokratik olarak kullanılmıştır. Akış hızı olarak 0,1 mL/dk, 0,2 mL/dk, 0,3 mL/dk, 0,5 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,5 mL/dk olmak üzere 6 farklı akış hızı denenmiştir. Çalışılan akış hızlarında elde edilen kromatogramlar 0,1 mL/dk'lık akış hızı için Şekil 4.16'da, 0,2 mL/dk'lık akış hızı için Şekil 4.17'de, 0,3 mL/dk'lık akış hızı için Şekil 4.18'de, 0,5 mL/dk'lık akış hızı için Şekil 4.19'da, 1,0 mL/dk'lık akış hızı için Şekil 4.20'de ve 1,5 mL/dk'lık akış hızı için Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



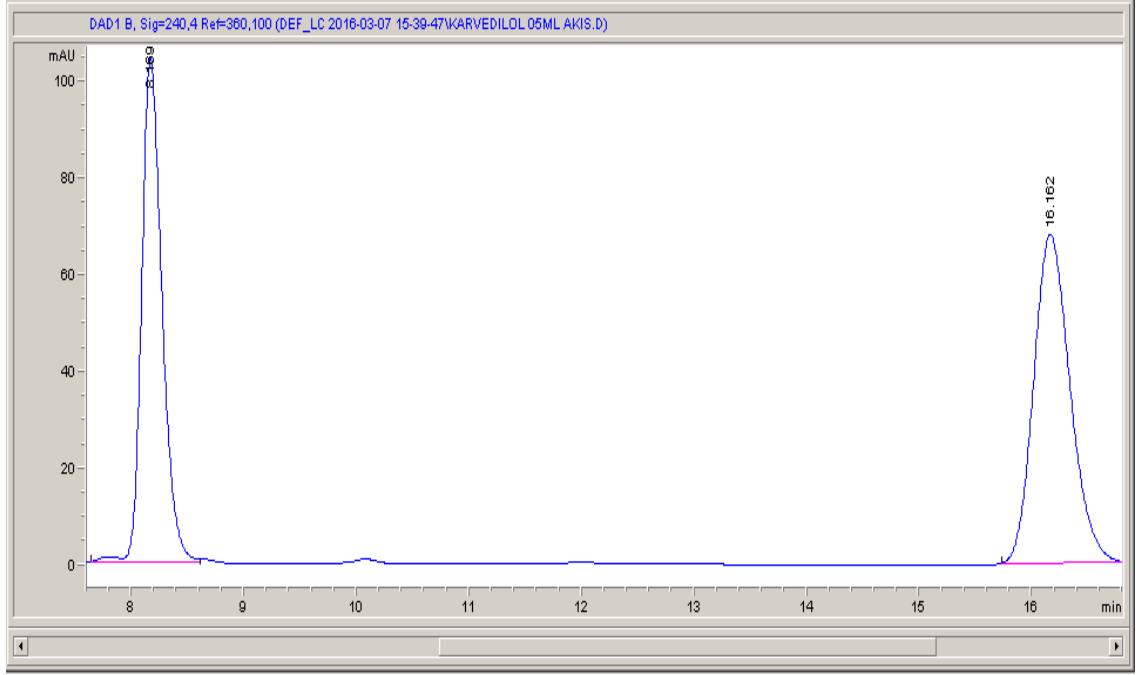
Şekil 4.16. Akış hızının 0,1 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



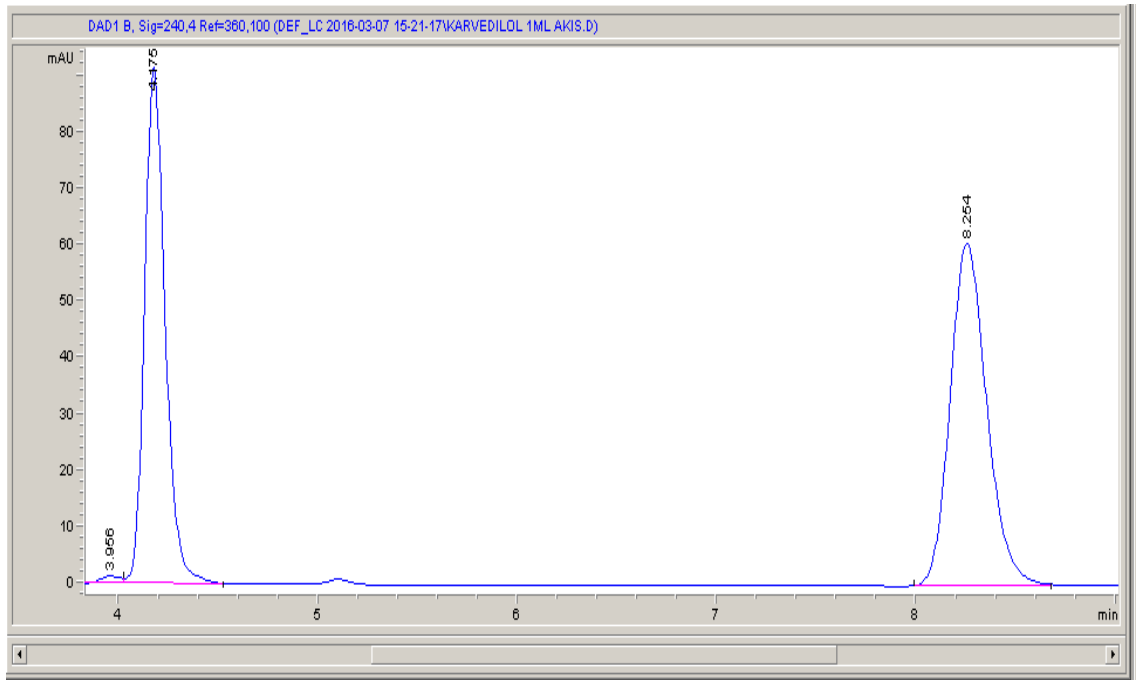
Şekil 4.17. Akış hızının 0,2 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



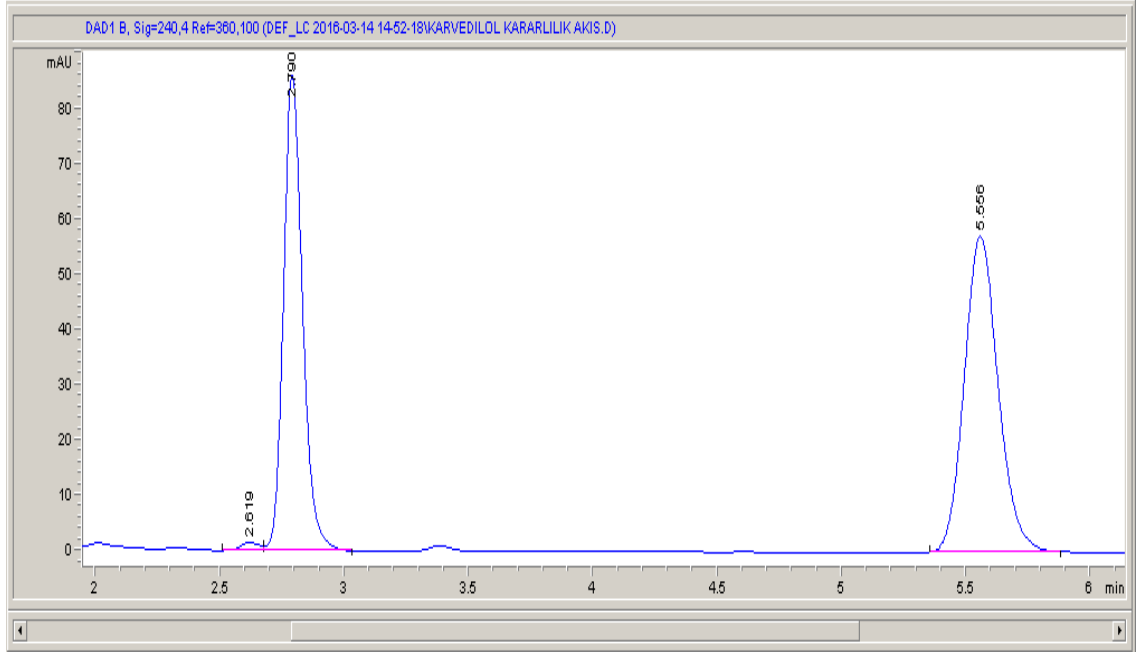
Şekil 4.18. Akış hızının 0,3 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.19. Akış hızının 0,5 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.20. Akış hızının 1,0 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.21. Akış hızının 1,5 mL/dk olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı

Akış hızını optimize etmek için Van Deemter eğrisi kullanılmıştır. Kullanılan akış hızlarına karşılık gelen plaka yükseklikleri (H), Eşitlik 4.1'e göre hesaplanmıştır.

$$H = \frac{L}{N} \quad (4.1)$$

Eşitlikteki H, plaka yüksekliği; L, kullanılan kolonun milimetre cinsinden uzunluğu ve N ise teorik plaka sayısıdır.

Teorik plaka sayısı Eşitlik 4.2'ye göre hesaplanmıştır.

$$N = 5,54 \left(\frac{t}{W_{h/2}} \right)^2 \quad (4.2)$$

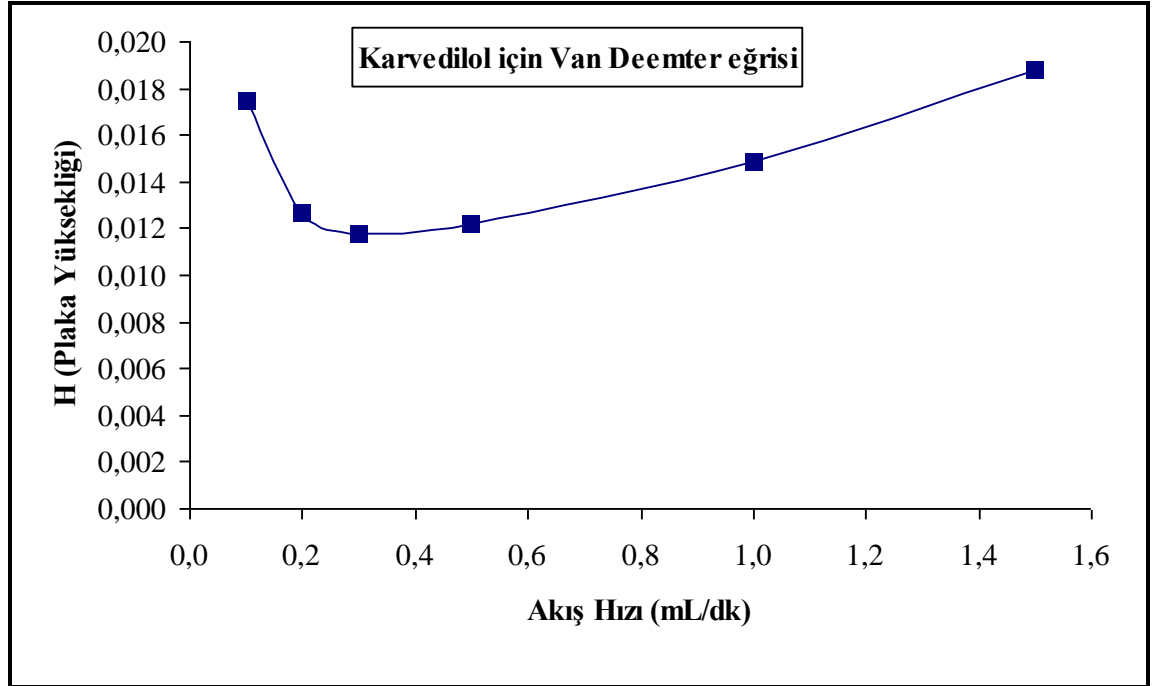
Eşitlik 4.2'de t, pikin geliş zamanını ve $W_{h/2}$ de yarı yükseklikteki pik genişliğini ifade etmektedir.

Kolonun uzunluğu, farklı akış hızlarındaki teorik plaka sayılarına bölünerek her akış hızı için plaka yükseklikleri (H) hesaplanmıştır. Akış hızlarına karşılık gelen teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Akış hızlarına karşılık elde edilen plaka yükseklikleri ve teorik plaka sayıları

H (Plaka yüksekliği)	Akış hızı (mL/dk)	Teorik plaka sayısı
0,01744	0,1	8602
0,01272	0,2	11793
0,01178	0,3	12730
0,01222	0,5	12276
0,01485	1,0	10098
0,01875	1,5	8001

Akış hızına karşı plaka yüksekliği grafiği çizildiğinde, eğrinin minimum noktasına karşılık gelen akış hızı, optimum akış hızıdır. Karvedilol için elde edilen Van Deemter eğrisi Şekil 4.22'de yer almaktadır.



Şekil 4.22. Karvedilol için elde edilen Van Deemter eğrisi

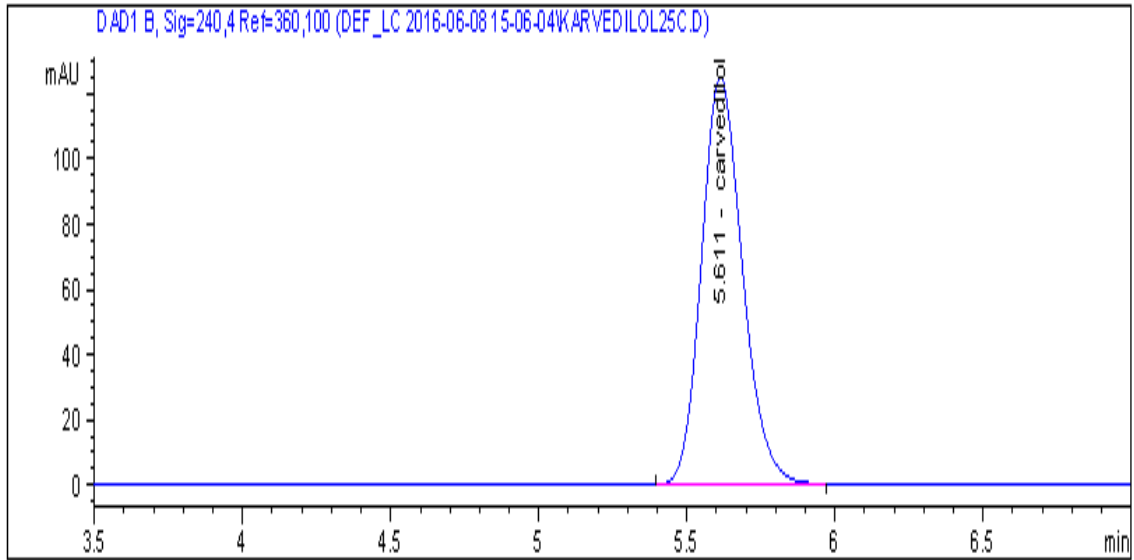
Bu eğriye göre optimum akış hızının, 0,3 mL/dk olduğu saptanmıştır. 0,3 mL/dk akış hızında karvedilolün alıkonma zamanı 26,84 dakikadır. Şekil 4.22'deki Van Deemter eğrisi incelendiğinde, eğrinin sağ taraftaki eğiminin düşük olduğu görülmektedir. 0,2 mL/dk, 0,3 mL/dk ve 0,5 mL/dk akış hızlarına karşılık gelen plaka yükseklikleri arasında önemli bir fark olmadığı ve üç akış hızında da analiz süresinin fazla olduğu saptanmıştır. 1,0 mL/dk ve 1,5 mL/dk akış hızlarına karşılık gelen plaka

yükseklikleri arasında bir miktar fark olsa da deneyde analiz süresinin kısa olması amaçlandığından karvedilolun alıkonma zamanının 5,56 dakika olduğu 1,5 mL/dk metodun akış hızı olarak belirlenmiştir.

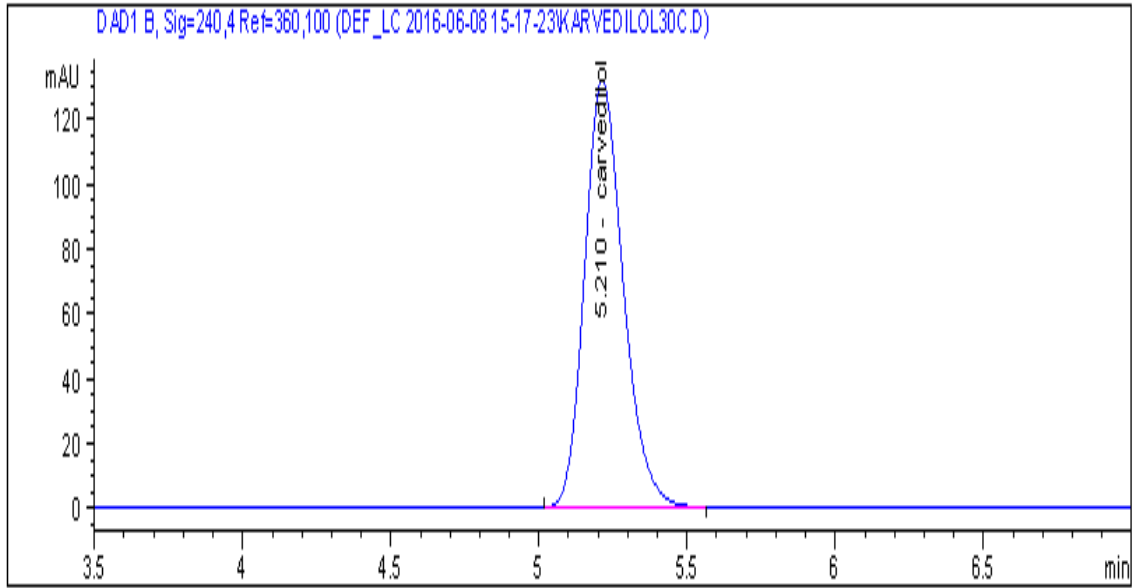
Literatür tarandığında karvedilolun HPLC ile analizinde, farklı mobil fazlar kullanıldığında dahi akış hızı olarak genellikle 1,0 mL/dk'nın seçildiği görülmektedir (Gannu vd 2007, Madishetty vd 2015, Rele 2015, Patel ve Jivani 2015, Dey vd 2010, Ketema ve Sankar 2012, Ibrahim 2015 ve Basaveswara vd 2012). Naidu vd (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mobil faz akış hızı 1,5 mL/dk olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaların dışında, Pal vd (2013) tarafından yapılan çalışmada mobil faz akış hızı 0,5 mL/dk olarak; Suganthi ve Ravi (2014)'ün çalışmasında ise 0,8 mL/dk olarak belirlenmiştir. Hiçbir çalışmada optimum akış hızını belirlemek için Van Deemter eğrisinin kullanılmadığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında, optimum akış hızı Van Deemter eğrisi ile değerlendirilmiş fakat karvedilolun alıkonma zamanı çok yüksek olduğundan akış hızı 1,5 mL/dk olarak belirlenmiştir.

4.2.4. Optimum kolon sıcaklığı

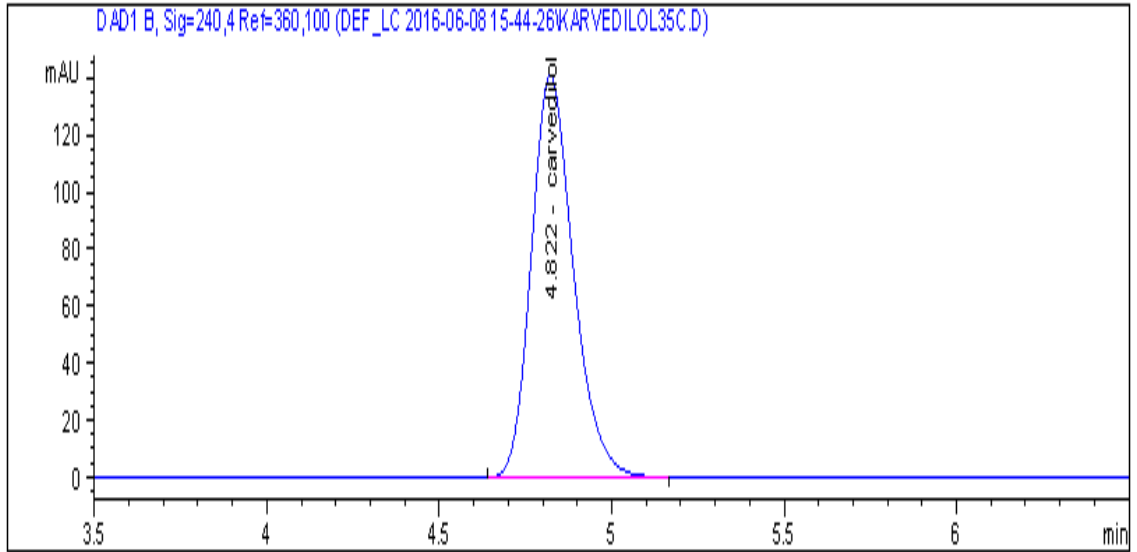
Optimum kolon sıcaklığını belirlemek için 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C olmak üzere 6 farklı sıcaklık denenmiştir. 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C kolon sıcaklıklarında elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.23'te, Şekil 4.24'te, Şekil 4.25'te, Şekil 4.26'da, Şekil 4.27'de ve Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



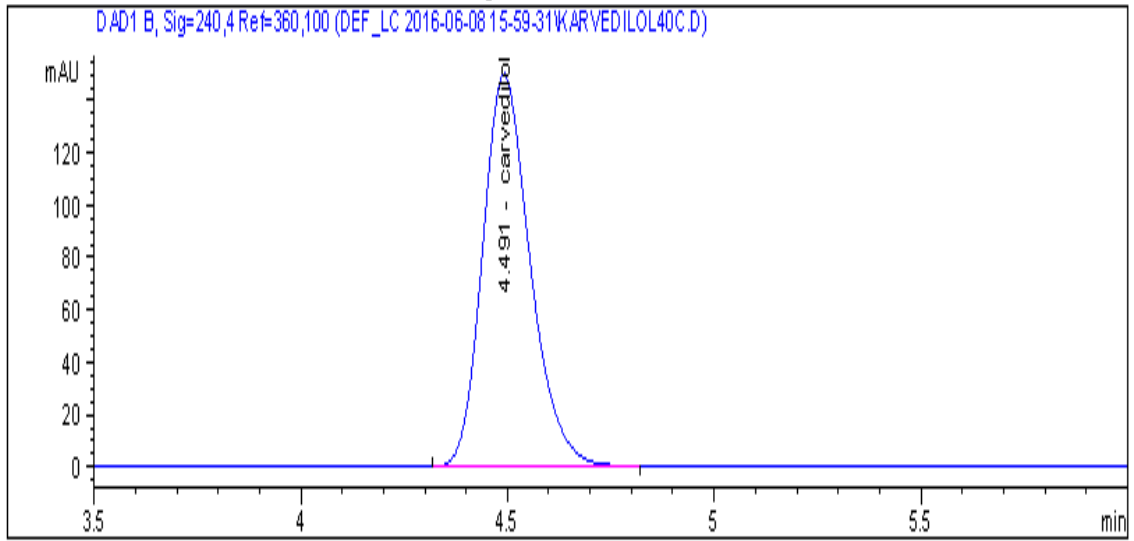
Şekil 4.23. Kolon sıcaklığının 25 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



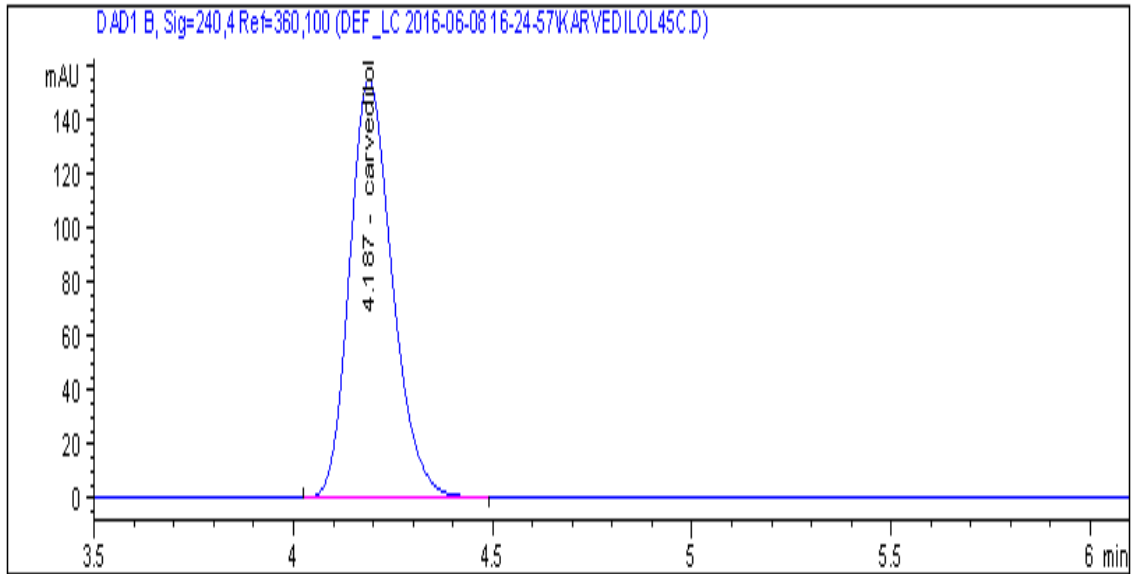
Şekil 4.24. Kolon sıcaklığının 30 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



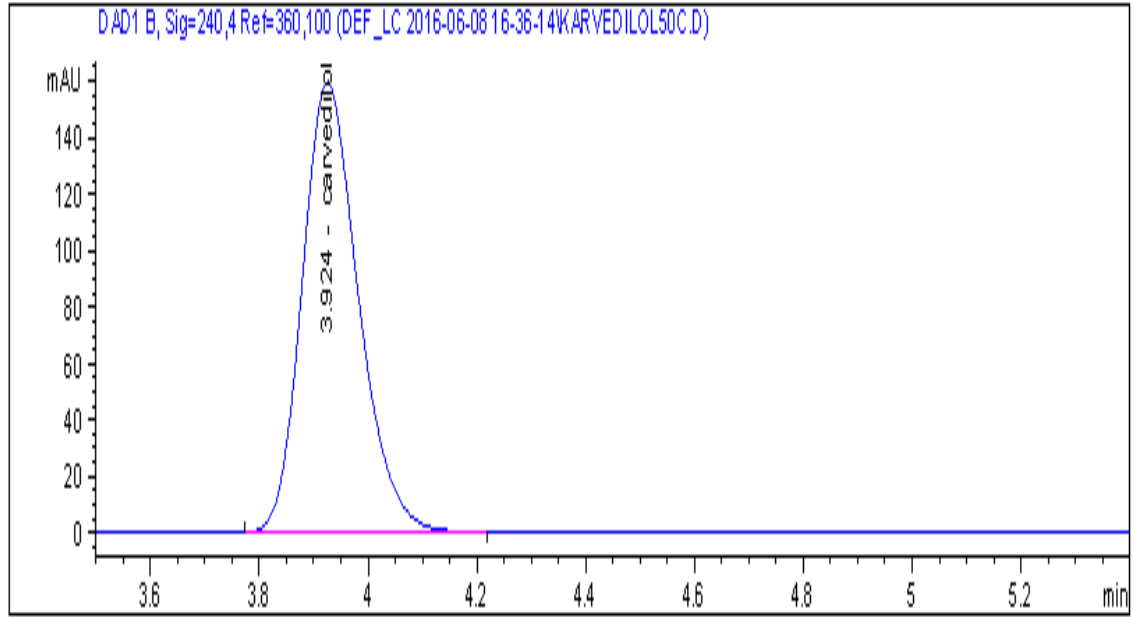
Şekil 4.25. Kolon sıcaklığının 35 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.26. Kolon sıcaklığının 40 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.27. Kolon sıcaklığının 45 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.28. Kolon sıcaklığının 50 °C olduğu durumda elde edilen HPLC kromatogramı

Deneysel çalışmalarda kullanılan kolon sıcaklıklarıyla ilgili sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kolon sıcaklığının optimizasyonu için kullanılan sıcaklık değerlerinin karşılaştırılması

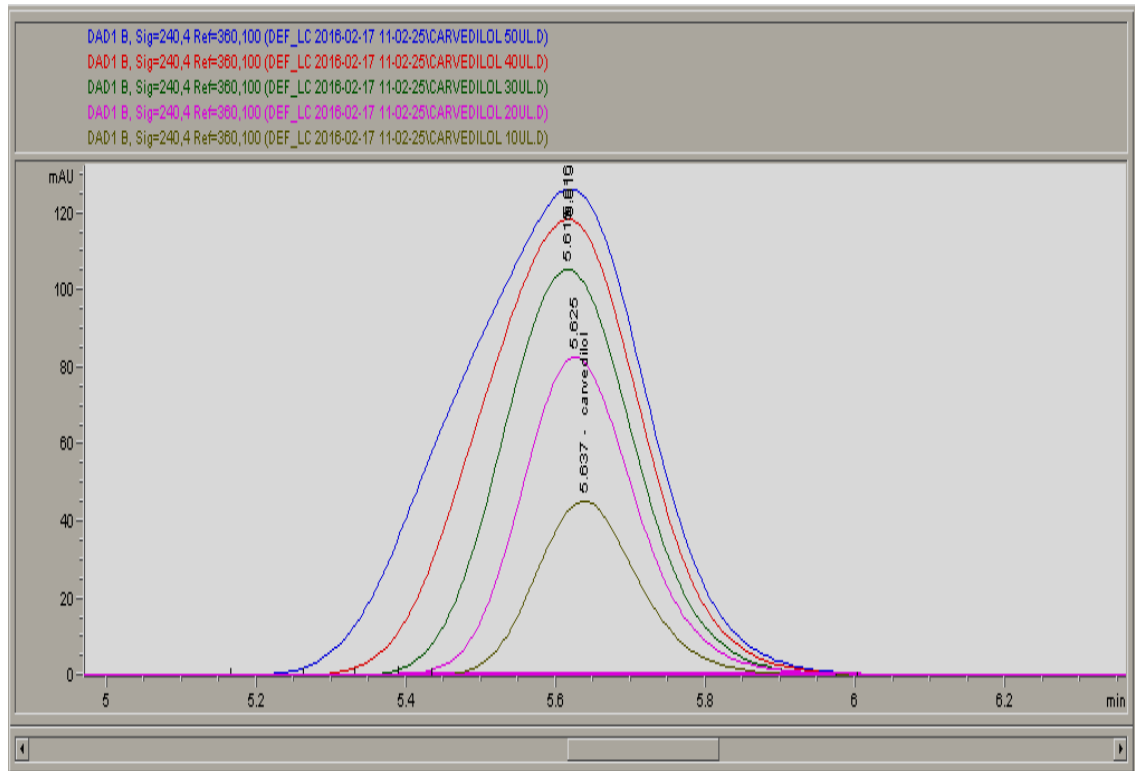
Etken madde	Sıcaklık (°C)	Pik alanı	USP kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alıkonma zamanı (dk)
KARVEDILOL	25	1202	1,177	8295	5,611
	30	1201	1,209	8051	5,210
	35	1199	1,240	7862	4,822
	40	1200	1,232	7760	4,491
	45	1151	1,213	7743	4,187
	50	1143	1,230	7314	3,924

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40 °C sıcaklıkta pik alanında neredeyse hiçbir değişiklik olmamıştır. Ancak, sıcaklık 40 °C'nin üzerine çıktığında pik alanı azalmaya başlamıştır. USP kuyruklanma faktörünün en az olduğu sıcaklığın 25 °C; en fazla olduğu sıcaklığın ise 35 °C olduğu görülmüştür. Kolonun verimliliğinin bir ölçüsü olan teorik plaka sayısı (N), sıcaklığın artmasıyla birlikte azalmıştır. Alıkonma zamanı da sıcaklığın artmasıyla birlikte doğal olarak azalmıştır. Kolon sıcaklığı olarak kolonun en verimli olduğu, kuyruklanmanın en az olduğu ve pik alanının en fazla olduğu 25 °C seçilmiştir.

Literatür taraması sonucunda, karvedilolun HPLC ile analizinde kolon sıcaklığı olarak genellikle 25 °C'nin belirlendiği görülmektedir. Basaveswara vd (2012), Ketema ve Sankar (2012), Madishetty vd (2015), Rele (2015) ve Suganthi ve Ravi (2014) çalışmalarında kolon sıcaklığı olarak 25 °C'yi belirlemiştir. Bu çalışmaların dışında, Naidu vd (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kolon sıcaklığı olarak 50 °C kullanılmıştır. Dey vd (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise kolon sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda belirlenen kolon sıcaklığının literatür taramasında elde edilen genel sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

4.2.5. Optimum enjeksiyon hacmi

Enjeksiyon hacmi olarak 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL denenmiştir. 50 µL enjeksiyon hacminde pik şeklinin bozulması, 20 µL ve 30 µL'lik enjeksiyonlarda temel hat çizgisinin bozuk olması nedeniyle enjeksiyon hacmi 40 µL olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Enjeksiyon hacminin 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL olduğu durumlarda elde edilen karvedilol piklerinin karşılaştırılması

4.3. Metot Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Metodun seçicilik, kesinlik, tekrarlanabilirlik, doğruluk, doğrusallık, kısa ve uzun dönem kararlılık, tespit limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) parametreleriyle validasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sistem uygunluk testleri ve sağlamlık testleri de yapılmıştır.

4.3.1. Doğruluk parametresi

Doğruluk parametresini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Doğruluk parametresi ile ilgili analiz sonuçları

Numune	Derişim (ng/mL)	Ortalama pik alanı (n=3)	Bulunan ortalama derişim (ng/mL) n=3	% Geri kazanım
1	100	7,49	101,80	101,80
2	200	15,45	196,97	98,49
3	300	24,06	299,46	99,82
4	400	35,11	400,12	100,03
5	500	45,71	499,27	99,85
6	600	55,83	599,01	99,84
7	700	63,77	698,82	99,83
8	800	76,30	797,73	99,72
9	900	88,55	898,63	99,85
10	1000	101,55	990,99	99,10
Ortalama (n=10)				99,83
Standart sapma				0,84
% RSD				0,84

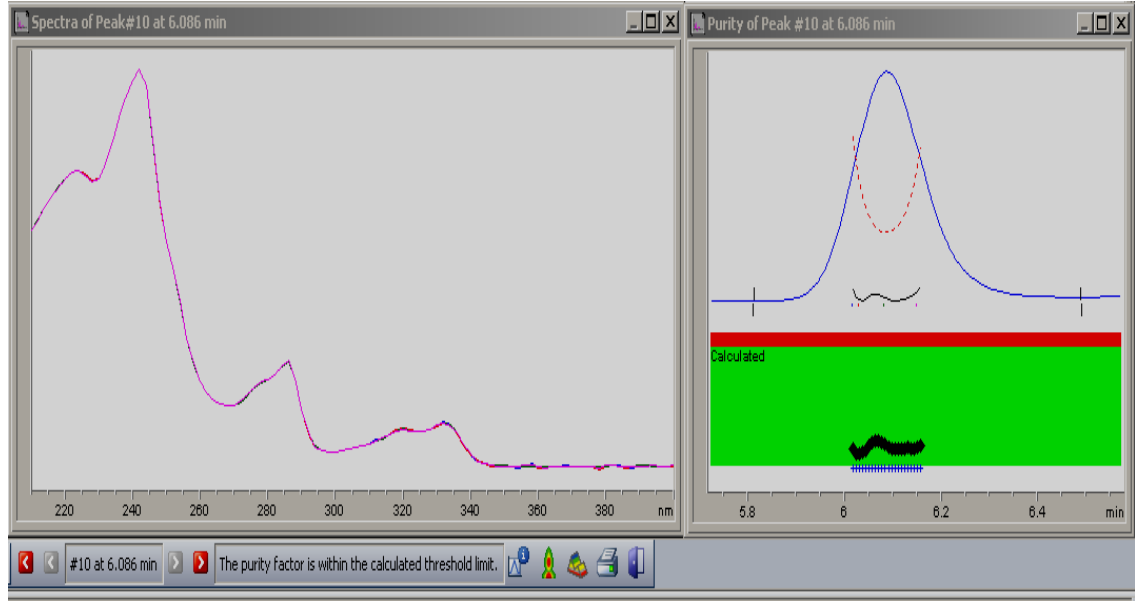
Doğruluk, Eşitlik 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Doğruluk} = \text{Ortalama} \pm \text{Standart Sapma} \quad (4.3)$$

Eşitlik 4.3'e göre; doğruluk değeri $99,83 \pm 0,84$ olarak belirlenmiştir.

4.3.2. Seçicilik parametresi

Kör numune, karvedilol standart çözeltisi ve karvedilol içeren insan serum numuneleri cihaza verilmiştir. Chemstation programının pik saflığı özelliği ile numunenin saflığı teyit edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Chemstation yazılımının pik saflığı özelliği kullanılarak numune saflığının tespiti

Pik saflığı özelliği, kromatogramdaki herhangi bir pikin saf olup olmadığını belirlememizi sağlamaktadır. Ayırmanın temel gerekliliklerinden bir tanesi de kromatogramdaki analitlere ait piklerin saflığını doğrulamaktır. Pik yanıtına etki edecek herhangi bir safsızlığın bulunmadığından emin olmak gerekmektedir. Çünkü analite ait pikin altında kalan herhangi bir safsızlık analiz sonuçlarında hataya neden olmaktadır. Valide edilmiş metotlarda, genellikle pik saflığının kontrolü validasyon kriterlerinin ana unsurlarındandır (<http://www.agilent.com/cs/library/applications/5988-8647EN.pdf>). Seçicilik çalışması sonucunda, insan serumundaki bileşenlerin karvedilol ile herhangi bir girişim yapmadığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.5).

α (seçicilik faktörü) değeri, Eşitlik 4.4 ve Eşitlik 4.5 kullanılarak hesaplanmıştır. α değeri, metodun seçiciliğinin bir ölçüsüdür ve α değerinin 1'den büyük olması beklenir.

$$k \text{ (Kapasite faktörü)} = \frac{(t - t_0)}{t_0} \quad (4.4)$$

Eşitlikteki k , kapasite faktörü; t , analitin alıkonma zamanı ve t_0 , kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanıdır.

$$\alpha \text{ (Seçicilik faktörü)} = \frac{k_2}{k_1} \quad (k_2 > k_1) \quad (4.5)$$

Eşitlikteki k_2 , karvedilole ait kapasite faktörü ve k_1 , iç standarta (propranolol) ait kapasite faktörüdür.

Çalışmada seçicilik faktörü değeri;

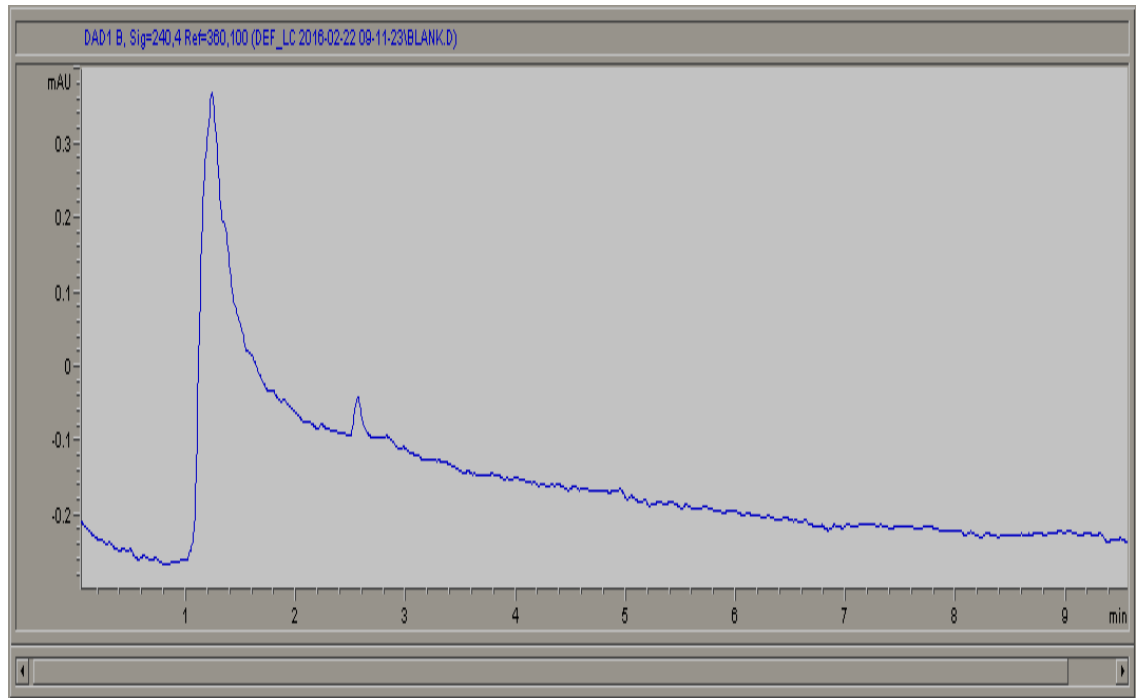
$$\alpha \text{ (Seçicilik faktörü)} = \frac{t_{\text{karvedilol}} - t_0}{t_{\text{istd}} - t_0} \implies \alpha = \frac{5,77 - 1,17}{2,84 - 1,17} = 2,75$$

olarak saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.33). Bu sonuç, metodun seçiciliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

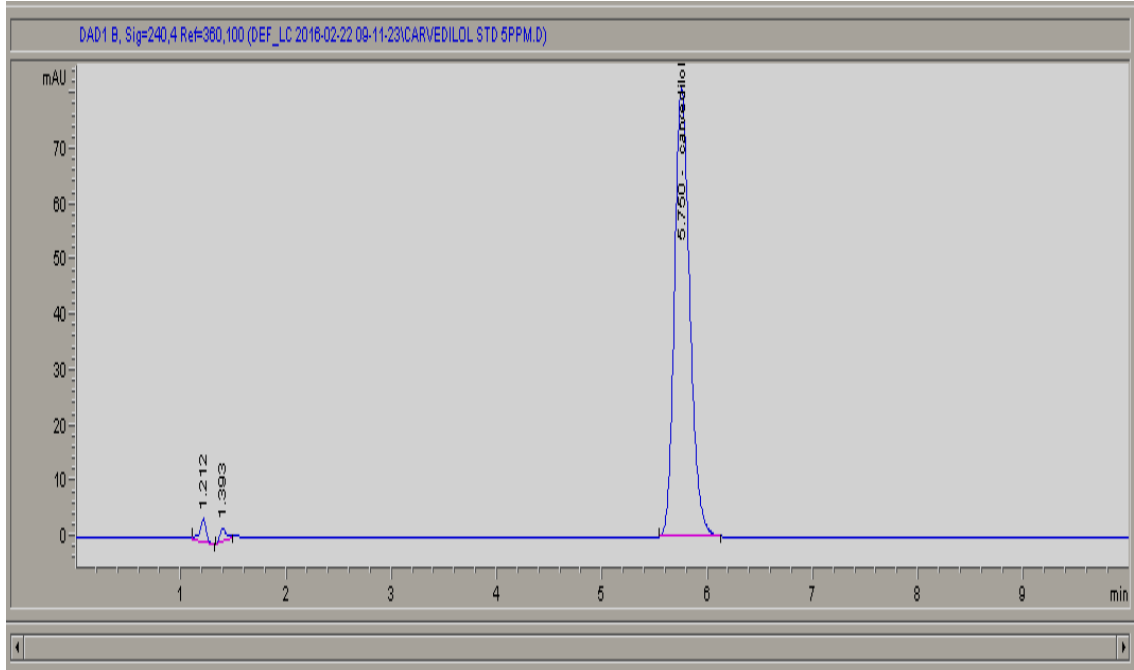
Çizelge 4.5. Seçicilik çalışması

Çözeltinin adı	Alınma zamanı (dk)
Kör numune	Pik yok
Karvedilol standart çözeltisi	5,75
Karvedilol içeren serum numunesi	5,77

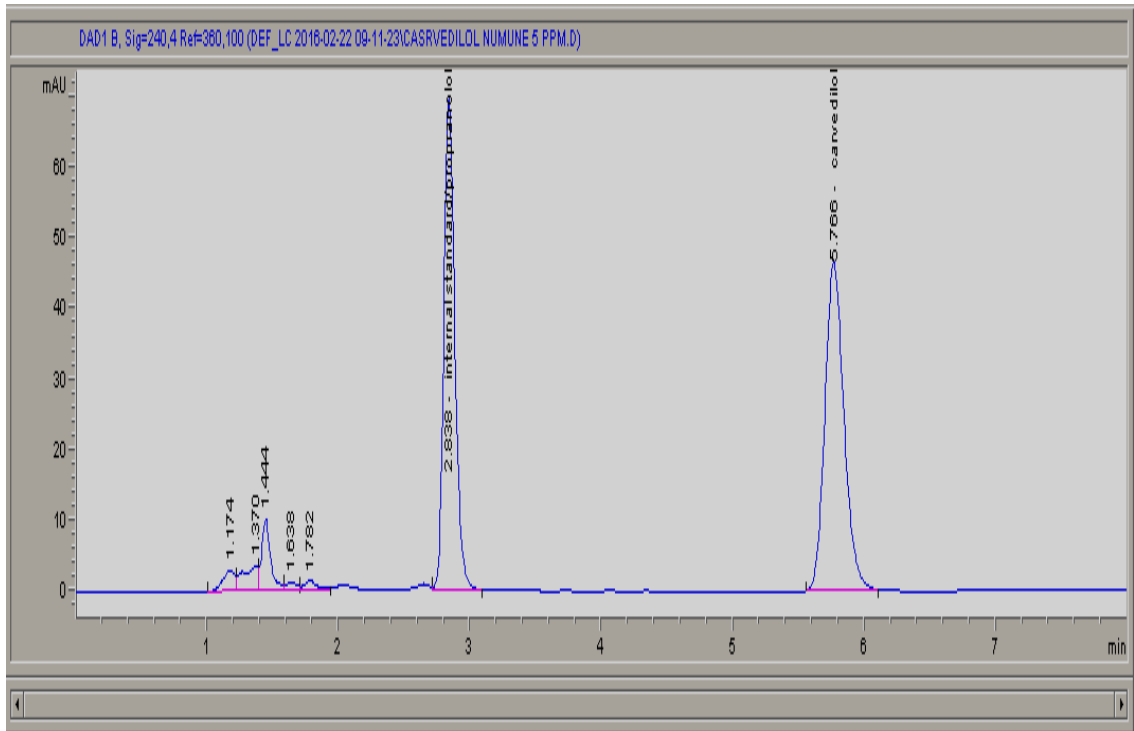
Seçicilik çalışmasında elde edilen kromatogramlar, kör numune, karvedilol standart çözeltisi ve karvedilol içeren serum numunesi için sırasıyla Şekil 4.31'de, Şekil 4.32'de ve Şekil 4.33'te gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Seçicilik çalışmasında kullanılan kör numunenin kromatogramı



Şekil 4.32. Seçicilik çalışmasında kullanılan carvedilol standardının kromatogramı



Şekil 4.33. Seçicilik çalışmasında kullanılan carvedilol içeren serum numunesinin kromatogramı

4.3.3. Kesinlik parametresi

Kesinlik, aynı koşullar altında elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecesi olarak tanımlanmaktadır. Kesinlik, genellikle elde edilen sonuçların standart sapması cinsinden ifade edilmektedir. Sonuçların standart sapma değeri ne kadar küçükse analizin kesinliği o kadar yüksektir. Kesinlik, analitin konsantrasyonuna ve kullanılan metoda önemli ölçüde bağlıdır (Fajgelj ve Ambrus 2000).

4.3.3.1. Gün içi kesinlik değeri

Gün içi kesinliği belirleyebilmek için düşük, orta ve yüksek derişimli karvedilol numuneleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Gün içi kesinlik ile ilgili analiz sonuçları

1. Gün	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Düşük derişim (300 ppb)	Enjeksiyon-1	5,607	20,10
	Enjeksiyon-2	5,609	20,10
	Enjeksiyon-3	5,629	19,98
Standart sapma		0,012	0,069
% RSD		0,22	0,34
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Orta derişim (1000 ppb)	Enjeksiyon-1	5,615	77,1
	Enjeksiyon-2	5,617	76,8
	Enjeksiyon-3	5,617	76,7
Standart sapma		0,001	0,208
% RSD		0,02	0,27
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Yüksek derişim (4000 ppb)	Enjeksiyon-1	5,618	392,7
	Enjeksiyon-2	5,619	393,3
	Enjeksiyon-3	5,629	393,6
Standart sapma		0,0061	0,458
% RSD		0,11	0,12

Çizelge 4.6'ya göre, 300 ppb, 1000 ppb ve 4000 ppb'lik karvedilol numuneleri için pik alanına ait % RSD değerleri sırasıyla 0,34, 0,27 ve 0,12 olarak bulunmuştur. % RSD değerlerinin düşük olması, metodun gün içi kesinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

4.3.3.2. Günler arası kesinlik değeri

Günler arası kesinliği belirleyebilmek için düşük, orta ve yüksek derişimli karvedilol numuneleri üç farklı günde cihaza verilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmektedir (1. günde elde edilen sonuçlar için Bkz. Çizelge 4.6).

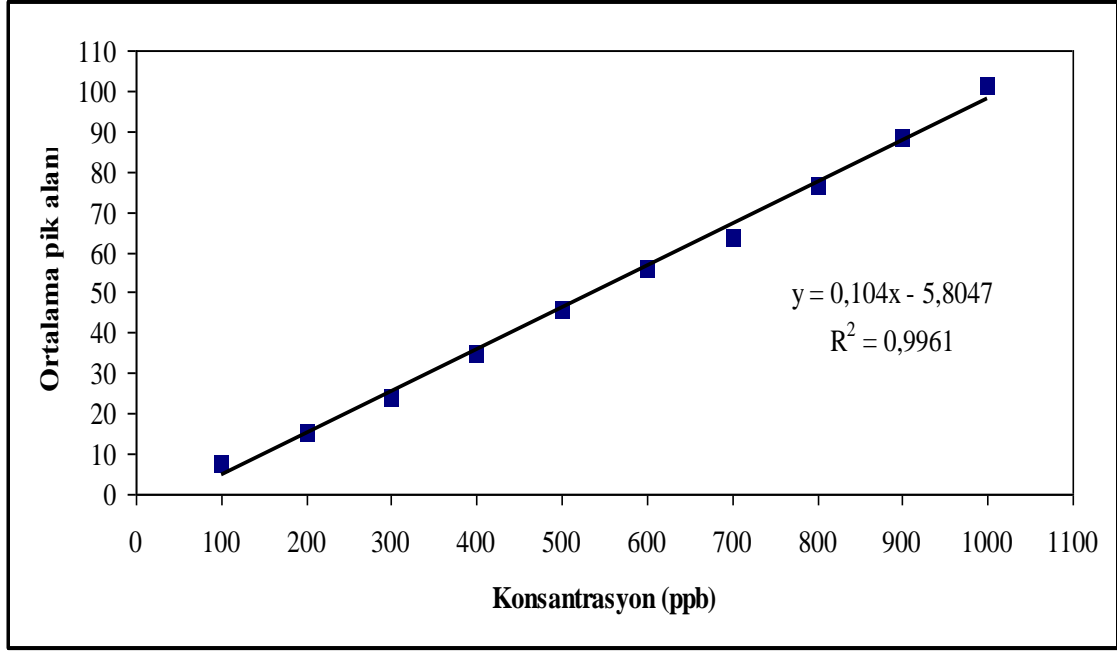
Çizelge 4.7. Günler arası kesinlik ile ilgili analiz sonuçları

2. Gün			
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Düşük derişim (300 ppb)	Enjeksiyon-1	5,586	19,9
	Enjeksiyon-2	5,585	19,8
	Enjeksiyon-3	5,588	19,7
Standart sapma		0,002	0,1
%RSD		0,03	0,51
Orta derişim (1000 ppb)			
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Orta derişim (1000 ppb)	Enjeksiyon-1	5,590	76,8
	Enjeksiyon-2	5,592	76,7
	Enjeksiyon-3	5,595	76,6
Standart sapma		0,003	0,1
%RSD		0,05	0,13
Yüksek derişim (4000 ppb)			
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Yüksek derişim (4000 ppb)	Enjeksiyon-1	5,596	392,9
	Enjeksiyon-2	5,598	392,9
	Enjeksiyon-3	5,600	393,2
Standart sapma		0,002	0,173205
%RSD		0,04	0,04
3. Gün			
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Düşük derişim (300 ppb)	Enjeksiyon-1	5,587	19,8
	Enjeksiyon-2	5,589	19,8
	Enjeksiyon-3	5,588	19,8
Standart sapma		0,001	0
%RSD		0,02	0
Orta derişim (1000 ppb)			
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Orta derişim (1000 ppb)	Enjeksiyon-1	5,588	76,7
	Enjeksiyon-2	5,589	76,6
	Enjeksiyon-3	5,591	76,5
Standart sapma		0,002	0,1
%RSD		0,03	0,13
Yüksek derişim (4000 ppb)			
	Enjeksiyon numarası	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı
Yüksek derişim (4000 ppb)	Enjeksiyon-1	5,591	391,8
	Enjeksiyon-2	5,594	391,9
	Enjeksiyon-3	5,595	391,7
Standart sapma		0,002	0,1
%RSD		0,04	0,03

Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7 incelendiğinde, 300 ppb, 1000 ppb ve 4000 ppb'lik karvedilol numuneleri için pik alanına ait % RSD değerleri 0 – 0,51 arasında değişmektedir. % RSD değerlerinin düşük olması, metodun günler arası kesinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

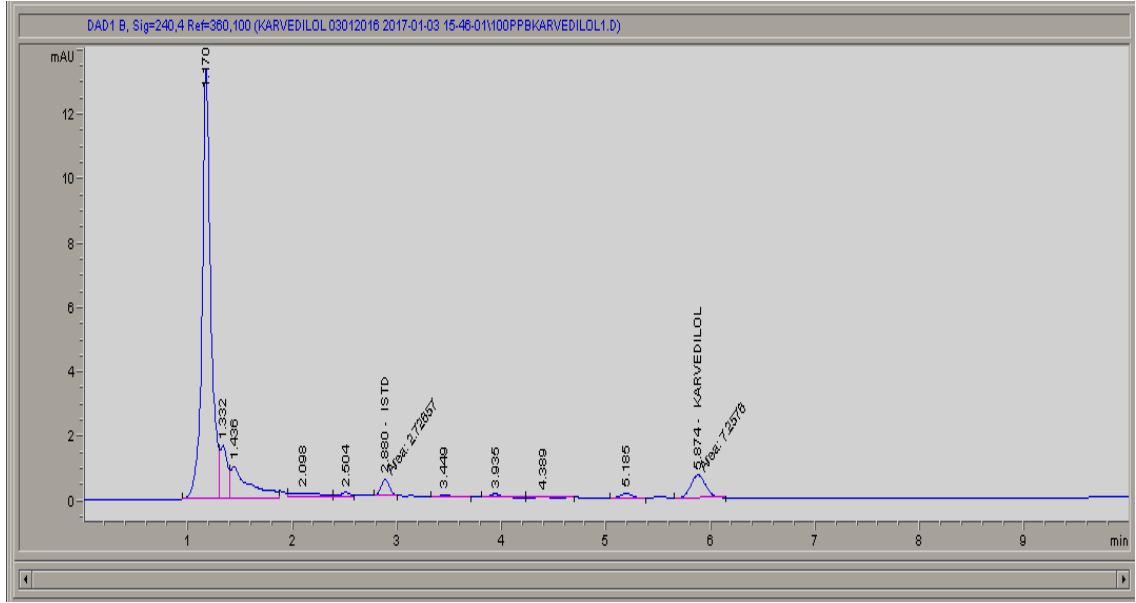
4.3.4. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi

Doğrusallık çalışmasında karvedilol için 10 farklı konsantrasyon ve her bir konsantrasyon seviyesinde 3 tekrar yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Herbir karvedilol konsantrasyonu için elde edilen ortalama pik alanı değerlerine karşı konsantrasyon verilerinin grafiğe geçirilmesiyle çizilen doğrusallık grafiği Şekil 4.34'te gösterilmiştir.

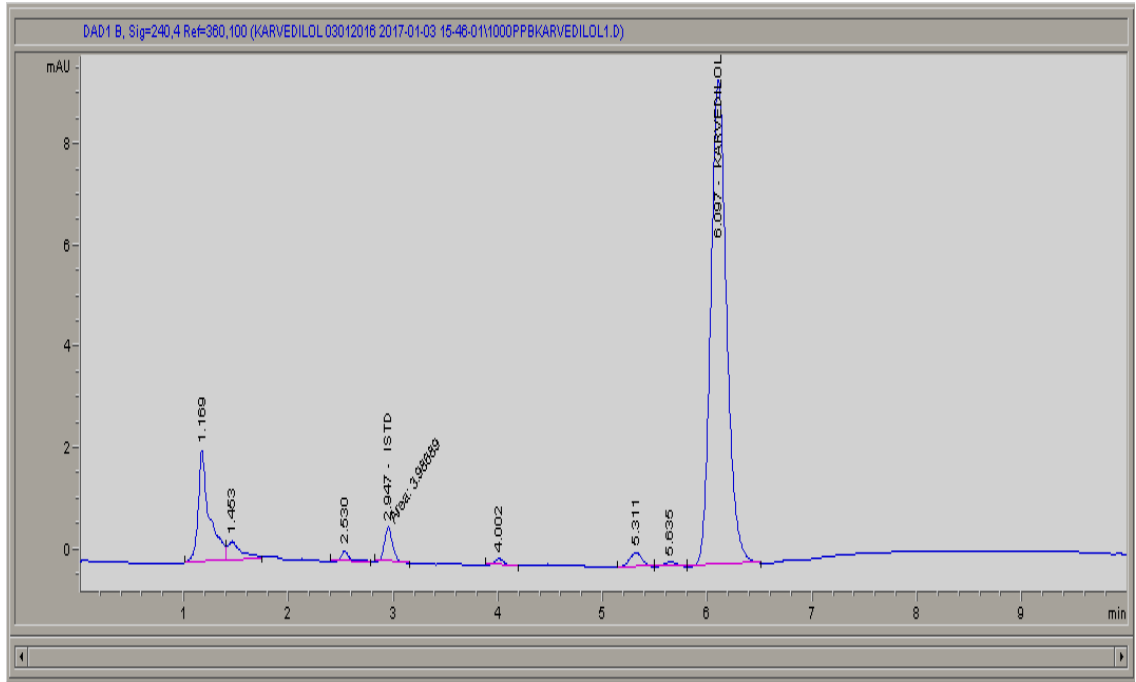


Şekil 4.34. Karvedilol analizinde kullanılan doğrusallık grafiği

Kullanılan metot, karvedilol için çalışılan 100-1000 ppb'lik konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermektedir. 100 ppb'lik karvedilol numunesine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.35'te ve 1000 ppb'lik karvedilol numunesine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



Şekil 4.35. 100 ppb karvedilol numunesinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.36. 1000 ppb karvedilol numunesinin HPLC kromatogramı

4.3.5. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması

Karvedilol analizinde kullanılan doğrusallık grafiğinden LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır.

$$y = mx + n \quad (4.6)$$

Eşitlik 4.6'daki m, eğimi; n ise kayım değerini ifade etmektedir. Buna göre; Çizelge 4.8'de gösterildiği gibi m (eğim) değeri 0,104; n (kayım) değeri ise -5,8047'dir.

Çizelge 4.8. Karvedilolun doğrusallık grafiği için regresyon istatistikleri

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,99804					
R Kare	0,996084					
Ayarlı R Kare	0,995595					
Standart Hata	2,093519					
Gözlem	10					
ANOVA						
	df	SS	MS	F	Anlamlılık F	
Regresyon	1	8919,04	8919,04	2034,999	6,44E-11	
Fark	8	35,06259	4,382823			
Toplam	9	8954,103				
	Katsayılar	Standart Hata	t Stat	P-değeri	Düşük %95	Yüksek %95
Kayım	-5,80467	1,430146	-4,05879	0,00364	-9,10259	-2,50674
X Değişkeni 1	0,103976	0,002305	45,11096	6,44E-11	0,098661	0,109291

LOD ve LOQ değerleri, sırasıyla Eşitlik 4.7 ve Eşitlik 4.8 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \times (\text{Kayımın standart sapması}/\text{Grafiğin eğimi}) \quad (4.7)$$

$$LOD = 3,3 \times \frac{1,43}{0,104} = 45,38 \text{ ppb}$$

$$LOQ = 10 \times (\text{Kayımın standart sapması}/\text{Grafiğin eğimi}) \quad (4.8)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{1,50}{0,081} = 137,50 \text{ ppb}$$

Eşitlik 4.7'ye göre LOD değeri 45,38 ppb ve Eşitlik 4.8'e göre LOQ değeri de 137,50 ppb olarak belirlenmiştir.

4.3.6. Kısa ve uzun dönem kararlılık testleri

4.3.6.1. Kısa dönem kararlılık testi sonuçları

Kısa dönem kararlılık testleri için, kontrol numunesinin oto-örnekleyicide 24 °C'de 0., 18., 24., 42. ve 48. saatlerdeki pik alanları kıyaslanmış ve Çizelge 4.9' daki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. Kısa dönem kararlılık testi sonuçları

Kısa dönem kararlılık	
Zaman	Pik alanı
0. saat	834,26
18. saat	838,76
24. saat	836,30
42. saat	834,54
48. saat	832,69
Standart sapma	2,32
Ortalama	835,31
% RSD	0,28

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi, çalışılan zaman aralıklarında karvedilol kontrol numunesinin pik alanlarında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Yüzde bağıl standart sapma (% RSD) değerinin düşük olması karvedilolun 24 °C'de en az 48 saat kararlı olduğunu göstermektedir.

4.3.6.2. Uzun dönem kararlılık testi sonuçları

Uzun dönem kararlılık testleri için, numune 48 saat oto-örnekleyicide 24 °C'de bekletilmiş sonra -20 °C'de 28 gün boyunca bekletilmiş ve 3 defa dondur-çöz zincirine maruz bırakıldıktan sonra taze hazırlanmış numuneyle pik alanı bakımından kıyaslanmıştır. Çizelge 4.10'daki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. Uzun dönem kararlılık testi sonuçları

Uzun dönem kararlılık	
Analiz edilen numune	Pik alanı
Taze hazırlanmış numune	834,26
48 saat oto-örnekleyicide (24 °C) bekletilmiş, sonra -20 °C'de 28 gün boyunca tutulmuş ve 3 defa dondur-çöz zincirine maruz bırakılmış numune	833,60
Standart sapma	0,47
Ortalama	833,93
% RSD	0,06

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi, 48 saat oto-örnekleyicide (24 °C) bekletildikten sonra -20 °C'de 28 gün boyunca muhafaza edilen ve 3 defa dondur-çöz zincirine maruz bırakılan karvedilol kontrol numunesinin pik alanlarında neredeyse hiçbir değişim gözlenmemiştir. Yüzde bağıl standart sapma (% RSD) değerinin çok düşük olması karvedilolun -20 °C'de en az 28 gün boyunca kararlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, karvedilol numunesinin -20 °C'de 3 defa dondur-çöz zincirine maruz bırakılması da kararlılığını etkilememiştir.

4.3.7. Sağlamlık testleri

Sağlamlık testleri, mobil fazın pH'sında, mobil faz bileşiminde, metodun akış hızında ve sistem sıcaklığında küçük değişiklikler yapıldığında sonuçların çok fazla değişip değişmediğini belirlemek için yapılmaktadır. Sağlamlık testlerinin sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Karvedilol için sağlamlık testi sonuçları

Değişiklik yapılan parametre	Değişim sayısı	Pikin adı	Alıkonma zamanı (dk)	Pik alanı	Pik yüksekliği	Teorik plaka sayısı	USP kuyruklanma faktörü
Akış hızı	1	Karvedilol (1,5 mL/dk akış)	5,59	847,5	86,5	7876	1,18
	2	Karvedilol (1,3 mL/dk akış)	6,42	976,1	89,7	8374	1,20
	3	Karvedilol (1,7 mL/dk akış)	4,97	746,4	83,4	7497	1,15
Kolon sıcaklığı	1	Karvedilol (25°C)	5,59	847,5	86,5	7876	1,18
	2	Karvedilol (30°C)	5,19	844	92,1	7803	1,20
Mobil faz bileşimi	1	Karvedilol %1 TEA (pH=3,5 OPA ile ayarlanmış) :ACN (70:30)	5,59	847,5	86,5	7876	1,18
	2	Karvedilol %1 TEA (pH=3,5 OPA ile ayarlanmış) :ACN (80:20)	39,31	796,6	13,4	10117	1,12
Mobil faz pH'sı	1	Karvedilol (pH=3,5)	5,59	847,5	86,5	7876	1,18
	2	Karvedilol (pH=3,0)	5,19	849,2	93	7800	1,17
	3	Karvedilol (pH=4,0)	5,57	845,9	86,1	7976	1,19

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi mobil fazın pH değerindeki küçük değişimlerin ($\pm 0,5$) metodun sağlamlığı üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Akış hızındaki küçük değişimlerin ($\pm 0,2$) metodun sağlamlığına etkisi çok düşüktür. Mobil faz bileşimindeki

küçük değişiklikler, kuyruklanma faktörü ve pik alanı üzerinde etkili olmamış, fakat alıkonma zamanı, pik yüksekliği ve teorik plaka sayısında önemli değişimlere neden olmuştur. Sonuç olarak, kullanılan metodun gerçekleştirilen değişimlerden çok fazla etkilenmediği ve sağlam olduğu gözlenmiştir.

4.3.8. Sistem uygunluk testleri

Sistem uygunluk testi, oluşturulan metodun analize uygunluğunu ve analiz için yeterli olup olmadığını belirlememizi sağlar. Sistem uygunluk testinin kabul kriterleri: kapasite faktörü $> 2,0$, kuyruklanma faktörü $\leq 2,0$ ve teorik plaka sayısı > 2000 'dir. Ayrıca, metodun tüm aşamalarında analitin pik alanının % RSD değeri 2,0'den küçük olmalıdır. Sistem uygunluk testi sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Karvedilol için sistem uygunluk testlerinin sonuçları

Parametre	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı (N)	Rezolüsyon (Rs)	Kapasite faktörü (k')	Seçicilik faktörü
Seçicilik çalışması	$< 1,22$	> 7791	$> 14,40$	$> 3,73$	$> 2,73$
Doğrusallık çalışması	$< 1,18$	> 7808	$> 14,17$	$> 3,83$	$> 2,73$
Kesinlik çalışması (gün içi)	$< 1,19$	> 7692	$> 14,13$	$> 3,76$	$> 2,74$

Çizelge 4.12'de görüldüğü üzere, kullanılan metot sistem uygunluk testi kabul kriterlerinin tamamını sağlamıştır ve insan serumu örneğinde karvedilol analizi için uygundur.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, diyot dizi (array) dedektöre (DAD) sahip ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle insan kanı serumunda karvedilol ilaç etken maddesinin analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- Çalışmalar sırasında çözügen olarak metanolün, asetonitrilin ve suyun; pH'ı ayarlamak için asetik asitin, formik asitin ve ortofosforik asitin; pik şeklini düzenlemek için ise trietilaminin kullanıldığı çok sayıda bileşim denenmiştir. Elde edilen pik şeklinin düzgün olması ve hazırlanışının kolay olması nedeniyle %1 TEA (pH=3,5 OPA ile ayarlanmış):ACN (70:30) bileşimi mobil faz olarak belirlenmiştir.
- Karvedilol analizi için 210 nm, 240 nm ve 254 nm olmak üzere üç farklı dalga boyu incelenmiş ve karvedilolun 240 nm'de maksimum absorbans verdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, metotta optimum dalga boyu değeri 240 nm olarak belirlenmiştir.
- 240 nm dalga boyunda band genişliği olarak 4, 8 ve 16 denenmiş ve karvedilol için en iyi sonuçlar band genişliğinin 4 olduğu durumda elde edilmiştir.
- Akış hızını optimize etmek için, Van Deemter eşitliği ve Chemstation yazılımının hesapladığı teorik plaka sayıları kullanılmış ve akış hızına karşı plaka yüksekliği grafiği çizilerek bir Van Deemter eğrisi elde edilmiştir. Van Deemter eğrisine göre, en ideal akış hızının 0,3 mL/dk olduğu tespit edilmiştir. 0,3 mL/dk'lık akış hızında karvedilolun alıkonma zamanının 26,84 dakika olması ve çalışmada analiz süresinin kısa olmasının amaçlanması nedeniyle karvedilolun alıkonma zamanının 5,56 dakika olduğu 1,5 mL/dk'lık akış hızı değeri metodun optimum akış hızı olarak belirlenmiştir.
- Optimum kolon sıcaklığını belirlemek için 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C olmak üzere 6 farklı sıcaklık denenmiştir. Optimum kolon sıcaklığı olarak kolonun en verimli olduğu, kuyruklanmanın en az olduğu ve pik alanının en fazla olduğu 25 °C belirlenmiştir.
- Optimum enjeksiyon hacmini belirlemek için enjeksiyon hacmi olarak 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL denenmiştir. 50 µL enjeksiyon hacminde pik şeklinin bozulması, 20 µL ve 30 µL'lik enjeksiyonlarda temel hat çizgisinin bozuk olması nedeniyle optimum enjeksiyon hacmi değeri 40 µL olarak belirlenmiştir.
- 100 ppb, 200 ppb, 300 ppb, 400 ppb, 500 ppb, 600 ppb, 700 ppb, 800 ppb, 900 ppb ve 1000 ppb derişimlerdeki 10 karvedilol çözeltisinin her biri üç kez tekrar edilmek suretiyle bir kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Yüzde geri kazanım oranları hesaplanmış ve doğruluk değerinin $99,83 \pm 0,84$ olduğu görülmüştür.

- Seçicilik çalışmasında kör numune, karvedilol standart çözeltisi ve karvedilol içeren insan serum numuneleri cihaza verilmiştir. İnsan serumundaki bileşenlerin karvedilol ile herhangi bir girişim yapmadığı tespit edilmiştir.
- Kesinliği belirlemek amacıyla düşük, orta ve yüksek derişimli (300 ppb, 1000 ppb ve 4000 ppb) karvedilol numuneleri için pik alanı bakımından gün içi ve günler arası yüzde bağıl standart sapmalarına bakılmıştır. Yüzde bağıl standart sapma değerleri gün içi kesinlik için 0,12 – 0,34 ve günler arası kesinlik için ise 0 – 0,51 aralığında bulunmuştur.
- Metot, deneysel çalışmalarda kullanılan 100 – 1000 ppb konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermektedir.
- Karvedilol analizinde kullanılan doğrusallık grafiğinden, tespit limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) değerlerinin sırasıyla 45,38 ppb ve 137,50 ppb olduğu saptanmıştır.
- Oluşturulan metot, sistem uygunluk gereksinimlerini karşılamaktadır. Metot, karvedilol analizine uygundur.
- Karvedilol kontrol numunesinin kısa dönem ve uzun dönem kararlılığı değerlendirilmiş ve pik alanlarının yüzde bağıl standart sapma değerleri belirlenmiştir. Kısa dönem ve uzun dönem kararlılık için, yüzde bağıl standart sapma değerleri sırasıyla 0,28 ve 0,06 olarak bulunmuştur. Bu durum, karvedilol çözeltisinin son derece kararlı olduğunu göstermektedir.
- Mobil faz bileşimindeki organik fazın oranının azaltılması, karvedilolun ve iç standardın alıkonma zamanlarında çok fazla değişime neden olurken; sıcaklık, akış hızı, mobil fazın pH'sındaki değişimler kullanılan metodun alıkonma zamanı, pik alanı, pik yüksekliği, teorik plaka sayısı ve USP kuyruklanma faktörü değerleri üzerinde çok fazla bir değişime neden olmamıştır. Yapılan değişimler değerlendirildiğinde sistemin sağlam olduğu görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- BARANOWSKA, I., MARKOWSKI and P., BARANOWSKI, J. 2009. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous analysis of 23 selected drugs belonging to different therapeutic groups in human urine samples. *Analytical Sciences*, 25: 1307–1313.
- BARANOWSKA, I. and KOWALSKI, B. 2010. The development of SPE procedures and an UHPLC method for the simultaneous determination of ten drugs in water samples. *Water Air Soil Pollution*, 211 (1): 417–425.
- BASAVESWARA, M.V., NAGENDRAKUMAR, A.V.D., YEDUKONDALU, M. and RAMAN, B.V. 2012. New validated RP-HPLC method for the estimation of carvedilol in pharmaceutical formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (2): 353–358
- BECHARA, V., SUBRAHMANYAM, E.V.S. and SHABARAYA, R. 2015. New analytical methods and their validation for the estimation of carvedilol in bulk and marketed formulation. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6: 421–424.
- BELAL, T.S., SHAALAN, R.A., EL YAZBI, F.A. and ELONSY, S.M. 2013. Validated stability-indicating HPLC–DAD determination of the antihypertensive binary mixture of carvedilol and hydrochlorothiazide in tablet dosage forms. *Chromatographia*, 76: 1707–1720.
- BERTHOD, A. and GARCIA-ALVAREZ-COQUE, C. 2000. Micellar Liquid Chromatography. Chromatic Science Series Volume 83, Marcel Dekker Inc., New York, p. 198.
- BLASCHKE, G., BEHN, F., MICHELS, S. and LAER, S. 2001. Separation of carvedilol enantiomers in very small volumes of human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Journal of Chromatography B*, 755: 111–117.
- BOOK W.M., 2002. Carvedilol: A nonselective β blocking agent with antioxidant properties. *Congestive Heart Failure*, 8: 173–175.
- DE BIEVRE, P. and GÜNZLER, H. 2003. Measurement Uncertainty in Chemical Analysis, Springer, p. 253, Heidelberg.
- DE NUCCI, G., ASTIGARRAGA, R.E.B., BORGES, N.C.C., MENDES, G.D., SILVA, D.O. and REZENDE, V.M. 2005. Quantification of carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: application to bioequivalence study. *Journal of Chromatography B*, 822: 253–262.

- DEY, S., KUMAR, D., SREENIVAS, S.A., SANDEEP, D. and CHOUDHARY, A. 2010. Analytical method development & validation of carvedilol by HPLC in bulk and dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, 3 (12): 3075–3077.
- DONG, M.V. 2006. Modern HPLC for Practicing Scientists, John Wiley & Sons, pp. 5–7, New Jersey.
- ELEZOVIC, A., PILIPOVIC, S., ELEZOVIC, A. and UZUNOVIC, A. 2015. Development and comparison of two HPLC methods, chiral and achiral, for determination of carvedilol content in tablets. *Pharmacia*, 18 (1): 30–35.
- FAJGELJ, A. and AMBRUS, A. 2000. Principles and Practices of Method Validation, The Royal Society of Chemistry, pp. 265–266, Cambridge.
- FURLONG, M.T., HE, B., MYLOTT, W., ZHAO, S., MARIANNINO, T., SHEN, J. and STOUFFER, B. 2012. A validated enantioselective LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of carvedilol and its pharmacologically active 4'-hydroxyphenyl metabolite in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70: 574–579.
- GANNU, R., YAMSANI, V.V. and MADHUSUDAN RAO, Y. 2007. New RP - HPLC method with UV - detection for the determination of carvedilol in human serum. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30 (11): 1677–1685.
- GE, R., LI, J., WANG, L., WANG, S., CHEN, M., GU, E. and HU, G. 2015. Simultaneous quantification of carvedilol and its metabolites in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and pharmacokinetic application. *Journal of Chromatography B*, 974: 138–146.
- GOMES, N.A., VAIDYA, V.V., PUDAGE, A.M., JOSHI, S.S., PAREKH, S.A. and TAMHANKAR, A.V. 2009. Application of a sensitive, rapid and validated LC-MS-MS method for the determination of carvedilol in human plasma. *Chromatographia*, 69 (1–2): 19–25.
- GREGSON, S.R. 2001. Heart Disease, Capstone Press, pp. 5–6, Minnesota.
- HANAI, T. 1999. HPLC: A Practical Guide, The Royal Society of Chemistry, p. 81, Cambridge.
- HARRIS, D.C. 2007. Quantitative Chemical Analysis. Freeman and Company, p. 572, New York.
- HO, W. F., STUART, B. and PRICHARD, E. 2003. Practical Laboratory Skills Training Guides High Performance Liquid Chromatography. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 1.

HOKAMA, N., HOBARA, N., KAMEYA, H., OHSHIRO, S. and SAKANASHI, M. 1999. Rapid and simple micro-determination of carvedilol in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 732: 233–238.

<http://laboratoryinfo.com/hplc/> [16.06.2016]

<http://www.agilent.com/cs/library/applications/5988-8647EN.pdf> [18.08.2016]

<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=10713> [21.03.2016]

<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15847> [21.03.2016]

<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855> [21.03.2016]

IBRAHIM, M.M. 2015. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of carvedilol, glimepiride or glibenclamide in binary combinations; and its application for in vitro - interaction studies. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (8): 2791–2802.

JONG de, J., BAST, A. and VIJGH van der, W.J.F. 1993. TRAC: Trend in Analytical Chemistry. Vol.=12, Elsevier Science Publishing Company, New York, p. 426.

JOUYBAN, A., SHADJOU, N., HASANZADEH, R., SAGHATFOROUSH, L. and MEHDIZADEH, R. 2011. Electrochemical behavior of atenolol, carvedilol and propranolol on copper-oxide nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 58: 336–347.

KETEMA, G. and SANKAR, D.G. 2012. RP-HPLC method for estimation of carvedilol in pharmaceutical dosage forms. *American Journal of Pharmtech Research*, 2(3): 514–521.

KRISTOFFERSEN, L., ØIESTAD, E.L., OPDAL, M.S., KROGH, M., LUNDANES, E. and CHRISTOPHERSEN, A.S. 2007. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry: Method development and robustness testing by experimental design. *Journal of Chromatography B*, 850 (1): 147–160.

LAER, S., BEHN, F. and SCHOLZ, H. 2001. Determination of carvedilol in human cardiac tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 39: 121–124.

LAMPRECHT, G. and STOSCHITZKY, K. 2004. Determination of carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography applying on-line deproteination and column switching. *Chromatographia*, 59: 551–554.

- LEE, H.S., JEONG, D.W., KIM, Y.H., JI, H.Y., YOUN, Y.S. and LEE, K.C. 2007. Analysis of carvedilol in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44: 547–552.
- LINDSAY, S. 1992. High Performance Liquid Chromatography, John Wiley&Sons, p. 80, West Sussex.
- MADISHETTYA, V.K., BONTNAB, V.K. and RAO D, S. 2015. Quantification of carvedilol in various lipids by RP- HPLC/UV method: application in development of lipid based drug delivery systems. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5 (3): 129–135.
- MAGIERA, S., BARANOWSKA, I. and KUSA, J. 2012. Development and validation of UHPLC-ESI-MS/MS method for the determination of selected cardiovascular drugs, polyphenols and their metabolites in human urine. *Talanta*, 89: 47–56.
- MAGIERA, S., ADOLF, W. and BARANOWSKA, I. 2013. Simultaneous chiral separation and determination of carvedilol and 5'-hydroxyphenyl carvedilol enantiomers from human urine by high performance liquid chromatography coupled with fluorescent detection. *Central European Journal of Chemistry*, 11 (12): 2076–2087.
- MAROSI, G., NAGY, B., FARKAS, A., BALOGH, A., PATAKI, H., VAJNA, B. and NAGY, Z.K. 2016. Quantification and handling of nonlinearity in Raman microspectrometry of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128: 236–246.
- MASI, A.N., SILVA, R.A., WANG, C.C. and FERNANDEZ, L.P. 2008. Flow injection spectrofluorimetric determination of carvedilol mediated by micelles. *Talanta*, 76: 166–171.
- McERLANE, K.M. and CLOHS, L. 2001. Development of a capillary electrophoresis assay for the determination of carvedilol enantiomers in serum using cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 545–554.
- McINTOSH, M.P., CARLSON, B.J., SCHORNO, K.S. and RAJEWSKI, R.A. 2007. Single quadrupole mass spectrometry for pre-clinical pharmacokinetic analysis: Quantitation of carvedilol in dog plasma. *Journal of Chromatography B*, 852: 665–668.
- McPOLIN, O. 2009. An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis, Mourn Training Services, pp. 11–12, Warrenpoint.
- MOFFAT, A.C., OSSELTON, M.D., WIDDOP, B. and GALICHET, L.Y. 2004. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3. Baskı, Pharmaceutical Press, pp. 1053–1054, Londra.

- MOLDOVEANU, S.C. and DAVID, V. 2013. Essentials in Modern HPLC Separations, p. 2, Elsevier Inc., Atlanta.
- MOSCOU, K. and SNIPE, K. 2013. Pharmacology for Pharmacy Technicians, Elsevier, pp. 354–357, Missouri.
- MYUNG, S-W. and JO, C-H. 2005. Gas chromatograph-mass spectrometric method for the determination of carvedilol and its metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, 822: 70–77.
- NAIDU, N.V., REDDY, M.R.M. and NAIDU, K.B. 2014. Development and validation of RP-HPLC method for determination of carvedilol in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Der Pharmacia Lettre*, 6 (6): 198–206.
- OMMATY, R. 2006. Vademecum Modern İlaç Rehberi+ATC Index. 30. baskı, Medical Tribune Yayıncılık, İstanbul, 534 s.
- PADH, H., RATHOD, R., PRASAD, L.P.C., RANI, S. and NIVSARKAR, M. 2007. Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC-fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 857: 219–223.
- PAL, S.L., JANA, U., MOHANTA, G.P. and MANNA, P.K. 2013. Method development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method to determine carvedilol in pharmaceutical formulations. *Der Pharmacia Sinica*, 4 (6): 22–27.
- PATEL, H. and JIVANI N. 2015. Development of validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of carvedilol and ivabradine. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (5): 630–639.
- PATEL, D.P., SHARMA, P., SANYAL, M., SINGHAL, P. and SHRIVASTAV, P.S. 2013. UPLC-MS/MS assay for the simultaneous quantification of carvedilol and its active metabolite 4'-hydroxyphenyl carvedilol in human plasma to support a bioequivalence study in healthy volunteers. *Biomedical Chromatography*, 27 (8): 974–986.
- PTACEK, P., MACEK, J. and KLIMA, J. 2003. Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 789: 405–410.
- RANI, Y.N., KUMAR, B.V.V.R. and MOHANTY, S. 2013. Development and validation of new analytical methods for the estimation of carvedilol in bulk and pharmaceutical dosage. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6 (2): 138–140.
- REIFF, K. 1987. High-performance liquid chromatographic method for the determination of carvedilol and its desmethyl metabolite in body fluids. *Journal of Chromatography*, 413: 355–362.

- RELE, R.V. 2015. Reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of carvedilol hydrochloride from active pharmaceutical dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7 (1): 237–241.
- SAAD, B., MAKAHLEH, A. and YAP, H.F. 2015. Vortex-assisted liquid-liquid-liquid microextraction (VALLLME) technique: A new microextraction approach for direct liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis. *Talanta*, 143: 394–401.
- SAITO, M., KAWANA, J., OHNO, T., KANEKO, M., MIHARA, K., HANADA, K., SUGITA, R., OKADA, N., OOSATO, S., NAGAYAMA, M., SUMIYOSHI, T. and OGATA, H. 2006. Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 843 (1): 73–77.
- SANTOS, J.L.M., PIRES, C.K., MARQUES, K.L., LAPA, R.A.S., LIMA, J.L.F.C. and ZAGATTO, E.A.G. 2005. Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system. *Talanta*, 68: 239–244.
- SCHIRMER, R.E. 1991. *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis Volume II*. 2nd Edition, CRC Press, California, p. 311.
- SCHULZ, M. and SCHMOLDT, A. 2003. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie*, 58 (7): 447–474.
- SOLEYMANPOUR, A. and GHASEMIAN, M. 2015. Chemically modified carbon paste electrode for determination of sulfate ion by potentiometric method. *Measurement*, 59: 14–20.
- SRIPALAKIT, P., KAEWNOK, S. and TUBTONGLANG, S. 2010. Development of carvedilol assay in tablet dosage form using HPLC with fluorescence detection. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4 (01): 8–19.
- STOJANOVIC, J., VLADIMIROV, S., MARINKOVIC, V., VELICKOVIC, D. and SIBINOVIC, P. 2007. Monitoring of the photochemical stability of carvedilol and its degradation products by the RP-HPLC method. *Journal of Serbian Chemical Society*, 72 (1): 37–44.
- SUGANTHI, A. and RAVI, T.K. 2014. Development of RP-HPLC methods for the estimation of nebivolol and carvedilol with selected NSAIDs and its application to drug displacement interaction studies. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12 (1): 47–65.
- SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. 2012. *Handbook of Analytical Validation*, CRC Press, Boca Raton, p. 61.

ŞANLI, N., ŞAHİN, S., KAYNAK, M.S. and ŞİMŞEK, F.Ö. 2012. Determination of amlodipine and furosemide with newly developed and validated RP-HPLC method in commercially available tablet dosage forms. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 32 (2): 145–158.

Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH harmonized tripartite guideline. 2005.

WANG, H.Y., XU, L.X., HUI, N. and MA, L.Y. 2005. Study on fluorescence property of carvedilol and determination of carvedilol by fluorimetry. *Spectrochimica Acta Part A*, 61: 855–859.

XU, Z., SHAO, M., HUANG, Y., ZHENG, S., PAN, Y. and LI, T. 2016. Simultaneous quantification of vortioxetine, carvedilol and its active metabolite 4-hydroxyphenyl carvedilol in rat plasma by UPLC-MS/MS: Application to their pharmacokinetic interaction study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128: 184–190.

YILMAZ, B. and EKİNCİ, D. 2011. Voltammetric behavior of carvedilol in non-aqueous media and its analytical determination in pharmaceutical preparations. *Reviews in Analytical Chemistry*, 30: 187–193.

ZARET, B.L., MOSER, M. and COHEN, L.S. 1992. Yale University School of Medicine Heart Book, Hearst Books, pp. 3–20, New York.

ZARGHI, A., FOROUTAN, S.M., SHAFATI, A. and KHODDAM, A. 2007. Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection: application in pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (1): 250–253.

ÖZGEÇMİŞ



Kemal KAPLAN 1980 yılında Amasya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Amasya'da tamamladı. 1998 yılında kazandığı Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde geçirdiği iki yıldan sonra yatay geçişle geçtiği Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2002 yılında Kimyager olarak mezun oldu. 2013 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda başladığı Yüksek Lisans eğitimine halen devam etmektedir. 2003–2008 yılları arasında çeşitli dersanelerde Kimya Öğretmenliği yaptı. 2009 yılından beri Adli Tıp Kurumu Antalya Grup Başkanlığı, Kimya İhtisas Dairesi Başkanlığında Kimyager olarak görev yapmaktadır.