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

FARMASÖTİK TABLET FORMUNDA KARVEDİLOL ve TELMİSARTANIN FOSFORİMETRİK TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Ebru ÜNCÜOĞLU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Nusret ERTAŞ

ANKARA
Ocak 2009

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

FARMASÖTİK TABLET FORMUNDA KARVEDİLOL ve TELMİSARTANIN FOSFORİMETRİK TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Ebru ÜNCÜOĞLU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Nusret ERTAŞ

ANKARA
Ocak 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 16/01/2009

Prof. Dr. Nilgün G. Göğer
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel A. Özkan
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Nusret Ertaş
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
Kabul ve Onay		**I**
İçindekiler		**II**
Şekiller		**VII**
Tablolar		**IX**
Teşekkür		**XI**
1. GİRİŞ		**1**
2. GENEL BİLGİLER		**3**
2.1.	Hipertansiyon Hakkında Genel Bilgiler	**3**
2.2.	Antihipertansif İlaçların Sınıflandırılması	**4**
2.3.	Karvedilol ile İlgili Genel Bilgiler	**5**
2.3.1.	Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	**5**
2.3.2.	Farmakolojik Özellikleri	**6**
2.4.	Telmisartan ile İlgili Genel Bilgiler	**7**
2.4.1.	Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	**7**
2.4.2.	Farmakolojik Özellikleri	**8**
2.5.	Analiz Yöntemleri	**9**

2.5.1.	Karvedilol için Uygulanan Tayin Yöntemleri	**9**
2.5.1.1.	Spektral Yöntemler	**9**
2.5.1.2.	Kromatografik Yöntemler	**10**
2.5.1.3.	Voltametrik Yöntemler	**13**
2.5.2.	Telmisartan için Uygulanan Tayin Yöntemleri	**14**
2.5.2.1.	Spektral Yöntemler	**14**
2.5.2.2.	Kromatografik Yöntemler	**15**
2.5.2.3.	Elektroforetik Yöntemler	**18**
2.6.	Moleküler Lüminesans Spektroskopisi	**18**
2.6.1.	Singlet ve Triplet Uyarılmış Haller	**20**
2.6.2.	Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi	**21**
2.6.2.1.	Sönüm İşlemleri	**22**
2.6.2.2.	Fosforesans Sinyalinin Ölçülmesi ve Parametreler	**23**
2.6.2.3.	Floresans ve Fosforesansı Etkileyen Değişkenler	**24**
2.6.3.	Floresans ve Fosforesans Spektrofotometreleri	**26**
2.6.4.	Fosforimetrik Yöntemler	**28**
2.6.4.1.	Düşük Sıcaklıkta Fosforesans (LTP)	**29**
2.6.4.2.	Oda Sıcaklığında Fosforesans (RTP)	**30**

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	**35**
3.2.	Kullanılan Cihazlar	**35**
3.3.	Kullanılan Farmasötik Preparatlar	**36**
3.4.	Çözeltilerin Hazırlanması	**36**
3.4.1.	Karvedilol Stok Çözeltisi	**36**
3.4.2.	Telmisartan Stok Çözeltisi	**36**
3.4.3.	KI Çözeltisi	**37**
3.4.4.	Na_2SO_3 Çözeltisi	**37**
3.4.5.	Hegzadesiltrimetil Amonyum Bromür Çözeltisi	**37**
3.5.	Fosforimetrik Yöntem	**37**
3.5.1.	Karvedilolün Fosforimetrik Tayini	**37**
3.5.2.	Telmisartanın Fosforimetrik Tayini	**37**
3.5.3.	Fosforimetrik Yöntemin Karvedilol Tabletlerine Uygulanması	**38**
3.5.4.	Fosforimetrik Yöntemin Telmisartan Tabletlerine Uygulanması	**38**
3.6.	Optimize Edilen Koşullar	**39**
3.7.	Karşılaştırma Yöntemleri	**39**
3.7.1.	Karvedilol için Karşılaştırma Yöntemi	**39**

3.7.2. HPLC Yönteminin Karvedilol Tabletlerine Uygulanması **40**

3.7.3. Telmisartan için Karşılaştırma Yöntemi **40**

3.7.4. HPLC Yönteminin Telmisartan Tabletlerine Uygulanması **41**

4. BULGULAR **42**

4.1. Karvedilolün Spektral Özellikleri **42**

4.1.1. Karvedilol için Optimizasyon Çalışmaları **43**

4.1.1.1. Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu **43**

4.1.1.2. KI Derişiminin Optimizasyonu **44**

4.1.1.3. Na_2SO_3 Derişiminin Optimizasyonu **45**

4.1.1.4. pH Optimizasyonu **45**

4.2. Telmisartanın Spektral Özellikleri **46**

4.2.1. Telmisartan için Optimizasyon Çalışmaları **47**

4.2.1.1. Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu **47**

4.2.1.2. HTAB Derişiminin Optimizasyonu **48**

4.2.1.3. KI Derişiminin Optimizasyonu **50**

4.2.1.4. Na_2SO_3 Derişiminin Optimizasyonu **50**

4.2.1.5. pH Optimizasyonu **51**

4.3. Karvedilol ve Telmisartanın Fosforimetrik Tayinleri için Optimize Edilen Parametreler **52**

4.4. Karvedilolün Fosforimetrik Tayini **53**

4.5. Telmisartanın Fosforimetrik Tayini **55**

4.6. Karvedilol için Karşılaştırma Yöntemi Sonuçları **57**

4.6.1. Karvedilol İçeren Tabletlerde HPLC-UV Yöntemi ile Tayin Sonuçları **58**

4.7. Telmisartan için Karşılaştırma Yöntemi Sonuçları **59**

4.7.1. Telmisartan İçeren Tabletlerde HPLC-UV Yöntemi ile Tayin Sonuçları **60**

5. TARTIŞMA ve SONUÇ **61**

5.1. Karvedilol ve Telmisartan İçeren Tabletlerde Fosforimetrik Tayin Sonuçları **63**

5.2. Yöntemlerin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması, Student – t ve Fisher Testleri **65**

6. ÖZET **68**

7. SUMMARY **69**

8. KAYNAKLAR **70**

9. ÖZGEÇMİŞ **79**

ŞEKİLLER

		Sayfa No
Şekil 1	Karvedilolün Yapısı	**5**
Şekil 2	Telmisartanın Yapısı	**7**
Şekil 3	Fotolüminesans Bir Sistem için Enerji Diyagramı	**21**
Şekil 4	Absorpsiyon, Floresans ve Fosforesans Spektrumu	**23**
Şekil 5	Analitin Pulslu Bir Işık Kaynağı İle Uyarılması ve Fosforesans Sinyalinin İzlenme Döngüsünün Şematik Gösterimi	**24**
Şekil 6	Bir Spektroflorimetrenin Bileşenleri	**27**
Şekil 7	Fosforesans Yöntemlerinin Sınıflandırılması	**29**
Şekil 8	Karvedilol için Floresans Uyarma ve Emisyon, Fosforesans Uyarma ve Emisyon Spektrumları	**42**
Şekil 9	Karvedilol için Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu	**43**
Şekil 10	Artan KI Derişimine Karşı 5.0 mg/l Karvedilol Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim	**44**
Şekil 11	Değişen Na_2SO_3 Konsantrasyonlarına Karşı 5.0 mg/l Karvedilol Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim	**45**
Şekil 12	pH Değişimine Karşı 5.0 mg/l Karvedilol Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim	**46**
Şekil 13	Telmisartan için Floresans Uyarma ve Emisyon, Fosforesans Uyarma ve Emisyon Spektrumları	**47**

Şekil 14 Telmisartan için Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu **48**

Şekil 15 Değişen HTAB Derişimine Karşı 0.3 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim **49**

Şekil 16 Artan KI Derişimlerine Karşı 4.0 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim **50**

Şekil 17 Değişen Na_2SO_3 Konsantrasyonlarına Karşı 4 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim **51**

Şekil 18 pH Değişimine Karşı 5.0 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim **52**

Şekil 19 Karvedilol Tayini için Kalibrasyon Doğrusu **53**

Şekil 20 Telmisartan Tayini için Kalibrasyon Doğrusu **55**

Şekil 21 Karvedilol için HPLC-UV Yöntemi ile Oluşturulan Kalibrasyon Doğrusu **57**

Şekil 22 Karvedilol İçeren Coronis (6.25 mg) Tabletlerin HPLC-UV ile Karşılaştırma Yöntemine Ait Kromatogram **58**

Şekil 23 Telmisartan için HPLC –UV Yöntemi ile Kalibrasyon Doğrusu **59**

Şekil 24 Telmisartan İçeren Pritor (80 mg) Tabletlerin HPLC-UV ile Karşılaştırma Yöntemine Ait Kromatogram **60**

TABLOLAR

		Sayfa No
Tablo 1	Uyarılma Şekilleri ve Lüminesans Olayları	**19**
Tablo 2	HAI-RTP ile Çalışılan Bazı Moleküllerin Tayininde Kullanılan Ağır Atomlar, LOD Değerleri ve Yarı Ömürleri	**34**
Tablo 3	Çalışılan Etken Maddeler ve Müstahzarları	**36**
Tablo 4	Karvedilol ve Telmisartanın Fosforimetrik Tayini için Parametreler	**52**
Tablo 5	Karvedilol Tayininde Kullanılan Fosforimetrik Yöntemin Analitik Performans Verileri	**54**
Tablo 6	Karvedilol Çözeltisinin Farklı Günlerdeki Sinyal Büyüklükleri	**54**
Tablo 7	Telmisartan Tayininde Kullanılan Fosforimetrik Yöntemin Analitik Performans Verileri	**56**
Tablo 8	Telmisartan Çözeltisinin Farklı Günlerdeki Sinyal Büyüklükleri	**56**
Tablo 9	Karvedilol Tayininde Kullanılan HPLC-UV Yönteminin Analitik Performans Verileri	**58**
Tablo 10	Telmisartan Tayininde Kullanılan HPLC-UV Yönteminin Analitik Performans Verileri	**60**
Tablo 11	Karvedilol İçeren Tabletlerde Fosforimetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar	**63**

Tablo 12 Telmisartan İçeren Tabletlerde Fosforimetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar **64**

Tablo 13 Karvedilol İçeren Tabletlerde HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar **64**

Tablo 14 Telmisartan İçeren Tabletlerde HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar **65**

Tablo 15 Tabletlerde Karvedilol Miktar Tayini için Kullanılan Yöntem Sonuçlarının Student-t ve Fisher Testi ile Karşılaştırılması **65**

Tablo 16 Tabletlerde Telmisartan Miktar Tayini için Kullanılan Yöntem Sonuçlarının Student-t ve Fisher Testi ile Karşılaştırılması **66**

Tablo 17 Karvedilol ve Telmisartan Tayinlerinde Kullanılan Yöntemlerin LOD Değerleri **67**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarıma yön veren, tezimin her aşamasında yanımda olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nusret ERTAŞ'a,

Çalışmalarım boyunca bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağlayan değerli hocam Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER'e,

Tez çalışmam boyunca yakın ilgi ve moral desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. M. Tevfik ORBEY'e,

Çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, zamanını ve desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. H. Eda ŞATANA'ya,

Her türlü destek ve dostluklarından dolayı tüm Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Bu çalışmanın yapılması için gerekli imkanı sağlayan Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı İlaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürü Sayın Uzm. Ecz. Birsel SUBAŞI'ya

Ve

Beni her konuda destekleyen, hayatta en değerli varlığım olan aileme saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Fosforimetrik yöntemler mevcut UV-VIS moleküler spektroskopik yöntemler arasında en seçici yöntem olmasına rağmen kullanımı yaygınlaşamamıştır. Bunun nedenlerinden bir tanesi geçmişte fosforesans sinyalinin ancak sıvı azot ile soğutulmuş[1] veya oda sıcaklığında, analitin katı bir yüzeye emdirilmesi[2] ile sağlanan rijit ortamlarda gözlenebiliyor olmasıdır. Her iki yöntem de uzun ve zahmetli ön işlemler gerektirdiğinden rutin kullanıma girememiştir.

Oda sıcaklığında ve sıvı ortamda fosforesans sinyali ilk defa Kalyanasunduran[3] ve çalışma arkadaşları tarafından misel ve ağır atom içeren analit çözeltisinden azot gazı geçirilerek çözünmüş oksijenin uzaklaştırılmasıyla gözlenmiştir. Bu gelişmenin ardından Love ve çalışma arkadaşları[4] misel ortamında-oda sıcaklığında fosforesans (MS-RTP) yönteminin metodolojisini oluşturmuştur. MS-RTP'nin başarılı uygulamalarının ardından ortam düzenleyici olarak yüzey aktif maddeler, vesikül[5] (VS-RTP), mikroemülsiyon[6] (ME-RTP) ve taç eter[7] kullanımına dayanan (CD-RTP) yöntemleri geliştirilmiştir. Bu RTP yöntemlerinin ortak özellikleri çözeltiye ağır atom ilavesiyle triplet hal popülasyonunun artırılması, koruyucu kimyasal ilavesi ve çözünmüş oksijenin uzaklaştırılmasıyla da iç ve dış dönüşüm yolu ile durulmanın minimize edilmesidir.

Son çalışmalar[8] bazı bileşiklerin herhangi bir koruyucu kimyasal ortama ihtiyaç duyulmaksızın, sadece ağır atom ve oksijen giderici kimyasal varlığında, sulu ortamda fosforesans sinyali oluşturabileceğini göstermiştir. Bu tip RTP emisyonu Ağır Atom Etkili-RTP (HAI-RTP) olarak isimlendirilmiştir. HAI-RTP sinyali moleküler yapıya çok bağlı olduğundan oldukça seçicidir, bunun yanı sıra basit, duyarlı ve akış düzenekleri ile kullanıma uygun olması nedeniyle rutin analitik uygulamalarda potansiyel bir yöntem olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı karvedilol ve telmisartanın farmasötik tabletlerde tayinleri için çözeltide ve oda sıcaklığında fosforimetrik tayin yöntemleri geliştirmektir. Literatürde her iki ilaç etken maddesi için önerilmiş fosforimetrik yönteme rastlanmamıştır. Geliştirilen yöntemlerin analitik performans verileri karvedilol ve telmisartanın tayinlerinde sıkça kullanılan HPLC-UV yöntemi ile kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Çalışmamızda kullanılan karvedilol ve telmisartan hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaç etken maddeleridir.

2.1. Hipertansiyon Hakkında Genel Bilgiler

Hipertansiyon, sistemik arteriyel kan basıncının devamlı yükselmesi ile kendini gösteren bir kalp-damar hastalığıdır. Yüksek kan basıncı damar çeperinde patolojik değişikliklere ve sol ventrikülde hipertrofiye neden olur. Hipertansiyon konjestif kalp yetmezliğine, miyokard infarktüsüne, böbrek dokusunda hasara ve serebrovasküler olayların gelişimine katkıda bulunur.

Bugün kabul edilen kan basıncı değeri dinlenme halindeki normal bir yetişkinde 120/80 mmHg'dır (milimetre civa). Herhangi bir kişide kan basıncı uyku sırasında düşük, sinir ya da heyecan durumunda yüksektir. Kan basıncı sürekli olarak 140/90 mmHg ve üzerinde seyrediyorsa hipertansiyondan sözedilir. Kişinin yaşı, cinsiyeti ve ırkı hipertansiyon görülme sıklığı konusunda belirleyici faktörlerdir. Kişi yaşının hipertansiyona olan katkısı öncelikle damarlarda yaşlanmaya eşlik eden anormalliklerdir. Bu durum özellikle kanı kalpten damarlara taşıyan damarlardaki esneklik kaybı ile açıklanabilir. Ancak yaşla hipertansiyon arasındaki bu bağlantıya bazı toplumlarda hiç rastlanmamaktadır. Bu durumda etkili faktörün yaşam tarzı olduğu söylenebilir. Yiyeceklerle bol miktarda tuz alımı, aşırı beslenme, hareketsiz yaşam, sigara, stres, vs buna neden olan faktörler olarak sayılabilir.

Hipertansiyon nedenine göre 2 grupta sınıflandırılır.

i. esansiyel (primer – birincil) hipertansiyon

ii. sekonder (ikincil) hipertansiyon

Hipertansiyon vakalarının yaklaşık %95'i nedeni bilinmediğinden esansiyel (veya primer) hipertansiyon olarak adlandırılır. Geri kalan %5'inde hipertansiyon, başta bazı böbrek hastalıkları ve bazı endokrin hastalıklar olmak üzere arteriyel kan basıncını yükselttiği bilinen patolojik bozukluklara bağlıdır[9,10].

Etkin bir antihipertansif tedavi hemorajik inme, kalp yetmezliği ve böbrek yetmezliği gibi komplikasyonları anlamlı ölçüde azaltmaktadır. Arteriyel kan basıncını oluşturan temel parametreler kalp debisi ve periferik damar direnci (PDD)'dir. Antihipertansif ilaçlar bu iki parametreden birisini veya her ikisini değiştirir. Kalp debisindeki azalma, miyokard kontraktilitesinin inhibisyonu veya ventrikül dolma basıncının düşürülmesiyle sağlanır. Ventrikül dolma basıncındaki azalma, ya venöz tonüs üzerine veya renal etkiyle total kan hacmi üzerine olan etkiden kaynaklanmaktadır. İlaçlarla PDD'deki azalmanın mekanizması ise düz kas üzerine direkt etkiyle direnç damarların gevşetilmesi veya direnç damarlarda kontraktil tonüsü düzenleyen sistemlerin (örneğin sempatik sinir sistemi) baskılanmasıdır[11].

2.2. Antihipertansif İlaçların Sınıflandırılması

Antihipertansif ilaçlar etki mekanizmaları ve primer etki yerleri dikkate alınarak 8 grupta sınıflandırılır[9].

1. Diüretikler
2. Adrenerjik reseptör blokörleri
3. Adrenerjik nöron blokörleri
4. Santral etkili sempatolitik ilaçlar ve diğer sempatolitikler
5. Kalsiyum kanal blokörleri

6. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve reseptör blokörleri

7. Direkt etkili vazodilatörler ve potasyum kanalı açıcı ilaçlar

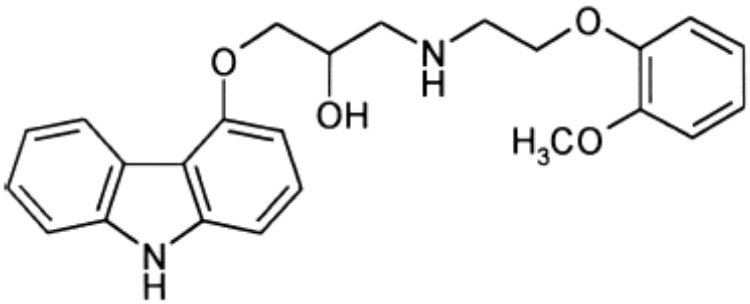
8. Sadece hipertansif kriz tedavisinde kullanılan ilaçlar

2.3. Karvedilol ile İlgili Genel Bilgiler

Karvedilol hem alfa (α) hem de selektif olmayan beta (β) blokörü etkileri olan bir adrenerjik reseptör blokörüdür. Ticari karvedilol preparatları her biri klinik etki bakımından önemli iki R(+) ve S(-) enantiomerinin rasemik karışımıdır.

2.3.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Karvedilol açık formülün okunuşu; 1 - (9 H – karbazol - 4-iloksi) – 3 [[2 - (2 – metoksifenoksi) etil] amino] – 2-Propanol (Şekil 1.)



Şekil 1. Karvedilolün Yapısı

Molekül formülü: $C_{24}H_{26}N_2O_4$

Molekül ağırlığı: 406.5

Karvedilol beyaz veya beyaza yakın renkte bir tozdur. Erime noktası 114 – 115 ºC'dir. Dimetilsülfoksitte serbestçe çözünür; metilen klorür ve metanolde çözünür; etanol ve izopropanolde az çözünür. Pratik olarak suda çözünmez.[12]

2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Karvedilol, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve kronik kalp yetmezliği durumlarında kullanılmaktadır.

Karvedilol, alfa$_{1,}$ beta$_1$ ve beta$_2$ adrenerjik reseptör blokaj özelliği olan bir adrenerjik reseptör blokörüdür. Beta-bloker ilaçlar arasında karvedilol diğerlerinden ayrı bir yere sahiptir. Diğer beta blokerler sadece beta$_1$ reseptörünü bloke ederken karvedilol alfa$_{1,}$ beta$_1$ ve beta$_2$ reseptörlerini yaygın olarak bloke eder. İlaç alfa bloker etkisiyle damarların genişlemesini sağlar. Beta bloker etkisiyle kalbin hızını ayarlar. Karvedilolün en önemli özelliği hipertansiyonu düşürürken, diyabet ve kolesterol üzerinde olumsuz etki yapmamasıdır.

Hipertansiyon tedavisinde kullanılabilecek birçok ilaç vardır. Ancak kalp yetmezliği tedavisinde seçenek çok azdır. Karvedilol kullanımıyla kalp yetmezliği olan hastalarda hastaneye başvurmalarında azalma yaşandığı saptanmıştır. Karvedilol aynı zamanda güçlü bir antioksidandır ve serbest radikal hasarını azaltır.

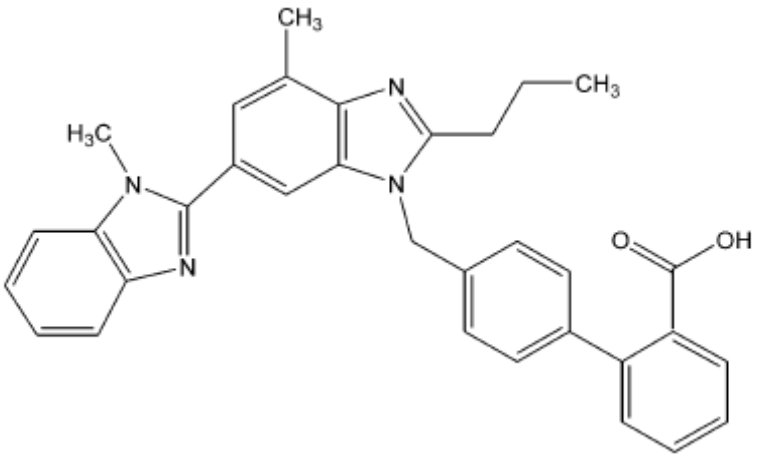
Kalp yetmezliği durumunda kalp, atım sayısını artırarak yetersiz pompalama açığını kapatmaya çalışır. Karvedilol hem kalp atım hızını azaltmakta hem de atar damar duvarlarındaki alfa alıcılarını bloke ederek atar damarlarda genişlemeyi sağlamaktadır. Böylece kalbin önündeki direnci de hafifleterek oksijen ihtiyacını azaltmakta, kasılma yeteneğini artırarak kalbin yıpranmasını önlemektedir[13,14].

2.4. Telmisartan ile İlgili Genel Bilgiler

Telmisartan güçlü vazokonstriktif anjiyotensin II'nin (AT II) AT_1 reseptöre yapışmasını önleyerek etki gösterir.

2.4.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Telmisartan nonpeptit bir moleküldür ve açık formülü; 4'- [(1,4 '- dimetil-2'propil [2,6'- bi - 1H – benzimidazol] – 1'- yl) metil] – [1,1'- bifenil] – 2 – karboksilik asit şeklindedir. (Şekil 2)



Şekil 2. Telmisartanın Yapısı

Molekül formülü: $C_{33}H_{30}N_4O_2$

Molekül ağırlığı: 514.63

Telmisartan sarımsı renkte bir katıdır. Pratik olarak suda ve pH 3 – 9 aralığında çözünmez. Güçlü asitlerde az çözünür (çözünmediği HCl hariç). Güçlü bazlarda çözünürlüğü yüksektir[15].

2.4.2. Farmakolojik Özellikleri

Telmisartan yağda çözülebilen, tetrazol yapısı taşımayan anjiyotensin II reseptör blokörüdür. Telmisartan'ın AT_1 reseptör alt tipine olan ilgisi AT II reseptör alt tipine olan ilgisine göre çok daha fazladır. Telmisartanın, AT II'nin etkilerini insüline duyarlılığı artıran ilaçların hedefi olan peroksizom proliferatörünce aktive edilen reseptör-γ'yi aktive ettiği gösterilmiştir (PPAR-γ). Antihipertansif etkisinin yanında, insülin duyarlılığını da artırarak hipertansiyon oluşum mekanizması, hedef organ hasarı, mortalite ve morbiditede önemli rol oynayan lipid ve glukoz metabolizması üzerine olumlu etkisi bulunur. Telmisartan anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye çeviren ve bradikinini parçalayan ADE'i (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim) inhibe etmez. Bradikinin, P maddesi ve ADE üzerine etkisi yoktur. Diğer hormon reseptörlerine veya kardiyovasküler regülasyonda önemli olduğu bilinen iyon kanallarına bağlanmaz veya bloke etmez.

Anjiyotensin II reseptörleri antagonizması, plazma renin düzeylerinde, anjiyotensin I ve anjiyotensin II düzeylerinde doza bağlı artışlara ve plazma aldosteron derişiminde de düşüşe sebep olur. Telmisartan diğer benzeri ilaçların moleküllerinden daha kuvvetli biçimde kalp, karaciğer ve böbreklerde bulunan AT_1 reseptörlerine bağlanarak uzun süre koruma sağlar. Kanda bulunan ve vücuttaki kan basıncını artıran AT II hormonunu daha etkili baskıladığı için daha uzun süreli etki göstermektedir. Yapılan çalışmalar Telmisartan'ın 35 saat etki yapabildiği için hipertansiyon hastalarında görülen sabah kalp krizi riskini azalttığı yönündedir[16,17].

2.5. Analiz Yöntemleri

2.5.1. Karvedilol için Uygulanan Tayin Yöntemleri

2.5.1.1. Spektral Yöntemler

Xu ve çalışma arkadaşları[18], asidik, alkali ortamların ve organik çözücülerin karvedilolün floresans spektrumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Farmasötik dozaj formundan karvedilolün miktar tayini için basit, hızlı ve oldukça duyarlı bir yöntem geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Bağıl floresans şiddeti 254 nm uyarma dalga boyu ve 356 nm emisyon dalga boylarında ölçülmüştür. Karvedilolün tayini için pH, bekleme süresi ve iyon etkisini incelemişlerdir. Bağıl floresans şiddetinin karvedilol derişimine karşı grafiğinde 0.50-270 ng/ml aralığında doğrusallık saptanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.9998, standart sapma %2.31, tayin limiti 0.19 ng/ml, geri kazanım %98.70 - 102.1 arası bulunmuştur.

Wen ve çalışma arkadaşları[19], karvedilolü β-siklodekstrinle inklüzyon kompleksine alarak floresans spektrometrisiyle ve ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ile tayin etmişlerdir. Katı inklüzyon kompleksinin özellikleri IR spektroskopisi, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve elemental analiz ile incelenmiştir.

Xiao ve çalışma arkadaşları[20], karvedilol ve ampisilin sodyumu aynı anda, herhangi bir ayırma işlemi yapmaksızın senkronize florimetri yöntemini kullanarak tayin etmişlerdir. Karvedilol ve ampisilin sodyumun emisyon spektrumlarının kısmi olarak örtüşmesi nedeniyle florimetrik yöntemle doğrudan tayin edilememektedir. Senkronize floresans yöntemi ile $\Delta\lambda$ = 80 nm seçildiğinde her iki etken maddenin aynı anda tayinine olanak sağlamaktadır. Karvedilol ve ampisilin sodyumun kalibrasyon grafiklerinde sırasıyla, 0.005-0.1 ve 5.0-70.0 mg/l derişim aralığında doğrusallık saptanmıştır. Tayin alt sınırı karvedilol ve ampisilin sodyum için sırasıyla 1 ng/ml ve 1 mg/l bulunmuştur. Bağıl standart sapma

karvedilol ve ampisilin sodyum için sırasıyla % 2.41 ve 1.61, geri kazanımlar ise karvedilol için %96.0-103.0 arası; ampisilin sodyum için %98.0-105.0 arasında bulunmuştur.

2.5.1.2. Kromatografik Yöntemler

Reiff[21], vücut sıvılarında karvedilol ve metaboliti dimetilkarvedilolü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin etmiştir. İç standart olarak naftopidil kullanılmıştır. Ayırma için Nükleosil 10 C18 kolonu, hareketli faz olarak %0.2 H_3PO_4:metanol (50:50) kullanılmıştır. Serum numunesinden geri kazanımı karvedilol için %95.8, metaboliti için %96.5 bulunmuştur. İdrarda karvedilol için geri kazanım %93.4, metaboliti için %93.2 olarak bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusu 0-100 ng/ml derişim aralığında doğrusaldır. Karvedilol için serum alt tayin limiti 0.38 ng/ml, metaboliti için 0.46 ng/ml bulunmuştur. İdrar tayin alt limiti, karvedilol için 1.07 ng/ml, metaboliti için 0.82 ng/ml olarak bulunmuştur.

Fujimaki ve çalışma arkadaşları[22], serumda karvedilolün S- ve R- enantiomerlerini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile tayin etmişlerdir. Bu yöntem karvedilolün her bir enantiomerinin plazmadan tayini için duyarlı, stereospesifik bir HPLC yöntemidir. Kiral yapıcı ajanla türevlendirme yapıldıktan sonra analiz gerçekleştirilmiştir. Karvedilol rasemik karışımı kontrollü olarak insana verildikten sonra Cmax ve AUC değerleri R(+) izomeri için daha aktif olan S(-) izomerinden sırasıyla 2.6 ve 2.8 defa daha yüksek bulunmuştur.

Hokama ve çalışma arkadaşları[23], sıçan plazmasından karvedilolü tayin etmişlerdir. Çalışmada katı faz ekstraksiyonu sonrasında C18 kolon, floresans dedektörü kullanarak basit, hızlı ve duyarlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geri kazanım çalışmalarında karvedilol plazmaya ilave edilmiş ve %94.2 bulunmuştur. Plazma tayin alt limiti 3.6 ng/ml'dir. Gün içi ve günler arası tekraredilebilirliği sırasıyla %2.7 - 7.5 ve %2.6 - 7.4 arasında bulunmuştur.

Clohs ve çalışma arkadaşları[24], serumdaki karvedilol enantiomerlerini kapiler elektroforez yöntemiyle, kiral seçici ajan olarak siklodekstrin kullanarak analiz etmişlerdir. Birçok siklodekstrin türü denenmiştir. En iyi sonuç tampon içinde 10mM hidroksipropil- β-siklodekstrin kullanılarak elde edilmiştir. Elektroforetik şartlar optimize edilmiş ve yöntem serumdaki karvedilol enantiomerleri için valide edilmiştir. Serumdaki her enantiomer için 50-4000 ng/ml derişim aralığında doğrusallık saptanmıştır.

Behn ve çalışma arkadaşları[25], kalp dokusunda beta reseptör blokörü olan karvedilolü HPLC yöntemiyle tayin etmişlerdir. Karvedilol ve iç standart olarak kullanılan naftopidil dokudan homojenize edildikten sonra asetonla ayrılmıştır. Çözücü buharlaştırılıp kurutulduktan sonra pH 3.5 asetat tamponuyla tekrar çözülmüştür. Karvedilol ve iç standardın geri kazanımları sırasıyla %69.8±12.2 ve %63.9±9.34 bulunmuştur. Dokudaki derişimde 0.01-0.35 ng/ml aralığında doğrusallık saptanmıştır. Tayin alt limiti 0.01 ng/ml'dir.

Machida ve çalışma arkadaşları[26], karvedilol ve karvedilol M21-aglikonun plazmadaki miktarını elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemi kullanarak tayin etmişlerdir. Tayin alt sınır her iki analit için de 0.10 ng/ml bulunmuştur. Karvedilol ve M21-aglikonun gün içi tekraredilebilirliği sırasıyla %6.1 ve %6.7'dir.Tayin alt sınırı klinik kullanım için yeterli düzeyde görülmüştür.

Ptacek ve çalışma arkadaşları[27], insan plazmasındaki karvedilolü florimetrik dedektörlü HPLC yöntemi ile tayin etmişlerdir. Ayırım için Develosil 3µ ODS 100x4.6 mm I.D. kolon ve hareketli faz olarak asetonitril - 30 mM pH 2 potasyum dihidrojen fosfat tamponu karışımı (30:70 h/h) kullanılmıştır. Tayin alt sınırı 1.3 ng/ml bulunmuştur. İç standart olarak dihidroergokristan mesilatı kullanılmıştır.

Yang ve çalışma arkadaşları[28], insan plazmasında karvedilol enantiomerlerinin kiral türevini kullanarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (HPLC/MS/MS) ile miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. İç standart olarak [$^{2}H_{5}$]-karvedilol kullanılmıştır. Ekstraktlar 2,3,4,6-tetra-O-asetil-beta-glukopiranosil izotiyosiyanat ile türevlendirildikten sonra 40 ºC de azot gazı atmosferinde kurutulmuştur. Kalıntı, 100 µl, 2 mM amonyum format (pH 3)/asetonitril (50/50 h/h) çözeltisi ile çözülmüş ve tayin edilmiştir. 150 µl plazma kullanıldığında doğrusallık 0.2-200 ng/ml aralığındadır. Yöntem HPLC ile karşılaştırılmış ve daha duyarlı olması, çok düşük miktarda plazma ile çalışılması açısından üstün olduğu belirtilmiştir.

Mauer ve çalışma arkadaşları[29], sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisiyle karvedilol dahil 22 beta blokörün tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalarda katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve yöntem valide edilmiştir.

Stojanovic ve çalışma arkadaşları[30], karvedilol ve safsızlıklarının ayırımı için UV dedektörlü ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bileşiklerin ayırım işlemi, Chromolit RP 8 (100x4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada hareketli faz olarak akış hızı 0.5 ml/dk olan asetonitril/su (45/55 h/h) karışımı, pH 2.5'e formik asit ile ayarlanarak kullanılmıştır. Karvedilol ve safsızlıklarının ayırımı 280 nm'de ve kolon sıcaklığı 40 °C'ye sabitlenerek sağlanmıştır. Geliştirilen yöntem valide edilmiş, karvedilol hammadde ve farmasötik formülasyonlarına uygulanmıştır.

Rathod ve çalışma arkadaşları[31], insan plazmasındaki karvedilolün miktar tayini için bir HPLC yöntemi önermişlerdir. Floresans dedektör kullanarak yapılan çalışmada ayırım için Lichrosphere R CN kolon seçilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril/20 mM amonyum asetat tamponu %0.1 trietilamin karışımı (pH 4.5), 40/60 h/h oranında

kullanılmıştır. Uyarma dalga boyu 282 nm ve emisyon dalga boyu 340 nm'dir. İç standart olarak domperidon kullanılmıştır. Doğrusal aralık 1-128 ng/ml, günlerarası ve güniçi kesinlik çalışmasında relatif standart sapma değeri %15'ten küçüktür. Karvedilol geri kazanımı %69.90'dır. Stabilite çalışmaları, insan plazmasındaki karvedilolün kısa süreli numune hazırlama ve analiz süresince stabil olduğunu göstermiştir.

Gannu ve çalışma arkadaşları[32], insan serumundaki karvedilolün miktar tayini için ters faz sıvı kromatografisini kullanmışlardır. UV dedektör ve 238 nm dalga boyu ile çalışılmıştır. Analit, önceden 300 µl 0.1 N NaOH ilave edilmiş serum numunelerinden n-hegzan ve diklorometan karışımı (70/30 h/h) ile ekstrakte edilmiştir. Kromatografik ayırım, Kromasil KR 100 5C8 kolon ve hareketli faz olarak akış hızı 1 ml/dk olan asetonitril/15 mM H_3PO_4 (37/63), %0.25 trietilamin karışımı kullanılarak yapılmıştır. Kalibrasyon doğrusu 5-500 ng/ml aralığında doğrusaldır. Yöntem valide edilmiş ve farmakokinetik çalışmalara başarıyla uygulanmıştır.

2.5.1.3. Voltametrik Yöntemler

Radi ve çalışma arkadaşları[33], antihipertansif karvedilolün pH 2.0-11.0 aralığında camsı karbon elektrotla doğrusal taramalı ve diferansiyel puls voltametrisiyle elektrokimyasal yükseltgenmesini incelemişlerdir. pH 8.0 Britton-Robinson tamponunda (BRT) diferansiyel puls voltametrisiyle miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon aralığı olarak 0.25-10.0 mg/l kullanılmış, tayin limiti 0.10 mg/l bulunmuştur. Bu yöntemde maddenin yükseltgenme mekanizmasına açıklık getirilmemiş tayin yöntemi üzerinde yoğunlaşılmıştır. Geliştirilen yöntem tablet dozaj formuna uygulanmıştır.

Doğan ve Özkan[34], karvedilolün yükseltgenme davranışını camsı karbon elektrot üzerinde ve alkol-su karışımlı ortamda (20/80, metanol/su, pH aralığı 1.0-12.0), dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri tekniklerini kullanarak çalışmışlardır. Deneyler, destek elektroliti yapısının, pH'ın ve potansiyel tarama hızının reaksiyon üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla BRT, fosfat, asetat tamponları ve 0.1; 0.2; 0.3; 0.5 M H_2SO_4 destek elektrolitleri içerisinde gerçekleştirilmiştir. Molekül, bütün pH değerlerinde tersinmez olarak iki yükseltgenme piki vermiştir. Bu iki pik sırasıyla difüzyon ve adsorpsiyon kontrollü bulunmuştur. İkinci yükseltgenme piki kullanılarak camsı karbon üzerinde, adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametrisi ve adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi yöntemleri karvedilolün miktar tayini için seçilmiştir. Karvedilolün biriktirme işleminin optimizasyonunda, en iyi ortam 0.2 M H_2SO_4 çözeltisi ve 275 saniye biriktirme zamanı saptanmıştır. İki voltametrik metot için karvedilolün saf maddesinde $2x10^{-7}$ - $2x10^{-5}$ M derişim aralığında; insan serumu numunesinde $2x10^{-7}$ - $1x10^{-5}$ M derişim aralığında doğrusallık sağlanmıştır. Yöntemler karvedilolün farmasötik dozaj formlarına ve insan serumundan tayinine başarıyla uygulanmıştır. Tabletlerdeki katı maddelerden ve biyolojik sıvılardaki endojen maddelerden herhangi bir elektroaktif girişime rastlanmamıştır.

2.5.2. Telmisartan için Uygulanan Tayin Yöntemleri

2.5.2.1. Spektral Yöntemler

Bebawy ve çalışma arkadaşları[35], farmasötik preparatlardaki telmisartan ve hidroklorotiyazitin miktar tayinleri için dört analitik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden ilki türev spektrofometrisidir. Türev yöntemiyle karışımdaki telmisartan ve hidroklorotiyazit için sırasıyla 241.6 ve 227.6 nm dalga boylarındaki türev absorbans değerlerinin ölçümleri kullanılmıştır. Spektrum oranları türev spektrofotometrisi yönteminde telmisartan için 242.7 nm'de ve hidroklorotiyazit için 274.9 nm'deki sinyal

genlikleri kullanılarak kalibrasyon yapılmıştır. İki etken maddenin İTK ile ayırımından sonra sırasıyla telmisartan ve hidroklorotiyazit için 295 ve 225 nm'deki dansiyometrik ölçümler ile kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.5.2.2. Kromatografik Yöntemler

Chen ve çalışma arkadaşları[36], telmisartanı insan plazmasında tayin edebilmek için sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemini kullanmışlardır. 0.1 ml plazmadaki proteinler metanol ile çöktürülmüş ve santrifüj edilerek plazma proteinleri ayrılmıştır. Daha sonra, metanol uçurulmuş ve kalıntı hareketli fazda çözülerek analize hazırlanmıştır. Kromatografik ayırım için Hypersil-Keystone C18 kolon seçilmiş ve hareketli faz olarak 10 mM amonyum asetat/asetonitril (58/42 h/h) ve %0.2 asetik asit karışımı 0.2 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. İç standart olarak valsartan kullanılmıştır. Ölçümler pozitif seçici iyon gösterim modunda elektrosprey iyon kaynağıyla yapılmıştır. Telmisartan için tayin sınırı 1 ng/ml bulunmuştur.

Torrealday ve çalışma arkadaşları[37], idrarda telmisartan miktar tayini için bir HPLC yöntemi önermişlerdir. Kromatografik ayırım için Novapak C18 150x3.9 mm, 4 µm kolon seçilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril/fosfat tamponu (pH 6.0; 5 mM) (45/55 h/h) karışımı kullanılmış, 0.5 ml/dk akış hızıyla çalışılmıştır. Ölçümler, floresans dedektör ile 305 nm uyarma ve 365 nm emisyon dalga boylarındaki cevapları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Shen ve çalışma arkadaşları[38], insan plazmasındaki telmisartanın miktar tayini için sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrası floresans dedektörlü HPLC yöntemi önermişlerdir. İç standart olarak naproksen kullanılmıştır. Çalışma aralığı 0.5-1000 ng/ml olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntem farmakokinetik çalışmalara başarı ile uygulanmıştır.

Patil ve çalışma arkadaşları[39], farmasötik formlardaki telmisartan ve ramiprilin eş zamanlı tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada ACE 5 C18 250 mm kolon ve mobil faz olarak 1.5 ml/dk akış hızındaki tampon/asetonitril (55/45 h/h) karışımı kullanılmıştır. Tampon çözeltisi, 0.1 M sodyum perklorat monohidrat çözeltisinin pH'sının trifloro asetik asit ile 3.0'a ayarlanmasıyla hazırlanmıştır. Fotodiyot serili dedektör ile 215 nm'de çalışılmış ve kolon sıcaklığı 30°C'ye sabitlenmiştir. Teorik plaka sayısı ramipril ve telmisartan için sırasıyla 13.022 ve 6.629, kuyruklanma faktörü ise 0.94 ve 0.98 bulunmuştur. Kalibrasyon grafiği, telmisartanın 20-400 mg/l, ramiprilin 2.5-50 mg/l derişimleri aralığında doğrusaldır. Korelasyon katsayısı her iki etken madde için 1 olarak bulunmuştur. Yöntemin, ramipril ve telmisartanın kombine olarak bulunduğu preparatlarda eş zamanlı miktar tayini ve stabilite çalışmaları için uygun olduğu belirtilmiştir.

Nie ve çalışma arkadaşları[40], insan plazması ve idrarında anjiyotensin II reseptör antagonistlerinin katı faz mikroekstraksiyonu için bir polimonolitik kapiler (metakrilik asit-etilen glikol dimakrilat, MAA-EGDMA) kullanmışlardır. HPLC yöntemi ve floresans dedektörü ile kandesartan, losartan, irbesartan, valsartan ve telmisartan miktar tayinleri yapılmıştır. Bu bileşikler için tayin sınırları sırasıyla insan plazmasında ve idrarda 0.1-15.3 ng/ml ve 0.1-15.2 ng/ml olarak bulunmuştur. Telmisartan için kalibrasyon eğrisinin doğrusal aralığı 0.5-200 ng/ml, kandesartan ve irbesartan için 0.005-2 mg/l, valsartan için 0.01-2 mg/l ve losartan için 0.05-5 mg/l olarak verilmiştir.

Wankhede ve çalışma arkadaşları[41], telmisartan ve hidroklorotiyazitin etken maddeden ve farmasötik dozaj formlarından tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Sabit faz olarak ODS Hypersil C18 250x4.6 mm kolon kullanılmıştır. Dalga boyu 271 nm seçilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril/0.05 mM KH_2PO_4 pH 3.0 (60/40 h/h) karışımı kullanılmıştır. Alıkonma zamanları telmisartan ve

hidroklorotiyazit için sırasıyla 5.19 ve 2.97d'dır. Telmisartan ve hidroklorotiyazit için doğrusal aralık 4.1-20.48 mg/l ve 1.28-6.4 mg/l bildirilmiştir.

Bhat ve çalışma arkadaşları[42], HPLC-UV yöntemi ile telmisartan, hidroklorotiyazit ve rabeprazol etken maddelerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Dalga boyu 270 nm, akış hızı 1 ml/dk ile çalışılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril/metanol (30/70 h/h) karışımı kullanılan yöntem telmisartan ve hidroklorotiyazit tabletlerine uygulanmıştır. Telmisartan, hidroklorotiyazit ve rabeprazolün alıkonma zamanları sırasıyla 1.79±0.01, 2.80±0.01 ve 3.19±0.01 d. olarak bulunmuştur.

Kutucu ve Özkan[43], telmisartan ve hidroklorotiyazitin aynı anda analizi için bir HPLC-UV yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Yöntemde, bir ters faz kolonu (Inertsil ODS 3V; 5 µ, 150x4.6 mm), 1.5 ml/dk akış hızındaki asetonitril/NaH_2PO_4 tampon (pH 3.0; 1.7 mM) (46/54 h/h) karışımından oluşan hareketli faz kullanılmış ve ölçümler 270nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım 30 °C'de yapılmıştır. İç standart olarak irbesartan kullanılmıştır. Alıkonma süreleri telmisartan için 3.02 d, hidroklorotiyazit için 2.35 d ve irbesartan için 5.10 d'dır. Standart çözelti kromatogramında ayrışma, seçicilik, asimetri ve kapasite faktörü gibi çeşitli parametreleri kontrol etmek için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Telmisartan için 0.0227-745 mg/l ve hidroklorotiyazit için 0.00476-156 mg/l derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Geri kazanım çalışmaları yöntemin, ilaç formülasyonunda bulunan katkı maddeleri ve yardımcı maddelerden etkilenmediğini göstermektedir. Geliştirilen HPLC-UV yönteminin, hammadde ve farmasötik formülasyonlarda , telmisartan ve hidroklorotiyazitin eş zamanlı tayini için basit, hızlı, yüksek kesinlik ve doğrulukta olduğu belirtilmiştir.

2.5.2.3. Elektroforetik Yöntemler

Gonzalez ve çalışma arkadaşları[44], telmisartanın da bulunduğu bir grup anjiyotensin II reseptör antagonisti etken maddenin (losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan, eprosartan) ayırımı için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada tampon derişimi, tampon pH'ı, voltaj, enjeksiyon basıncı gibi parametrelerin ayırma üzerine etkisi incelenmiştir. Tampon sistemi olarak 50 mM potasyum dihidrojen fosfat ve %5 metanol içeren pH 5.5 borik asit tamponu (25/75 h/h) kullanılmıştır. Çalışma voltajı 25 kV, analiz süresi 8 d'dır.

2.6. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi

Bir atom ya da molekülün en kararlı elektron konfigürasyonu elektronların en düşük enerji seviyelerinde bulundukları halleridir. Bu durum atom ya da molekülün temel enerji düzeyini veya temel halini oluşturur. Elektronların daha üst enerji düzeyine yerleşmesiyle atom ya da molekülün uyarılmış hali oluşur. Uyarılmış hal kararsızdır ve fazla enerjisini atarak temel hale dönmek eğilimindedir. Atom ya da molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin hepsini veya bir kısmını ışık şeklinde yayabilir. Bu olaya genel olarak *lüminesans* adı verilir.

Lüminesant bileşikler farklı türlerde olabilirler:

1. Organik bileşikler: Aromatik hidrokarbonlar (naftalen, antrasen, vb.), floressein, aminoasitler (triptofan, tirozin, fenilalanin)

2. İnorganik bileşikler: Uranil iyonu (UO_2^+), lantanit iyonları (Eu^{+3} , Tb^{+3}), kolloidal ve nano yapılar (ZnS, CdS, CdSe, Al_2O_3/Cr^{+3})

3. Organometalik bileşikler: Rutenyum kompleksleri, lantanit iyonları ile kompleksler, florojenik şelat yapıcı ajanlarla kompleksler

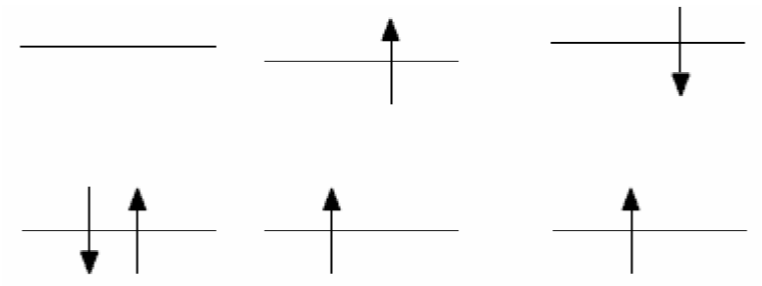
Atom ya da molekülün, gerekli uyarılma enerjisini sağladığı yola bağlı olarak gözlenen lüminesans farklı isimler alır. Uyarma şekilleri ve meydana gelen lüminesans olayları Tablo 1'de verilmektedir[45-47].

Tablo 1. Uyarılma Şekilleri ve Lüminesans Olayları

Uyarılma Şekli	Lüminesans
Işık absorpsiyonu	Fotolüminesans (floresans, fosforesans)
İyonize radyasyon (X-Ray, α, β, γ)	Radyolüminesans
Katot ışınları	Katotlüminesans
Elektrik akımı	Elektrolüminesans
Isı	Termolüminesans
Kimyasal reaksiyonlar	Kemilüminesans
Biyokimyasal reaksiyonlar	Biyolüminesans
Sürtünme veya elektrostatik kuvvetler	Tribolüminesans
Ultrasound	Sonolüminesans

2.6.1. Singlet ve Triplet Uyarılmış Haller

Atom ya da moleküllerin elektronları, orbitallere spinleri ters olarak yerleşmişse bu hale *singlet hal*, iki ayrı orbitalde spinleri birbirine paralel birer elektron varsa *triplet hal* ortaya çıkar. Singlet ve triplet haldeki bir sistem temel enerji düzeyinde bulunabileceği gibi uyarılmış enerji düzeyinde de bulunabilir. Uyarılmış singlet halde, uyarılmış elektronun spini temel haldeki elektron ile eşleşmiş durumdadır. Triplet halde ise iki elektronun spinleri eşleşmemiş durumda birbirine paraleldir. Temel ve uyarılmış haldeki singlet, triplet haller aşağıdaki şekilde gösterilebilir.

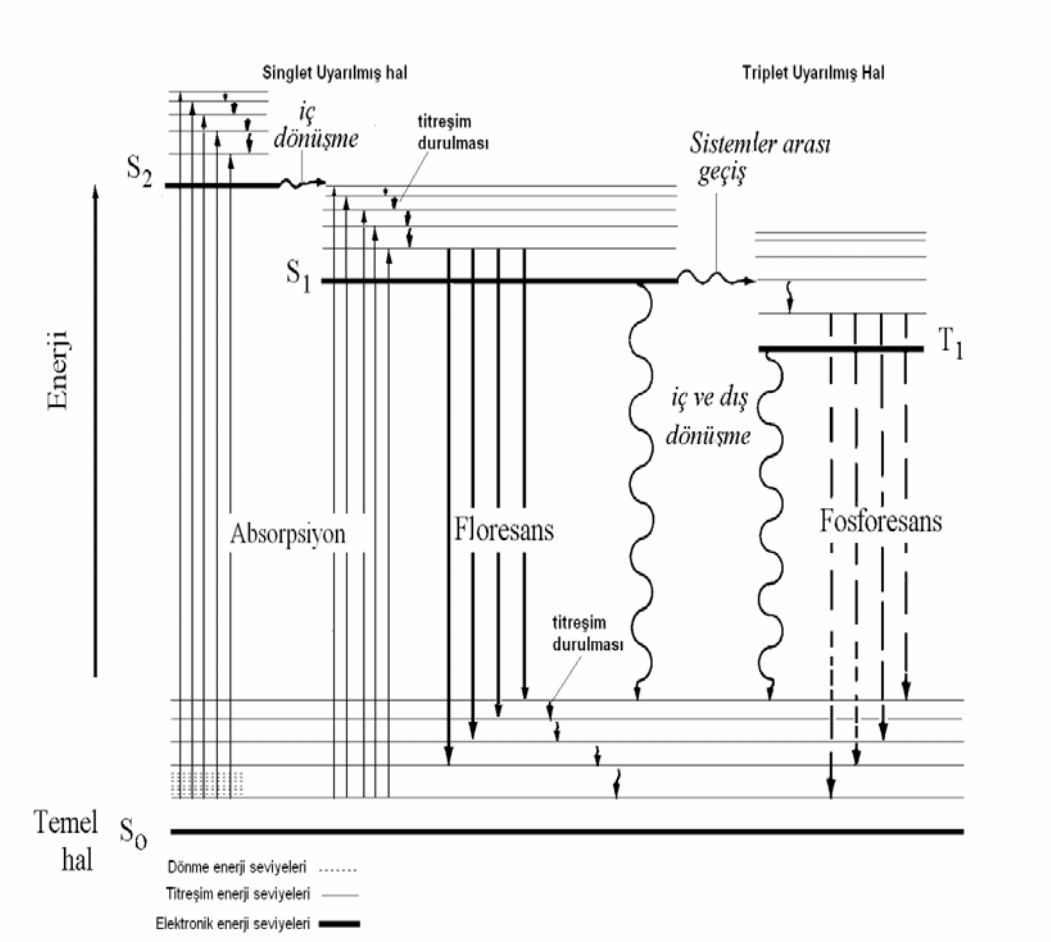


Temel Singlet Hal Uyarılmış Triplet Hal Uyarılmış Singlet hal

Burada uyarılmış triplet halin enerji düzeyinin singlet halin enerji düzeyinden düşük olması önemlidir. Uyarılmış triplet haldeki molekül ile uyarılmış singlet haldeki molekülün özellikleri birbirinden farklıdır. Örneğin bir molekül triplet halde paramanyetik iken singlet halde diamanyetiktir. Ayrıca singlet/triplet geçişler, singlet/singlet geçişine göre daha az oranda gerçekleşir. Bir triplet halin uyarılmış haldeki ortalama ömrü 10^{-4}s'den birkaç saniyeye kadar uzayabilirken bir uyarılmış singlet halin ömrü 10^{-5}-10^{-8} saniyedir[45-47].

2.6.2. Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi

Şekil 3, Jablonski Diyagramı olarak bilinen fotolüminesans bir molekülün uyarılması ve deaktivasyon yollarını içeren enerji düzeylerini göstermektedir. En alttaki koyu çizgi ile gösterilen S_0 molekülün temel hal enerjisini göstermektedir. Molekül uygun enerjili bir foton tarafından uyarıldığında son enerji yörüngesindeki S_1 ile gösterilen ilk uyarılma düzeyine veya S_2 ile gösterilen ikinci uyarılma bölgesine gider. Uyarılmış bir molekül temel hale dönerken almış olduğu enerjiyi ışıma şeklinde verebileceği gibi ışıma yapmadan da temel hale dönebilir[45-47].



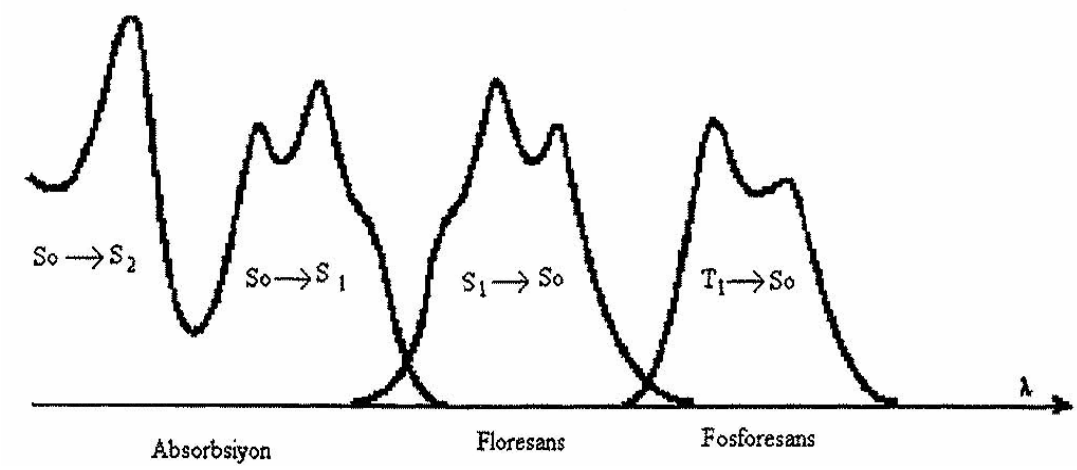
Şekil 3. Fotolüminesans Bir Sistem için Enerji Diyagramı (Jablonski Diyagramı)

2.6.2.1. Sönüm İşlemleri

Uyarılmış halden temel hale dönüş sürecinde gerçekleşen olaylar sönüm işlemleri olarak isimlendirilir. Bunlar Şekil 3'te gösterilmiştir. Sönüm işlemlerinden sadece floresans ve fosforesans ile durulma işleminden UV-VIS bölgesinde emisyon gözlenir. Uyarılmış haldeki molekül fazla enerjisini titreşimsel durulma, iç dönüşüm, dış dönüşüm, sistemler arası geçiş, ayrışma, ön ayrışma yoluyla kısmen veya tamamen kullanabilir.

Fosforesans: Bir molekül uyarılmış triplet halden iç dönüşüm, dış dönüşüm, sistemler arası geçiş, fosforesans ile temel hale dönebilir. Uyarılmış bir triplet halin ortalama ömrü 10^{-4} ile 10 s arasındadır. Bu nedenle böyle bir geçişten kaynaklanan emisyon, ışınlama kesildikten sonra da sürebilir. Fosforesans yolu ile durulma olasılığı düşük sıcaklıklarda, çok viskoz veya katı ortamlarda artar. Triplet halin enerji seviyeleri S_1 enerji seviyesinden daha düşük olduğundan fosforesans spektrumu floresans spektrumundan daha uzun dalga boylarına kayar (Şekil 4).

Floresans: Uyarılmış bir singlet sistemden (S_1) temel haldeki bir singlet sisteme (S_0) geçiş sırasında yayılan ışığa *floresans* denir. Floresans yolu ile durulmada yayılan ışığın frekansı ile sistemi uyaran ışığın frekansı birbirine eşit ise buna *rezonans floresans* adı verilir. Rezonans floresans daha çok atomlarda ve katı haldeki moleküllerde gözlenir. Genelde uyarılmış moleküller almış oldukları enerjinin bir kısmını titreşimsel durulma ile kaybettiğinden gözlenen floresansın dalga boyu uyarma dalga boyundan daha uzundur. Buna *Stokes Kayması* denir. (Şekil 4).

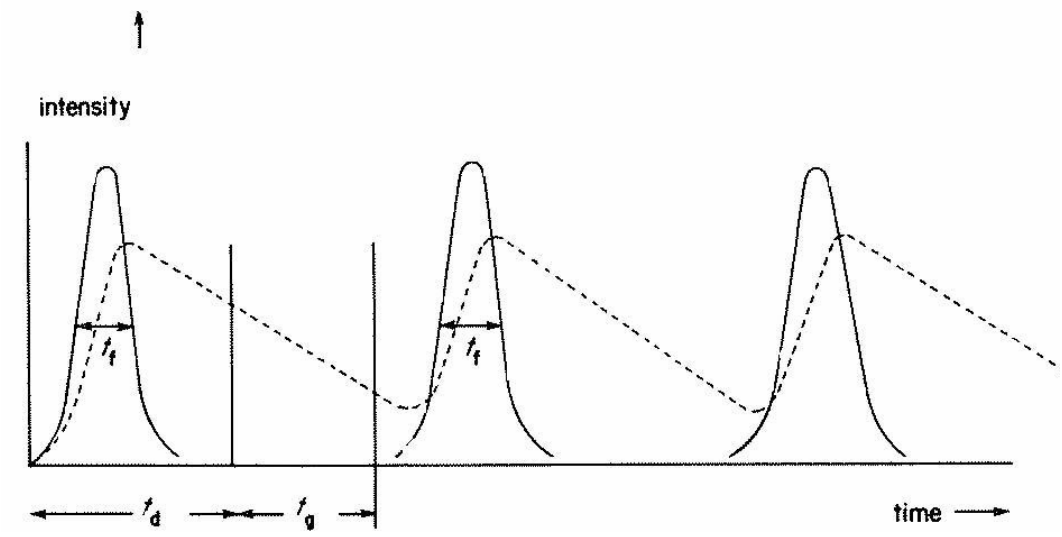


Şekil 4. Absorpsiyon, Floresans ve Fosforesans Spektrumu

2.6.2.2. Fosforesans Sinyalinin Ölçülmesi ve Parametreler

Fosforesans sinyali floresans sinyaline kıyasla gecikmeli olarak gerçekleştiğinden fosforesans ölçümlerinde ek olarak birkaç parametre dikkate alınmalıdır. Bunlar gecikme süresi t_d ve veri toplama süresi, t_g'dir. Şekil 5'te gecikme ve veri toplama süreleri şematik olarak gösterilmiştir. Fosforesans ölçümlerinde etkin band genişliği t_f süresinde olan ışık pulsu numune ile etkileştirilerek numunenin uyarılması sağlanır. Bu sırada dedektör tanımlanmış bir gecikme süresi kadar kapalı tutulur ve ölçüm yapılmaz. Gecikme süresi ışık kaynağından gelen ışımanın, analitin floresans emisyonunun ve numune hücresinde olası saçılmanın tamamen sönümlendiğinden emin olacak kadar uzun, fakat analitin fosforesans sinyalinin makul sinyal-gürültü oranında ölçülebileceği kısalıkta olmalıdır. Veri toplama süresi ise gecikme süresinin hemen ardından başlar. Uyarılma işlemi devam etmediği için sönümlenmekte olan fosforesans şiddeti-zaman grafiğinin altındaki alanın hesaplandığı süredir. Çok kısa veri toplama sürelerinde ölçülen alan küçük olacağından duyarlılığı olumsuz etkilerken, uzun veri toplama sürelerinde fosforesans sinyali sönümlenmiş olacağından sadece gürültü integre edilmekte ve sinyal-

gürültü oranı düşmektedir. Dolayısıyla, gerek gecikme, gerekse veri toplama süreleri deneysel olarak tespit edilmelidir. Ksenon ışık kaynağı kullanan ticari luminesans spektrofotometreleri fosforesans modunda kullanıldığında mümkün olan en kısa gecikme süresi 0.1 ms'dir. Floresans sinyali ve saçılmanın 10^{-9}-10^{-7} s'de sönümlenmesi, ksenon lambasının puls genişliğinin de 10^{-5} s olması nedeniyle 0.1 ms gecikme süresinde bu sinyallerin girişim yapması mümkün görünmemektedir. Bu nedenle, sadece veri toplama süresini deneysel olarak tespit etmek ve 0.1 ms gecikme süresi kullanmak yolu da izlenebilir.



Şekil 5. Analitin Pulslu Bir Işık Kaynağı İle Uyarılması ve Fosforesans Sinyalinin İzlenme Döngüsünün Şematik Gösterimi. t_f; Işık kaynağından gelen elektromanyetik radyasyonun etkin band genişliği, t_d; gecikme süresi, t_g; veri toplama süresi

2.6.2.3. Floresans ve Fosforesansı Etkileyen Değişkenler

Moleküler yapı ve kimyasal çevre, maddenin lüminesans yapıp yapmamasına ve lüminesans şiddetine etki eder.

Kuvantum Verimi: Floresans ve fosforesans için kuvantum verimi, lüminesans yapan moleküllerin sayısının, toplam uyarılmış molekül sayısına oranı olarak tanımlanır. Kuvantum verimi (ϕ), floresans (k_f), sistemler arası geçiş (k_s), dış dönüşüm (k_{dd}), iç dönüşüm (k_{id}), ön ayrışma ($k_{öa}$) ve ayrışma (k_a) olaylarından etkilenir. Bu ilişki şu şekilde ifade edilebilir;

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_s + k_{dd} + k_{id} + k_{öa} + k_a}$$

Floresansta Geçiş Tipleri: Bir molekülün ışığı absorplama yeteneği ne kadar yüksek olursa floresans emisyon şiddeti de orantılı olarak yüksek olur. $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin molar absorbtivite katsayısı yaklaşık 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$ mertebelerinde olup bu moleküllerde gözlenen $\pi^* \rightarrow \pi$ floresansı da oldukça şiddetlidir. Heteroatom içeren bileşiklerde ise $n \rightarrow \pi^*$ geçişi söz konusudur ve bu geçişin molar absorbtivite katsayısı yaklaşık 10^2-10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ olduğundan bu moleküllerin yaptığı floresans şiddeti göreceli olarak düşüktür. Fakat, $n \rightarrow \pi^*$ türü bir geçişten sonra oluşan sistemler arası geçiş olasılığı $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi sonrası oluşan geçişe göre daha yüksektir. Bu nedenle heteroatom içeren bir molekülde triplet hal oluşma olasılığı dolayısıyla fosforesans oluşma ihtimali daha yüksektir.

Floresans ve Yapı: Molekülün düzlemsel ve rijit yapıda olması, konjugasyon ve halka sayısının artması, floresans verimini artırır. Halkalı bir yapıda elektron yoğunluğunu artıran substitüentler de floresans kuvantum verimini artırır. Ancak yapıya halojenlerin bağlanması sistemler arası geçişi artırdığı için floresansı düşürür.

Sıcaklık ve Çözücü Etkisi: Birçok molekülde floresansın kuvantum verimi sıcaklık arttıkça azalır. Yüksek sıcaklıklarda uyarılmış atomların çarpışma olasılığı artacağından iç dönüşüm yoluyla durulma

artar ve floresans azalır. Çözücü viskozitesinin artması da floresansta artmaya neden olur. Bir molekülün floresansı, ağır atomları veya yapılarında bu atomların içeren çözücüler varlığında azalır. Bu etki, ağır atomların floresans yapan bileşiklerde sübstitüent olarak bulunduğu durumdakine benzer şekilde triplet oluşum hızında artışa sebep olur. Çözeltiye ağır iyon ilavesiyle floresans azalır, fosforesans artar.

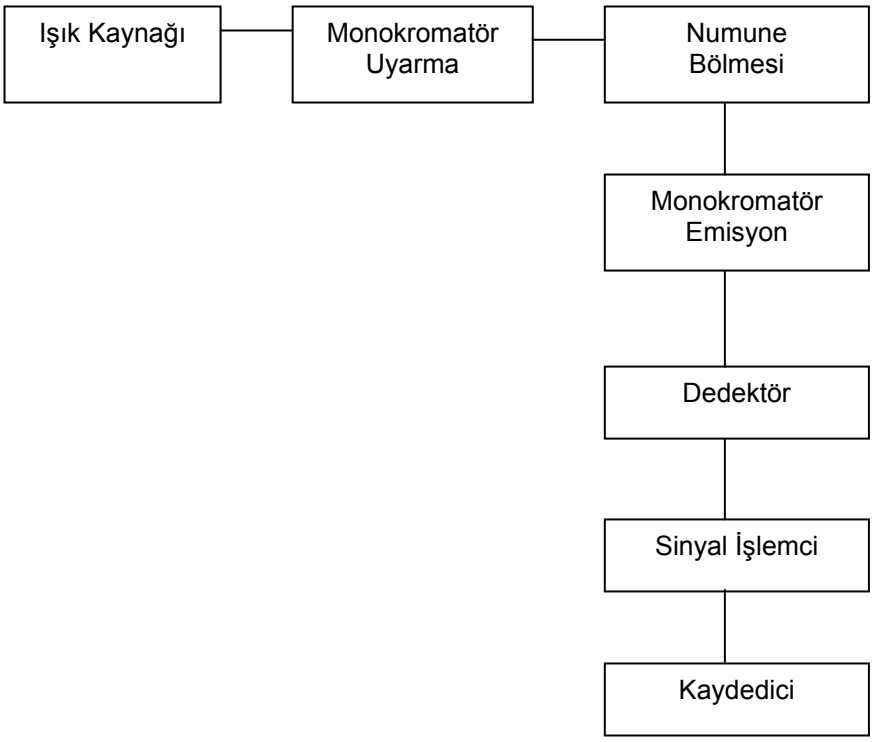
pH'nın Etkisi : Bileşiğin pH' ya bağlı olarak iyonlaşmış veya iyonlaşmamış halde bulunması floresansı etkiler. Bu tip bileşiklerin emisyonundaki değişimler, rezonansın değişmesinden kaynaklanır.

Çözünmüş Oksijenin Etkisi: Bir çözeltide oksijen bulunması genellikle floresans verimini düşürür. Oksijenin paramanyetik özelliğinden dolayı sistemler arası geçiş ve triplet hal oluşumu artmakla birlikte fosforesans sinyali de azalır.

Derişimin Etkisi: Yüksek derişimlerde doğrusallıktan negatif yönde sapma, iki nedene bağlıdır. Birincisi uyarılmış moleküller arası çarpışma sonucu oluşan sönüm, diğeri ise emisyon dalga boyunun absorpsiyon piki ile örtüşmesi sonucu gerçekleşen kendi kendine absorpsiyondur[45-47].

2.6.3. Floresans ve Fosforesans Spektrofotometreleri

UV ve görünür bölgede kullanılan bir ışık kaynağından gelen ışık, uyarma dalga boyu seçicisinden geçtikten sonra numuneye gönderilir. Numunenin emisyonu ışık kaynağına göre 90º lik açıdaki emisyon dalga boyu seçicisinden geçerek dedektöre ulaşır. Böylece kaynaktan gelerek transmit edilen ışığın dedektöre ulaşması engellenir. Şekil 6'da fotolüminesans ölçümü için kullanılan genel bir cihazın bileşenleri gösterilmektedir.



Şekil 6. Bir Spektroflorimetrenin Bileşenleri

Floresansın ölçüldüğü dalga boyu sabit tutulup uyarma dalga boyunun taranması ile elde edilen spektruma *uyarma spektrumu*, uyarma dalga boyu sabit tutulup emisyon dalga boyunun tarandığı spektruma *emisyon spektrumu* denir. Hem uyarma hem de emisyon dalga boyu seçicilerinin aralarında tanımlanmış bir dalga boyu (veya dalga sayısı) farkı birlikte değiştirilerek elde edilen spektruma ise *senkronize floresans spektrumu* adı verilir[45-47].

2.6.4. Fosforimetrik Yöntemler

Fosforesans, elektronun triplet halden temel hale dönüşünde gerçekleşir. Fosforesans spin yasaklı geçiş olması nedeniyle yarı ömrü (10^{-6}-10 s) floresans yarı ömrüne (10^{-9}-10^{-7} s) kıyasla daha uzundur. Her durumda florimetri daha sık kullanılan bir teknik olmakla birlikte RTP yöntemi önemli bazı avantajlara sahiptir. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.

-Triplet uyarılmış hal daha uzun ömürlü olduğundan göreceli olarak daha basit cihazlar ile çalışılabilir.

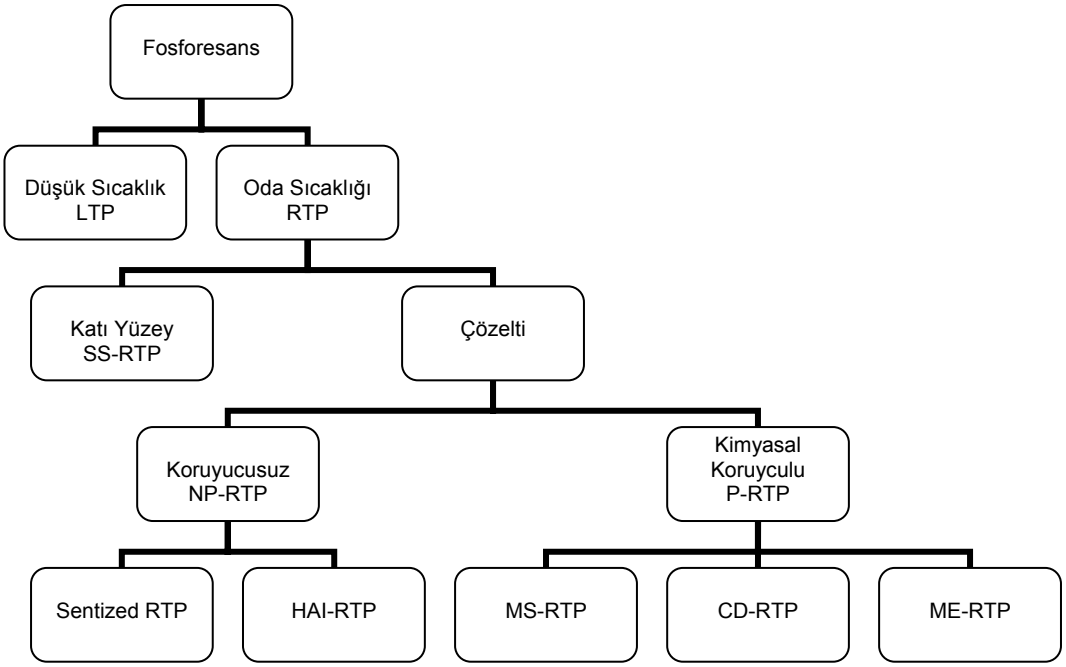
-Uygun gecikme süreleri (t_d) seçilerek kısa ömürlü floresant moleküllerin ve saçılan ışığın girişimlerinden kurtulmak mümkündür.

-Fosforesans sinyallerinde Stokes kaymasının daha fazla olması, uyarma dalga boyunun spektral ayırımını kolaylaştırmaktadır.

-Fosforimetrik yöntemlerde sinyalin daha uzun dalga boylarında gözlenmesi ve her floresant molekülün fosforesant olmaması nedeniyle genel olarak daha seçicidir.

Bu avantajların yanında RTP sinyali gözleyebilmek için; Işımasız durulmayı azaltacak rijit bir ortam, sistemler arası geçişi artırarak triplet uyarılmış haldeki elektron populasyonunu artıracak ağır atom kullanma zorunluluğu ve fosforesans sinyalinin bastırılmasında en önemli parametre olan çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması gibi bazı önemli koşullar gereklidir.

Fosforesans metodolojilerinin sınıflandırılması Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Fosforesans Yöntemlerinin Sınıflandırılması

2.6.4.1. Düşük Sıcaklıkta Fosforesans (LTP)

Düşük sıcaklıktaki fosforesans yönteminde numune uygun bir çözücüde çözülülür ve 1-3 mm çapındaki kuvars hücreye konulduktan sonra, 77 K sıcaklıktaki sıvı azot ortamında dondurulup camsı hale getirilerek fosforesans sinyali ölçülür. Düşük sıcaklıklarda moleküler çarpışma azalacağından iç dönüşüm azalır, fosforesans artar. Fosforesans sinyalinin şiddetinde krayojenik şartların sağlanması ve doğru çözücü seçiminin önemi büyüktür. Polar olmayan bileşikler için en çok kullanılan çözücü etanol/izopentan/dietil eter karışımıdır (EPA, 2:5:5) Polar bileşikler için en çok kullanılan çözücü etanoldür[2,48,49]. Numune hazırlama işlemlerinin uzun sürmesi ve krayojenik koşullarda çalışma güçlükleri nedeniyle rutin analize uygun değildir.

2.6.4.2. Oda Sıcaklığında Fosforesans (RTP)

Katı Yüzey Fosforesans (SS-RTP)

Bu yöntemde analit çözeltisi kağıt, silika, selüloz, alumina ya da sodyum sülfat gibi bir katı yüzeye emdirilir ve çözücü buharlaştırılır. Fosforesans emisyonu yüzeyden ölçülür. Katı matriks moleküler çarpışma yolu ile sönümlenmeyi en aza indirir, yapıda rijitlik sağlanmış olur. Analit çözeltisinin asidik ya da bazik olması iyonlaşmayı etkileyeceğinden pH'ya bağlı olarak fosforesans şiddeti değişebilir. Ayrıca çözeltiye NaI, $AgNO_3$, $Pb(C_2H_3O_2)_2$ gibi ağır iyonları içeren bileşiklerin ilavesiyle sistemler arası geçiş artar ve fosforesansta artış görülür. Katı yüzey kullanıldığında numune hazırlama süresinin uzun ve tekrarlanabilir olmaması, kullanılan katı yüzeylerin zemin sinyaline neden olması yöntemin dezavantajlarıdır[2,45,48,49].

Sıvı Ortamda RTP Yöntemleri

Oda sıcaklığında ve yüzey aktif madde içeren sıvı ortamda fosforesans yöntemi ilk defa 1977 de yayınlandı[3]. Ardından yeni ortam düzenleyicilerin kullanımına dayanan RTP yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar misel ortamında-oda sıcaklığında fosforesans (MS-RTP)[3,4], siklodekstrin ortamında-oda sıcaklığında fosforesans (CD-RTP)[7] ve ağır atom etkili oda sıcaklığında fosforesans (HAI-RTP)[8] yöntemleridir.

Misel Fosforesans (MS-RTP)

Fosforesans sinyalinin oda sıcaklığında ve çözeltide stabilize edilmesi için misel kullanımına dayanan fosforesans yöntemidir. İlk defa Kalyanasunduran[3] ve çalışma arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Sulu bir çözeltide tipik bir misel, çevresindeki çözücüye dönük tarafında hidrofilik başların ve hidrofobik başların miselin merkezinde yer aldığı küresel bir yapı oluşturur. Misellerin yapısal konformasyonu moleküller

arası çarpışmaları azalttığı gibi triplet hali koruyarak titreşimsel durulma ile deaktivasyon olasılığını azaltır. Bu amaçla en çok kullanılan yüzey-aktif madde sodyum dodesil sülfattır (SDS) ve genellikle 10-100 mM derişimlerinde kullanılır. Çözeltiye ağır iyon ilavesi ve deoksijenasyon işlemi fosforesans sinyalinin gözlenebilmesi için zorunludur[2,48,49]. İlk çalışmalarda çözünmüş oksijeni ortamdan uzaklaştırmak için çözeltiden azot gazı geçirilmekteydi. Bu işlem sırasında oluşan köpük optik yöntemler ile uyuşmadığından alternatif deoksijenasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla sodyum sülfit kullanımı basit, etkili ve hızlı bir deoksijenasyon sağladığından en çok tercih edilen yöntemdir[50]. Diğer deoksijenasyon işlemleri Zn(k)/HCl, Na_2CO_3/HCl ilavesiyle oluşan H_2 ve CO_2 gazlarının çıkışı sırasında ortmadan O_2 gazını uzaklaştırması esasına dayanır[51]. Bu işlemle deoksijenasyonun hızlı olduğu rapor edildiyse de oldukça asidik koşullara neden olması ve RTP sinyalinin gaz çıkışı tamamladıktan sonra ancak 10 dakika kadar stabil kalabilmesi nedeniyle tercih edilmez. Halbuki, çözeltide Na_2SO_3'ün aşırısı bulunduğundan, çözeltinin moleküler oksijenden uzun süre korunması mümkündür.

Sonraki yıllarda mikro-emülüsyon ve blok-kopolimerler ile oluşturulan misel ortamlarında RTP çalışmaları da yayınlanmıştır. Farklı koruyucu ortamlara ihtiyaç duyulmasındaki nedenler; analit moleküllerinin sulu ortamda çözünürlüklerini artırmak, fosforimetrik yöntemlerin duyarlılığına etkisini incelemek, kullanılan ağır iyon ve oksijen giderici kimyasalların çökelek oluşturmadığı kimyasal ortamlar bulmak ve köpük oluşumunu azaltma çabalarından kaynaklanmaktadır. Bu amaçla suda çözünen 1-vinilnaftalen, metakrilik asit kopolimerleri ilk defa 1991'de kullanılmış ve köpük oluşumunun önemli derecede azaldığı belirtilmiştir[52]. Poli(etilenoksit)-Poli(propilenoksit)-Poli(etilenoksit) blok kopolimeri veya bunların SDS ile karışımları da bu amaçla kullanılmıştır[53]. Mikro-emülsiyon RTP çalışmalarında ağırlıklı olarak sulu ortamda hazırlanmış SDS miselleri ile % 0.01-%0.02 derişimlerinde 1-butanol, 1-pentanol veya n-

heptan, diklorometan katılmakta ve ağır iyon olarak da talyum nitrat kullanılmaktadır. Yöntemin avantajları olarak polar olmayan analit türlerinin çözünürlüğünün artması ve analitin moleküler oksijenden daha verimli korunması olduğu belirtilmiştir. Buna rağmen deoksijenasyon işlemi zorunludur[54].

Siklodekstrin Ortamında RTP

Çözeltiden RTP sinyali gözlemenin diğer bir yolu da analit molekülün taç eterin hidrofobik kavitesine girmesi ile sağlanan rijitlik sonucu gerçekleşir. Deoksijenasyon her durumda gerekli olmakla birlikte ağır atom ilavesi yapısında halojen içermeyen taç eterler için gereklidir. Fakat, fosforesans kuvantum verimliliğini artırmak için eklenebilir. Polar olmayan moleküllerde van der Waals etkileşiminin kuvvetli olabilmesi için kavite ve molekül boyutlarının uyumlu olması gerekir. Polar moleküllerde ise taç eter ile analit arasında hidrojen bağı oluşmaktadır[55]. Analitten gözlenen RTP sinyali, kavitenin analiti çözünmüş oksijenden etkili bir şekilde koruması ve rijit bir ortam sağlamasından kaynaklanmaktadır.

Duyarlılaştırılmış Fosforesans (Sensitized-RTP)

Duyarlılaştırılmış RTP, uyarılmış haldeki analit molekülü ile ortama ilave edilmiş fosforofor arasında triplet-triplet enerji transferi yolu ile gerçekleşir. Dolayısıyla, bir donör molekül (analit) ve akseptör (fosforofor) molekül arasında sık ve verimli çarpışma ortamının sağlandığı ve donör molekülün triplet enerji seviyesinin akseptör moleküle kıyasla daha yüksek enerjiye sahip olduğu durumlarda mümkündür. Ayrıca, enerji transferinin verimli olabilmesi için donör ve akseptör moleküllerin fosforesans spektrumlarının da örtüşmesi ve fosforesans yarı ömürlerinin yeterli derecede uzun olması gereklidir[56].

Fosforofor olarak biasetil ve bromonaftalin en sık kullanılanlardandır ve direkt fosforesans moduna kıyasla önemli derecede sinyal artışı sağlanmaktadır. Fakat bu modun tercih edilmesinde esas önemli etken seçiciliğin artmasıdır. Örneğin, floren, naftalin, fenantren ve piren içeren bir çözeltide piren tayini amacıyla fosforofor olarak tripaflavin kullanıldığında floresans ve MS-RTP yöntemlerine kıyasla, seçicilik faktöründe sırasıyla 2, 7 ve 35 kez artış sağlanmıştır[57].

Ağır İyon Etkili Fosforesans (HAI-RTP)

Oda sıcaklığında fosforesans sinyalinin SS-RTP ve MS-RTP yöntemlerinden farklı olarak herhangi bir koruyucu yapıya gerek duymaksızın, doğrudan analit çözeltisinden ölçülebilmesine imkan sağlayan bir yöntemdir. Çözeltiye yüksek derişimde ağır iyon ilave edilir ve deoksijenasyon için genellikle sodyum sülfit çözeltisi kullanılır.

Daha uygun bir isimlendirme olarak korumasız-sıvı RTP önerilmişse de literatürde ağır atom etkili RTP olarak kullanılmaktadır. Başlangıçta sıra dışı az sayıda molekül için geçerli olduğu düşünülmüş, ancak gittikçe artan sayıda molekülün HAI-RTP sinyali oluşturduğu gözlenmiştir.

Koruyucu içeren ortamların polar olmayan bileşiklerin çözünürlüğünü arttırmak gibi bir avantajı olmasına rağmen bunların kör sinyaline neden olmaları, numunenin homojenleştirilmesi veya inert bir gaz geçirerek oksijenin uzaklaştırılması sırasında köpüklenmesi, kullanılan kapların temizlenmesindeki güçlükler, koruyucuların ağır iyon olarak kullanılan bazı kimyasallar ile çökelek oluşturması ve ortamdan çözünmüş oksijeni uzaklaştırma işlemini yavaşlatması gibi dezavantajları vardır. Siklodekstrin kullanıldığında ise deoksijenasyon işlemi oldukça uzun zaman almakta ve tayin sınırları yeterli olmamaktadır. HAI-RTP yöntemi ise bu iki yöntemi basitleştirmektedir. Fosforesans emisyonu sadece yüksek derişimde ağır atom ve sodyum sülfit ilavesiyle basit ve beklemeyi

gerektirmeyecek kadar hızlı bir deoksijenasyon işlemiyle gözlenebilmektedir[58]. Köpük oluşması söz konusu değildir. Bu avantajları, fosforimetrik yöntemlerin akış düzeneklerinde dedektör olarak kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır[8].

HAI-RTP ile az sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda analit molekülleri, kullanılan ağır atomlar ve LOD değerleri Tablo 2' de özetlenmiştir.

Tablo 2. HAI-RTP ile Çalışılan Bazı Moleküllerin Tayininde Kullanılan Ağır Atomlar, LOD Değerleri Ve Yarı Ömürleri.

Bileşik Adı	Ağır Atom	LOD, ng/ml	Yarı ömrü, µs	Kaynak
Dansil klorür	$TlNO_3$	5	-	8
Dansillenmiş amino asit	$TlNO_3$	-	260-640	58
Naproksen	$TlNO_3$/KI	18	1028	58, 59
Nafronil	$TlNO_3$/KI	3	300	60
Nafozolin	KI	44	632	61, 62
Naftopidil	$TlNO_3$	21	475	63
Triptamin	$TlNO_3$/KI	20	90	58
Triptofan	$TlNO_3$/KI	11	166	58
Melatonin	KI	3.6	260	64
Nabumeton	$TlNO_3$	11.6	-	65
Propranolol	KI	14.4	-	66
Propranolol	KI	7.7	1250	67
Pindolol	KI	21.1	-	68

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Karvedilol (Bilim)
- Telmisartan (Glaxo Smith Kline)
- Metanol (JT. Baker)
- Asetonitril (JT. Baker)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Sodyum sülfit (Merck)
- Potasyum iyodür (Merck)
- Hegzadesiltrimetil amonyum bromür (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat (JT. Baker)
- Fosforik asit (JT. Baker)
- Deiyonize su

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Spektroflorimetre : Varian, Cary Eclipse
- HPLC : Shimadzu LC 20A
- HPLC kolonu : Zorbax SB-C8 250x4.6 mm 5 µ
- Hassas terazi : Shimadzu AW 320
- Ultrasonik banyo : Bandelin Sonorex

- HPLC saflıkta su cihazı : Sartorius ve Millipore Simplicity
- pH metre : Orion 720A
- Mekanik karıştırıcı : Nüve MK418

3.3. Kullanılan Farmasötik Preparatlar

Çalışılan etken maddeler, bu maddelerin preparatlarının müstahzar adları, farmasötik şekilleri ve doz içerikleri Tablo 3'te verilmektedir.

Tablo 3. Çalışılan Etken Maddeler ve Müstahzarları

Etken Madde	Müstahzar Adı	Farmasötik Şekil	Birim Doz İçeriği
Karvedilol	Coronis	Tablet	6.25 mg
Telmisartan	Pritor	Tablet	80 mg

3.4. Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Karvedilol Stok Çözeltisi

Çalışmalarda kullanılacak karvedilol stok çözeltisi derişimi 0.5 mg/ml olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Ara stok çözeltiler metanol ile hazırlanmış, ölçüm yapılacak derişim değerlerine su ile seyreltilmiştir.

3.4.2. Telmisartan Stok Çözeltisi

Çalışmalarda kullanılacak telmisartan stok çözeltisi derişimi 0.5 mg/ml olacak şekilde 0.1 M NaOH içerisinde hazırlanmıştır. Ara stok çözeltiler 0.1 M NaOH ile, çalışma standartları ise su ile seyreltilmiştir.

3.4.3. KI Çözeltisi

Ağır atom olarak kullanılmak üzere 4 M KI çözeltisi günlük hazırlanmıştır.

3.4.4. Na_2SO_3 Çözeltisi

Deneylerde deoksijenasyon işlemi için günlük hazırlanmış 0.2 M Na_2SO_3 çözeltisi kullanılmıştır.

3.4.5. Hegzadesiltrimetil Amonyum Bromür Çözeltisi

Telmisartanın fosforimetrik tayini için kullanılmak üzere $1x10^{-3}$ M derişiminde hegzadesiltrimetil amonyum bromür çözeltisi hazırlanmıştır.

3.5. Fosforimetrik Yöntem

3.5.1. Karvedilolün Fosforimetrik Tayini

Karvedilolün fosforimetrik tayini için 0.5 mg/ml stok standart karvedilol çözeltisinden hareketle $5x10^{-2}$ mg/ml ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ara stok çözeltiden 10, 20, 50, 200, 400, 1000 µl alınmış ve 400 µl 0.2 M Na_2SO_3 , 5 ml 4 M KI ilave edilerek 10.0 ml'ye su ile tamamlanmıştır. Böylece 0.05 – 5.0 mg/l derişim aralığında standart çözeltiler hazırlanmıştır. λ_{uyarma}= 323 nm ve $\lambda_{emisyon}$= 440 nm'de emisyon değerleri okunarak kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir. Spektral band genişliği 20 nm'dir.

3.5.2. Telmisartanın Fosforimetrik Tayini

Telmisartanın fosforimetrik tayini için 0.5 mg/ml stok standart çözeltisinden hareketle $5x10^{-2}$ mg/ml ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ara stok çözeltiden 10, 20, 50, 100, 400, 1000 µl alınmış ve 400 µl 0.2 M Na_2SO_3 , 5 ml 4 M KI ve 100 µl $1x10^{-3}$ M HTAB çözeltisi ilave

edilmiştir. Bir süre bekletilen çözeltiler su ile 10.0 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece 0.05 – 5.0 mg/l derişim aralığında standart çözeltiler elde edilmiştir. λ_{uyarma}= 306 nm ve $\lambda_{emisyon}$=500 nm'de emisyon değerleri okunarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Spektral band genişliği 20 nm'dir.

3.5.3. Fosforimetrik Yöntemin Karvedilol Tabletlerine Uygulanması

Karvedilol içeren 10 adet tablet duyarlı olarak tartılmış ve bir havanda toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 10.0 mg karvedilole eşdeğer miktarda tartılmış ve balonjojede metanol ile 20.0 ml'ye tamamlanmıştır. Mekanik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Süre sonunda üstteki berrak çözeltiden uygun miktarda alınıp 400 µl 0.2 M Na_2SO_3 , 5 ml 4 M KI ilave edilerek 10.0 ml'ye su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin standart çözeltilerle aynı koşullarda emisyon değerleri okunmuş, kalibrasyon doğrusu yardımıyla tablet içeriğindeki karvedilol miktarı hesaplanmıştır.

3.5.4. Fosforimetrik Yöntemin Telmisartan Tabletlerine Uygulanması

Telmisartan içeren 10 adet tablet duyarlı olarak tartılmış ve bir havanda toz edilmiştir. Toz karışımından 50.0 mg telmisartana eşdeğer miktarda tartılmış ve balonjojede 0.1 M NaOH ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Mekanik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldıktan sonra üstteki berrak çözeltiden uygun miktarda alınıp 400 µl 0.2 M Na_2SO_3, 5 ml 4.0 M KI ve 100 µl $1x10^{-3}$ M HTAB çözeltisi ilave edilmiştir. Bir süre bekletilen çözeltiler su ile 10.0 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin standart çözeltilerle aynı koşullarda emisyon değerleri okunmuş, kalibrasyon doğrusu yardımıyla tablet içeriğindeki telmisartan miktarı hesaplanmıştır.

3.6. Optimize Edilen Koşullar

Çalışmamızda oda sıcaklığında ağır iyon etkili fosforesans yönteminde analitin fosforesans sinyalini etkileyen KI derişimi, $NaSO_3$ derişimi, pH ve HTAB derişimi gibi parametreler incelenerek deneysel koşullar optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında bir parametre incelenirken tüm diğer parametreler sabit tutulmuştur.

3.7. Karşılaştırma Yöntemleri

3.7.1. Karvedilol için Karşılaştırma Yöntemi

Karvedilol tabletlerinden etken madde tayininde karşılaştırma yöntemi olarak literatürde bulunan HPLC-UV yöntemindeki hareketli faz optimize edilmiş ve farklı sabit fazlar denendikten sonra kullanılmıştır [23].

Hareketli Faz Çözeltisi : 0.05 M derişiminde KH_2PO_4 çözeltisi deiyonize su içerisinde hazırlanmıştır. HPLC saflıkta asetonitril ile KH_2PO_4 oranı 65/35 olacak şekilde karıştırılmıştır. Çözeltinin pH değeri fosforik asit ile pH 2.5'e ayarlanmıştır. Hareketli faz çözeltisi süzülüp degaze edildikten sonra pH kontrolü tekrarlanmıştır.

Kalibrasyon Çözeltileri : Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılacak karvedilol stok çözeltisi 500 mg/l olacak şekilde hareketli faz çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Stok çözeltiden hareketle 0.5-20 mg/l derişim aralığında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bütün seyreltmeler hareketli faz çözeltisi ile yapılmıştır.

Kolon sıcaklığı 40 ºC, hareketli faz akış hızı 1 ml/dk ve dalga boyu 247 nm seçilerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

3.7.2. HPLC Yönteminin Karvedilol Tabletlerine Uygulanması

Karvedilol içeren 10 adet tablet duyarlı olarak tartılmış ve bir havanda toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 10 mg karvedilole eşdeğer miktarda tartılmış ve hareketli faz çözeltisi ile balonjojede 20 ml'ye tamamlanmıştır. Mekanik karıştırıcıda 30 d süreyle karışması sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0.45 µm PTFE filtreden süzülerek hareketli faz çözeltisi ile uygun derişime seyreltilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri ile aynı kromatografik koşullarda absorbans değerleri okunmuş ve tablet içeriğindeki karvedilol miktarı hesaplanmıştır.

3.7.3. Telmisartan için Karşılaştırma Yöntemi

Telmisartan tabletlerinden etken maddelerin analizinde karşılaştırma yöntemi olarak literatürde bulunan bir HPLC yöntemi, farklı sabit fazlar ile denenmiş ve en iyi sinyal gözlenen kolon ile çalışılmıştır[42].

Hareketli Faz Çözeltisi : Hareketli faz çözeltisi olarak HPLC saflıkta metanol ve asetonitril karışımı kullanılmıştır (70/30). Hareketli faz çözeltisi süzülüp degaze edilmiştir.

Kalibrasyon Çözeltileri : Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılacak telmisartan stok çözeltisi 500 mg/l olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Stok telmisartan çözeltisinden hareketle 0.5-50 mg/l derişim aralığında standart çözeltiler hareketli faz çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Hareketli faz akış hızı 1 ml/dk ve dalga boyu 270 nm seçilerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

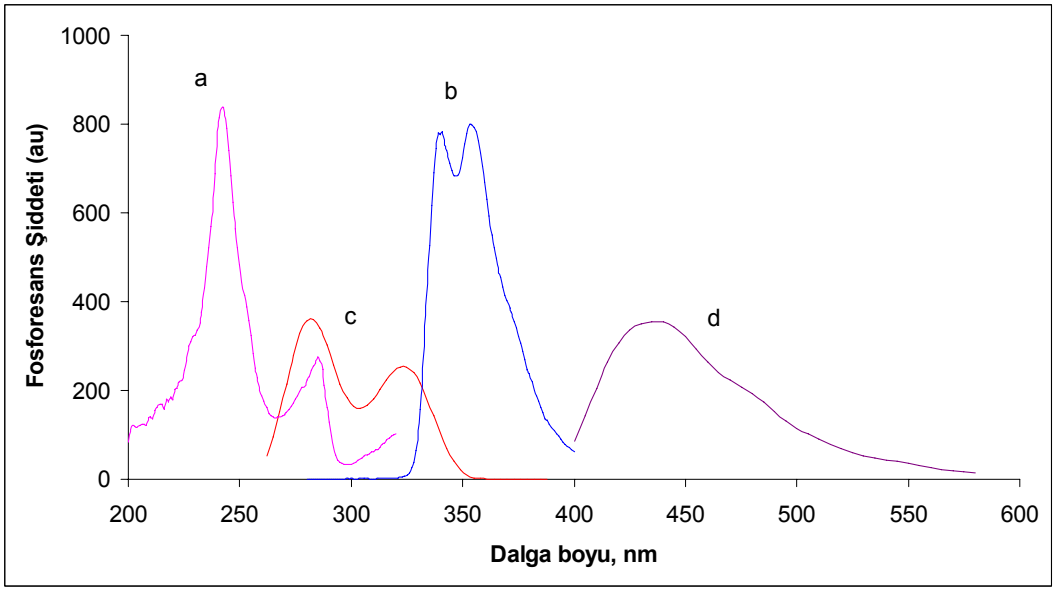
3.7.4. HPLC Yönteminin Telmisartan Tabletlerine Uygulanması

Telmisartan içeren 10 adet tablet duyarlı olarak tartılmış ve bir havanda toz haline getirilmiştir. Toz karışımından 100 mg telmisartana eşdeğer miktarda tartılmış ve balonjojede metanol ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Mekanik karıştırıcıda 30 d karıştırılmıştır. Hazırlanan tablet çözeltisi 0.45 µm PTFE filtreden süzülerek hareketli faz çözeltisi ile uygun derişime seyreltilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri ile aynı kromatografik koşullarda absorbans değerleri okunmuş ve tablet içeriğindeki telmisartan miktarı hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Karvedilolün Spektral Özellikleri

Karvedilolün sulu ortamda hazırlanan 0.5 mg/l çözeltisinden floresans uyarma ve emisyon spektrumları kaydedilmiştir. Şekil 8 (a) ve (b)'de gösterildiği gibi 242 ve 285 nm lerde uyarma maksimum dalga boyları, 341 ve 353 nm'de de floresans emisyon maksimumları tespit edilmiştir. Fosforesans uyarma ve emisyon spektrumları 2.0 mg/l karvedilol, 2.0 M KI ve $2x10^{-3}$ M Na_2SO_3 içeren çözeltiden, oda sıcaklığında kaydedilmiştir. Fosforesans spektrumlarında maksimum uyarma dalga boylarının 282 ve 323 nm ve emisyon maksimumunun 440 nm olduğu gözlenmiştir. Fosforesans spektrumları kaydedilirken gecikme süresi 0.1 ms, veri toplama süresi 2 ms, her iki monokromatörün spektral band aralıkları 20 nm ve dedektör voltajı 800 V'a ayarlanmıştır.



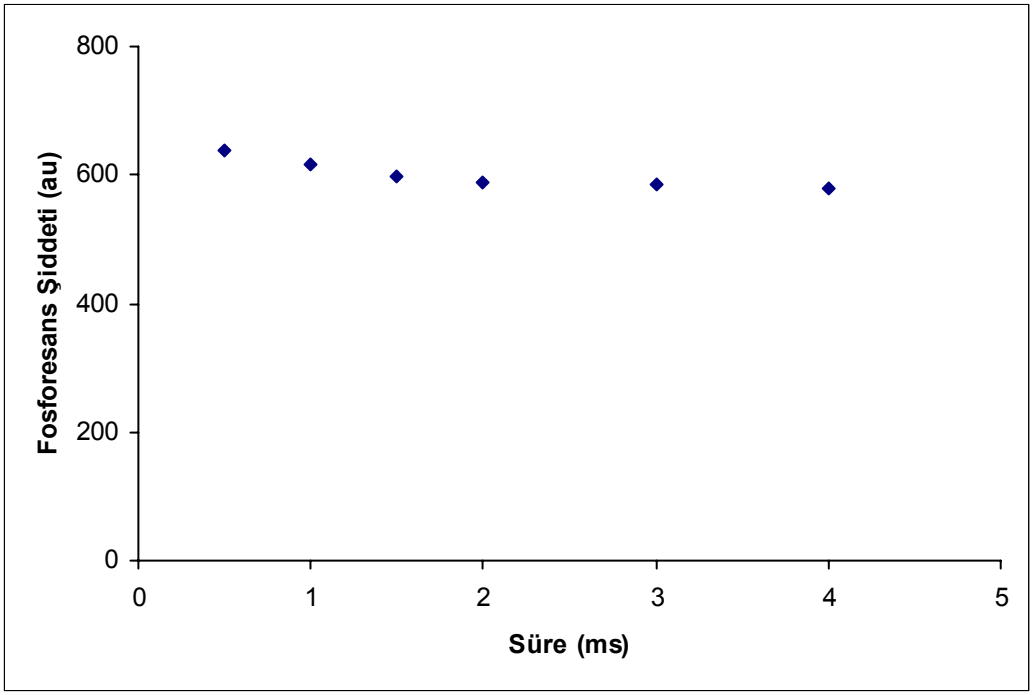
Şekil 8. Karvedilol için Floresans Uyarma (a) ve Emisyon (b) ve Fosforesans Uyarma (c) ve Emisyon (d) Spektrumları

4.1.1. Karvedilol için Optimizasyon Çalışmaları

Karvedilol tayinine yönelik optimizasyon çalışmalarında veri toplama süresi, KI derişimi, Na_2SO_3 derişimi ve ortam pH'sının fosforesans sinyali üzerine etkileri incelendi.

4.1.1.1. Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu

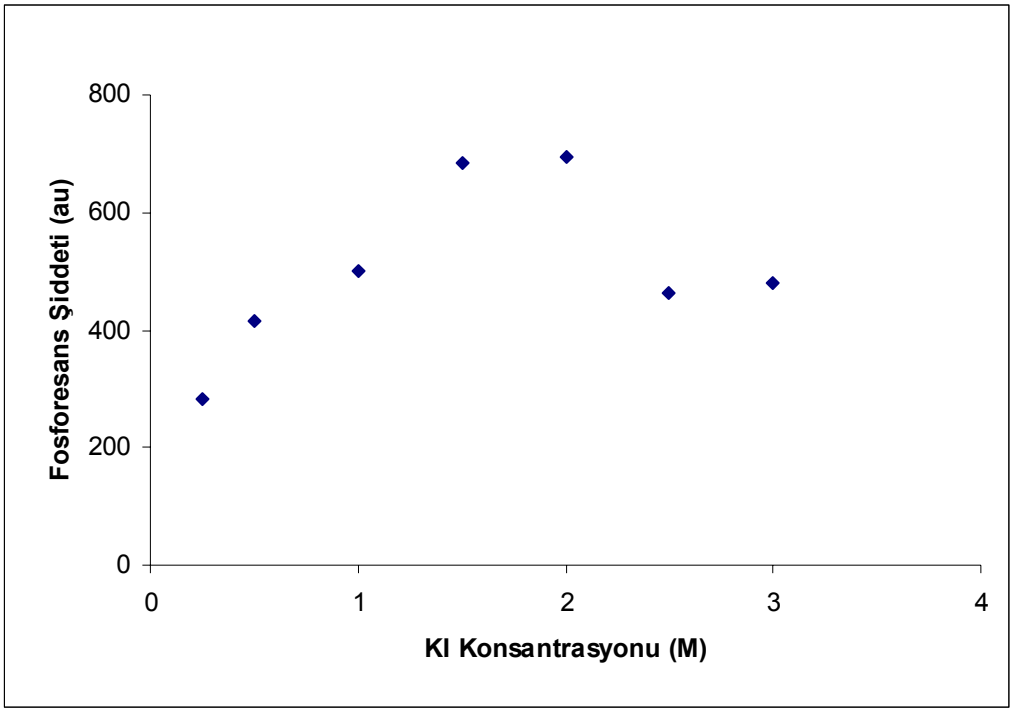
Karvedilol için veri toplama süresi 0.5 ms ile 4 ms arasında taranmış, fosforesans sinyalinin şiddeti ve sinyal gürültü oranları dikkate alınarak 2 ms veri toplama süresi seçilmiştir. Veri toplama süresi ile fosforesans şiddetinin değişimi Şekil 9'da gösterilmektedir.



Şekil 9. Karvedilol için Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu. 5 mg/l Karvedilol, 2.0 M KI, 2 x 10^{-3} M Na_2SO_3, λex =323 nm, λem =440 nm

4.1.1.2. KI Derişiminin Optimizasyonu

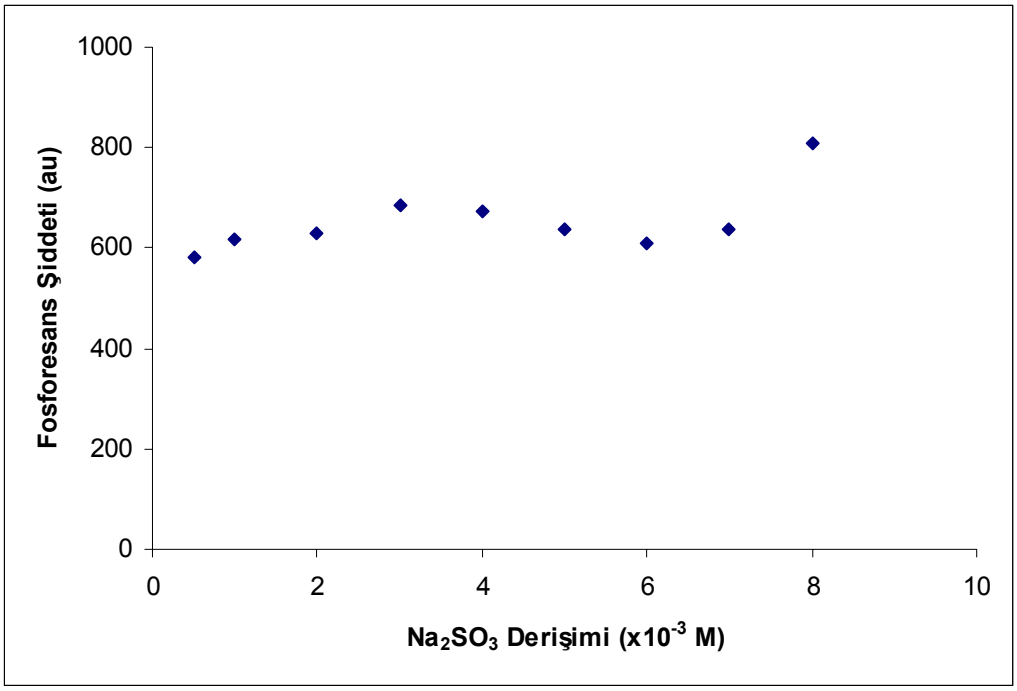
Karvedilol ve Na_2SO_3 derişimleri sabit tutularak KI derişimi 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 M olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve ağır iyon derişiminin fosforesans şiddetine etkisi incelenmiştir. Artan derişimlerdeki potasyum iyodürün fosforesans şiddetine etkisi Şekil 10'da gösterilmektedir. Sonuçta fosforesans şiddetinin yüksek olduğu 2.0 M KI derişimi seçilmiştir.



Şekil 10. Artan KI Derişimine Karşı 5.0 mg/l Karvedilol Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim. Na_2SO_3 derişimi 2x 10^{-3} M , λex=323 nm, λem = 440 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

4.1.1.3. Na_2SO_3 Derişiminin Optimizasyonu

Çözelti içerisindeki Na_2SO_3 derişiminin fosforesans şiddetine olan etkisini incelemek için, karvedilol ve KI derişimleri sabit tutularak artan Na_2SO_3 derişiminin fosforesans şiddetine karşı grafiği çizilmiştir. Şekil 11'de görüldüğü gibi en yüksek fosforesans şiddeti $8x10^{-3}$ M Na_2SO_3 derişiminde gözlenmiştir.

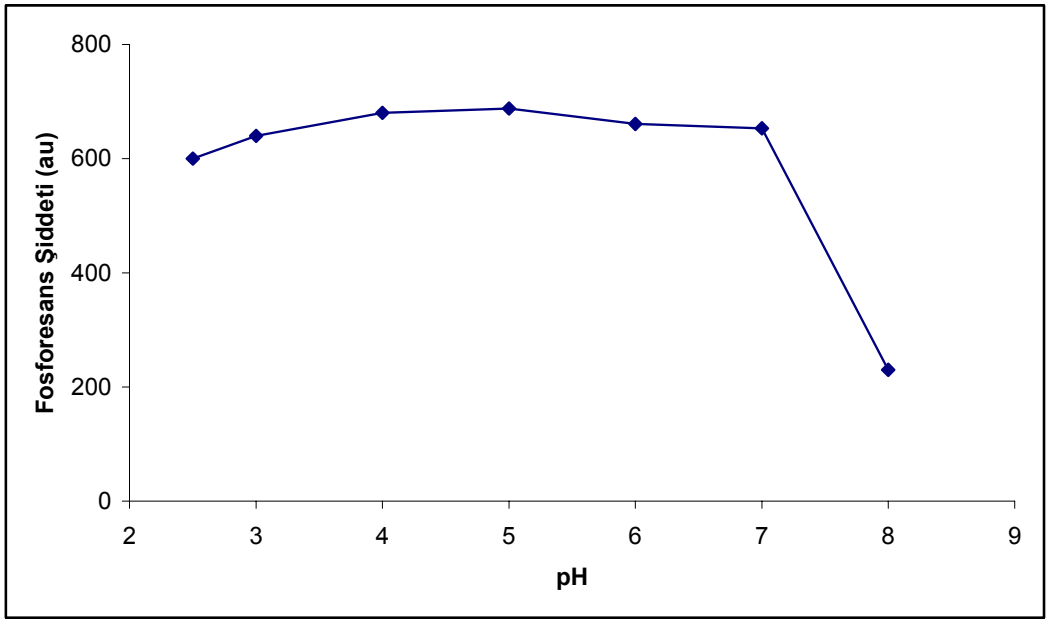


Şekil 11. Değişen Na_2SO_3 Konsantrasyonlarına Karşı 5.0 mg/l Karvedilol Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim. KI derişimi 2.0 M, λex=323 nm, λem = 440 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

4.1.1.4. pH Optimizasyonu

Fosforesans sinyaline etki eden parametre olan pH'nın etkisini incelemek amacıyla pH'sı 2.5-8.0 arasına ayarlanmış, 5.0 mg/l derişiminde karvedilol çözeltilerinin fosforesans sinyalleri ölçüldü. Ortam pH'sının ayarlanmasında 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri kullanılmıştır. pH'ya bağlı olarak karvedilolün fosforesans şiddetinin değişimi Şekil 12'de gösterilmiştir. Fosforesans şiddetinin pH 4-7 arasında sabit kaldığı

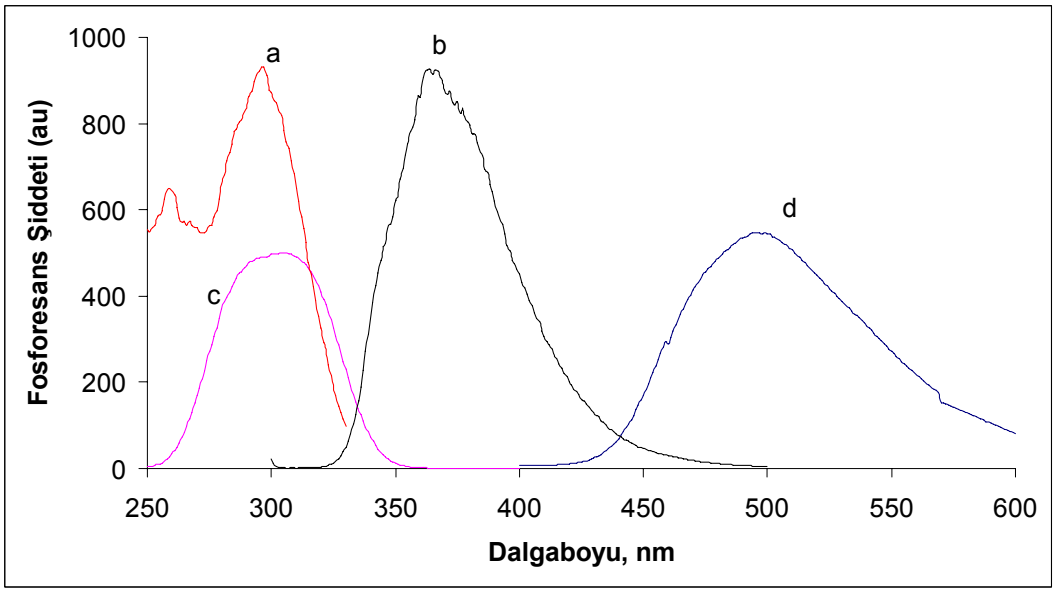
gözlenmiştir. Bu nedenle ortamın kendi pH sı olan 5.6 değeri seçilmiş ve sonraki çalışmalarda da ölçümler pH ayarlanmadan gerçekleştirilmiştir.



Şekil 12. pH Değişimine Karşı 5.0 mg/l Karvedilol Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim. KI derişimi 2.0 M, Na_2SO_3 derişimi 8x 10^{-3} M, λex=323 nm, λem = 440 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

4.2. Telmisartanın Spektral Özellikleri

Telmisartanın sulu ortamda hazırlanan 0.5 mg/l çözeltisinden floresans uyarma ve emisyon spektrumları kaydedilmiştir. Şekil 13 (a) ve (b)'de gösterildiği gibi 296 nm'de uyarma maksimum dalga boyu, 363 nm'de de floresans emisyon maksimumu tespit edilmiştir. Fosforesans uyarma ve emisyon spektrumları 2.0 mg/l Telmisartan, 2.0 M KI ve 2x10^{-3} M Na_2SO_3 içeren çözeltiden, oda sıcaklığında kaydedilmiştir. Fosforesans spektrumlarında maksimum uyarma dalga boyunun 306 nm ve emisyon maksimumunun 500 nm'de olduğu gözlenmiştir. Fosforesans spektrumları kaydedilirken gecikme süresi 0.1 ms, veri toplama süresi 2 ms, her iki monokromatörün spektral band aralıkları 20 nm ve dedektör voltajı 800 V'a ayarlanmıştır.



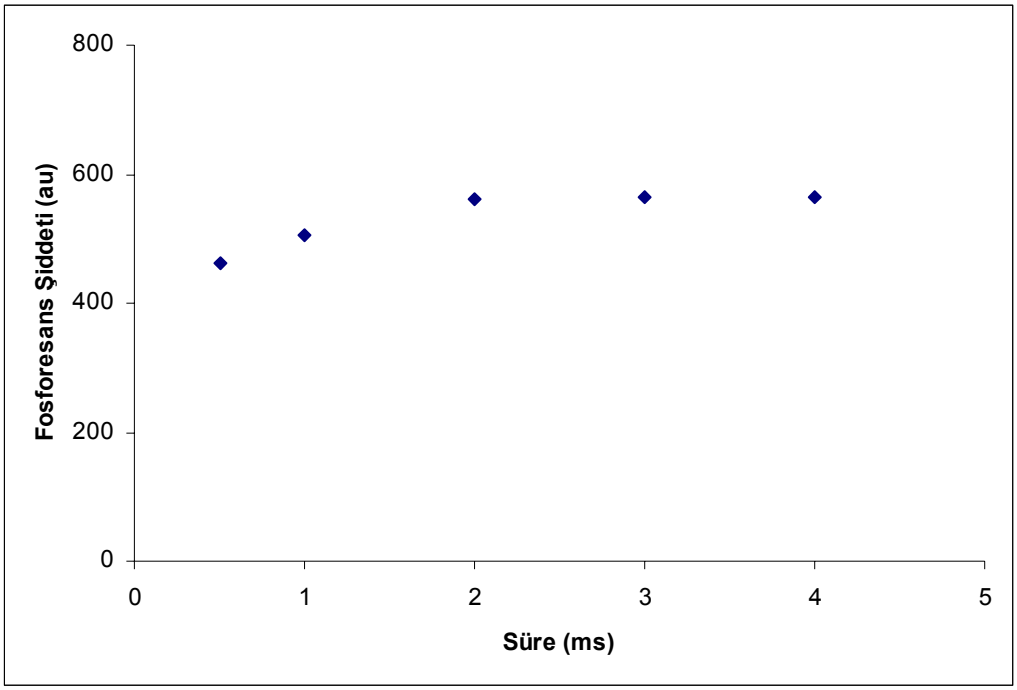
Şekil 13. Telmisartan için Floresans Uyarma (a) ve Emisyon (b) ve Fosforesans Uyarma (c) ve Emisyon (d) Spektrumları

4.2.1. Telmisartan için Optimizasyon Çalışmaları

Telmisartan tayinine yönelik optimizasyon çalışmalarında veri toplama süresi, HTAB derişimi, KI derişimi, Na_2SO_3 derişimi ve pH'nın fosforesans sinyaline etkileri incelendi.

4.2.1.1. Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu

Telmisartan için veri toplama süresi 0.5 ms ile 4 ms arasında taranmış, fosforesans sinyalinin şiddeti ve sinyal gürültü oranları dikkate alınarak 2 ms veri toplama süresi seçilmiştir. Veri toplama süresi ile fosforesans şiddetinin değişimi Şekil 14'te gösterilmektedir.

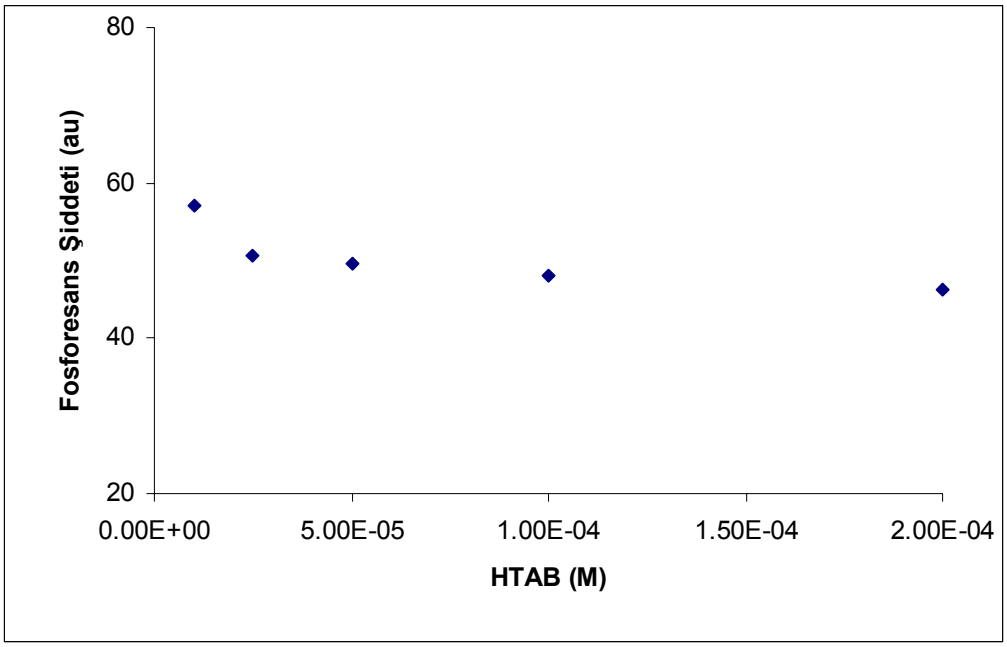


Şekil 14. Telmisartan için Veri Toplama Süresinin Optimizasyonu. 4 mg/l Telmisartan, 2.0 M KI, $2x10^{-3}$ M Na_2SO_3, λex = 306 nm, λem = 500 nm

4.2.1.2. HTAB Derişiminin Optimizasyonu

Telmisartan ile yapılan çalışmalarda hazırlanan paralel çözeltilerden elde edilen sinyallerin tekrarlanabilirliğinin oldukça kötü olması ve bu sinyal farklılıklarının çözeltilerin bekleme süresi, reaktiflerin eklenme sırası, çalkalama gibi işlemlerden bağımsız olduğu deneysel olarak görülmüştür. Ortama yüzey aktif madde ilavesi ile sinyal stabilize edilmiş ve kalibrasyon eğrisi oluşturulabilmek mümkün olmuştur. Ortamda misel oluşturabilecek bir yüzey aktif maddenin varlığı nedeniyle telmisartan için geliştirilen yöntemin HAI-RTP'den ziyade MS-RTP olarak isimlendirilmesi doğru olacaktır. Bununla beraber kullanılan yüzey aktif madde derişimi, literatürdeki MS-RTP yöntemlerindeki derişimlere kıyasla oldukça düşük derişimdedir.

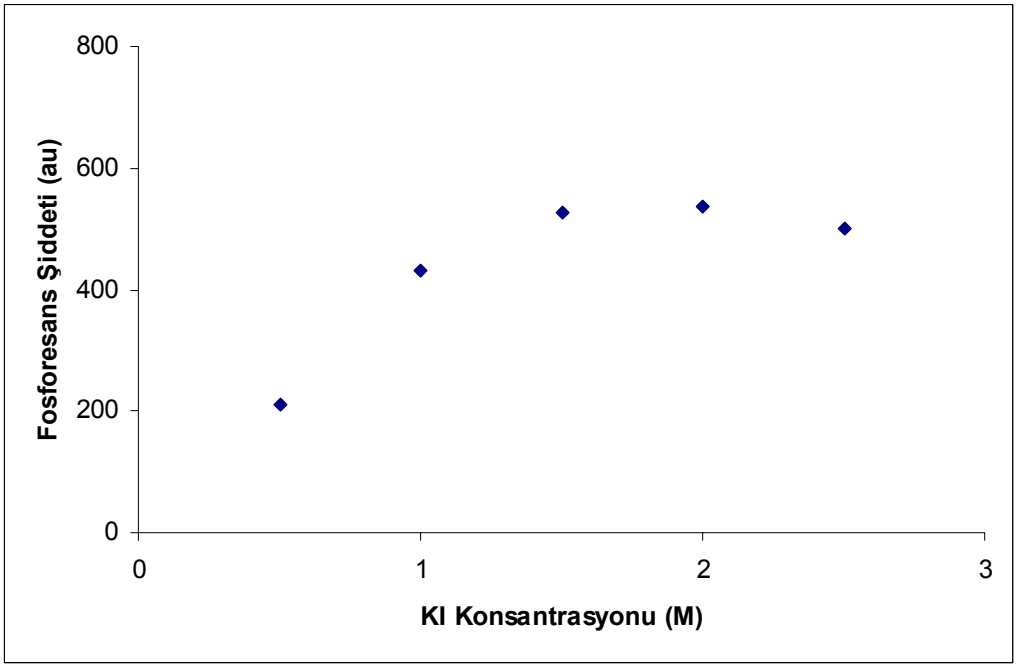
Telmisartan çözeltisinin fosforesans şiddetini stabilize etmek için kullanılan yüzey-aktif maddeler (sodyum dodesil sülfat, anyonik, Pluronik F-127, yüksüz, hegzadesiltrimetil amonyum bromür, katyonik) arasında en yüksek fosforesans şiddeti HTAB kullanıldığında elde edilmiştir. Fosforesans ölçümü yapılacak çözelti içerisindeki HTAB derişiminin optimizasyonu için 1.0×10^{-5}, 2.5×10^{-5}, 5.0×10^{-5}, 1.0×10^{-4}, 2.0×10^{-4} M HTAB içeren telmisartan çözeltileri hazırlanmış ve fosforesans sinyaline etkisi incelenmiştir. En yüksek fosforesans şiddeti 1.0×10^{-5} M HTAB ilavesi ile elde edilmiştir (Şekil 15). HTAB ilavesinin 1.0×10^{-4} M dan fazla olduğu durumlarda çözeltilerin bekletilme süresine bağlı olarak çökelek oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 15. Değişen HTAB Derişimine Karşı 0.3 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim

4.2.1.3. KI Derişiminin Optimizasyonu

Telmisartan, HTAB ve Na_2SO_3 derişimleri sabit tutularak KI derişimi 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 M olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve ağır iyon derişiminin fosforesans şiddetine etkisi incelenmiştir. Fosforesans şiddetinin 1.5-2.0 M KI derişimlerinde sabit kaldığı gözlenmiş ve deneylerin devamında 2.0 M KI derişimi kullanılmıştır (Şekil 16).

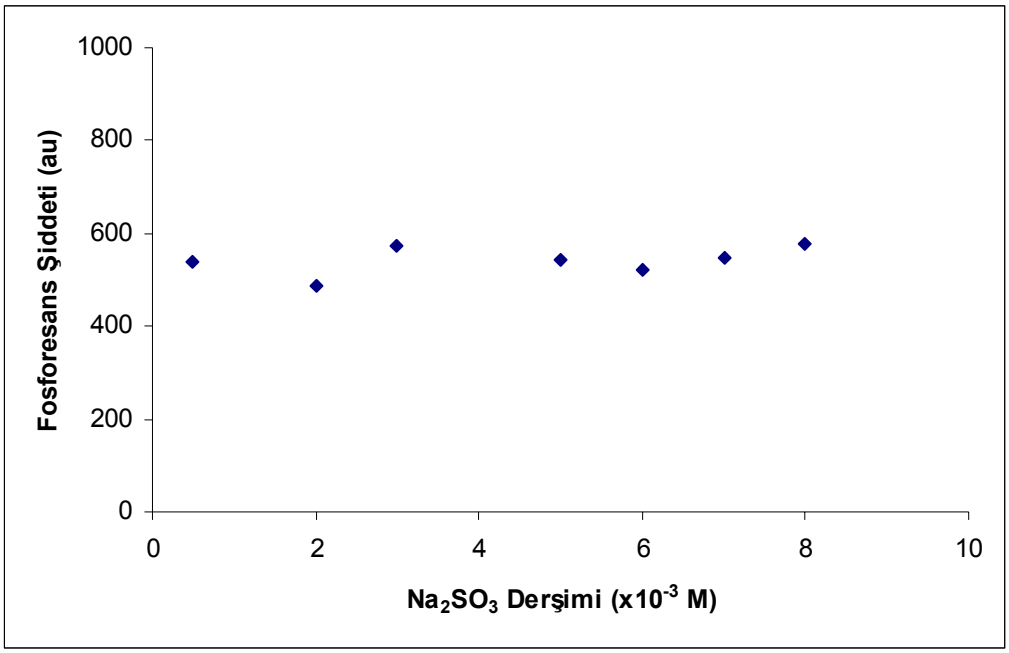


Şekil 16. Artan KI Derişimlerine Karşı 4.0 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim. Na_2SO_3 derişimi 2x 10^{-3} M, HTAB derişimi 1x10^{-5} M, λex=306 nm, λem = 500 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

4.2.1.4. Na_2SO_3 Derişiminin Optimizasyonu

Telmisartan, HTAB ve KI derişimleri sabit tutularak artan konsantrasyonlardaki Na_2SO_3 derişiminin fosforesans şiddetine etkisi Şekil 17'de gösterilmektedir. Değişen Na_2SO_3 derişimine karşı fosforesans

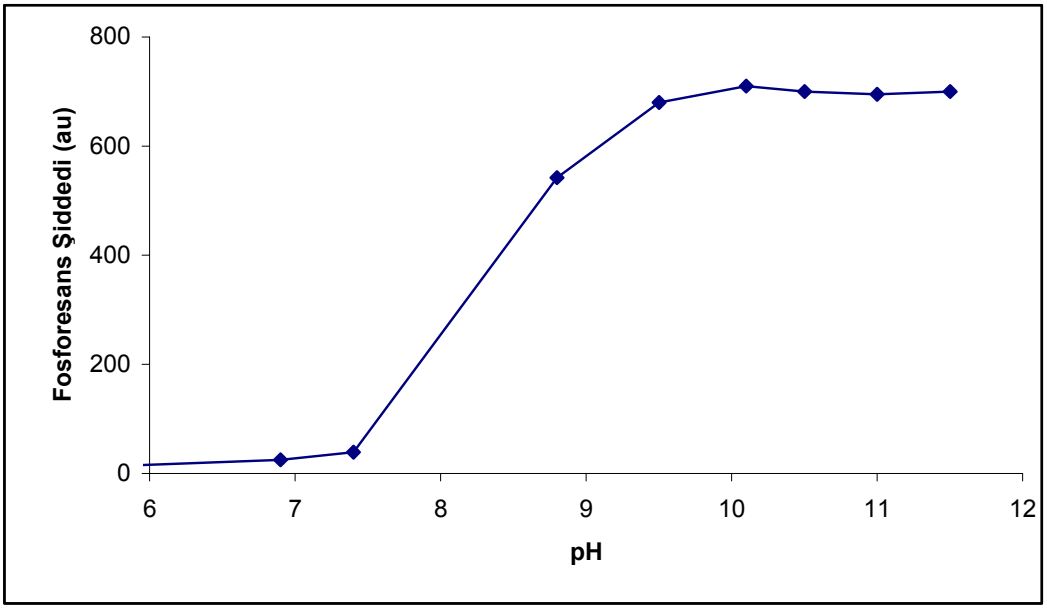
şiddetinde belirgin bir değişiklik gözlenmemekle birlikte deneylerin devamında $8x10^{-3}$ M Na_2SO_3 derişimi kullanılmıştır.



Şekil 17. Değişen Na_2SO_3 Konsantrasyonlarına Karşı 4 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim. KI derişimi 2.0 M, HTAB derişimi $1x10^{-5}$ M, λex=306 nm, λem = 500 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

4.2.1.5. pH Optimizasyonu

Ortam pH'sının telmisartanın fosforesans şiddetine etkisi pH 6.90-11.50 arasında incelenmiştir. Telmisartanın stok çözeltisi 0.1 M NaOH içinde hazırlandığından çalışma çözeltileri de bazik özellik göstermektedir. Çözeltilerin kendi pH sı 10.0 olarak ölçülmüştür. Ortam pH'sının ayarlanmasında 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri kullanılmıştır. Şekil 18'de gösterildiği gibi telmisartanın fosforesans sinyali 9.5-11.5 arasında sabit kalmaktadır. Bu çalışmaya göre ortamın kendi pH değerinde, (pH =10.0), en yüksek sinyali oluşturduğundan sonraki çalışmalarda da ölçümler pH ayarlanmadan gerçekleştirilmiştir.



Şekil 18. pH Değişimine Karşı 5.0 mg/l Telmisartan Çözeltisinin Fosforesans Şiddetindeki Değişim. KI derişimi 2.0 M, Na_2SO_3 derişimi 8x 10^{-3} M, HTAB derişimi 1x10^{-5} M, λex=306 nm, λem = 500 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

4.3. Karvedilol ve Telmisartanın Fosforimetrik Tayinleri için Optimize Edilen Parametreler

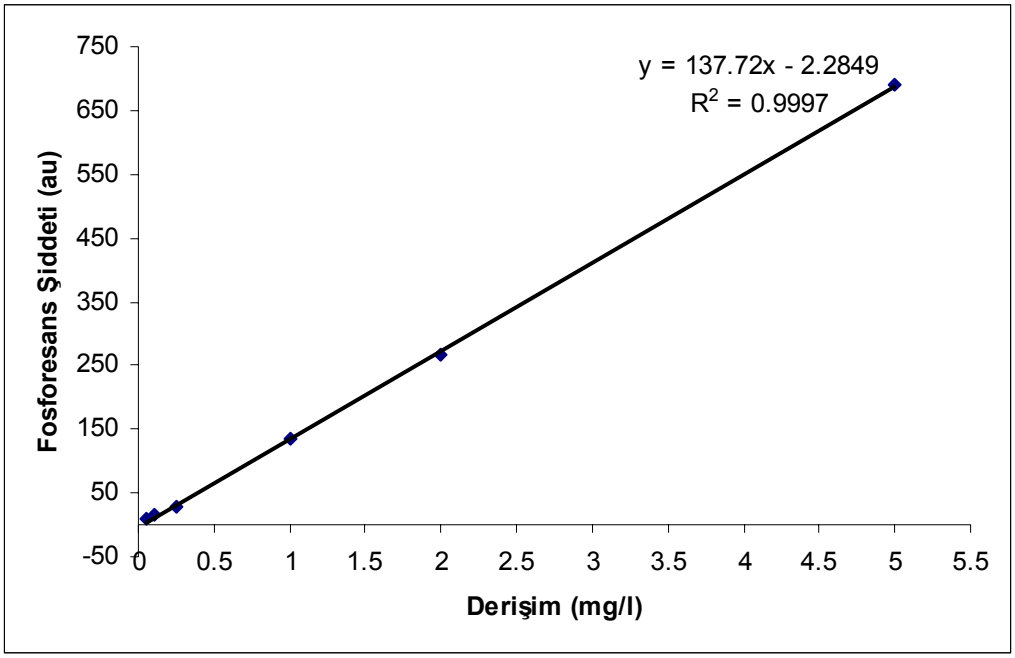
Karvedilol ve telmisartan için optimize edilen parametreler Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. Karvedilol ve Telmisartanın Fosforimetrik Tayini için Parametreler

	Karvedilol	**Telmisartan**
KI Derişimi	2.0 M	2.0 M
Na_2SO_3 Derişimi	8x10^{-3} M	8x10^{-3} M
Veri toplama süresi	2 ms	2 ms
pH	5.6	10.0
HTAB Derişimi	---	1x10^{-5}

4.4. Karvedilolün Fosforimetrik Tayini

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra karvedilol için Tablo 4 'te gösterilen optimum koşullarda, λ_{ex} 323 nm, λ_{em} 440 nm dalga boylarında kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve 0.05-5.0 mg/l karvedilol derişimleri arasında doğrusallık gözlenmiştir (Şekil 19). Kalibrasyon doğrusundaki her bir nokta için 5 ölçüm değerinin ortalaması kullanılmıştır. Karvedilol tayinine yönelik geliştirilen yöntemin analitik performans verileri hesaplanmış ve Tablo 5'te sunulmuştur.



Şekil 19. Karvedilol için Kalibrasyon Doğrusu

Tablo 5. Karvedilol Tayininde Kullanılan Fosforimetrik Yöntemin Analitik Performans Verileri

Regresyon Denklemi	y=137.72x-2.285
Eğimin Standart Hatası	1.151
Kesişimin Standart Hatası	2.577
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.9997
Kalibrasyon Aralığı (mg/l)	0.05-5.0
LOD (mg/l)	0.013
LOQ (mg/l)	0.044

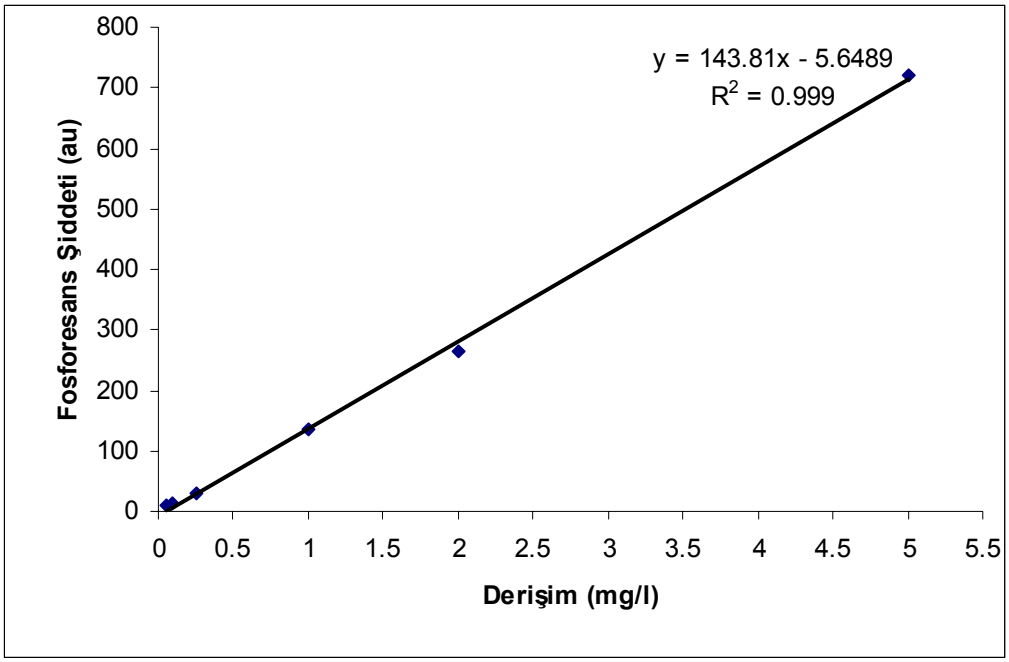
Karvedilolün gün içi çalışmaları altı paralel çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise altı paralel çözelti yeniden hazırlanarak üç ayrı günde yapılmıştır. Karvedilol için 1.5 mg/l derişiminde gerçekleştirilmiş gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. Karvedilol Çözeltisinin Farklı Günlerdeki Sinyal Büyüklükleri (1.5 mg/l) KI derişimi 2.0 M, Na_2SO_3 derişimi 8x 10^{-3} M, λex=323 nm, λem = 440 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

		1. veri seti	2. veri seti	3. veri seti
1.5 mg/l Karvedilol		196.661	189.986	191.129
		197.927	189.441	192.822
		196.215	191.620	192.853
		195.917	192.185	192.684
		198.025	192.211	190.358
		197.535	191.631	191.912
Gün İçi	X_{ort}	197.04	191.18	191.96
	SD	0.90	1.18	1.03
	%RSD	0.458	0.615	0.537
Günler Arası		X_{ort}	193.4	
		SD	2.83	
		%RSD	1.46	

4.5. Telmisartanın Fosforimetrik Tayini

Telmisartan için Tablo 4'te gösterilen optimum koşullarda ve λ_{ex} 306 nm, λ_{em} 500 nm dalga boylarında hazırlanan kalibrasyon doğrusu 0.05-5.0 mg/l telmisartan derişimleri arasında doğrusallık göstermektedir (Şekil 20). Kalibrasyon doğrusundaki her bir nokta 5 ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 20. Telmisartan Tayini için Kalibrasyon Doğrusu

Telmisartan tayinine yönelik geliştirilen yöntemin analitik performans verileri hesaplanmış ve Tablo 7'de sunulmuştur. Telmisartanın gün içi çalışmaları altı paralel çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise altı paralel çözelti yeniden hazırlanarak üç ayrı günde yapılmıştır. Telmisartan için 2.0 mg/l derişiminde gerçekleştirilmiş gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 7. Telmisartan Tayininde Kullanılan Fosforimetrik Yöntemin Analitik Performans Verileri

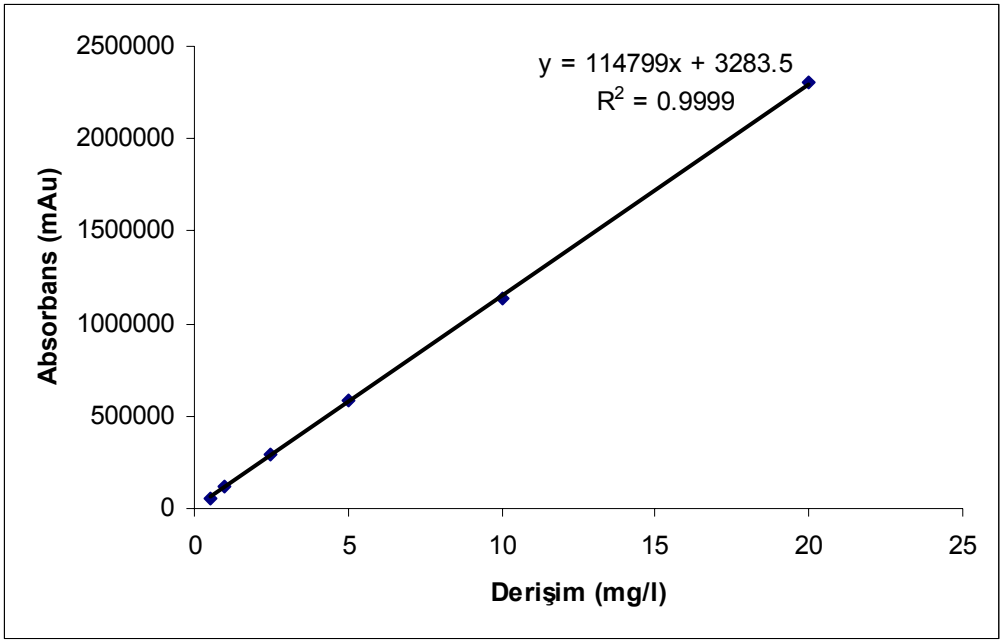
Regresyon Denklemi	y=143.81x-5.649
Eğimin Standart Hatası	2.291
Kesişimin Standart Hatası	5.12
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.9990
Kalibrasyon Aralığı (mg/l)	0.05-5.0
LOD (mg/l)	0.002
LOQ (mg/l)	0.006

Tablo 8. Telmisartan Çözeltisinin Farklı Günlerdeki Sinyal Büyüklükleri (2.0 mg/l) KI derişimi 2.0 M, Na_2SO_3 derişimi 8x 10^{-3} M, HTAB derişimi 1x10^{-5} M, λex=306 nm, λem = 500 nm, veri toplama süresi 2 ms dir.

		1. veri seti	2. veri seti	3. veri seti
2 mg/l Telmisartan		281.322	270.412	269.417
		280.722	268.337	268.847
		280.386	267.328	270.945
		276.439	271.007	267.218
		279.931	269.814	268.515
		282.287	276.644	268.714
Gün İçi	X_{ort}	280.2	270.6	268.94
	SD	2.00	3.26	1.22
	%RSD	0.716	1.20	0.453
Günler Arası		X_{ort}	273.2	
		SD	5.54	
		%RSD	2.03	

4.6. Karvedilol için Karşılaştırma Yöntemi Sonuçları

Karvedilolün fosforimetrik tayini ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla kullanılan HPLC-UV yöntemi ve kromatografik koşullar Bölüm 3.7.1'de anlatılmıştır. Karvedilol tayini için farklı kolonlar denenmiştir. Belirtilen kromatografik şartlarda en iyi ayırım ve sonuçların tekrar edilebilirliği bakımından en uygun sonuçlar Zorbax SB-C8 250x4.6 mm 5 µm kolonu kullanılarak elde edilmiştir. Bu koşullarda karvedilolün alıkonma zamanı 2.66 dakikadır. Kalibrasyon doğrusundaki her bir nokta 3 ölçüm ortalamasına karşılık gelmektedir. Karvedilol için HPLC-UV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 21'de ve yöntemin analitik performans verileri Tablo 9'da sunulmuştur.



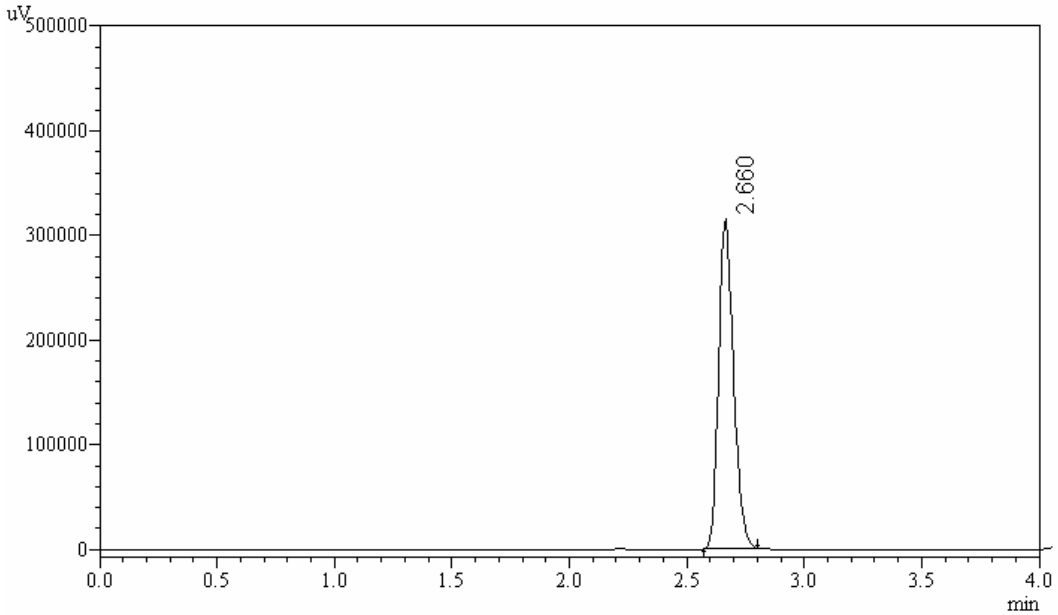
Şekil 21. Karvedilol için HPLC-UV Yöntemi ile Oluşturulan Kalibrasyon Doğrusu

Tablo 9. Karvedilol Tayininde Kullanılan HPLC-UV Yönteminin Analitik Performans Verileri

Regresyon Denklemi	y=114799x-3283.5
Eğimin Standart Hatası	410.51
Kesişimin Standart Hatası	3867.33
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.9999
Kalibrasyon Aralığı (mg/l)	0.5-20.0
LOD (mg/l)	0.006
LOQ (mg/l)	0.027

4.6.1. Karvedilol İçeren Tabletlerde HPLC-UV Yöntemi ile Tayin Sonuçları

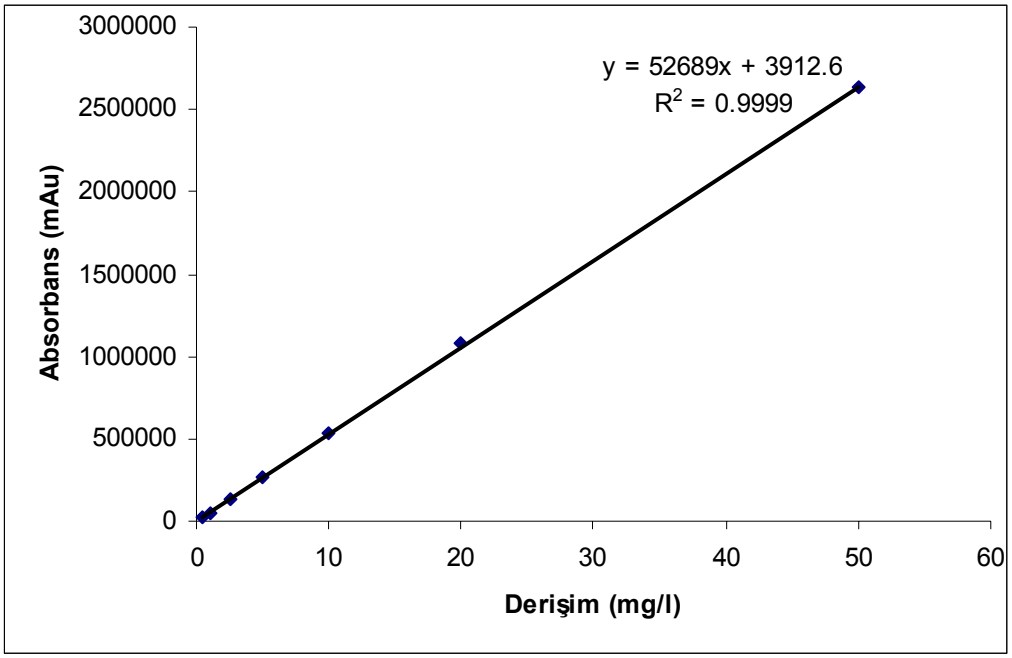
Karvedilol içeren tabletlerde HPLC-UV yöntemi ile yapılan miktar tayininde Bölüm 3.7.2'de anlatılan yol izlenerek kromatogramlar elde edilmiştir. Karvedilol içeren tabletlerde HPLC-UV ile elde edilen örnek kromatogram Şekil 22'de verilmektedir. Tayinlerde sonuçlar 5 paralel numune çözeltisinin ortalamasına karşılık gelmektedir. Tayin sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 13'te verilmektedir.



Şekil 22. Karvedilol İçeren Coronis (6.25 mg) Tabletlerin HPLC-UV ile Karşılaştırma Yöntemine Ait Kromatogram ; 12.5 mg/l Karvedilol

4.7. Telmisartan için Karşılaştırma Yöntemi Sonuçları

HPLC-UV yöntemi ile yapılan çalışmada Bölüm 3.7.3'de anlatılan yol izlenmiştir. Kromatografik ayırım için farklı kolonlar denenmiş ve belirtilen kromatografik şartlarda en iyi sonuçlar Zorbax SB-C8 250x4.6 mm 5 µ kolonu kullanılarak elde edilmiştir. Telmisartan için alıkonma zamanı 1.88 dakika olarak saptanmıştır. Kalibrasyon doğrusundaki her bir nokta 3 ölçümün ortalamasına karşılık gelmektedir. Telmisartan için HPLC-UV yöntemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 23'te ve yöntemin analitik performans verileri Tablo 10'da sunulmuştur.



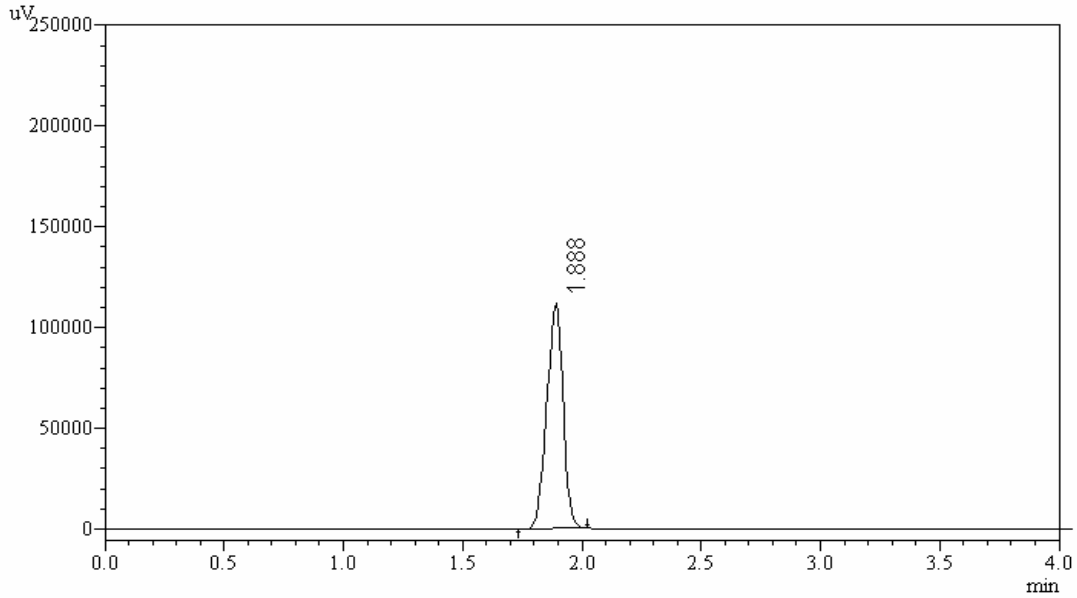
Şekil 23. Telmisartan için HPLC –UV Yöntemi ile Kalibrasyon Doğrusu

Tablo 10. Telmisartan Tayininde Kullanılan HPLC-UV Yönteminin Analitik Performans Verileri

Regresyon Denklemi	y=52689x-3912.6
Eğimin Standart Hatası	261.008
Kesişimin Standart Hatası	5432.5
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0.9999
Kalibrasyon Aralığı (mg/l)	0.5-50.0
LOD (mg/l)	0.007
LOQ (mg/l)	0.022

4.7.1. Telmisartan İçeren Tabletlerde HPLC-UV Yöntemi ile Tayin Sonuçları

Telmisartan içeren tabletlerde HPLC-UV yöntemi ile yapılacak miktar tayininde Bölüm 3.7.4'te anlatılan yol izlenerek kromatogramlar elde edilmiştir. Numune çözeltisi ile elde edilen örnek kromatogram Şekil 24'te verilmektedir. Tayinlerde sonuçlar 5 paralel numune çözeltisinin ortalamasına karşılık gelmektedir. Tayin sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 14'te verilmektedir.



Şekil 24. Telmisartan İçeren Pritor (80 mg) Tabletlerin HPLC-UV ile Karşılaştırma Yöntemine Ait Kromatogram ; 10 mg/l Telmisartan

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fosforimetrik yöntemler ilk analitik uygulamalarında (LTP ve SS-RTP) sinyallerin rijit ortamda ölçülüyor olması ve numune hazırlama işlemlerinin uzun sürmesi nedenleriyle rutin uygulamalara girememiştir. Çözelti ortamında ve oda sıcaklığında fosforesans yöntemlerinin (MS-RTP, CD-RTP, ME-RTP) geliştirilmesi ile göreceli olarak yaygınlaşmıştır. Son olarak bazı moleküllerin herhangi bir ortam düzenleyici katılmadan fosforesans sinyali oluşturması, yöntemi daha da basitleştirmiştir. Yüksek seçiciliği, duyarlılığı, akış sistemlerinde dedektör olarak kullanılma potansiyeli ve sensör uygulamalarına uygunluğundan dolayı fosforimetrik yöntemler ile çalışmalarda artış gözlenmektedir. Literatürde de HAI-RTP ile yapılan çalışmalar aromatik heterosiklik yapıdaki ilaç etken maddeleri üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Yapısal özelliklerini göz önünde bulundurarak seçtiğimiz moleküllerden karvedilol ve telmisartanın koruyucu kullanmaksızın, oda sıcaklığında, sıvı ortamda sadece ağır atom ve oksijen giderici varlığında fosforimetrik spektral özellikleri çalışıldı. Gözlenen sinyallerin analitik olup olmadıklarının tespitinden sonra optimizasyon çalışmalarına geçildi. Karvedilol için HAI-RTP yöntemi ile başarılı sonuçlar elde edilmiş fakat, telmisartan tayininde ortama yüzey aktif ortam düzenleyici madde ilavesi gerekli görülmüştür.

Karvedilol ile yapılan çalışmalarda öncelikle spektral özelliklerin tespit edilmesi için fosforesans spektrumu alınmıştır. Karvedilolün maksimum uyarma dalga boyları 282 ve 323 nm, fosforesans emisyon maksimumu 440 nm olarak tespit edilmiştir. Yöntemin duyarlılığı ve sinyal gürültü oranı göz önünde tutularak dedektör voltajı 800 V olarak seçilmiştir. Bu koşulların belirlenmesinden sonra fosforesans ölçümlerinde sinyal-gürültü oranını etkileyen enstrümental bir parametre olan veri toplama süresi incelenmiş ve veri toplama süresi olarak 2 ms seçilmiştir. Bu deneyler sırasında potasyum iyodür ve sodyum sülfit derişimleri gerek

literatür gerekse ön deneyler göz önünde tutularak sırası ile 2.0 M ve 0.002 M derişimlerde kullanılmıştır. Bu çalışmaların ardından potasyum iyodür derişiminin fosforesans sinyaline etkisi incelenmiş ve en yüksek sinyal 1.5-2.0 M KI derişimlerinde gözlendiğinden 2.0 M KI derişimi seçilmiştir. Karvedilolün sinyalini etkileyebilecek parametrelerden sodyum sülfit derişimi taranmış ve $8x10^{-3}$ M sodyum sülfit derişimi seçilmiştir. Son olarak fosforesans sinyaline etki eden parametre olan pH'nın etkisi çalışılmıştır. Ölçüme hazırlanan karvedilol çözeltilerinin pH'sı 5.6 olarak ölçülmüştür. Ortam pH'sının ayarlanmasında 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri kullanılmıştır. Ortamın kendi pH'sı en yüksek sinyali oluşturduğundan sonraki çalışmalarda da tampon çözeltisi kullanılmadan ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Benzer çalışmalar telmisartan ile yapılmış ve her iki maddenin tayini için belirlenen koşullar Tablo 4'te verilmiştir. Telmisartan stok ve ara stok çözeltileri 0.1 M NaOH ile hazırlandığından ölçüm yapılan çözeltilerde ortam baziktir (pH 10.0). pH nın fosforesans sinyaline etkisi incelenirken ortam pH'sının ayarlanmasında 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri kullanılmıştır.

Telmisartan tayinine yönelik yöntem geliştirme çalışmalarında kalibrasyon grafiğinin oluşturulmasında güçlükler ile karşılaşıldı. Paralel çözeltilerde tekrarlanabilir olmayan veya artan telmisartan derişimi ile doğrusal ilişki göstermeyen fosforesans siddetleri gözlenmiştir. Telmisartanın fosforesans sinyalinde gözlenen bu tutarsızlıkların nedeni, yapısında bulunan ve fosforesans sinyalini oluşturan iki aromatik heterosiklik yapı arasındaki tek bağ etrafında serbestçe dönüyor olmasıdır. Dönme hareketini ve bu hareketin neden olduğu iç dönüşüm yolu ile ışımasız durulmayı minimize etmek amacıyla ortamın rijitliğini artıracak yüzey aktif maddesi ilavesine karar verilmiştir. Bu amaçla telmisartan çözeltilerine sodyum dodesil sülfat (anyonik), hegzadesiltrimetil amonyum bromür (katyonik) ve Poli(etilenoksit)-Poli(propilenoksit)-Poli(etilenoksit) (nötral) yüzey aktif maddeleri

eklenmiştir. HTAB ilavesi ile telmisartanın fosforesans sinyalinin kararlı hale getirilerek kalibrasyon grafiğinin çizilebildiği gözlenmiş ve sonrasında tüm çalışmalar optimize edilerek optimum derişimdeki HTAB ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Başlangıçtaki amaç HAI-RTP yöntemi geliştirilmesi olsa da bu durumda telmisartan tayinine yönelik geliştirilen yöntem daha çok MS-RTP sınıfına dahil edilmektedir.

Optimizasyonlar tamamlandıktan sonra yöntemin analitik performans verileri tespit edilmiş ve Tablo 5'te özetlenmiştir. Önerilen yöntem karvedilol ve telmisartan için 0.050-5.0 mg/l arasında doğrusallık göstermektedir. LOD ($3s_b/m$) ve LOQ ($10\ s_b/m$) değerleri karvedilol için 0.013 ve 0.044 mg/l ve telmisartan için 0.002 ve 0.006 mg/l olarak hesaplanmıştır.

5.1. Karvedilol ve Telmisartan İçeren Tabletlerde Fosforimetrik Tayin Sonuçları

Geliştirilen fosforimetrik yöntemler karvedilol ve telmisartan içeren farmasötik tabletlere uygulanmış ve bulunan değerler ile beyan edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Fosforimetrik tayin sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 11 ve Tablo 12'de verilmektedir.

Tablo 11. Karvedilol İçeren Tabletlerde Fosforimetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

Numune No	Bulunan Miktar (mg)	Belirtilen Miktar (6.25 mg/tablet)
1	6.27	X_{ort} = 6.14
2	5.99	SD = 0.12 %RSD = 1.95
3	6.05	t.SD√n =0.15
4	6.14	Güven Aralığı = 5.99-6.29
5	6.24	

Tablo 12. Telmisartan İçeren Tabletlerde Fosforimetrik Yöntemle Elde Edilen Sonuçlar

Numune No	Bulunan Miktar,mg	Belirtilen Miktar (80 mg/tablet)
1	79.51	X_{ort} = 79.81
2	79.08	SD = 1.2 %RSD = 1.51
3	81.22	t.SD√n = 1.495
4	78.37	Güven Aralığı = 78.31-81.30
5	80.86	

X_{ort} : Aritmetik Ortalama

SD : Standart Sapma

RSD : Relatif Standart Sapma

Karşılaştırma yöntemi olarak aynı numuneler HPLC-UV ile tayin edilerek bulunan değerler ile beyan edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. HPLC-UV yöntemi ile elde edilen tayin sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 13 ve Tablo 14'de verilmektedir.

Tablo 13. Karvedilol İçeren Tabletlerde HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar

Numune No	Bulunan Miktar (mg)	Belirtilen Miktar (6.25 mg/tablet)
1	6.21	X_{ort} = 6.18
2	6.34	SD = 0.1 %RSD = 1.60
3	6.17	t.SD√n = 0.123
4	6.10	Güven Aralığı = 6.06-6.31
5	6.10	

Tablo 14. Telmisartan İçeren Tabletlerde HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar

Numune No	Bulunan Miktar (mg)	Belirtilen Miktar (80 mg/tablet)
1	78.58	X_{ort} = 79.21
2	78.52	SD = 1.03 %RSD = 1.31
3	78.43	t.SD√n = 1.29
4	79.68	Güven Aralığı = 77.92-80.50
5	80.82	

5.2. Yöntemlerin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması, Student – t ve Fisher Testleri

Fosforimetrik ve HPLC-UV yöntemleri doğruluk ve kesinlik açısından kıyaslanmış ve % 95 güven aralığında iki yöntem arasında doğruluk ve kesinlik açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo 15 ve Tablo 16'da özetlenmiştir.

Tablo 15. Tabletlerde Karvedilol Miktar Tayini için Kullanılan Yöntem Sonuçlarının Student-t ve Fisher Testi ile Karşılaştırılması

Karvedilol Tablet	Fosforimetri	HPLC
n	5	5
X_{ort} (mg)	6.14	6.18
Student-t		
Fosforimetri-HPLC	$t_{deneysel}$ = 0.60 < t_{teorik} = 2.31	
Fisher		
Fosforimetri-HPLC	$F_{deneysel}$ = 1.44 < F_{teorik} = 6.39	

Tablo 16. Tabletlerde Telmisartan Miktar Tayini için Kullanılan Yöntem Sonuçlarının Student-t ve Fisher Testi ile Karşılaştırılması

Telmisartan Tablet	Fosforimetri	HPLC
n	5	5
X_{ort} (mg)	79.81	79.21
Student-t		
Fosforimetri-HPLC	$t_{deneysel} = 0.86 < t_{teorik} = 2.31$	
Fisher		
Fosforimetri-HPLC	$F_{deneysel} = 1.35 < F_{teorik} = 6.39$	

Geliştirilen fosforimetrik yöntemlerin duyarlılığının UV-VIS absorbans spektrometrisi ile aynı düzeyde olduğu gözlenmektedir. Tablo 15'te karvedilol ve telmisartan tayinlerinde kullanılan yöntemlerin LOD değerleri verilmektedir. Bu çalışmaların bir kısmında analitin ekstraksiyonu sırasında zenginleştirme işlemi de mevcuttur.

Çok az sayıda molekülün fosforesans özellik göstermesi ve bu moleküllerin de yapısal özellikleri dolayısıyla bir kısmının HAI-RTP sinyali oluşturması bir anlamda yöntemin dezavantajı olmakla birlikte önemli derecede seçicilik sağlamaktadır. HAI-RTP yönteminin analitik performans özelliklerinin karakterize edilmesi, yöntem ile ilgili verilerin artması ile özellikle farmasötik analizlerde alternatif bir yöntem olarak değerlendirilebileceği kanaati taşımaktayız.

Tablo 17. Karvedilol ve Telmisartan Tayinlerinde Kullanılan Yöntemlerin LOD Değerleri

Karvedilol	Numune	Metod	LOD ng/ml	Kaynak
	Tablet	Florimetrik	0.19	18
	İdrar	Senkronize floresans	1	20
	Plazma	HPLC-FL	3.6	23
	Plazma	HPLC-ECD	0.1	26
	Plazma	HPLC-FL	1.3*	27
	Tablet	HPLC-UV	7	30
	Plazma	HPLC-FL	1*	31
	Plazma	HPLC-UV	2.5	32
	Tablet	Fosforimetrik	13	Bu Çalışma
Telmisartan	İdrar	HPLC-FL	1	37
	Plazma	HPLC-FL	0.5*	38
	Tablet	HPLC-UV	30	39
	Plazma, idrar	HPLC-FL	0.1	40
	Tablet	HPLC-UV	4.24	43
	Tablet	Fosforimetrik	2	Bu Çalışma

* Literatürde sadece LOQ değeri verilmiştir

Fosforimetrik yöntemlerin oda sıcaklığında ve sıvı ortamlarda kullanılabileceğini gösteren çalışmaların artması bu yöntemlerin akış düzenekleri ve kromatografik ayırım sonrası dedektör olarak kullanılmasını teşvik edecek ve fosforimetrik yöntemlerin rutin uygulamalara girmesini kolaylaştıracaktır.

6. ÖZET

Farmasötik Tablet Formunda Karvedilol ve Telmisartanın Fosforimetrik Tayini

Karvedilol ve telmisartanın farmasötik tabletlerden tayinine yönelik oda sıcaklığında fosforesans yöntemleri geliştirilmiştir. Kullanılan metodoloji analit moleküllerinin bağıl fosforesans sinyallerinin doğrudan çözelti ortamında ölçümleri esasına dayanmaktadır. Ağır atom olarak potasyum iyodür, oksijen giderici olarak da sodyum sülfit kullanılmıştır. Uyarma ve emisyon maksimum dalga boyları karvedilol için 323 ve 440 nm, telmisartan için 306 ve 500 nm'dir. Bağıl fosforesans şiddeti ve derişim arasındaki ilişki karvedilol ve telmisartan için 0.05-5.0 mg/l derişimleri arasında doğrusaldır. Gözlenebilme ve tayin sınırları karvedilol için 0.013 ve 0.044 mg/l, telmisartan için ise 0.002 ve 0.006 olarak hesaplanmıştır. Karvedilol ve telmisartan ölçümlerinde bağıl standart sapma % 1-3.5 arasındadır. Önerilen yöntemler farmasötik tablet formlarına başarı ile uygulanmıştır. Sonuçlar HPLC-UV yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Karvedilol, Telmisartan, Fosforesans, Ağır Atom, HPLC.

7. SUMMARY

Phosphorimetric Determination of Carvedilol and Telmisartan in Pharmaceutical Tablet Forms

Room temperature phosphorescence methods were developed for the determination of carvedilol and telmisartan in pharmaceutical tablets. This methodology is based on the direct measurements of RTP emission of analytes from their aqueous solutions. Potassium iodide and sodium sulphite were used as heavy atom perturber and oxygen scavenger respectively. The excitation and emission maximum wavelengths were 323 nm and 440 nm for carvedilol and 306 nm and 500 nm for telmisartan. The linear relation was obtained between the relative phosphorescence intensity and concentration of carvedilol and telmisartan in the range of 0.05-2.0 mg/L for both drugs. The limit of detection and the limit of quantitation for carvedilol and telmisartan were found as 0.013 and 0.044 mg/l and 0.0019 and 0.0064 mg/l, respectively. The relative standard deviations of carvedilol and telmisartan are in the range of 1.0-3.5 %. The suggested methods have been successfully applied to the determination of carvedilol and telmisartan in pharmaceutical tablet forms. The results were compared to those obtained with HPLC-UV method.

Keywords : Carvedilol, Telmisartan, Phosphorescence, Heavy Atom, HPLC.

8. KAYNAKLAR

1) Wellons S.L., Paynter R.A., Winefordner J.D. Room temperature phosphorimetry of biologically-important compounds adsorbed on filter paper. Spectrochim. Acta Part A 1974; 30: 2133-2140.

2) Vo-Dinh T. Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis. New York: Wiley; 1984.

3) Kalyanasundaram K., Grieser F., Thomas J.K. Room temperature phosphorescence of aromatic hydrocarbons in aqueous micellar solutions. Chem. Phys. Lett. 1977; 51: 501-505.

4) Cline Love L.J., Skrilec M., Habarta J.G. Analysis of micelle-stabilized room temperature phosphorescence in solution. Anal. Chem. 1980; 52 (4): 754-759.

5) Fernández de la Campa M.R., Liu Y.M., Díaz García M.E., Sanz-Medel A. Fluorescence and liquid room-temperature phosphorescence of the aluminium-ferron chelate in vesicles. Anal. Chim. Acta 1990; 238: 297-305.

6) Ramis Ramos G., Khasawneh I.M., Garcia-Alvarez-Coque M.C., Winefordner J.D. Room-temperature phosphorimetry of polyaromatic hydrocarbons with organized media and paper substrate: A comparative study. Talanta 1988; 35: 41-46.

7) Turro N.J., Bolt J.D., Kuroda Y., Tabushi I. A Study Of The Kinetics Of Inclusion Of Halonaphthalenes With ß-Cyclodextrin Via Time Correlated Phosphorescence. Photochem. 1982; 35: 69-72.

8) Li L., Chen Y., Zhao Y., Tong A. Room-temperature phosphorescence of dansyl chloride solution in the absence of protective medium and its medium effect. Anal. Chim. Acta 1997; 341: 241-249.

9) Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Dokuzuncu Baskı. Ankara: Feryal Matbaacılık; 2000

10) Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C. Lippincot's Illustrated Reviews Serisinden Farmakoloji. Atagündüz P (Çev), 2.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1998.

11) Bökesoy T.A., Çakıcı İ., Melli M. Farmakoloji Ders Kitabı. Ankara: Gazi Kitabevi; 2000

12) Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B., editors. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3 rd ed. London: Pharmaceutical Pres; 2004.

13) Physicans Desk Reference, PDR®, Electronic Library, Thomson Medical Economics, Version 6.0.0a, Montvale, 2005.

14) Beer M.H., Porter R.S., Jones T.V., editors. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. 18 th ed. USA: Merck &Co. Inc. ;2006.

15) http://www.rxlist.com/cgi/generic/telmisartan.html

16) Rx Mediapharma. İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Prof.Dr. Levent Üstünes, Gemaş Yayıncılık; 2008

17) Sweetman S.C. The Complete Drug Reference. 35th Ed. London: Pharmaceutical Pres; 2007.

18) Xu L.X., Hui N., Ma L.Y., Wang H.Y. Study on fluorescence property of carvedilol and determination of carvedilol by fluorimetry. Spectrochim. Acta Part A 2005; 61(5): 855-859.

19) Wen X., Tan F., Jing Z., Liu Z. Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with β-cyclodextrin. J. Pharm. Biomed. Anal. 2004; 34: 517-523.

20) Xiao Y., Wang H.Y., Han Jiuan. Simultaneous determination of carvedilol and ampicillin sodium by synchronous fluorimetry. Spectrochim. Acta Part A 2005; 61(4): 567-573.

21) Reiff K. High-performance liquid chromatographic method for the determination of carvedilol and its desmethyl metabolite in body fluids. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. and Appl. 1987; 413: 355-362.

22) Fujimaki M., Murakoshi Y., Hakusui H. Assay and disposition of carvedilol enantiomers in humans and monkeys: evidence of stereoselective presystemic metabolism. J. Pharm. Sci 1990; 79: 568-572.

23) Hokama N., Hobara N., Kameya H., Ohshiro S., Sakanashı M. Rapid and simple micro-determination of carvedilol in rat plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B. 1999; 732: 233-238.

24) Clohs L., McErlane K.M. Development of a capillary electrophoresis assay for the determination of carvedilol enantiomers in serum using cyclodextrins. J. Pharm. Biomed. Anal. 2001; 24: 545-554

25) Behn F., Laer S., Scholz H. Determination of carvedilol in human cardiac tissue by high-performance liquid chromatograpy. J. Chromatogr. Sci. 2001; 39: 121-4

26) Machida M., Watanabe M., Takechi S., Kakinoki S., Nomura A. Measurement of carvedilol in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. B. Analyt. Biomed. Life Sci. 2003; 798: 187-91

27) Ptacek P., Macek J., Klima J. Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma. J. Chromatogr. B. 2003; 787: 405-410.

28) Yang E., Wang S., Kratz J., Cyronak M.J. Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLC/MS/MS after chiral derivatization. J. Pharm. Biomed. Anal. 2004; 36: 609-615.

29) Mauer H.H., Tenberken O., Kratzsch C., Weber A.A., Peters F.T. Sceening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. J. Chromatogr. A. 2004; 1058: 169-81

30) Stojanovic J., Marinkovic V., Vladimirov S., Velickovic D., Sibinovic P. Determination of carvedilol and its metabolits in pharmaceuticals. Chromatographia 2005; 62: 9-10.

31) Rathod R., Prasad L.P.C., Rani S., Nivsarkar M., Padh H. Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC-fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study. J. Chromatogr. B. 2007; 857: 219-223.

32) Gannu R., Yamsani V.V., Rao Y.M. New RP-HPLC method with UV-detection for the determination of carvedilol in human serum. J. Liquid Chromatogr. 2007; 30: 1677-1685.

33) Radi A., Elmogy T. Differential pulse voltametric determination of carvedilol in tablets dosage form using glassy carbon electrode. Farmaco 2004; 60: 43.

34) Doğan B., Özkan S.A. Electrochemical behavior of carvedilol and its adsorptive stripping determination in dosage forms and biological fluids. Electroanalysis 2005; 22: 2074-2083.

35) Bebawy L.I., Abbas S.S., Fattah L.A., Refaat H.H. Aplication of first-derivative spectrometry, TLC-densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in

pharmaceutical dosage forms and human plasma. Farmaco 2005; 60: 859-67.

36) Chen B.M., Liang Y.Z., Wang Y.L., Deng F.L., Zhou P., Guo F.Q., Huang L.F. Development and validation of liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of telmisartan in human plasma. Anal. Chim. Acta 2005; 540(2) : 367-373.

37) Torrealday N., Gonzales L., Alonso R.M., Jimenez R.M., Lastra E.O. Experimental design approach for the optimisation of a HPLC-fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan in urine. J. Pharm. Biomed. Anal. 2003; 32(4-5) : 847-857.

38) Shen J., Jiao Z., Li Z.D., Shi Z.J., Zhong M.K. HPLC determination of telmisartan in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. Pharmazie 2005; 60(6) : 418-420

39) Patil K.R., Rane V.P., Sangshetti J.N., Shinde D.B. A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of telmisartan and ramipril in dosage form. Chromatographia 2008; 67: 575-582.

40) Nie J., Zhang M., Fan Y., Wen Y., Xiang B., Feng Y.Q. Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of anjiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2005; 828(1-2) : 62-69.

41) Wankhede S.B., Tajne M.R., Gupta K.R., Wadodkar S.G. RP-HPLC method for simultaneous estimation of telmisartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. Indian J. Pharm Sci. 2007; 69: 298-300.

42) Bhat L.R., Godge R.K., Vora A.T., Damle M.C. Validated RP-HPLC method for simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulation. J. of Liq. Chromatogr. 2007; 30: 3059-3067

43) Kutucu T. Telmisartan ve hidroklorotiyazitin YPSK yöntemleri ile aynı anda analizi. Yüksek Lisans. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2008

44) Gonzalez L., Akesolo U., Jimenez R.M., Alonso R.M. Application of capillary zone electrophoresis to the screening of some angiotensin II receptor antagonists. Electrophoresis 2002; 23(2): 223-9.

45) Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. Enstrümental Analiz İlkeleri. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (Çev), 1. Baskı, Ankara: Bilim Yayıncılık;1998.

46) Valeur B. Molecular Fluorescence Principles and Applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002.

47) Yıldız A., Genç Ö. Enstrümantal Analiz. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları; 1993.A-64.

48) Rhys Williams A.T., An Introduction to Phosphorescence Spectroscopy. Beaconsfield: Perkin Emler; 1981.

49) Hurtubise RJ. Phosphorimetry, Theory, Instrumentation and Applications. New York: VCH Publishers; 1990

50) Diaz Garcia M.E., Sanz-Medel A. Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperature phosphorescence. Anal. Chem. 1986; 58: 1436-1440.

51) Zhang H.R., Zhang J., Wei Y.S., Jin W.J., Liu C.S. Study of new facile deoxygenation methods in cyclodextrin induced room temperature phosphorescence. Anal. Chim. Acta 1997; 357: 119-125.

52) Soutar L., Swanson L. Water-soluble copolymers: a new class of media for fluorescence and phosphorescence analyses in aqueous systems. Analyst. 1991; 116: 671-673.

53) Nakashima K., Tango M., Araki K., Takeuchi K. Room temperature phosphorescence of 6-bromo-2-naphthol in micelles of poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) block copolymers and in their mixed aggregates with sodium dodecyl sulfate. Spectrochim. Acta Part A 2002; 58: 123-128.

54) Kuijt J., Ariese F., Th. Brinkman U.A., Gooijer C. Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry. Anal. Chim. Acta 2003; 488: 135-171.

55) De la Peña A.M., Mahedero M.C., Bautista Sánchez A. Room temperature phosphorescence in cyclodextrins. Analytical applications. Analysis 2000; 28: 670-678.

56) Hurtubise R.J. Solid-matrix luminescence analysis: photophysics, physicochemical interactions and applications. Anal. Chim. Acta 1997; 351: 1-3.

57) Goryacheva I.Y., Melnikov G.V., Shtykov S.N., Ponomarev A.S. Phosphorimetric determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in gasoline. J. Anal. Chem. 2000; 55: 795-798.

58) Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Canabate-Diaz B., Fernandez-Sanchez J.F., Fernandez- Gutierrez A. Heavy-atom induced room temperature phosphorescence: a straightforward methodology for the determination of organic compounds in solution. Anal. Chim. Acta 2000; 417: 19-30.

59) Cruces-Blanco C., Segura-Carretero A., Ramiez-Garcia M.I., Fernandez-Gutierrez A. A simple and rapid phosphorimetric method for the determination of naphthalenaacetamide in fruit samples. Int. J. Environm. Anal. Chem. 1999; 75: 377-385.

60) Cruces-Blanco C., Segura-Carretero A., Fernandez Sanchez J.F., Fernandez Guiterrez A. Facile and selective determination of the cerebral vasodilator nafronyl in a commercial formulation by heavy atom induced room temperature phosphorimetry. J. Pharm. Biomed. 2000; 23: 845-850.

61) Fernandez Guiterrez A., Segura-Carretero A., Canabate-Diaz B., Cruces-Blanco C. Determination of the drug naphazoline in pharmaceutical preparations by heavy atom-induced room-temperature phosphorescence, Appl. Spectrosc. 1999; 53: 741-744.

62) Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Canabate-Diaz B., Fernandez Guiterrez A. An innovative way of obtaining room-temperature phosphorescence signals in solution. Anal. Chim. Acta 1998; 361: 217-222.

63) Murillo-Pulgarin J.A., Alanon-Molina A., Alanon-Pardo M.T. Direct determination of naftopidil by non-protected fluid room temperature phosphorescence. Analyst 2001; 126: 234-238.

64) Amjadi M., Manzoori J.L., Miller J.N. Study of heavy atom-induced room temperature phosphorescence properties of melatonin and its analytical application. Spectrochim. Acta Part A 2006; 63: 337-342.

65) Murillo-Pulgarín J.A., Alanon-Molina A., Sánchez I., Robles F. Simple and rapid determination of active metabolite of nabumetone in biological fluids by heavy atom-induced room temperature phosphorescence. Anal. Chim. Acta 2005; 554: 37-42.

66) Canabate-Diaz B., Cruces-Blanco C., Segura-Carretero A., Fernandez- Gutierrez A. Simple determination of propranolol in pharmaceutical preparations by heavy atom induced room temperature phosphorescence. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002; 30: 987-992.

67) Long W.Q., Zhang Z.X., Li L.D. Studies on properties and application of non-protected room temperature phosphorescence of propranolol. Spectrochim. Acta Part A 2002; 58: 2185-2191.

68) Salinas-Castillo B., Canabate-Diaz A., Segura-Carretero A., Fernandez- Gutierrez A. Room-temperature phosphorimetric determination of the beta-blocking agent pindolol in pharmaceutical tablets, urine and blood serum. Anal. Bioanal. Chem. 2007; 387:1945-1948.

ÖZGEÇMİŞ

Adı	:	Ebru
Soyadı	:	Üncüoğlu
Doğum Yeri ve Tarihi	:	Çankırı – 1982
Eğitimi	:	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2001 – 2005) Çankırı Anadolu Lisesi (1994 – 2001) Çankırı Aksu İlkokulu (1989 – 1994)
Yabancı Dili	:	İngilizce
Görevi	:	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı İlaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürlüğü (2006 – …)