



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALİSKİREN VE AMLODİPİNİN BİRARADA YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE MİKTAR TAYİNİ**

ATALAY AKYÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Filiz ARIÖZ ÖZDEMİR

İSTANBUL - 2012

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya
Tez Sahibi : Atalay Akyüz
Tez Başlığı : Amlodipin ve aliskirenin birarada HPLC ile tayini
Sınav Yeri : Analitik Kimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 04.06.2012

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Emre Dölen

Doç. Dr. Sevgi Tatar Ulu

Yrd. Doç. Dr. Filiz Arıöz Özdemir

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İstanbul Üniversitesi

(Danışman) Marmara Üniversitesi

İmza

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 4.06 tarih ve 9 sayılı kararı ile onaylanmıştır. 2012

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının bütünüyle kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasında elde edilmeyen bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ATALAY AKYÜZ

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın hazırlanmasında ve tüm aşamasında bilimsel bilgi ve deneyimleri ile her türlü desteği büyük bir özveri ile gösteren ve çok emeği geçen değerli danışmanım, sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Filiz Arıöz ÖZDEMİR' e,

Huzurlu ve rahat bir çalışma ortamı sağladıkları için başta Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Emre Dölen ve tüm öğretim üyelerine,

Laboratuvar çalışma ortamında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Türkan Yurdun ve Öğretim Görevlisi Nuray Yüктаş'a,

Standart etken madde destekleri için sayın Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş'a, Doç. Dr Armağan Önal, Mehmet Ali Ünlü ve Celalettin İpek'e

Tez çalışmam boyunca gösterdiği anlayış ve destek için Metabolik Sendrom Derneği Başkanı Sayın Prof. Dr. Aytekin Oğuz'a,

Tez çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Arzu Akalın nezdinde PURE Türkiye Sağlık Çalışması Merkez ekibine,

Tez çalışmam boyunca hayatıma kattıkları ve bundan sonra katacaklar için eşim Elçin Giray'a ve hayatım her evresinde bana sonsuz desteğiyle yardımını esirgemeyen annem Aysel Akyüz' e tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

BEYAN.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SEMBOLLER.....	iv
KISALTMALAR.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ	
1.1. Giriş.....	3
1.2. Amaç.....	4
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER	
2.1.AMLODİPİN BESİLAT.....	5
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	5
2.1.2. Farmakolojik Özellikleri.....	5
2.1.3. Analiz Çalışmaları.....	7
2.2. ALİSKİREN HEMİFUMARAT.....	19
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal özellikleri.....	19
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri.....	20
2.2.3. Analiz Çalışmaları.....	20

BÖLÜM 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Cihazlar.....	22
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
3.2.1. Çözeltiler	
3.2.1.1. Aliskiren Çözeltileri.....	23
3.2.2.2. Amlodipin Çözeltileri.....	23
3.2.2.3. Karışım Çözeltisi	23
3.3.4. Hareketli Faz Çözeltisi.....	23
3.4. Analiz Yönteminin Geliştirilmesine İlişkin Çalışmalar.....	24
3.4.1. Kromatografik koşulların Belirlenmesi.....	24
3.5. Yöntem Validasyonu.....	24
3.5.1. Seçicilik	24
3.5.2. Doğrusallık.....	24
3.5.3. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	25
3.5.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	25
3.5.5. Çözelti Kararlılığı	25
3.5.6. Doğruluk	25
3.5.7. Yöntemin Sağlamlığı	26
3.5.8. Uygunluk Testi	26
3.6. Tablet Tozu Karışımında Aliskiren ve Amlodipin Analizi	
3.6.1. Kıyas Yöntemi ile Analiz.....	26
3.6.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Analiz.....	27

BÖLÜM 4. BULGULAR

4.1. Kromatografik koşulların Belirlenmesi	28
4.2. Yöntem Validasyonu	
4.2.1. Seçicilik	35
4.2.2. Tayin Sınırı (LOD) ve Gözlenebilme Sınırı (LOQ)	35
4.2.3. Doğrusallık.....	35
4.2.4. Doğruluk	39
4.2.5. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	40
4.2.6. Çözelti Kararlılığı	41
4.2.7.Yöntemin Sağlamlığı	43
4.2.8. Uygunluk Testi.....	44
4.3. Tablet Tozu Karışında Amlodipin ve Aliskiren Analizi	
4.3.1. Kıyas Yöntemi ile Ölçü Eğrisinin Hazırlanması ve Regresyon Analizi.....	44
4.3.2. Geliştirilen HPLC ve UV-VIS Spektrofotometrik Yöntemler ile Analiz.....	49
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	65

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi
RP-HPLC	: Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	: UltraViyole
VIS	: Görünür Bölge
DAD	: Diod Aray dedektör
ODS	: Oktadesil Silan
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ICH	: Uluslararası Uyum Konferansı
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
SD	: Standart Sapma
RSD	: Bağlı Standart Sapma
t_R	: Alıkonma Zamanı
S/n	: Sinyal / Gürültü
ALS	: Aliskiren
AML	: Amlodipin
ACN	: Asetonitril
MeOH	: Metanol

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil-1. Amlodipin besilatın açık kimyasal formülü.....5
- Şekil-2. Aliskiren hemifumaratın açık kimyasal formülü.....19
- Şekil-3. 160 µg/mL amlodipin besilatın 215 nm dalga boyundaki kromatogramı....28
- Şekil-4. 160 µg/mL amlodipin besilatın 237 nm dalga boyundaki kromatogramı ...29
- Şekil-5. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumaat (1), 13,5 µg/mL amlodipin besilat (2), 10 mM asetat tamponu (pH=4,5), CH₃CN/MeOH, 50/40/10,h/h/h).....30
- Şekil-6. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat(1),13,50µg/mLamlodipin besilat(2),50mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3), CH₃CN/MeOH, 50/30/20,h/h/h).....30
- Şekil-7. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat(1),13,5µg/mL amlodipin besilat(2),50 mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3), CH₃CN/MeOH, 40/40/20,h/h/h).....31
- Şekil-8. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram(218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat(1),13,50µg/mLamlodipin besilat(2),50mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3), CH₃CN/MeOH, 45/15/40,h/h/h)..... 31
- Şekil-9. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram(218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat(1),13,50µg/mLamlodipin besilat(2),50mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3), CH₃CN/MeOH, 30/40/30,h/h/h)..... 32
- Şekil-10. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat(1), 13,50µg/mL amlodipin besilat(2),50 mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3),CH₃CN/MeOH, 50/40/10,h/h/h).....32
- Şekil-11. Kapasite faktörü hesabının kromatogram üzerinde gösterimi.....33
- Şekil-12. Asidik ve bazik türlerin hareketli fazın pH değişimindeki durumları.....34

Şekil-13. Amlodipin ve aliskiren çözelti karışımını içeren kromatogram (26,50 µg/mL aliskiren hemifumarat (1) ve 1,60 µg/mL amlodipin besilat (2), 50 mM fosfat tamponu (pH=3), CH ₃ CN/MeOH, 50/40/10, h/h/h, λ=237, akış hızı 1 mL/dk	34
Şekil-14. Hareketli faz enjeksiyonuna ait kromatogram.....	35
Şekil-15. Aliskiren hemifumaratın 5,0-50,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	37
Şekil-16. Amlodipin besilatın 2,65–26,50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	39
Şekil-17. Aliskiren ve amlodipin karışımının oda sıcaklığında, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	42
Şekil-18. Aliskiren ve amlodipin karışımının +4 °C de, karanlıkta, 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	42
Şekil-19. 130,5 µg/mL aliskiren hemifumaratın sudaki çözeltisinin UV spektrumu..	45
Şekil-20. 49,5 µg/mL amlodipin besilatın sudaki çözeltisinin UV spektrumu.....	45
Şekil-21. Amlodipin besilatın 5,0 – 66,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	47
Şekil-22. Aliskiren hemifumaratın 20,0 – 272,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	48
Şekil-23. Tablet tozu karışımının analizine ait kromatogram (23,98 µg/mL aliskiren (1) 1,60 µg/mL amlodipin (2)).....	50
Şekil-24. Tablet tozu karışımının analizine ait spektrum (10,0 µg/mL amlodipin (1), 150,0 µg/mL aliskiren hemifumarat (2)).....	50

TABLO LİSTESİ

Tablo-1.Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre aliskiren ve amlodipinin alıkonma zamanı değerlerinin değişimi.....	33
Tablo-2.Aliskiren hemifumaratın 5,0 – 50,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatiksel verileri.....	36
Tablo-3. Tablo-2’ deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler.....	37
Tablo-4. Amlodipin besilatın 2,65 – 26,5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanları ve istatiksel veriler.....	38
Tablo-5. Tablo-4’ deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler.....	38
Tablo-6. Aliskiren hemifumarat ve Amlodipin besilat için doğruluk (geri kazanım) çalışması sonuçları.....	40
Tablo-7. Aynı gün ve farklı gün içinde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	41
Tablo-8. Yöntemin sağlamlık parametreleri.....	43
Tablo-9. Sistem uygunluk testi parametreleri.....	44
Tablo-10.Amlodipinin besilatın 5,0 – 66,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait değerler ve istatiksel verileri.....	46
Tablo-11. Tablo-10’ daki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler.....	46
Tablo-12.Aliskiren hemifumaratın 20,0 – 272,0 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen ölçü eğrilerine ait değerler ve istatiksel verileri.....	47
Tablo-13.Tablo-12’deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler.....	48
Tablo-14.10,00 mg amlodipin 150,0 mg aliskiren içeren tablet tozu karışımının geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları ve bu sonuçların geliştirilen kıyas yöntemiyle elde edilenlerle istatiksel olarak karşılaştırılması.....	51
Tablo-15. Geliştirilen HPLC yöntemine ait sonuç parametreleri	53

ÖZET

Aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilat hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaç etkin maddeleridir. Bu iki etkin maddeyi ayrı ayrı içeren ilaç formülasyonları ve her iki etkin maddeyi bir arada içeren Tekamlo isimli oldukça yeni bir ilaç formülasyonu vardır.

Birden fazla benzer etkili etkin maddenin biraradaki ilaç formülasyonlarının tedavide daha etkili olduğuna ilişkin klinik bilgilerin ışığında bu çalışmada bu iki maddenin eşzamanlı tayini için basit, hızlı, kesinliği yüksek bir HPLC yöntemi geliştirildi ve geliştirilen yöntem valide edildi.

Geliştirilen yöntem, biraradaki bu iki etkin maddenin C₁₈ kolonda; 50 mM trietilamin – ortofosforik asit çözeltisi (pH=3)/ asetonitril / metanol (50/40/10, h/h/h) hareketli fazı ve UV dedektör ile 237 nm dalga boyunda 1 mL/dak. akış hızında ayrılmaları temeline dayanır. Çalışılan doğrusal konsantrasyon aralıkları amlodipin besilat için 2,65 – 26,50 µg / mL ve aliskiren hemifumarat için 5,0 – 50,0 µg / mL, gözlenebilme ve tayin sınırları ise amlodipin besilat için 0,51ve 1,70 µg / mL, aliskiren hemifumarat için 0,95 ve 3,18 µg / mL dir. Geliştirilen yöntem her iki ilacın ilaç formülasyonlarının karışımının analizine başarıyla uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirilen UV spektrofotometrik yöntem ile Student-t ve Fischer–F testleri uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Geliştirilen HPLC yöntemi kolay, kesinliği yüksek ve tekrarlanabilir olup amlodipin ve aliskirenin biraradaki tablet analizlerinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Aliskiren hemifumarat, amlodipin besilat, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, Eşzamanlı tayin

SUMMARY

Simultaneous Determination of Amlodipine and Aliskiren by High-Performance Liquid Chromatography

Aliskiren hemifumarate and amlodipine besylate are commonly used antihypertensive drugs. Aliskiren and amlodipine in pharmaceutical formulations can be found separately, there is also new formulation called together the tekamlo. In this study, A simple, rapid and precise method is developed and validated for the quantitative simultaneous determination of amlodipine and aliskiren in combined pure and pharmaceutical dosage form. The method is based on high – performance liquid chromatographic (HPLC) on a reverse – phase column, C₁₈, 4.6 mm x 25 cm, 0.5 µm, using a mobile phase of triethylamine buffer (50 mM, pH=3), acetonitrile and methanol (50:40:10, v\v\v). The chromatographic conditions are flow rate 1 mL / min, column temperature at 25° C and detector wavelength of 237 nm. Linearity of the method was found to be in the concentration range of 5.0 – 50.0 µg/mL for aliskiren hemifumarate and 2.65 – 26.5 µg/mL for amlodipine besylate , LOD and LOQ values were 0.51, 0.95, 1.70, 3.18 µg/mL for amlodipine besylate and aliskiren hemifumarate. Obtain results from UV spectrophotometric and HPLC method were compared by statistically with Student – t and Fischer – F test. No significant difference was not found between two methods in 95 % probability level by average and standard deviation.

The developed method is simple, sensitive and reproducible and can be used safely routine simultaneous analysis of amlodipine and aliskiren in tablets.

Keywords : Aliskiren hemifumarate, Amlodipine besilate, High-performance liquid chromatography, Simultaneous determination

1.GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. GİRİŞ

Hipertansiyon günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri ve önlenebilir ölüm nedenleri içerisinde bir numaralı risk faktörüdür.

Hipertansiyon tedavisinde ilaç kullanımı giderek daha yaygın hale gelmektedir. Bu amaçla kullanılan ilaçlar; idrar söktürücüler, β adrenerjik reseptör blokerler, α adrenerjik reseptör blokerler, kalsiyum kanal blokerler, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörler (ACEI), angiotensin II (AT-II) reseptör blokerler, direkt etkili damar genişleticiler, santral etkili sempatolitik ilaçlar, adrenerjik nöron blokerleri ve sadece hipertansif kriz tedavisinde kullanılan ilaçlar olarak sınıflandırılabilir (<http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/kitaplar/114.pdf>, Erişim tarihi: 10 Ocak 2012).

Tekamlo ağustos 2010' da FDA onayı almış hipertansiyon tedavisinde kullanılan yeni bir ilaçtır. Aliskren hemifumarat ve amlodipin besilat etkin maddelerinden oluşmaktadır ve bu etkin maddelerin her biri ayrı ayrı hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Aliskren renin inhibitörü, amlodipin ise bir kalsiyum kanal blokördür. Bu etkin maddelerin birlikte tek bir ilaçta kullanıldıklarında, ayrı ayrı ilaç olarak kullanımlarına göre kan basıncını daha fazla düşürdükleri yapılan klinik çalışmalarla tespit edilmiştir. Kombine ilaç formülasyonları giderek daha yaygın kullanım alanı bulmakta ve bu nedenle bu tür formülasyonlarda ve biyolojik materyalde eş zamanlı tayin yöntemlerine ihtiyaç giderek artmaktadır.

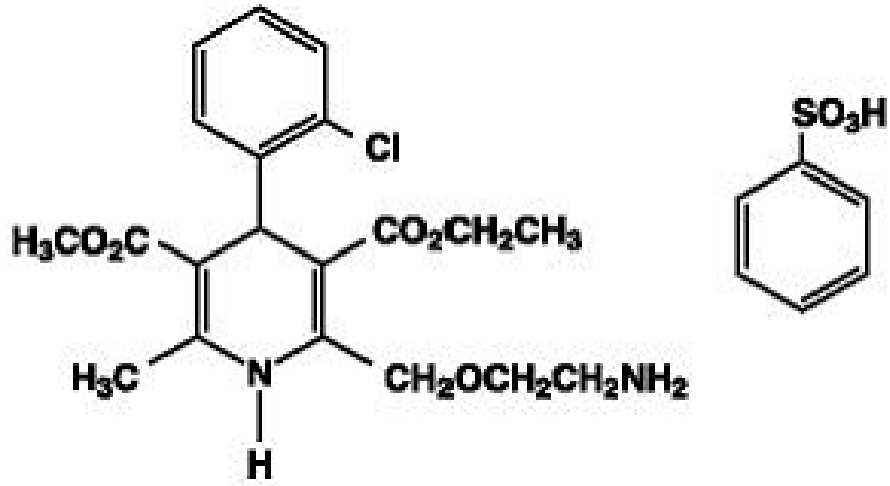
1.2. AMAÇ

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilatın birarada tayinine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmadı bu nedenle biz çalışmamızda bu iki maddenin eşzamanlı tayinine ilişkin basit, hızlı, kesinliği yüksek, tayin edilebilir sınırı düşük bir HPLC yöntemi geliştirmeyi ve geliştirdiğimiz yöntemi valide etmeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. AMLODİPİN BESİLAT

2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri



Şekil-1. Amlodipin besilatın açık kimyasal formülü

Amlodipin besilatın kimyasal adı 3-Etil-5-metil(4RS)-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-klorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikorboksilat benzen sülfonat olup kapalı formülü $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$, molekül ağırlığı 567,10 g/mol' dür. Beyaz kristal bir toz olan amlodipin besilat tuzu suda ve çok az miktarda da etanolde çözünür, pK_a değeri 8,6 dır (61).

2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

Kalsiyum kanal blokerleri damar düz kas hücrelerinin membranındaki voltaja bağımlı L-tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek uyarı sırasında bu kanallardan hücre içine Ca^{2+} girişini inhibe ederek damarların genişlemesini sağlarlar. Damar seçici özellikte olmayanlar, ayrıca miyokard ve diğer kalp hücrelerinin membranındaki voltaja bağımlı L-tipi kalsiyum kanallarını da bloke ederek, kalbi yavaşlatarak kalp debisini azaltırlar. Kalsiyum kanal blokörleri, kimyasal yapılarına göre 3 gruba ayrılırlar:

1. 1,4-dihidropridin (DHP) türevleri
2. Fenilalkilamin türevleri (Verapamil)
3. Benzotiazepin türevleri (Diltiazem)

Bu üç grubun kalsiyum kanal proteini üzerindeki bağlanma yerleri farklıdır.

Hipertansiyon tedavisinde kullanılmalarının yanında göğüs ağrısı engelleyicisi, hafif ve orta dereceli hipertansiyonda monoterapi olarak kullanılabilirler. Damar genişletici etkileri, küçük atardamarlarda toplar damalardakine göre daha belirgindir. Atar damardaki kan basıncını düşürmelerine rağmen, diğer bazı gruplardaki ilaçların aksine, beyinde ve böbreğin üst kısmında yer alan damardan geçen kanın içersinde yer alan protein ve büyük hücrelerin idrar içersine karışmasını engelleyen filtrasyon hızında azalma yapmazlar. Hipertansiyon tedavisinde, dihidropridin türevleri, damar seçici oldukları için daha fazla tercih edilirler. Kendi içlerinde en önemli farklılıkları etki süreleriyle ilişkilidir. Ortak yan etkileri; baş ağrısı, baş dönmesi, yüz kızarması, yüzde ve bacaklarda yanma hissi, ayak bileği ödemi, çarpıntı ve bazen taşikardi, hipotansiyon ve kabızlıktır. Verapamil, dihidropridin türevlerinden farklı olarak, belirgin kardiyak (kalbin kasılma gücünü azaltıcı etki, kalbin düzenli çalışmasını engeleyen etki ve kalbin uyarılma etkilerinin değişmesi gibi) etkinlik gösterir. Beta-blokörlerle beraber kullanılmamalıdır. Galopamil, yapıca ve farmakolojik etki profili bakımından verapamile benzer. Diltiazem, verapamile göre daha zayıf kardiyak etkinlik gösterir. Beta-blokörlerle beraber kullanılırken dikkatli olunmalıdır [4].

Amlodipin uzun etki süreli, dihidropiridin türevi bir kalsiyum kanal blokörüdür. Damar düz kas membranındaki hem voltaja bağımlı, hem de frekansa bağımlı kalsiyum kanallarını bloke eder. Böylece düz kas hücresine kalsiyum girişini önler; bu da periferik vasküler sistemde damar genişlemesine yol açar. Dilatasyon özellikle arteriyollerde belirgindir. Sonuçta total periferik direnç dolayısıyla kalbin karşı karşıya kaldığı yük ve oksijen tüketimi azalır. Vazodilatör etki ile genişleyen koroner damarlar, yeterli kan akım sağlanamayan miyokardın kanlanmasını artırır. Amlodipin toplam kan direncini düşürerek, kalbin iş yükünü azaltır ve miyokardın oksijen tüketimini düşürür. Bu özelliklerinden dolayı hipertansiyonda, stabil ve tipik göğüs ağrılarının tedavisinde yararlı etkiler oluşturmaktadır (<http://www.ieg.gov.tr>, erişim tarihi: 10 Ocak 2012).

Emilim, tedavi için gerekli dozların oral uygulanmasından sonra, amlodipin iyi absorbe olur ve doz sonrası 6 - 12 saatler arasında kandaki konsantrasyonu en yüksek seviyededir. Mutlak biyoyararlanım % 64 - 80 arasında hesaplanmıştır. Gıda ile alınması, amlodipin emilimini etkilemez. Greyfurt suyu ile alınımı tavsiye edilmez. Dağılım hacmi takriben 21 l/kg dır. In vitro çalışmalar dolaşımdaki amlodipinin yaklaşık % 97,5' inin plazma proteinlerine bağlı olduğunu göstermiştir. Kararlı durumdaki plazma seviyelerine birbirini takip eden dozlarla 7 - 8 gün sonra erişilir. Amlodipin karaciğerde yoğun şekilde metabolize olarak inaktif metabolitlere dönüşür ki ilacın % 10' u ile metabolitlerinin % 60' ı idrarla atılır. Eliminasyonun yarı ömrü yaklaşık 35 - 50 saattir ve bu günde tek doz kullanım tavsiyesi ile uyumludur.

2.1.3. Analiz Çalışmaları

Tatar ve Atmaca (2001) insan plazmasında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanarak yaptıkları çalışmada 459 nm dalga boyunda floresans dedektörü kullanarak, 0,8 mL / dak. akış hızında, C₁₈ kolon ve metanol (MeOH) / su (80:20, h/h) hareketli faz karışımı ile çalışmışlar. Amlodipin besilatın doğrusal konsantrasyon aralılığını 30 - 70 ng/mL, tayin edilebilme (LOD) ve gözlenebilme sınırı (LOQ) değerlerini 0,125, 0,250 ng/mL olarak bulmuşlardır (6).

Klinkenberg, Streel ve Ceccato (2003) tabletlerde HPLC ile yaptıkları çalışmada 237 nm dalga boyunda UV dedektörü ile 1 mL / dk akış hızında RP-C₁₈ kolon, asetonitril (ACN)/MeOH/ trietilamin – ortofosforik asit çözeltisini (pH=3,00) (15:35:50 h/h/h) hareketli faz olarak kullanmışlar ve amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 0,39 - 1,56 µg/mL, LOD ve LOQ değerlerini 0,02 ve 0,08 µg/mL olarak bulmuşlardır (13).

Bahrami ve Mirzaeei (2004) serum örneklerinde HPLC ile 237 nm dalga boyunda UV dedektör ile amlodipin tayinini C₁₈ kolon, 2,8 mL/dk akış hızı, 0,05 M fosfat tamponu (pH=2,50)/MeOH karışımını kullanılarak gradient elüsyon yapmışlar ve amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 0,25–16 ng/mL ve LOQ değerlerini 0,25 ng/mL olarak bulmuşlardır (7).

Owens, Fell, Coleman ve Berridge (1996) HPLC ile 238 nm dalga boyunda UV dedektör ile amlodipin tayinini gerçekleştirmişler ve bu analiz için C₈ kolon, 1 mL / dk akış hızı, ACN/ fosfat tamponu (pH=3,93)(26,5:73,5, h/h) karışımını mobil faz olarak kullanmışlardır (10).

Zarghi, Foroutan, Shafaati ve Khoddam (2005) plazma örneklerinde HPLC de ve 239 nm dalga boyunda UV dedektörü ile amlodipin tayini gerçekleştirmişler ve bu analiz için C₈ kolon, 1,5 mL / dk akış hızı ve asetonitril/ 0,01M fosfat tamponu (63:37, h/h) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır. Çalışma sonucunda amlodipin için LOD değerini 0,2 ng/mL doğrusal konsantrasyon aralığını 0,5 – 16 ng/mL olarak bulmuşlardır (64)

Bhushan, Gupta ve Singh (2006) HPLC ile 210 nm dalga boyunda UV dedektör ile amlodipin tayini gerçekleştirmişler, bu analiz için Lichrocart kolon, 1 mL / dk akış hızı ve hareketli faz olarak MeOH/su (50:50, h/h) karışımını kullanmışlardır (11).

Ma, Qin, Sun, Lu ve Li (2007) insan plazmasında MS-UPLC ile amlodipin tayini gerçekleştirmişler, bu analiz için C₁₈ kolon, hareketli faz olarak ACN/su karışımını kullanmışlar, amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 0,15 – 16 ng/mL ve LOQ değerini 0,15 ng/mL olarak bulmuşlardır (23).

Yasuda, Tanaka ve Iba (1996) yüksek performanslı sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (HPLC-MS) ile insan serumunda amlodipin tayini gerçekleştirmişler, bu çalışmada C₁₈ kolon, 0,2 mL / dk akış hızı ve hareketli faz olarak 10 mM asetat tamponu (pH=4,5) – MeOH (33:67, h/h) karışımını kullanmışlar ve LOQ değerini 0,014 ng/mL ve doğrusal konsantrasyon aralığını ise 0,014 – 7,2 ng/mL olarak bulmuşlardır (62).

Streel, Laine, Zimmera, Sibenalerb ve Ceccatoa (2002) insan plazmasında HPLC-MS ile amlodipin tayini için OJ Chiralcel OD kolon, 0,9 mL / dk akış hızı, 10 mM asetat tamponu (pH=4,5) / propanol (1:99, h/h) karışımını kullanmışlar, doğrusal konsantrasyon aralığını 0,1 – 5 ng/mL, LOQ ve LOD değerlerini 0,03 ve 0,09 µg/mL olarak bulmuşlardır (58).

Carvalho, Oliveira, Mendes, Sucupira, Moraes ve Nuccia (2001) plazmada UPLC-MS ile amlodipin tayini gerçekleştirmişler, bu çalışmada C₁₈ kolon, 0,4 mL / dk akış hızı kullanmışlar, amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 0,1-20 ng/mL ve LOQ değerini 0,1 ng/mL olarak bulmuşlardır (12).

Ramakrishna, Nirogi, Kandikere, Mudigonda, Shukla ve Maurya (2006) plazmada UPLC-MS ile amlodipin tayini gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈ kolon, 1 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak su, ACN ve formik asit (30: 70: 0,03, h/h/h) karışımını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 50 – 10000 pg/mL ve LOQ değerini 50 pg/mL olarak bulmuşlardır (30).

Bhatt, Singh, Subbaiah, Shah, Kambli ve Ameta (2007) plazmada HPLC-MS ile amlodipin tayini gerçekleştirdikleri bu çalışmada C₁₈ kolon, 0,5 mL / dak akış hızı ve metanol/amonyum format (80:20, v\|v) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar. Amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 0,1 -10 ng/mL, LOQ değerini ise 0,1 ng/mL olarak bulmuşlardır (56).

Argekar ve Powar (2000) tablet örneklerinde amlodipin ve atenolol için TLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemde 230 nm dalga boyunda UV dedektörü, metilen klorür, metanol ve amonyak çözeltisi (8,8:1,3:0,1, h/h/h) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar, amlodipin ve atenolol için LOD

değerlerini 2 µg/mL ve 1 µg/mL ve LOQ değerlerini 6 µg/mL ve 3 µg /mL ve her ikisi için doğrusal konsantrasyon aralığını 10 – 500 µg / mL olarak bulmuşlardır (5).

Barman, Islam, Ahmed, Wahed, Islam, Khan, Hossain ve Rahman (2007) tabletlerde HPLC ile 237 nm dalga boyunda UV dedektörü ile amlodipin ve atenolol tayini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada C₁₈ kolon, 1,5 mL / dk akış hızı, asetat tamponu (pH=4,5)/asetonitril/metanol (35/30/35, h/h/h) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar, amlodipin ve atenolol korelasyon katsayılarını 0.999979 ve 0.999963 olarak bulmuşlardır (8).

Naidu, Kale ve Shingare (2005) tablet örneklerinde HPLC ile 240 nm dalga boyunda amlodipin ve benazapril eş zamanlı tayin etmişlerdir. Bu analiz için; C₁₈ kolon, fosfat tamponu (pH=7,0) / ACN (65:35, h/h) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar, amlodipin ve benazapril için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 6 – 14 µg/mL ve 12 – 28 µg/mL olarak bulmuşlardır (28).

Pilli, Inamadugu, Mullangi, Karra, Vaidyad ve Raoe (2011) tablet örneklerinde HPLC ile amlodipin, ramipril, atorvastatin ve benazapril eş zamanlı tayin etmişlerdir. Bu çalışmada C₁₈ kolon, formik asit/ACN (15:85, h/h) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar, amlodipin, ramipril, atorvastatin ve benazapril için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 0,25–208 ng/mL, 0,25–208 ng/mL, 0,26–210 ng/mL, 0,74–607 ng/mL olarak bulmuşlardır (42).

Sivakumar, Manavalan, Kannappan (2007) tablet örneklerinde HPLC ile 240 nm dalga boyunda UV dedektörü kullanarak amlodipin ve atorvastatin tayini için metot geliştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈ kolon, 1,12 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak MeOH, ACN ve 15 mM fosfat tamponu çözeltisi (pH=5,33) karışımını kullanmışlar, amlodipin ve atorvastatin için doğrusal konsantrasyon aralığını, LOD ve LOQ değerlerini 0,5 – 5 µg/mL, 1–10 µg/mL, 1,86, 2,65, 5,3, 5,64 ng/mL olarak hesaplanmıştır (57).

Mohammadi, Rezanour, Dogaheh, Bidkorbeh, Hashem ve Walker (2007) tablet örneklerinde HPLC ve 237 nm dalga boyunda UV dedektör kullanarak eşzamanlı amlodipin ve atorvastatin tayini yapmışlardır. Bu analiz için ODS-3 kolon,

1 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak MeOH/ACN ve 0,025 M fosfat tampon (pH=5,33) karışımını kullanmışlar, amlodipin ve atorvastatin için doğrusal konsantrasyon aralıklarını, LOD ve LOQ değerlerini; 1 – 20, 2–30, 0,35, 0,65, 1, 2 µg/mL olarak bulmuşlardır (25).

Acharjya, Annapurna ve Koya (2010) tablet örneklerinde HPLC ile 240 nm dalga boyunda UV dedektör ile amlodipin ve atorvastatin tayini gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için BDS kolon, 1 mL / dk akış hızını, 0,05 M asetat tamponu (pH=4,0) ve ACN karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar, amlodipin ve atorvastatin için doğrusal konsantrasyon aralığını, LOD ve LOQ değerlerini 1 – 20, 60 – 140, 0,3469, 0,3957, 1,051, 1,199 µg/mL olarak bulmuşlardır (3).

Yu, Hu, Zhu, Wan, Li ve Guo (2011) hipertansiyon hastalarının plazmalarında HPLC -MS ile amlodipin ve atorvastatin tayini yapmışlar ve bu analiz için C₁₈ kolon, 0,4 mL/dk akış hızı kullanmışlardır. Formik asit çözeltisi ve ACN karışımı ile gradiyent elüsyon yaptıkları bu çalışma sonucunda amlodipin ve atorvastatin doğrusal konsantrasyon aralıklarını 0,46 – 1 ng/mL olarak bulmuşlardır (63).

Sarkar, Ghosh, Das, Selvan, Gowda, Mandal, Bose, Agarwal, Bhaumik ve Pal (2008) insan plazmasında HPLC-MS ile amlodipin ve metoprolol tayini gerçekleştirmişlerdir ve bu çalışmada C₁₈ kolon ve hareketli faz olarak metanol ve % 0,5 formik asit çözeltisini (80:20, h\h) kullanmışlar, amlodipin ve metoprolol için doğrusal konsantrasyon aralıklarını, LOD ve LOQ değerlerini, 1,25 – 12,5, 1–100 , 0,5, 1 ve 1,25, 1,5 olarak bulmuşlardır (55).

Dongre, Shah, Karmuse, Phadke ve Jadhav (2008) tabletlerde HPLC ile 254 nm dalga boyunda PDA dedektörü ile amlodipin ve metoprolol tayini gerçekleştirmişler bu analiz için BDS kolon, 1 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak trietilamin çözeltisi ve ACN (85:15, h\h) karışımını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda amlodipin ve metoprolol için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 42 – 98 ve 300 – 700 µg/mL olarak bulmuşlardır (16).

Rao, Rahaman, Prasad ve Reddy (2010) tablet örneklerinde HPLC ile 215 nm dalga boyunda PDA dedektörü kullanarak amlodipin ve metoprolol tayini yapmışlar

ve bu çalışmada ODS kolon, 1 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak ACN ve 0,02 M fosfat tamponu (80:20, h/h) karışımı kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda amlodipin ve meteprolol için doğrusal konsantrasyon aralığını, LOD ve LOQ değerlerini 2,5 – 15, 25 – 100, 0,03, 0,32 ve 0,1, 0,95 µg/mL olarak bulmuşlardır (50).

Patil, More, Aachin, Pishwikar (2011) tablet örneklerinde HPLC ile 240 nm dalga boyunda UV dedektör ile amlodipin ve olmesertan tayini üzerine çalışmışlar bu analizde C₁₈ kolon, 1 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak asetonitril ve su (60:40, h/h) karışımı kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda amlodipin ve olmesertan için doğrusal konsantrasyon aralığını LOD ve LOQ değerlerini, 20 – 40, 5 – 35, 0,0343, 0,0735 ve 0,1039, 0,2277 µg/mL olarak bulmuşlardır (37).

Qutaba, Razzaq, Ashfaq, Khan ve Mumtaz (2009) tablet örneklerinde HPLC ile 239 nm dalga boyunda UV dedektörü ile amlodipin ve olmesertan tayini üzerine çalışmışlardır. Bu analiz için C₁₈ kolon, 1 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak amonyum asetat (pH=6,8) ve ACN (40:60, h/h) karışımı kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda amlodipin ve olmesertan doğrusal konsantrasyon aralığını, LOD ve LOQ değerlerini 4 - 28, 16 – 112, 0,12, 0,08 ve 0,27, 0,4 µg/mL olarak bulmuşlardır (31).

Pedroso, Oliveira, Campos, Galves, Trindade ve Pontarolo (2009) losartan potasyum ve amlodipin için yeni bir yöntem geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde ODS kolon, 1 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak fosfat tamponu (pH=3) ve ACN kullanmışlar, yapılan analizler sonucunda amlodipin ve losartan potasyum için doğrusal konsantrasyon aralıklarını, 1,4 - 4,2, 20-60 µg/mL, amlodipin için LOD ve LOQ değerlerini 0,0875, 0,175 µg/mL olarak bulmuşlardır (41).

Ramani, Sengupta ve Mullangi (2009) insan plazmasında HPLC ile amlodipin, simvastatin ve valsartan tayini gerçekleştirmişler bu analiz için C₁₈ kolon, 0,5 mL/ dk akış hızı, hareketli faz olarak 0,02 M format tampon (pH:4,5) çözeltisi ve ACN (20:80, h/h) karışımını kullanmışlar, amlodipin ve valsartan için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 0,2 – 50 ve 0,5 – 50 ng/mL olarak bulmuşlardır (47).

Patel, Chaudhari, Buch, Patel (2009) tablet örneklerinde HPLC ve 237 nm dalga boyunda UV dedektörü ile amlodipin ve valsartan tayini gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için RPC₁₈ kolon, 1,5 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak su – trifloroasetik asit ve su-ACN-trifloroasetikasitin farklı oranlardaki karışımlarını kullanmışlar, çalışma sonucunda amlodipin ve valsartanın için doğrusal konsantrasyon aralıklarını, LOD ve LOQ değerlerini, 1-30, 1,6 -240, 0,8, 0,95 ve 1, 1,6 µg/mL olarak bulmuşlardır (38).

Kardile, Kalyane, Thakkar, Patel ve Moradiya (2010) tabletlerde olmesartan ile amlodipin eşzamanlı tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C₁₈ kolon, 337 nm dalga boyunda UV dedektör, 1 mL/ dk akış hızı, hareketli faz olarak 0,05 M fosfat tamponu (pH=6,8) ve ACN (50 : 50, h/h) karışımı kullanmışlar ve analiz sonucunda amlodipin ve olmesartan için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 4 – 20, 16 – 80 µg/mL olarak bulmuşlardır (21).

Nalwade, Reddy, Rao ve Rao (2011) tabletlerde telmisartan, amlodipin ve hidroklorotiyazidinin eşzamanlı tayini için hızlı, basit ve ekonomik UPLC metodu geliştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈ kolon, 238 nm dalga boyununda UV dedektör, 0,6 mL/ dk akış hızı ve hareketli faz olarak A karışımı; sodyum perklorat tamponu (pH=3,2) ve ACN (90:10, h/h), B karışımı; sodyum perklorat tamponu (pH=3,2) ve ACN (20:80, h/h) kullanmışlar, çalışma sonucunda amlodipin, telmisartan ve hidroklorotiyazid için doğrusal konsantrasyon aralığını 2 – 6, 16 – 48, 5 -15 µg/mL olarak bulmuşlardır (29).

Muthu, Sankhla, Gupta, Smith ve Manavalan (2010) tabletlerde telmisartan ve amlodipinin HPLC ile bir arada tayinini yapmışlar, bu çalışmada 238 nm dalga boyunda UV dedektörü, C₁₈ kolon, 1,3 mL / dk akış hızı, hareketli faz olarak fosfat tamponu (pH=4,5) ve ACN (40 : 60, h/h) karışımını kullanmışlar, amlodipin ve telmisartan için doğrusal konsantrasyon aralıkları, LOD ve LOQ değerleri 1 – 11, 8 – 80, 0,020668, 3,3403 ve 0,062629, 10,122 olarak bulmuşlardır (27).

Chabukswar, Jagdale, Kumbhar, Kadam, Patil, Kuchekar ve Lokhande (2010) tabletlerde telmisartan ile amlodipinin eşzamanlı tayini için hızlı, basit ve ekonomik bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografi metodu geliştirmişlerdir.

Bu analizde sabit faz olarak silikajel, hareketli faz olarak; etil asetat, 1,4 – dioksan, metanol ve amonyak (15: 1,5 : 3 : 1,5, h/h/h) karışımını kullanmışlar ve sonuç olarak amlodipin ve telmisartan için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 200 – 1000, 100– 500 µg/ml, LOD değerlerini 0,0236, 0,025 µg/mL, LOQ değerlerini ise 0,0714, 0,0747 µg/mL olarak bulmuşlardır (14).

Ragno, Garofalo ve Vetuschi (2002) amlodipinin tayini için geliştirdikleri türev spektrometri yönteminde 280 ve 360 nm dalga boylarında çalışmışlar ve amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 5 – 10 µg/mL ve geri kazanım oranını % 95 – 99 olarak bulmuşlardır (43).

Rahman ve Hoda (2003) 2,3-dikloro 5,6-disiyona 1,4-benzokinon (DDQ) ile kompleks oluşumuna dayanan bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişler, geliştirdikleri yöntem ile tabletlerde amlodipin tayini yapmışlardır. Bu çalışmada doğrusal konsantrasyon aralığını; 1 – 125 µg/mL ve 10 – 140 µg/mL olarak bulmuşlardır (45).

Rahman, Singh ve Hoda (2004) tabletlerde amlodipin tayini için spektrofotometre kullanılan üç farklı yöntem ile çalışmışlar, bu çalışmaların sonucunda amlodipin için doğrusal konsantrasyon aralığını 15 – 59 µg/mL olarak bulmuşlardır (46).

Abdel,Wadood, Mohamed ve Mahmoud (2008) tabletlerde amlodipin tayini için spektrofluorometri kullanılmışlar, bu analizde, ninhidrin ve fenilasetaldahit içeren iki farklı metot geliştirerek valide etmişlerdir. 535 nm dalga boyunda LOD değerlerini; 0,09, 0,16 µg/mL, LOQ değerlerini; 0,30, 0,54 µg/mL ve doğrusal konsantrasyon aralıklarını 0,35–1,80 µg/mL ve 0,55–3 µg/mL olarak bulmuşlardır (2).

Prasad, Saha ve Parimoo (1999) tabletlerde amlodipin – lisinopril ve amlodipin - enalapril tayini için türev spektrofotometrisi yöntemi geliştirmişler. 215 ve 260 nm dalga boyunda çalışmışlar ve amlodipinin geri kazanım yüzdelerini % 100,15 ve % 99,71 olarak hesaplanmışlardır (40).

Prasad, Parihar, Chowdhary, Purohit ve Parimoot (1998) tabletlerde amlodipin – atenolol tayinini türev spektroskopisiyle eş zamanlı olarak gerçekleştirmişler, bu analizlerde 250 ve 273,4 nm dalga boylarında çalışmışlar, amlodipin ve atenolol için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 2,5–10, 15 – 30, µg/mL, LOD değerleri 0,020, 0,094 µg/mL ve LOQ değerleri 0,10, 0,40 µg/mL olarak bulmuşlardır (39).

Juyal, Chaudhary, Kumar, Gnanarajan ve Yadav (2008) çok bileşenli analiz modlu UV spektrometrisi ile amlodipin ve atorvastatinin tabletlerde eş zamanlı analizi için hızlı, kesin ve basit bir metot geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Doğrusal konsantrasyon aralığını amlodipin ve atorvastatin için 7,0 – 10, 14 – 26 µg/mL olarak bulmuşlardır (20).

Ramesh ve Ramakrishna (2010) amlodipin besilat ve atorvastatin kalsiyumun tabletlerde eş zamanlı analizi için kesinliği yüksek ve ekonomik spektrofotometrik iki metot geliştirmişlerdir. 1. Metot da 361 ve 246 nm dalga boyunda, 2. Metot da 238,8 ve 246 nm dalga boyunda çalışmışlar, doğrusal konsantrasyon aralığını amlodipin ve atorvastatin için 0,5 – 30 µg/mL olarak bulmuşlar ve her bir dalga boyu için LOD ve LOQ değerlerini hesaplamışlardır (48).

Rao, Rajeswari ve Sankar (2010) amlodipin ve atorvastatinin tabletlerde eş zamanlı analizi için hızlı, kesin ve basit spektrofotometrik bir metot geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Bu metot için 242 nm ve 364 nm dalga boylarını kullanmışlardır. Bu metodun validasyon aşamasında amlodipin ve atorvastatin için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 1 – 50, 1 – 20 µg/mL olarak bulmuşlardır (49).

Abdallah ve Badawey (2011) tabletlerde türev spektrofotometrisi ile amlodipin ve atorvastatinin eşzamanlı tayini için metot geliştirmişlerdir. Bu çalışmada 228 nm ve 245 nm dalga boylarında ölçümler yapmışlar, amlodipin ve atorvastatin için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 10 – 100, 2,5 – 30 µg/mL , LOQ değerleri 3, 0,75 µg/mL ve LOD değerlerini 1 , 0,25 µg/mL olarak bulmuşlardır (1).

Basavaiah, Chandrashekar ve Prameela (2003) tabletlerde Fe(III) ve ferrisiyanür kullanarak amlodipin ve felodipinin eşzamanlı tayini için hızlı, basit ve ekonomik bir metot geliştirmişlerdir. Bu metot için 760 nm dalga boyunda

çalışmışlar, amlodipin ve felodipin için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 5 – 15, 1,5 – 5 µg/mL, LOQ değerleri 0,43, 0,17 µg/mL ve LOD değerlerini 0,13, 0,05 µg/mL olarak bulmuşlardır (9).

Rathee, Rathee, Thakur ve Kumar (2010) tabletlerde türev spektrofotometrisi ile amlodipin ve lisinoprilin eşzamanlı tayinini gerçekleştirmişler ve bu çalışmada amlodipin ve lisinopril doğrusal konsantrasyon aralıklarını 10 – 70, 4 – 40 µg/mL, LOQ değerlerini 0,694, 0,751 µg/mL ve LOD değeri ise 0,229, 0,248 µg/mL olarak bulmuşlardır (52).

Joshi ve Patel (2011) amlodipin ve lisinopril tabletlerde eş zamanlı analizi iki spektroskopik yöntem geliştirmişlerdir. 1. yöntem de 360 ve 248 nm dalga boyunda, 2. yöntemde 300 ve 360 nm dalga boylarında her iki maddenin absorbansını ölçmüşler, amlodipin ve lisinopril için doğrusal konsantrasyon aralığını 5 – 40 µg/mL olarak bulmuşlardır (19).

Patil, Rakesh, Dhabale ve Burade (2009) tabletlerde amlodipin ve losartan potasyumun eşzamanlı tayini için iki spektrofotometrik metot geliştirmişlerdir. 1. yöntemde 208 ve 237,5 nm dalga boyunda, 2. yöntemde de 242,5 ve 237,5 nm dalga boylarında ölçümler almışlar, amlodipin ve losartan potasyumun doğrusal konsantrasyon aralıklarını 2 – 20 µg/mL olarak bulmuşlardır (34).

Kaveri, Saravanan ve Mozhi (2011) tabletlerde amlodipin ve losartan potasyumun eşzamanlı tayini için hızlı, basit ve ekonomik bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişler, bu yöntemde 206 ve 360 nm gibi iki farklı dalga boyunda çalışmışlar, amlodipin ve losartan için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 10 – 30 ve 2,5 – 7,5 µg/mL olarak bulmuşlardır (22).

Rahman ve Azmi (2001) amlodipin ve ninhidrinin tabletlerde eşzamanlı tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirmişler yaptıkları bu çalışmada 595 nm dalga boyunda çalışmışlar, amlodipin ve ninhidrin için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 10 – 60 µg/mL olarak bulmuşlardır (44).

Mehulkumar, Ramesh, Kumar, Srinivas ve Diwan (2009) tabletlerde amlodipin ve olmesartanın eşzamanlı tayini için spektrofotometrik bir yöntem

geliştirmişler bu yöntemde amlodipin için 259 nm dalga boyunda çalışmışlar, sonuç olarak amlodipin ve olmesartanın doğrusal konsantrasyon aralıklarını 5 – 30 µg/mL, LOQ değerlerini 0,18, 0,43 µg/mL ve LOD değerlerini 0,06, 0,14 µg/mL olarak bulmuşlardır (24).

Kardile, Kalyane, Thatkar, Patel ve Moradiya (2010) tabletlerde olmesartan ile amlodipinin eşzamanlı tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişler, 239 ve 256 nm dalga boyunda çalışmışlar, bu çalışmada amlodipin ve olmesartan için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 5 – 35 µg/mL olarak bulmuşlardır (21).

Patil, Barge, More ve Piswkar (2011) tabletlerde olmesartan ile amlodipinin eşzamanlı tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde 360 nm dalga boyunda çalışmışlar, amlodipin ve olmesartan için doğrusal konsantrasyon aralığını 2 – 20, 2 – 32 µg/mL, LOQ değerleri 0,092, 0,0525 µg/mL ve LOD değerini ise 0,066, 0,116 µg/mL olarak bulmuşlardır (33).

Patil, Kulkarni, Burkul, More, Pishawikar (2011) tabletlerde olmesartan ile amlodipinin eşzamanlı tayini için geliştirdikleri spektrofotometrik yöntemde amlodipin için 241 nm, olmesartan için 226 nm dalga boyunda ölçüm yapmışlar doğrusal konsantrasyon aralıklarını 2 – 20, 2 – 32 µg/mL, LOQ değerlerini 0,45, 0,048 µg/mL, LOD değerlerini ise 0,22, 0,0166 µg/mL olarak bulmuşlardır (36).

Patil, Rakesh, Dhabale ve Burade (2009) tabletlerde amlodipin ve ramiprilin eşzamanlı tayini için hızlı, basit ve ekonomik bir UV-spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada 210 ve 238 nm dalga boyunda ölçümler yapmışlar, amlodipin ve ramipril için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 5 – 25 ve 15 – 25 µg/mL olarak bulmuşlardır (35).

Muthu, Chidalla, Prasad, Kumare ve Manavala (2011) tabletlerde UV-spektrofotometresiyle ile amlodipin ve felodipinin eşzamanlı tayini için yöntem geliştirmişler, bu yöntemde 296 ve 363 nm gibi iki farklı dalga boyunda çalışmışlar, amlodipin ve felodipin için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 1 – 3 µg/mL, LOD değerlerini; 296 nm'de 0,4125 µg/mL, 363 nm'de 0,3786 µg/mL, bu dalga boylarındaki LOQ değerlerini ise sırasıyla 1,25, 1,1475 µg/mL olarak bulmuşlardır (26).

Shaalan and Belal (2010) tabletlerde amlodipin ve valsartanın eşzamanlı tayini için spektroskopik metot geliştirmişler ve geliştirdikleri metot ile yaptıkları çalışmada amlodipin ve valsartan için doğrusal konsantrasyon aralıklarını 0,2 – 3,6, 0,008 – 0,080 µg/mL ve LOD değerlerini 0,025, 0,0012 µg/mL olarak bulmuşlardır (51).

Çelebier, Süslü ve Altınöz (2011) tabletler de amlodipin ve olmesartanın kapiler elektroforez kullanarak tayinlerini yapmışlar, amlodipin ve olmesartan için doğrusal konsantrasyon aralığını 2 – 30 µg/mL ve LOD değerini ise 0,05 µg/mL olarak bulmuşlardır (15).

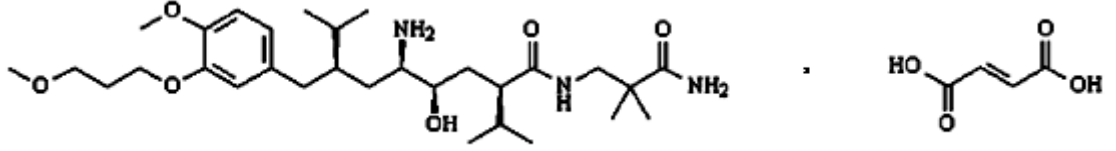
Altıokka, Dogrukol, Ak, Tunçel, Aboul, Enein (2002) tabletlerde amlodipin tayini için cam karbon elektrodunun yüzeyinde bulunan dihidropridin oksidasyonu üzerine temellenmiş differansiyel – akım voltametrisiyle geliştirdikleri yöntemde amlodipinin LOQ değerlerini sırasıyla 0,012, 0,022 olarak LOD değerlerini ise 0,004, 0,0072 olarak bulmuşlardır (4).

Gazy (2004) cam karbon elektrot yüzeyinde kare – dalga anodik ayırma voltametrisiyle biyolojik sıvılarda ve tabletlerde amlodipinin tayinini yapmış, bu çalışmada amlodipinin 0,510 v daki oksidasyon pikini, amlodipinin 4×10^{-8} – 2×10^{-6} M konsantrasyon aralığındaki tayininde kullanmış ve amlodipin için LOD değerini $1,4 \times 10^{-8}$ M olarak bulmuştur (17).

Goyal ve Bishnoi (2010) tabletlerde ve idrarda amlodipin tayinini voltametrik yöntemle yapmışlar ve doğrusal konsantrasyon aralığını $5,10^{-9}$ – $1,10^{-6}$ mol/L ve LOD değerini ise 1×10^{-9} , 5×10^{-9} mol/L olarak bulmuşlardır (18).

2.2.ALİSKİREN HEMİFUMARAT

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil-2. Aliskiren hemifumaratın açık kimyasal formülü

Aliskirenin kimyasal adı (2*S*,4*S*,5*S*,7*S*)-5-amino-*N*-(2-karbamol-2,2-dimetiletil)-4-hidroksi-7-{[4-metoksi-3-(3-metoksipropoksi)fenil]metil}-8-metil-2-(propan-2-yl)nonanamit olup kapalı formülü $C_{30}H_{53}N_3O_6 \cdot 1/2C_4H_4O_4$, molekül ağırlığı ise 609,83 g/mol'dür. Aliskiren beyaz ile hafif sarımsı arası renkte bir tozdur. Fosfat tamponunda, n-oktanolde ve suda oldukça fazla çözünür. pK_a değeri 9,49 dur (60).

2.2.2. Farmakolojik özellikleri

Aliskiren hemifumarat sağlıklı bireylerde plazma renin aktivitesini, anjiyotensin I, anjiyotensin II ve aldosteron konsantrasyonlarını doza bağlı olarak azaltan renin inhibitörü yeni bir ilaçtır (ABD’de 2007 yılında ruhsatlandırılmıştır). Nedeni bilinmeyen hipertansiyon hastalıklarında plazma renin aktivitesini azaltmakta ve kan basıncını anjiyotensin reseptör antagonistleri kadar düşürmektedir. Güvenlik ve tolere edilebilirlik yönlerinden de anjiyotensin reseptör blokerlerine benzerlik göstermektedir. Sözü edilen nedenlerle renin inhibisyonu, hipertansiyon ve öteki kardiyovasküler hastalıklarla böbrek hastalıklarının tedavisinde geleceği olan bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır (http://www.tfd.org.tr/bulten/102_2009_4.pdf, erişim tarihi : 25 Ocak 2012). Aliskiren oral yoldan alındıktan sonra en yüksek plazma konsantrasyonuna 1-3 saat içerisinde ulaşır. Doğrudan damar yolu ile uygulanmasını takiben kararlı durumdaki ortalama dağılım hacmi yaklaşık 135 litredir; bu da aliskirenin damardışı boşluğa büyük ölçüde dağıldığını göstermektedir. Plazma proteinlerine bağlanması ise orta düzeydedir (% 47-51) ve konsantrasyonundan bağımsızdır. Aliskirenin vücut içerisinde kimyasal olarak değişime uğrama yarı ömrü ortalama olarak 40 saattir. Büyük bir kısmı (%78) dışkı yoluyla atılır ve oral uygulamayı takiben dozun yaklaşık % 0,6’ sı idrardan geri kazanılır. Damar yolundan verildikten sonra idrarla aliskirenden temizlenen plazma hacmi yaklaşık 9 l / saat olarak saptanmıştır.

2.2.3. Analiz Çalışmaları

Swamy, Rao, Kumar, Kumar, Bikshapathi ve Kumar (2011) tablet ve hammadde örneklerinde 293 nm dalga boyunda UV dedektörü kullanılarak RP-HPLC ile aliskirenin tayini için metot geliştirmişler ve bu metodu valide etmişlerdir. Bu çalışmada C₁₈ kolon, fosfat tamponu (pH=3) ve ACN (60:40, h\h) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar, akış hızını 1 mL / dak. olarak ayarlamışlar ve doğrusal konsantrasyon aralığını aliskiren için 5 – 30 µg/mL, LOD ve LOQ değerlerini 0,58, 1,76 µg/mL olarak bulmuşlardır (59).

Sangoi, Sangoi, Oliveira, Secretti ve Rolim (2011) tablet örneklerinde 229 nm dalga boyunda UV dedektörü kullanarak RP-HPLC ile aliskiren tayini yapmışlardır, bu analiz için C₁₈ kolon, ACN – su (95: 5, h\h) ve fosforik asit (40:60, h\h) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlar, akış hızını 1 mL / dk olarak ayarlamışlar ve doğrusal konsantrasyon aralığını 10 – 300 µg/ml, LOD ve LOQ değerlerini 2,38, 7,93 µg/mL olarak bulmuşlardır (53).

Pachauri, Paliwal, Srinivas, Singh ve Jain (2010) 215 nm de DAD dedektörü kullanarak HPLC ile yaptıkları çalışmada aliskirenin de içinde bulunduğu dört antihipertansif ilacın analizi için metot geliştirmişler ve geliştirilen yöntemi valide etmişlerdir. Bu çalışmada purosphere RP18 kolon, ACN ve trietilamin tampon karışımı (pH=3,00) ve 215 nm dalga boyunu kullanmışlar, çalışmanın sonucunda aliskiren, ramipril, valsartan ve hidroklorotiyazit için r² değerlerini 0,9993, 0,9927, 0,9997 ve 0,9997 olarak bulmuşlardır (32).

Sangoi, Secretti ve Rolim (2010) tabletlerde aliskiren tayini için UV spektrofotometrik yöntem geliştirip valide etmişler ve aliskiren için doğrusal konsantrasyon aralığını 40 – 100 µg/ml, LOD ve LOQ değerlerini 2,55, 8,49 µg/mL olarak bulmuşlardır (54).

Bölüm 3. Gereç ve Yöntemler

3.1. Kullanılan Cihazlar

3.1.1. HPLC Cihazı (Thermo Separation Products - 1100)

- Pompa Sistemi (Thermo Separation Product - P4000)
- UV Dedektör (Thermo Spectra System UV 3000)
- SN 4000 Sistem kontrol Ünitesi
- AS Otomatik numune örnekleyici (Thermo Spectra System)
- TCP PC 1000 yazılım versiyonu (Thermo)
- Analitik kolon LiChroCART, Purospher RP-18 (4,6 mm x 250 mm) (merck)
- Dell Masa üstü bilgisayar
- HP lazerjet 1100 yazıcı

3.1.2. Mobil faz süzme ünitesi (Millipore, 0,5)

3.1.3. Spektrofotometre (Shimadzu UV 1601)

3.1.4. 1 cm'lik quartz kuvetler (Heilma 100-Qs)(10x10x45 mm)

3.1.5. pH metre (Mettler Toledo MP)

3.1.6. Terazi (Adam PW 124)

3.1.7. Ultrasonik banyo

3.1.8. Termostatlı su banyosu

3.1.9. Ultra saf su cihazı

3.1.10. Otomatik pipetler (Ependorf 200 µL, Gillson 1 mL)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amlodipine besilat (Mustafa Nevzat A.Ş.), aliskiren hemifumarat (Novartis A.Ş.Türkiye) USP standartları başış olarak sağlanmıştır. Metanol, asetonitril, trietilamin ve ortofosforik asit Merck saflıktadır. Tüm çözeltiler bidistile su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.3. Çözeltiler

3.3.1. Aliskiren Çözeltisi

20,00 mg aliskiren hemifumarat tam olarak tartıldı 10 mL lik balonjojede bidistile su ile çözümlenerek hacmine tamamlandı (2,0 mg/mL = $3,28 \times 10^{-3}$ M aliskiren hemifumarat) (1. Stok). Bu çözeltilerden 1ml alınarak 10 mL' ye bidistile su ile seyreltildi (0,20 mg/mL) (2. Stok).

3.3.2. Amlodipin Çözeltisi

10,60 mg amlodipin besilat tam olarak tartıldı, 10 mL lik balonjojede bidistile su ile çözümlenerek hacmine tamamlandı (1,06 mg/mL= $1,87 \times 10^{-3}$ M amlodipin besilat) (1. Stok). Bu çözeltilerden 1mL alınarak 10 mL' ye bidistile su ile seyreltildi (0,106 mg/mL) (2. Stok).

3.3.3. Karışım Çözeltisi

Aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilatın 2. stok çözeltilerinden 0,25 – 2,50 mL arası 6 farklı hacimde çözeltiler alınıp herbiri ayrı ayrı 10 mL'lik balonjojelere konuldu ve bidistile su ile hacimlerine tamamlandı.

3.3.4. Hareketli Faz Çözeltisi

Hareketli faz çözeltisi olarak 40/10/50 (h/h/h), asetonitril, metanol ve trietilamin - ortofosforik asit tampon çözeltisi (pH= 3,0) kullanıldı. 250 mL'lik balonjojeye yaklaşık 200 mL kadar bidistile su konuldu, 1,75 mL trietilamin (% 99,5, $d = 0,726 \text{ g/cm}^3$) çözeltisi ilave edildi. Behere alınan ve pH metrede ortofosforik asit çözeltisi ile pH'si 3' e ayarlanan çözelti 250mL' lik balon jodede bidistile su ile hacmine tamamlandı.

3.4. Analiz Yönteminin Geliştirilmesine İlişkin Çalışmalar

Aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilatın HPLC ile yanyana analizinin yapılabilmesi için dedektör, dalgaboyu, kolon, hareketli faz sistemi, hareketli faz akış hızı gibi kromatografik koşullar belirlendi. Belirtilen şartlar altında geliştirilen yöntem ilaç maddelerinin tabletlerinden hazırlanan karışıma uygulandı.

3.4.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Literatür çalışmaları gözönüne alınarak HPLC çalışmaları C₁₈ kolonda yapıldı. Çeşitli oranlarda asetonitril, metanol ve 50 mM trietilamin – ortofosforik asit (pH = 3,0) karışımı hareketli faz sistemleri denendi, alıkonma zamanı ve çalışılacak dalga boyu belirlendi. Sonuçlar Bölüm 4.1' de verilmiştir.

3.5. Yöntem Validasyonu

Metot geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik metot validasyonu ICH kılavuzu Q2 ye göre yapıldı.

3.5.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla hareketli faz çözeltilerinden ileri gelebilecek herhangi bir girişimin olup olmadığı incelendi. İlgili kromatogram Bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

3.5.2. Doğrusallık

Doğrusal aralık, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık ve tekrarlanabilirlikte sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır.

Doğrusal konsantrasyon aralığının araştırılması için amlodipin besilat ve aliskiren hemifumaratı 6 farklı konsantrasyonda içeren karışımlar ile analizler yapıldı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanlarının ilgili konsantrasyonlara karşı grafikleri çizildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.3'de verilmiştir.

3.5.3. Tayin Sınırı(LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.2' de verilmiştir.

$$\text{LOD}= 3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ}=10 \times \text{SD}/m$$

SD : kalibrasyon doğrusunun y eksenini kestiği değer in standart sapması

m : kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.5.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Metodun Kesinliği)

Üç farklı konsantrasyonda 3,25, 9,50, 20,50 µg/mL ve 17,50, 26,25, 43,75 µg/mL amlodipin besilat ve aliskiren hemifumarat içeren çözeltiler ile çalışıldı. Gün içinde ve birbirini takip eden üç farklı günde her bir konsantrasyon için 6 enjeksiyon yapıldı, pik alanları ölçüldü. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.5'de verilmiştir.

3.5.5. Çözelti Kararlılığı

Çözelti kararlılığının saptanması için standart çözeltiler oda sıcaklığında, 24 saat ve +4 °C' de 1 ay bekletildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.6'da verilmiştir.

3.5.6. Doğruluk (Geri Kazanım)

Analitik metodun doğruluğu, referans kabul edilen bir değer in, bulunan değere yakınlığıdır. Yapılan doğruluk çalışması sırasında aliskiren hemifumarat için 16,70, 33,60 ve 50,40 µg/mL, amlodipin besilat için 3,25, 9,50 ve 20,50 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan karışım çözeltilerinin kromatogramları alındı, pik alanları yardımıyla konsantrasyonları ölçü eğrisi kullanılarak hesaplandı. Bulunan deneysel konsantrasyonların teorik konsantrasyonlara bölümü sonucu ortaya çıkan % geri kazanımlar Bölüm 4.2.4'de verilmiştir

3.5.7. Yöntemin Sağlamlığı

Geliştirilen yöntemin hareketli faz içindeki tampon çözelti pH'sinde, kolon sıcaklığında, akış hızında ve hareketli faz bileşenlerinin oranlarında küçük değişiklikler yapılarak yöntemin sağlamlığı araştırıldı. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.2.7' de verilmiştir

3.5.8. Uygunluk Testi

Uygunluk testi için önemli parametreler olan alıkonma zamanı (t_R), kuyruklanma faktörü (T), ayrılma faktörü (R_s) ve teorik plaka sayısı (N) değerleri Bölüm 4.2.8'de verilmiştir.

3.6. Tablet Tozu Karışımında Aliskiren ve Amlodipin Analizi

3.6.1. Kıyas Yöntemi ile Tayin

Bu tez çalışmasında her iki ilacın bir arada tayinine ilişkin bir çalışma yöntemi olmadığından kıyas yöntemi olarak uygulanması kolay ve basit bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiş ve sonuçlar Bölüm 4.3.1'de verilmiştir.

3.6.1.1. Çözeltiler

Aliskiren Stok Çözeltisi

20,00 mg aliskiren hemifumarat tam olarak tartıldı. 25 mL' lik balonjojede bidistile su ile çözülerek hacmine tamamlandı.

Amlodipin Stok Çözeltisi

10,00 mg amlodipin besilat 50 mL' lik balonjojede bidistile su ile çözülerek hacmine tamamlandı.

Karışım Çözeltisi

Aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilatın stok çözeltilerinden 0,25- 4,2 mL arasında 7 farklı hacimde alınan çözeltilerin herbiri 10 mL' lik balonjojede bidistile su ile hacmine tamamlandı ve analiz edildi.

3.6.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Analiz

Türkiye’de Tekamlo isimli ilaç formülasyonu bulunmadığından aliskirenin ve amlodipinin ayrı ayrı ilaç formülasyonlarından (tablet) Tekamlo içindeki miktarlarına eş değer konsantrasyonlarda tablet tozu karışımları hazırlandı. Bu amaçla 10,0 mg amlodipin içeren tabletlerden 20 adet, 150,0 mg aliskiren içeren tabletlerden de 20 adet teker teker tartıldı, ortalama tablet ağırlıkları bulundu. Ayrı ayrı havanda toz edilen aliskiren ve amlodipin tablet örneklerindem birer tablet ağırlığına eşit miktarda tartımlar alınıp karıştırıldı. 25 mL suda ultrasonik karıştırıcıda 30 dakika çalkalandı ve mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntüden alınan ve uygun şekilde seyreltilen örnek çözeltileri geliştirilen HPLC ve UV spektrofotometrik yöntemler ile analiz edildi. Tablet tozu karışımındaki aliskiren ve amlodipin konsantrasyonları daha önceden hazırlanan ölçü eğrileri yardımıyla hesaplandı. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar, 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalamalar, SD, %RSD ve % 95 olasılık düzeyinde güven aralıkları Tablo-14’ de verilmiştir.

Geliştirilen yöntemler ile elde edilen sonuçların ortalama yönünden karşılaştırılması t testi (Student t– testi), standart sapmalar yönünden karşılaştırılması F testi (Fisher test) uygulanarak yapıldı. Sonuçlar Tablo-14’de görülmektedir.

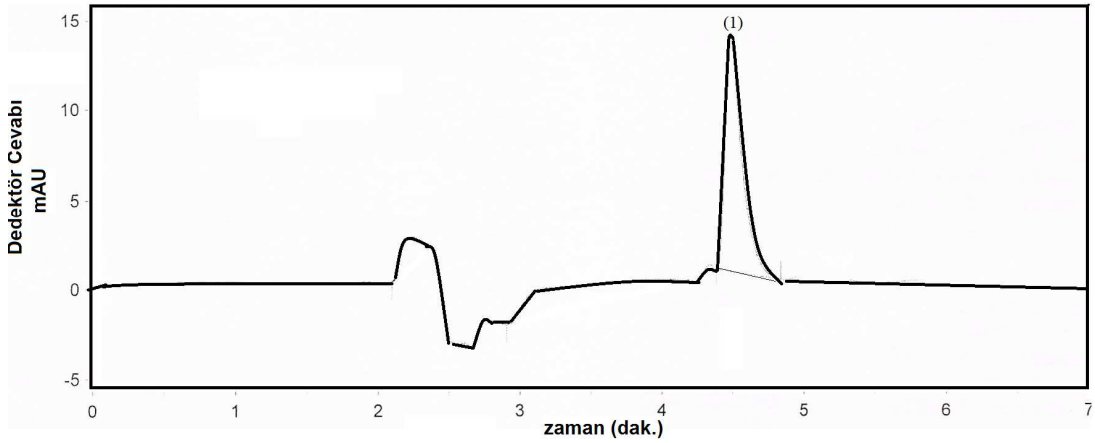
4. Bulgular

Yöntemin geliştirilmesi amacı ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ilgili bölümlerde verilmiştir.

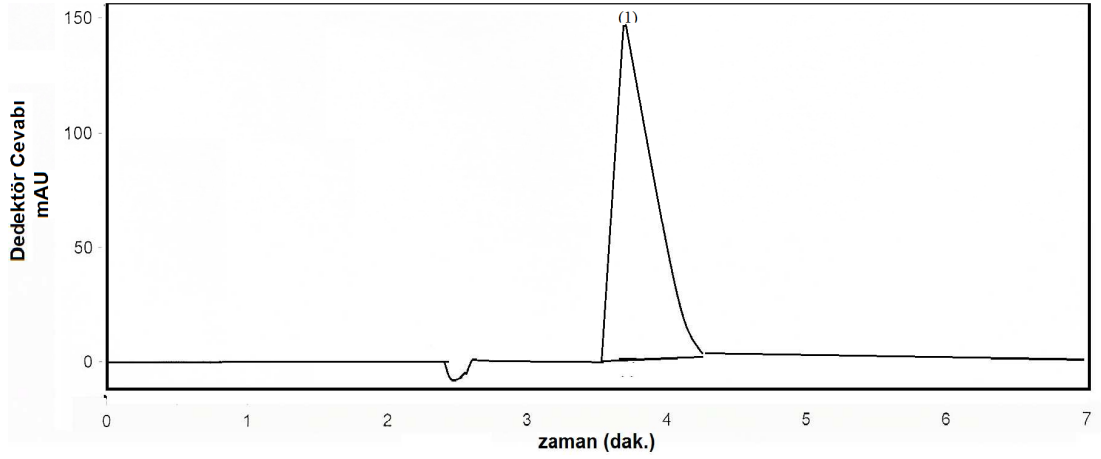
4.1. Kromatografik koşulların belirlenmesi

4.1.1. Dedektör ve Dalgaboyu Seçimi

Yapılan literatür araştırmaları her iki etken maddenin analizi için de en çok kullanılan ve en uygun dedektörün UV dedektör olduğunu gösterdiği için bu çalışmada da UV dedektör kullanılmış, öncelikle amlodipin besilat ile 237 ve 215 nm dalgaboyunda yapılan ön denemeler sonucunda 215 nm’ de gözlenen amlodipin pikinin 237 nm dalgaboyundakine göre daha küçük olması nedeniyle 237 nm uygun dalgaboyu olarak seçilmiştir. Her iki dalgaboyu arasındaki farklılıklar Şekil-3 ve Şekil-4’de gösterilmiştir.



Şekil-3. 160,0 µg/mL amlodipin besilatın 215 nm dalgaboyundaki kromatogramı



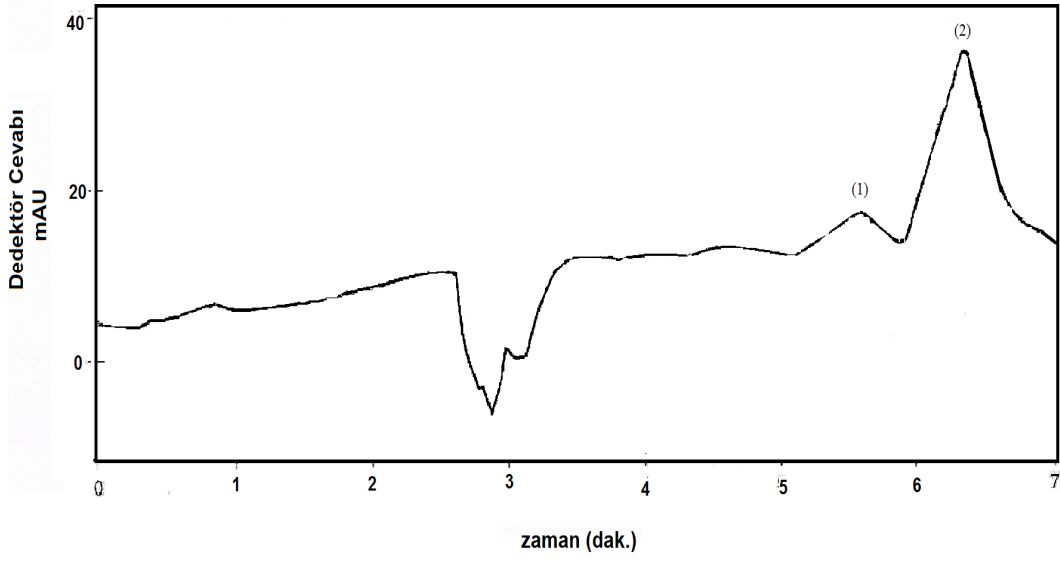
Şekil-4. 160,0 µg/mL amlodipin besilatın 237 nm dalgaboyundaki kromatogramı

4.1.2 Kolon Seçimi

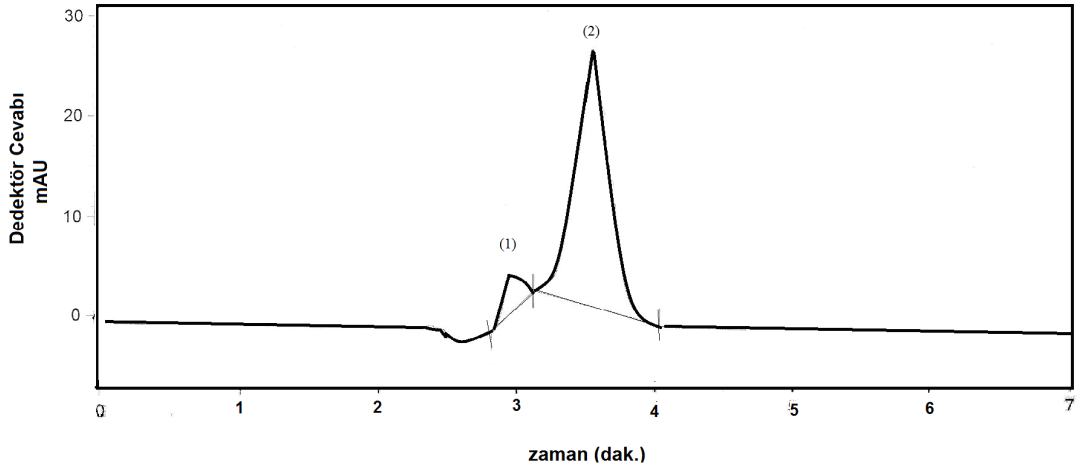
Lichrocart (merck) C₁₈ (250mm x 4,6 mm, 5µ) HPLC kolonu ile yaptığımız ön denemelerde uygun ve geliştirilebilir sonuçlar alınmış ve bu nedenle çalışmaya bu kolon ile devam edilmiştir.

4.1.3 Hareketli Fazın pH'si ve Çözücü Bileşimi

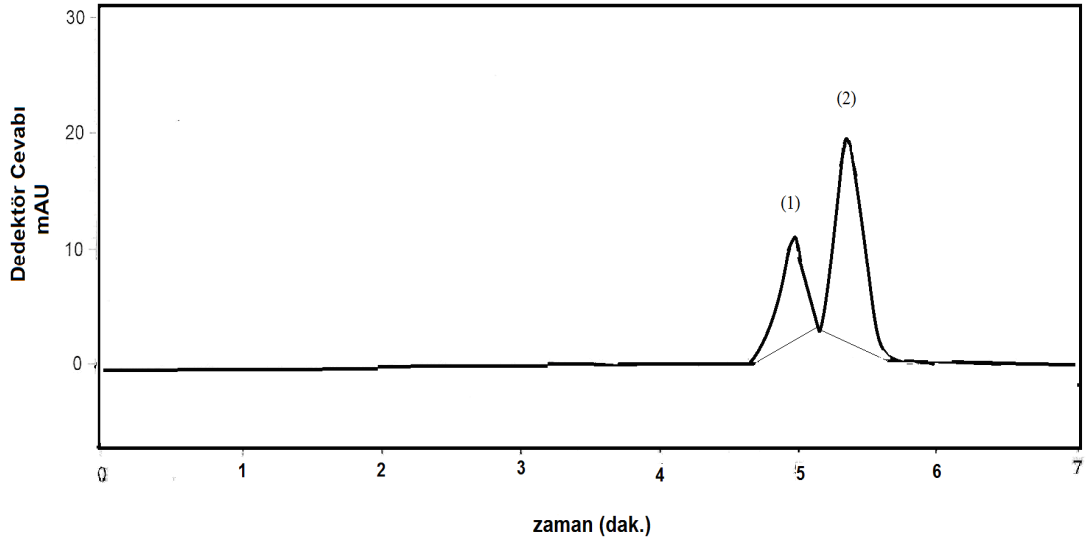
Yapılan literatür araştırmalarında amlodipin ve aliskirenin ayrı ayrı analizleri için geliştirilen yöntemlerde asidik tamponlar ve çoğunlukla pH = 3 tercih edildiğinden bu çalışmada da başlangıç olarak trietilamin – fosfat tamponu ile pH=3'de çalışıldı ve uygun sonuçların alınması nedeniyle pH=3'de çalışılmaya devam edildi. Ayrıca hareketli faz içinde kullanılacak uygun tampon çözeltinin tespiti için asetat ve trietilamin – ortofosforik çözeltileri, asetonitril, metanol karışımıyla çalışıldı. Asetat tamponu kullanıldığında piklerin genişlediği Şekil-5' de görülmektedir. Trietilamin – ortafosforik asit tamponu kullandığımızda ise daha dar ve uygun pikler elde edildi. Dalga boyuna karar verildikten sonra ACN, MeOH ve trietilamin – ortofosforik asit tamponu çözeltilerinin karışımı için en uygun oranın tespit çalışmaları yapıldı, sonuçlar Tablo-1 ve Şekil-5,6,7,8,9,10' da verilmiştir.



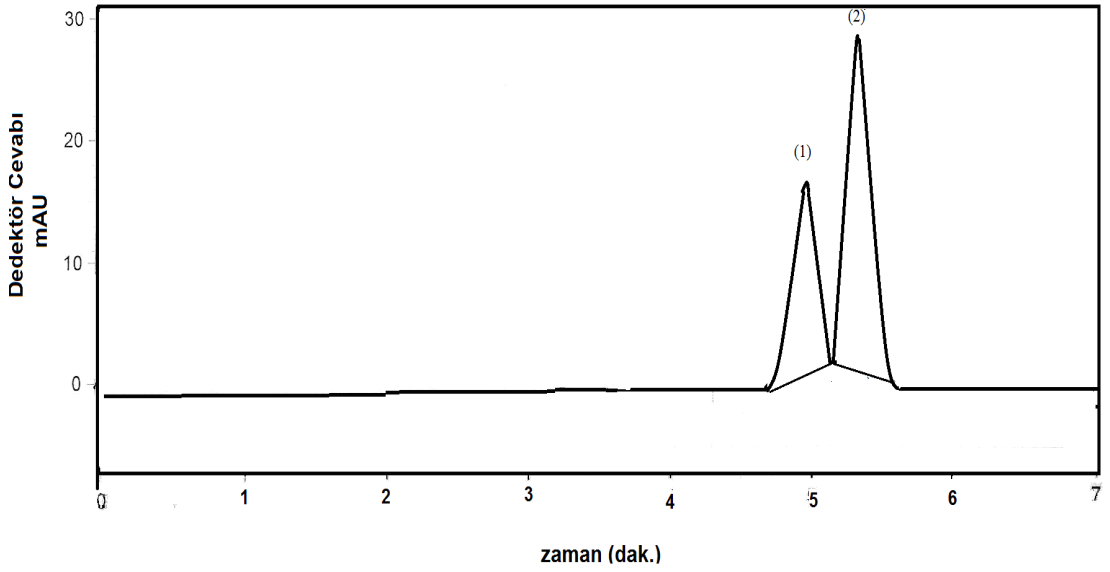
Şekil-5. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat (1), 13,5µg/mL amlodipin besilat (2), 10 mM asetat tamponu (pH=4,5), CH₃CN/MeOH, 50/40/10,h/h/h)



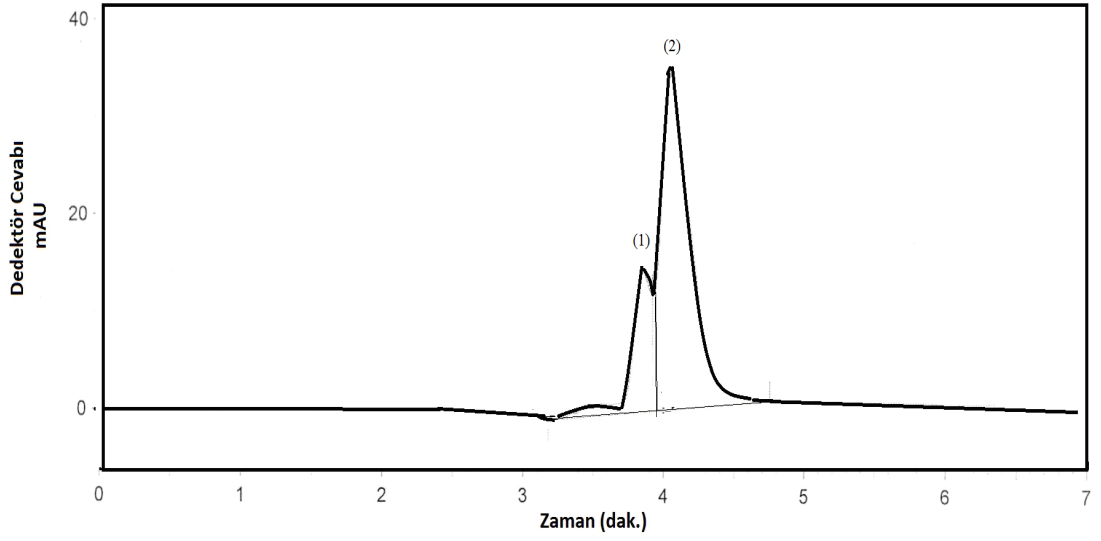
Şekil-6. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat (1), 13,5µg/mL amlodipin besilat (2), 50mM trietilamin-ortofosforik asit tamponu (pH=3,0), CH₃CN/MeOH, 50/30/20,h/h/h)



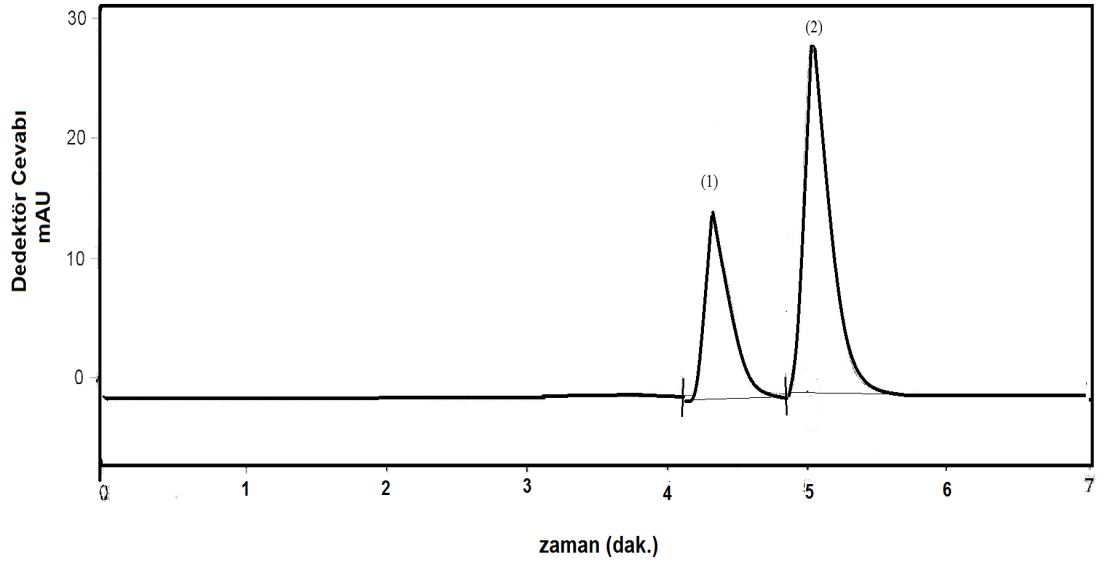
Şekil-7. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat (1), 13,5µg/mL amlodipin besilat (2), 50mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3,0), CH₃CN/MeOH, 40/40/20,h/h/h)



Şekil-8. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat (1), 13,5 µg/mL amlodipin besilat (2), 50 mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3,0), CH₃CN/MeOH, 45/15/40,h/h/h)



Şekil-9. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat (1), 13,5µg/mL amlodipin besilat (2), 50 mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3,0), CH₃CN/MeOH, 30/40/30,h/h/h)



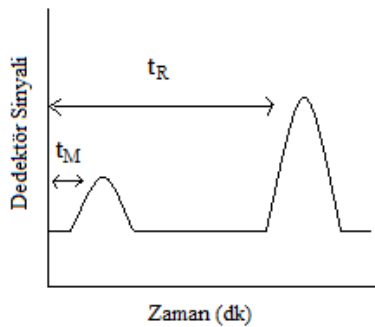
Şekil-10. Aliskiren ve amlodipin karışımını içeren kromatogram. (218,5 µg/mL aliskiren hemifumarat (1), 13,5 µg/mL amlodipin besilat (2), 50 mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu (pH=3,0), CH₃CN/MeOH, 50/40/10,h/h/h)

Tablo-1. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre aliskiren ve amlodipinin alıkonma zamanı değerlerinin değişimi

CH ₃ CN (%)	MeOH (%)	Tampon çöz. (%) (pH=3,0)	Aliskiren t _R (dak.)	Amlodipin t _R (dak.)
40	30	30	3,8	4,0
40	20	40	4,7	5,2
40	15	45	3,9	4,4
50	20	30	3,5	3,5
40	10	50	4,1	5,2

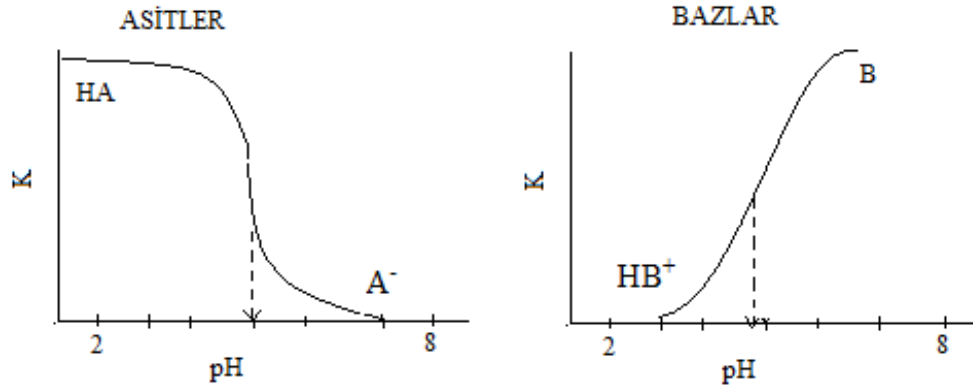
4.1.4 pH Seçimi

İyonik maddelerin kromatografide ayrılmalarında rol oynayan faktörlerden biride hareketli fazın pH değeridir. Elüsyon zamanı ve pik şekli bu değere bağlıdır. Bir çözünen için alıkonma faktörü birden çok küçük olduğunda, elüsyon çok hızlı olacağından alıkonma zamanının doğru tayini zordur. Alıkonma faktörü büyük olduğunda ise elüsyon zamanı çok uzun olur. En uygun durumdaki ayırmalar bir karışımdaki çözünenlerin kapasite faktörünün 2 ile 10 arasında olduğu koşullarda gerçekleşir. Kapasite faktörü = $t_R - t_M / t_M$

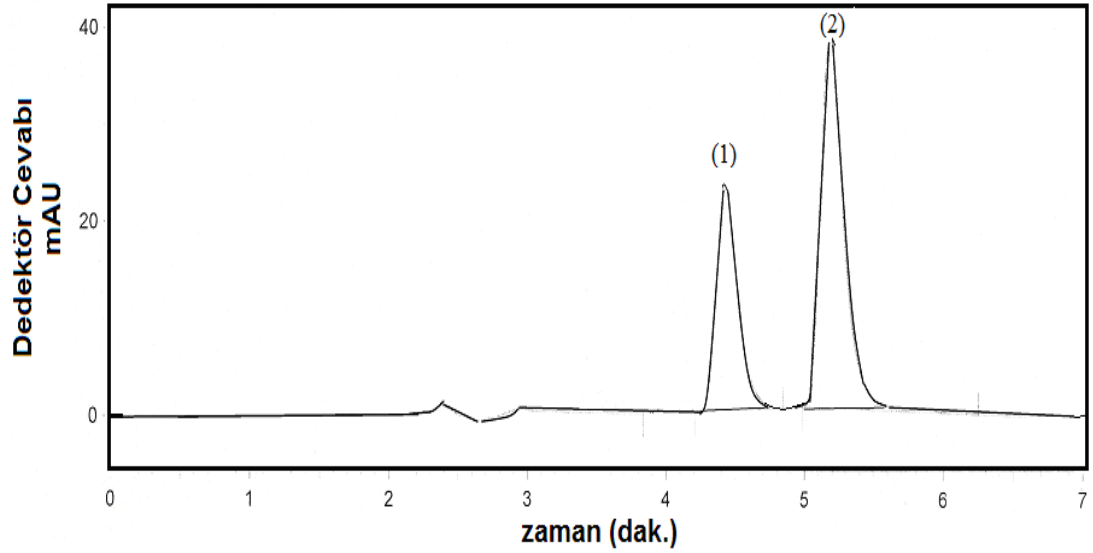


Şekil-11. Kapasite faktörü hesabının kromatogram üzerinde gösterimi

İyonik maddeler nötral hallerinden daha hidrofildir. Bu nedenle tamamen nötr oldukları durumda kolonda daha çok tutunmaları ve tamamen iyonlaşmış olduklarında kolonda az tutunmaları beklenir. Şekil-12’ de görüleceği üzere tam dönüm noktası üzerinde çözünme denge hali kazanır ve bu anda çözeltide iyonik madde konsantrasyonu % 50’dir. Bu pK_a değeridir.



Şekil-12. Asidik ve bazik türlerin hareketli fazın pH değişimindeki durumları



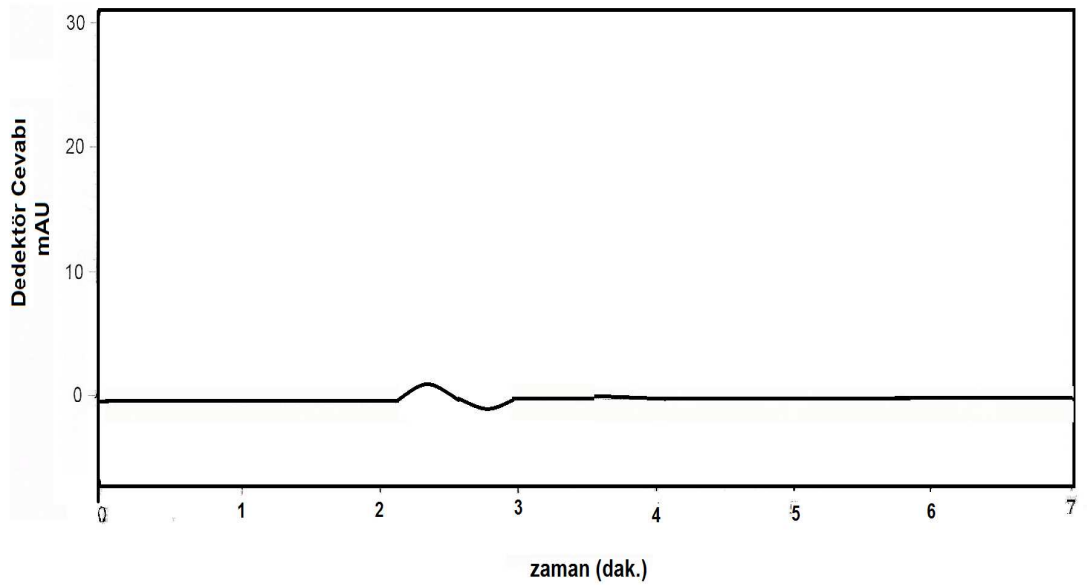
Şekil-13. Amlodipin ve aliskiren çözelti karışımını içeren kromatogram (26,5 $\mu\text{g/mL}$ aliskiren hemifumarat (1) ve 1,6 $\mu\text{g/mL}$ amlodipin besilat (2), 50 mM trietilamin–ortofosforik asit tamponu ($\text{pH}=3,0$), $\text{CH}_3\text{CN/MeOH}$, (50/40/10,h/h/h), $\lambda=237$, akış hızı 1 mL/dak.)

4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen yöntemin validasyonu için Bölüm-3.5' de anlatıldığı gibi çalışılmıştır.

4.2.1. Seçicilik

Kolona hareketli faz enjekte edildi, amlodipin ve aliskiren piklerinin görüldüğü dakikalarda hareketli faz karışımından ileri gelen herhangi bir pik olmadığı belirlendi (Şekil-14).



Şekil-14. Hareketli faz enjeksiyonuna ait kromatogram

4.2.2. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Bölüm 3.5.3' de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD değerleri aliskiren hemifumarat için 0,95 $\mu\text{g/mL}$, amlodipin besilat için 0,51 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değerleri aliskiren hemifumarat için 3,18 $\mu\text{g/mL}$, amlodipin besilat için 1,70 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

4.2.3. Doğrusallık

Amlodipin besilat için 2,65 – 26,50 $\mu\text{g/mL}$ ve aliskiren hemifumarat için 5,0 – 50,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyondaki çözeltiler ile Bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her bir konsantrasyona karşı elde edilen

ortalama pik alanları değerleri ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi aliskiren için Şekil-15’de, amlodipin için Şekil-16’da verilmiştir.

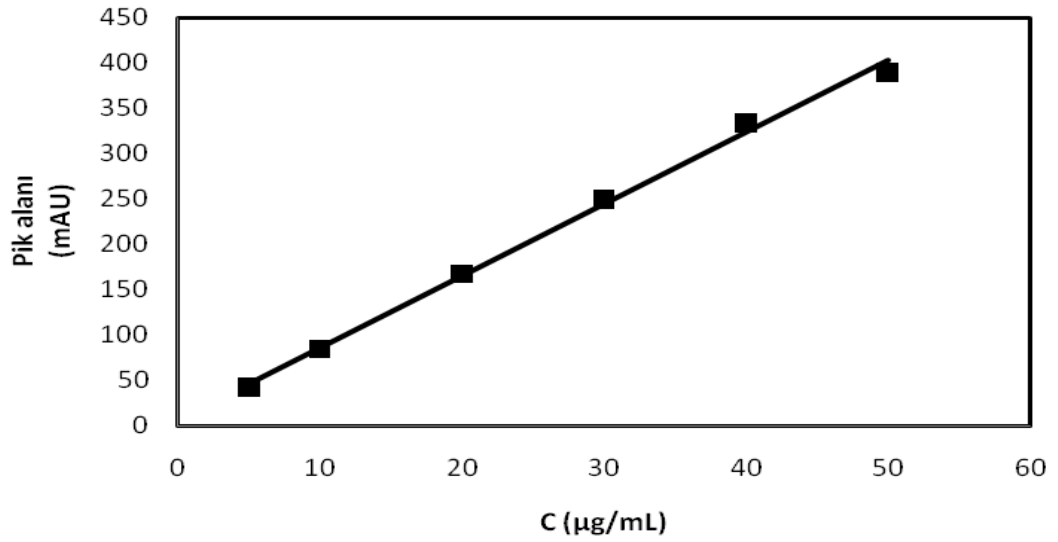
Tablo 2 ve 4’ de pik alanları ve ortalamaları (A_{AML} ve A_{ALS}), SD ve RSD değerleri, Tablo 3 ve 5’ de ise en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denkleminde ($A=mC+b$, A= alan değerleri, m=eğim, b=kesim noktası, C= konsantrasyon) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r^2) verilmiştir.

Tablo-2. Aliskiren hemifumaratın 5,0 - 50,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistiksel verileri

$C_{\mu\text{g/mL}}$ A_{ALS}	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0	50,0
1	40,811	83,867	168,50	250,54	333,94	375,16
2	42,457	83,436	166,477	250,724	324,173	394,212
3	41,104	84,558	168,458	249,554	345,219	401,293
4	40,856	84,041	164,173	247,52	334,696	386,635
5	41,585	82,468	167,733	250,856	332,904	394,481
Ortalama	41,363	83,674	167,068	249,838	334,187	390,357
SD	0,685	0,784	1,813	1,393	7,482	9,952
RSD (%)	1,66	0,94	1,09	0,56	2,24	2,55
Ortalama alan değerlerinden hesaplanan doğru denklemi						
$y = 7,921x + 6,433, r=0,9960$						

Tablo-3. Tablo-2' deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	4	5	Ortalama \pm SD
m	7,68	7,88	8,19	7,88	7,90	7,90 \pm 0,162
b	10,40	6,63	3,54	6,21	5,39	6,43 \pm 2,51
r	0,99	0,998	0,996	0,995	0,997	0,9952 \pm 0,003



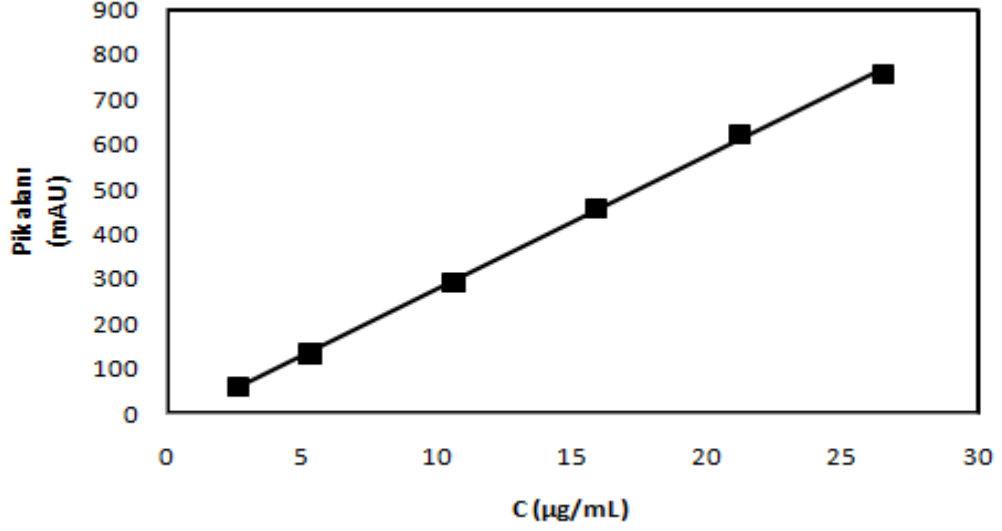
Şekil- 15. Aliskiren hemifumaratın 5,0 – 50,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo-4. Amlodipin besilatın 2,65 – 26,50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanları ve istatistiksel verileri

C µg/mL A _{AML}	2,65	5,30	10,6	15,9	21,2	26,5
1	66,942	137,368	298,681	456,417	637,795	754,810
2	61,399	138,16	300,201	467,957	625,511	755,829
3	60,362	136,461	293,098	451,978	607,012	763,437
4	59,06	128,938	293,319	452,21	619,792	752,612
5	60,988	129,986	275,924	459,521	632,384	755,843
Ortalama	61,750	134,183	292,244	457,617	624,499	756,506
SD	3,034	4,366	9,657	6,577	11,916	4,092
RSD (%)	4,91	3,25	3,30	1,44	1,91	0,54
Ortalama alan değerlerinden hesaplanan doğru denklemi $y=29,67x-18,51, r = 0,9990$						

Tablo-5. Tablo-4' deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	4	5	Ortalama ± SD
m	29,60	29,60	29,53	29,61	30,02	29,67 ± 0,20
b	-13,40	-13,77	-18,95	-21,13	-25,31	-18,51 ± 5,04
r	0,9970	0,9980	1,0000	0,9990	0,9970	0,9982 ± 0,001



Şekil-16. Amlodipin besilatın 2,65 – 26,50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

4.2.4. Doğruluk

Bölüm 3.5.6' da belirtildiği gibi doğruluk çalışması amlodipin besilat ve aliskiren hemifumarat için değişik konsantrasyonlarda enjekte edilen numune çözeltilerinin standart kalibrasyon grafiğinden hesaplaması ile yapıldı. Bu amaçla aliskiren hemifumarat için 16,70, 33,60, 50,45 µg/mL, amlodipin besilat için 3,25, 9,50, 20,50 µg/mL konsantrasyondaki çözeltiler kolona enjekte edildi ve geri kazanım yüzdeleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo-6' da verilmiştir.

Tablo-6. Aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilat için doğruluk (geri kazanım) çalışması sonuçları

	Alınan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
ALS	16,70	17,30	103,59
	33,60	33,95	101,04
	50,45	51,84	102,76
AML	3,25	3,15	96,92
	9,50	9,15	96,32
	20,50	20,04	97,76

4.2.5. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda amlodipin besilat (3,25, 9,50, 20,50 $\mu\text{g/mL}$) ve aliskiren hemifumarat (17,50, 26,25, 43,75 $\mu\text{g/mL}$) içeren çözeltilerle Bölüm-3.5.4' de anlatıldığı gibi çalışıldı. Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri ve farklı günlerde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri Tablo-7'de verilmiştir.

Tablo-7. Aynı gün ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği

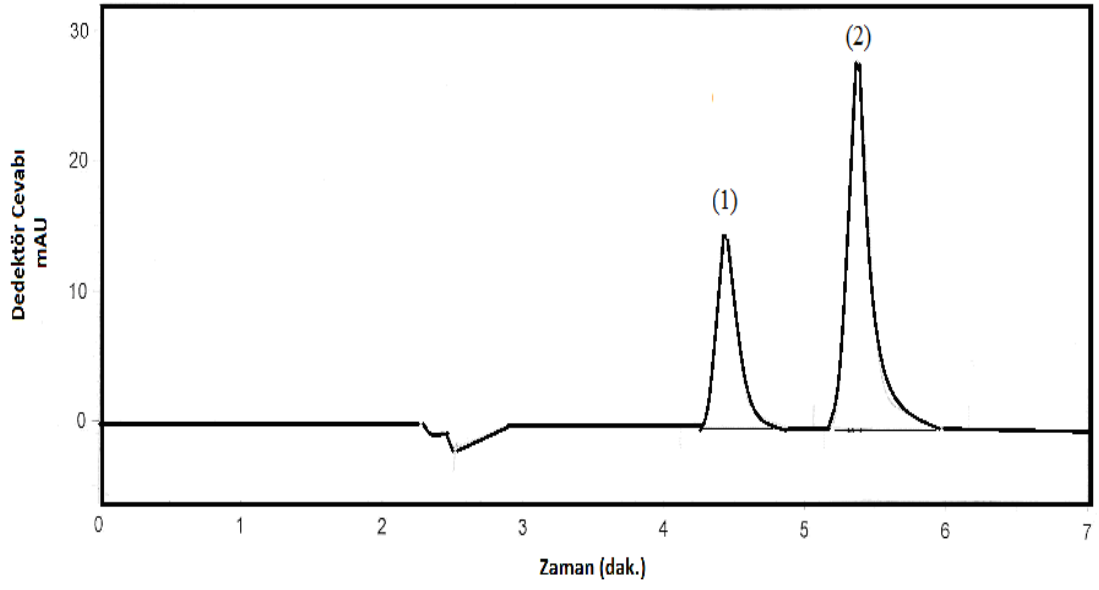
	Gün içi*			Günler arası**		
	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%)	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%)
AML	3,25	3,27	0,92	3,25	3,26	0,64
	9,50	9,30	0,43	9,50	9,32	0,64
	20,50	20,52	0,15	20,50	20,51	0,10
ALS	17,50	17,52	0,59	17,50	17,35	0,23
	26,25	26,38	0,20	26,25	27,38	0,23
	43,75	43,66	0,14	43,75	43,65	0,27

* her bir konsantrasyonda 3 ölçüm yapılmıştır.

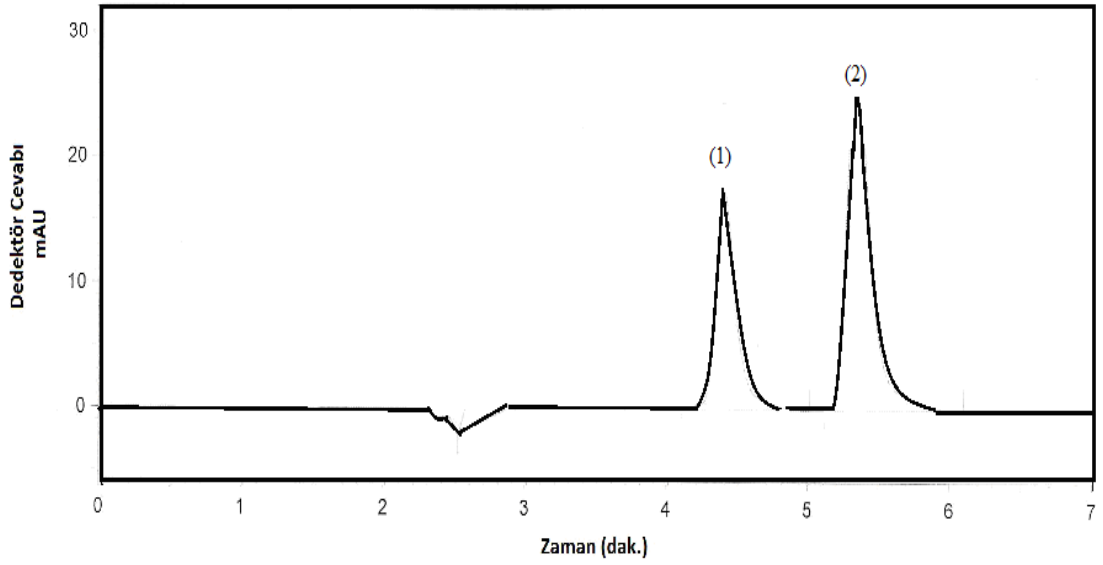
** üç farklı günde elde edilen sonuçlar

4.2.6. Çözelti Kararlılığı

Çözeltilerin kararlılığının saptanması için standart çözeltiler oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat ve +4 °C de 1 ay bekletildi. Yapılan değerlendirme sonucunda bu şartlar altında stok çözeltilerde herhangi bir bozunma ürününe rastlanmadı. Elde edilen sonuçlar Şekil-17 ve 18'de verilmiştir.



Şekil-17. Aliskiren (1) ve amlodipin (2) çözelti karışımının oda sıcaklığında, 24 saat beklendikten sonra alınan kromatogramı



Şekil-18. Aliskiren (1) ve amlodipin (2) çözelti karışımının +4 °C de, karanlıkta, 1 ay beklendikten sonra alınan kromatogramı

4.2.7. Yöntemin Sağlamlığı

Mobil Faz bileşiminde (± 2), pH'sinde ($\pm 0,5$), akış hızında ($\pm 0,1$) ve kolon sıcaklığında ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) yapılan küçük değişikliklerde elde edilen sonuçlar Tablo-8'de görülmektedir.

Tablo-8. Yöntemin sağlamlık parametreleri

pH	Aliskiren t_R	Amlodipin t_R
3,00	4,12	5,22
2,50	4,21	5,26
3,50	4,07	5,12
Kolon Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)		
25	4,13	5,23
30	4,04	5,11
35	3,99	5,01
Mobil Faz Oranındaki Değişim (% 2)		
50 mM trietilamin– ortofosforik asit tamponu (pH=3,0) /MeOH/ACN (49/10/41, h/h/h)	4,01	5,10
50 mM trietilamin– ortofosforik asit tamponu (pH=3,0) /MeOH/ACN (50,2/9,8/40), h/h/h)	3,98	5,07
Akış Hızı (mL/dak.)		
1,01	4,01	5,11
1,00	4,12	5,22
0,99	4,22	5,33

4.2.8. Uygunluk Testi

Geliştirilen yöntem sonucunda elde edilen uygunluk testi parametreleri Tablo-9' da özetlenmiştir.

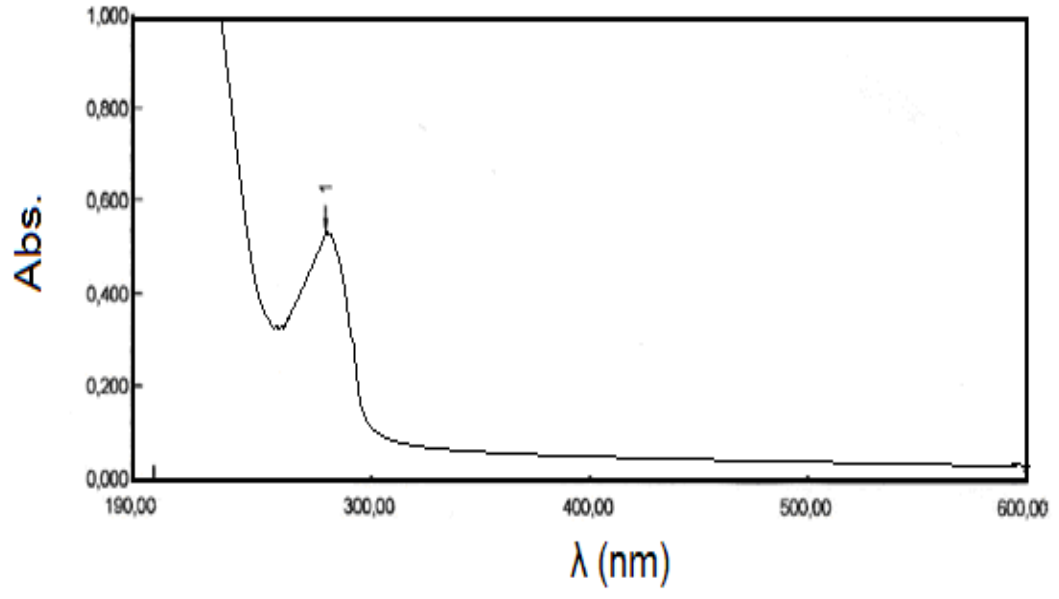
Tablo-9. Sistem uygunluk testi parametreleri

	Aliskiren	Amlodipin
Alıkonma zamanı (t_R)	4,12	5,22
Teorik Plaka Sayısı (N)	3861	4254
Kuyruklanma Faktörü (T)	1,61	1,71
Ayrılma Faktörü (R_s)	2,10	

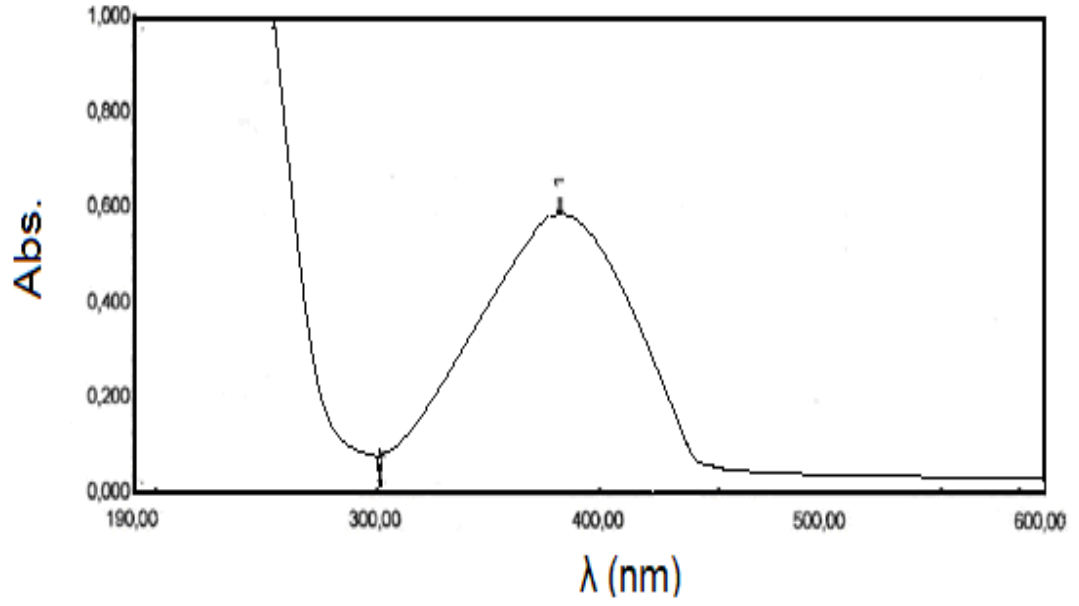
4.3. Tablet Tozu Karışımında Amlodipin ve Aliskiren Analizi

4.3.1. Kıyas Yöntemi ile Ölçü Eğrisinin Hazırlanması ve Regresyon Analizi

Kıyas yöntemi olarak UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilatın sulu çözeltilsinin UV spektrumları alınmış ve aliskirenin 279,5 nm ve amlodipinin 365 nm dalgaboyunda maksimum absorbans yaptıkları gözlenmiştir. Şekil-19 ve Şekil-20' de her bir etkin maddenin ayrı ayrı sudaki çözeltilerinin spektrumları görülmektedir. Bölüm 3.6.1' de anlatıldığı gibi çalışılarak öncelikle absorbans değerleri ile konsantrasyonların doğrusal olduğu alan tespit edildi. Bu nedenle aliskiren için 20,0 – 272,0 µg/mL, amlodipin besilat için 5,0 – 66,0 µg/mL aralığında 7 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Bu konsantrasyonlara karşı ölçülen absorbans değerleri ile oluşturulan ölçü eğrilerine en küçük kareler yöntemi uygulanarak en uygun doğru denklemi ve korelasyon katsayısı (r^2) $A=mC+b$ eşitliğine göre hesaplandı. Ortalama değerler ile çizilen ölçü eğrileri Şekil-21 ve Şekil-22'de, bu ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler Tablo-11 ve Tablo-13'de verilmiştir.



Şekil-19. 130,5 µg/mL aliskiren hemifumaratın sudaki çözeltisinin UV spektrumu



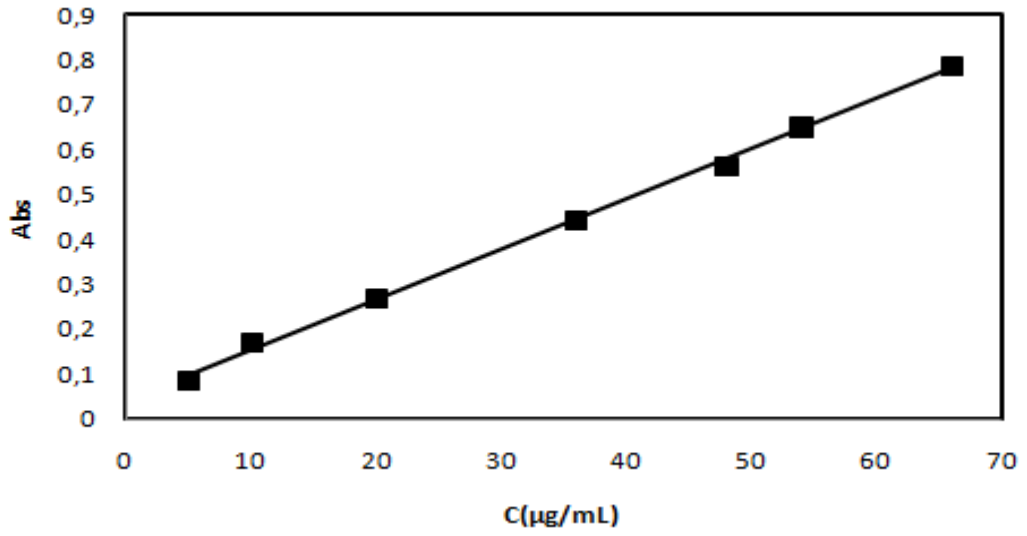
Şekil-20. 49,5 µg/mL amlodipin besilatın sudaki çözeltisinin UV spektrumu

Tablo-10. Amlodipin besilatın 5,0 – 66,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait değerler ve istatistiksel verileri

$C_{(\mu\text{g/mL})}$ $A_{(AML)}$	5,0	10,0	20,0	36,0	48,0	54,0	66,0
1	0,089	0,177	0,296	0,431	0,555	0,634	0,787
2	0,088	0,168	0,286	0,447	0,568	0,657	0,798
3	0,086	0,170	0,278	0,442	0,577	0,657	0,789
4	0,088	0,176	0,248	0,443	0,557	0,652	0,778
5	0,086	0,170	0,243	0,445	0,556	0,652	0,776
Ort	0,087	0,172	0,270	0,442	0,563	0,651	0,786
SD	0,001	0,004	0,023	0,006	0,010	0,009	0,009
RSD (%)	1,49	2,44	8,59	1,42	1,72	2,27	1,32
Ortalama değerlerden hesaplanan doğru denklemi: $y = 0,011x + 0,044$, $r = 0,9981$							

Tablo-11. Tablo-10' daki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	4	5	Ortalama ± SD
m	0,010	0,011	0,011	0,011	0,011	0,011 ± 0,001
b	0,053	0,045	0,043	0,041	0,037	0,044 ± 0,006
r	0,9940	0,9970	0,9980	0,9960	0,9960	0,9962 ± 0,0015



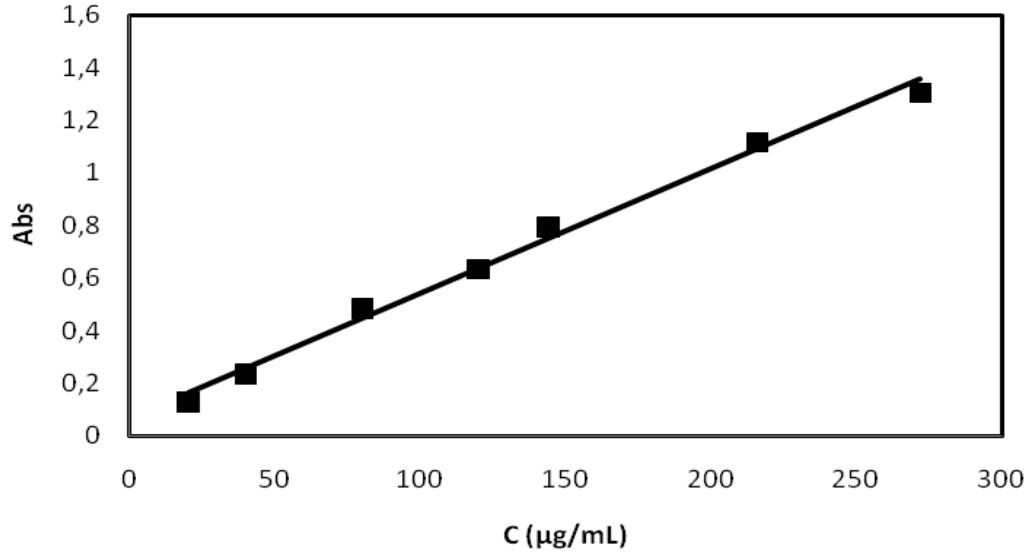
Şekil-21. Amlodipin besilatın 5,0 – 66,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo-12. Aliskiren hemifumaratın 20,0 – 272,0 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilen ölçü eğrilerine ait değerler ve istatistiksel verileri

$C_{(\mu\text{g/mL})}$	20,0	40,0	80,0	120,0	144,0	216,0	272,0
$A_{(ALS)}$							
1	0,125	0,233	0,473	0,656	0,796	1,151	1,313
2	0,126	0,234	0,466	0,627	0,792	1,100	1,317
3	0,126	0,234	0,475	0,626	0,793	1,110	1,317
4	0,125	0,233	0,497	0,629	0,797	1,117	1,249
5	0,127	0,234	0,504	0,630	0,798	1,114	1,325
Ort	0,126	0,234	0,483	0,634	0,795	1,118	1,304
SD	0,001	0,001	0,017	0,013	0,003	0,020	0,031
RSD (%)	0,79	0,43	3,52	1,99	2,05	1,79	2,38
Ortalama değerlerden hesaplanan doğru denklemi: $y = 0,005x + 0,067$, $r=0,9924$							

Tablo-13. Tablo-12'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler

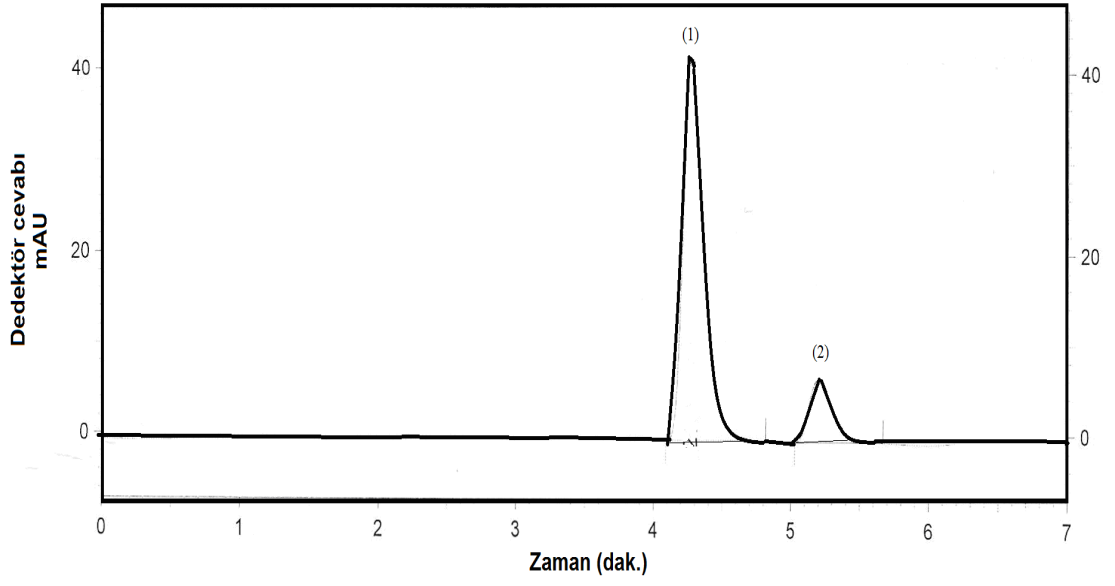
	1	2	3	4	5	Ortalama \pm SD
m	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005 \pm 0,000
b	0,062	0,060	0,061	0,081	0,068	0,066 \pm 0,009
r	0,9910	0,9950	0,9940	0,9840	0,9920	0,9912 \pm 0,004



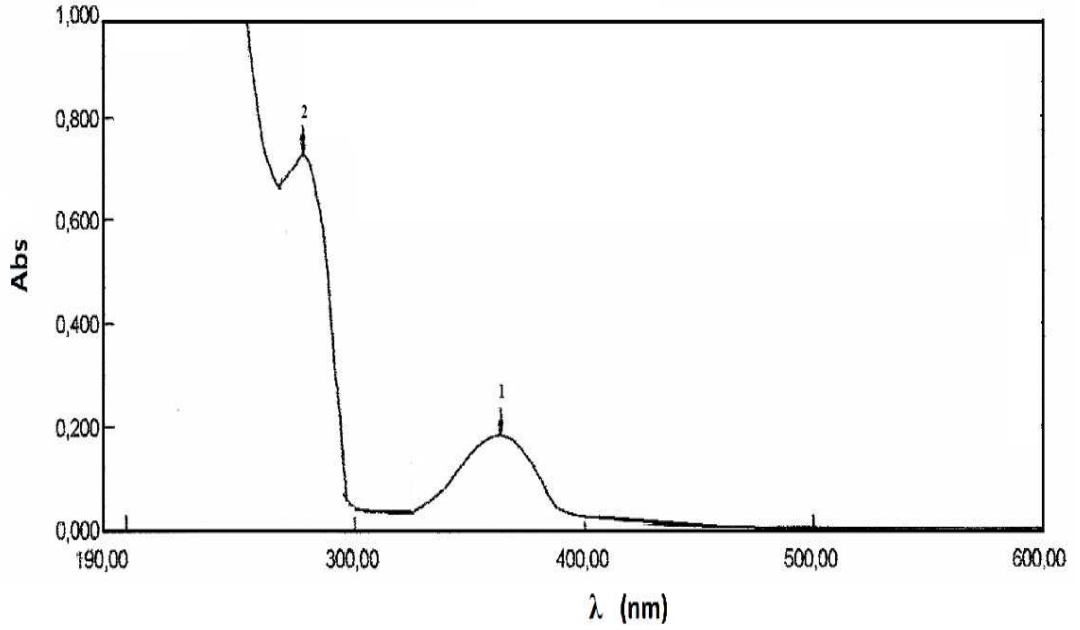
Şekil-22. Aliskiren hemifumaratın 20,0 – 272,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

4.3.2. Geliştirilen HPLC ve UV-VIS Spektrofotometrik Yöntemler ile Analiz

10,0 mg amlodipin besilat ve 150,0 mg aliskiren hemifumarat içeren tablet tozu karışımı Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı gibi geliştirilen HPLC yöntemi ve UV-VIS spektrofotometrik yöntem ile analiz edilerek ilaç içindeki etkin maddelerinin miktarları tayin edildi (Şekil-23,24). Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalamalar \bar{X} , SD, %RSD, ve % 95 olasılık düzeyinde güven aralıkları Tablo-14' de verilmiştir. Geliştirilen yöntemler ile elde edilen sonuçların ortalama yönünden karşılaştırılması t – testi (Student t – testi), standart sapmalar yönünden karşılaştırılması F testi (Fisher test) uygulanarak yapıldı. Tablo-14' de görüldüğü gibi hesaplanan t- ve F- değerleri % 95 olasılık düzeyi ve 5 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen HPLC yöntemi ile kıyas yöntemi arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.



Şekil-23. Tablet tozu karışımının analizine ait kromatogram (23,98 $\mu\text{g/mL}$ aliskiren (1), 1,15 $\mu\text{g/mL}$ amlodipin (2))



Şekil-24. Tablet tozu karışımının analizine ait spektrum (10,0 $\mu\text{g/mL}$ amlodipin (1), 150,0 $\mu\text{g/mL}$ aliskiren (2))

Tablo.14- 10,0 mg amlodipin, 150,0 mg aliskiren içeren tablet tozu karışımının geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları ve bu sonuçların geliştirilen kıyas yöntemiyle elde edilenlerle istatistiksel olarak karşılaştırılması

	ALS ^a		AML ^b	
	HPLC Yöntemi	UV-VIS Spek. Yöntem	HPLC Yöntemi	UV-VIS Spek. Yöntem
1	151,55	151,41	10,13	10,18
2	151,83	151,32	10,19	10,27
3	150,70	150,78	10,00	10,09
4	152,40	151,39	10,16	9,91
5	151,83	151,77	10,13	9,73
\bar{x}_{ort}	151,66	151,34	10,12	10,04
Geri Kazanım %	101,1	100,9	101,00	101,0
SD	0,62	0,36	0,07	0,16
RSD	0,41	0,24	0,70	2,18
$t.s/\sqrt{n}$	0,46	0,27	0,02	0,04
Güven Sınırları	151,66 ± 0,46	151,34 ± 0,27	10,12 ± 0,02	10,04 ± 0,04
t	1,67		0,62	
F	2,92		0,60	

$n_1=n_2=5$

a=Tekturna (her tablet 150,0 mg aliskiren içerir)

b=Monovas (her tablet 10,0 mg amlodipin içerir)

($p=0,05$, t (tablo) = 2,23)

($p=0,05$, F (tablo)= 5,05)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Hipertansiyon günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Hipertansiyon tedavisinde ilaç kullanımı kan basıncının kontrolü için önemlidir ve bu tedavi sırasında ilaç sayısının azaltılması için kombine ilaç kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu amaçla kullanılan Tekamlo isimli ilaç ağustos 2010'da FDA onayı almış hipertansiyon tedavisinde kullanılan yeni bir ilaçtır. Tekamlo aliskiren hemifumarat ve amlodipin besilat etkin maddelerinden oluşmaktadır ve bu etkin maddelerin her biri ayrı ayrı hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Aliskiren renin inhibitörü, amlodipin ise bir kalsiyum kanal blokördür.

Yapılan literatür araştırmalarında bu iki ilacın eşzamanlı analizine ilişkin herhangi bir çalışmanın olmaması ayrıca bu ilaçların biraradaki ilaç formülasyonunun (Tekamlo) yurtdışında kullanılıyor olması bizi böyle bir çalışma yapmaya teşvik etmiştir.

Bu çalışmada bu iki ilaç maddesinin eşzamanlı tayini için bir RP-HPLC yöntemi geliştirildi, geliştirilen yöntem valide edildi ve her iki ilaç maddesinin ayrı ayrı ilaç formülasyonlarının karışımının analizine uygulandı.

Belirlenen çalışma koşullarında doğrusal konsantrasyon aralığı aliskiren hemifumarat için 5,0 – 50,0 µg/mL ve amlodipin besilat için 2,65 – 26,50 µg/mL olarak tespit edildi. Geliştirilen yönteminin validasyon çalışmaları sonucunda yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde üç farklı konsantrasyonda analizler yapıldı. Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda geri kazanım ortalama değerleri amlodipin besilat için %97,07 ve aliskiren hemifumarat için %102,50 olarak hesaplandı, kalibrasyon eğrilerine ait doğru denklemleri aliskiren hemifumarat için $y = 7,92x + 6,43$, $r^2=0,9960$ ve amlodipin besilat için $y=29,67x-18,51$, $r^2=0,9990$ olarak bulundu. Amlodipin ve aliskiren için tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırları (LOD) sırasıyla 1,70, 0,51 ve 3,18, 0,95 olarak hesaplandı.

Kıyas yöntemi olarak UV-VIS spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi, geliştirilen bu yöntemde 365 ve 279,5 nm dalgaboyunda çalışıldı ve doğrusal konsantrasyon aralıkları amlodipin besilat için 5,0 – 66,0, aliskiren hemifumarat için 20,0 – 272,0 µg/mL olarak bulundu. Geliştirilen HPLC yöntemi ve kıyas yöntemi olarak geliştirilen UV- VIS spektrofotometrik yöntem 150,0 mg aliskiren ve 10,0 mg amlodipin içeren tablet tozu karışımlarına uygulandı ve ortalama geri kazanım sonuçları HPLC yönteminde, amlodipin için % 101,0 aliskiren için % 101,1 ve UV spektroskopik yöntemde, amlodipin için % 101,0, aliskiren için %100,9 olarak bulundu.

Geliştirilen HPLC yönteminin kıyas yöntemi ile karşılaştırılması amacıyla Student – t ve Fisher – F testi kullanılmış, sonuçlar kıyaslanmış ve bulunan sonuçlar beş deneme için verilen teorik değerlerden (t=2,23; F=5,05) küçük olduğundan ortalamalar (t – testi) ve standart sapmalar (F-testi) yönünden anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Sonuç olarak bu çalışmada, aliskiren ve amlodipinin eşzamanlı analizlerinde kullanabilecek kolay, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek, hızlı ve ekonomik bir yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen bu yöntem valide edilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntem bu iki ilacın bir aradaki rutin analizlerinde güvenle kullanılabilir.

Tablo-15. Optimize edilmiş kromatografik koşullar

Parametreler	Optimize koşullar
HPLC sistemi	Thermo Separation Products 1100
Kolon	RP- C ₁₈ (250mm X 4.6mm X 5 µm)
Hareketli Faz	50 mM trietilamin- ortofosforik asit tampon çözeltisi (pH=3,0)/ MeOH /CH ₃ CN (50/10/40, h/h/h)
Akış Hızı	1 mL/dak.
Sıcaklık	Oda sıcaklığı
Dedektör ve Dalgaboyu	UV dedektör 237 nm
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

KAYNAKLAR

1. Abdallah OM, Badawey AM. (2011). Derivative - ratio spectrophotometric, chemometric and HPLC validated methods for simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in combined dosage form. *Int. J. Ind. Chem.*, 2(2), 78–85.
2. Abdel-Wadood HM, Mohamed NA, Mahmoud AM. (2008). Validated spectrofluorometric methods for determination of amlodipine besylate in tablets. *Spectrochim. Act.*, 70, 564–570.
3. Acharjya SK, Annapurna MM, Koya S. (2010). Liquid chromatographic method for simultaneous estimation of atorvastatin calcium and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage forms. *Int. J. Phar. and Bio Sci.*, 1 (4), 161–170.
4. Altiokka G, Dogrukol-Ak D, Tunçel M, Aboul-Enein HY. (2002). Determination of amlodipine in pharmaceutical formulations by differential-pulse voltammetry with a glassy carbon electrode. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 2, 104–108.
5. Argekar AP, Powar SG. (2000). Simultaneous determination of atenolol and amlodipine in tablets by high-performance thin-layer chromatography. *J. Phar. and Bio. Anal.*, 21, 1137–1142.
6. Atmaca S, Tatar S. (2001). Determination of amlodipine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 758, 305 – 310.
7. Bahrami G, Mirzaeei S. (2004). Simple and rapid HPLC method for determination of amlodipine in human serum with fluorescence detection and its use in pharmacokinetic studies. *J. Pharma. and Bio. Ana.*, 36, 163–168.
8. Barman RK, Islam MAU, Maruf A, Wahed MII, Islam R, Khan A, Hossain MB, Rahman BM. (2007). Simultaneous high-performance liquid chromatographic

determination of atenolol and amlodipine in pharmaceutical-dosage form. *Pak. J. Pharm. Sci*, 20(4), 27 –279 .

9. Basavaiah K, Chandrashekar U, Prameela HC. (2003). Sensitive spectrophotometric determination of amlodipine and felodipine using iron(III) and ferricyanide. *II Farm.*, 58, 141–148.
10. Berridge JC, Coleman MW, Fell AF, Owens PK. (1996). Method development in liquid chromatography with a charged cyclodextrin additive for chiral resolution of rac-amlodipine utilising a central composite design, *Chir.*, 8,466–476.
11. Bhushan R, Gupta D, Singh SK. (2006). Liquid chromatographic separation and UV determination of certain antihypertensive agents. *Biomed. Chromatogr.*, 20, 217–224.
12. Carvalho M, Oliveira CH, Mendes GD, Sucupira M, Moraes MEA, Nuccia GD. (2001). Amlodipine bioequivalence study: Quantification by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Biopharm. Drug Dispos*, 22, 383–390.
13. Ceccato A, Klinkenberg R, Streeb B. (2003). Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amlodipine residues on manufacturing equipment surfaces. *J. of Pharm. and Biomed. Ana.*, 32, 345 – 352.
14. Chabukswar AR, Jagdale SC, Kumbhar SV, Kadam VJ, Patil VD Bhanudas SK, Pradeep DL. (2010). Simultaneous HPTLC estimation of telmisartan and amlodipine besylate in tablet dosage form. *Arch. of App. Sci. Res.*, 2 (3), 94–100.
15. Çelebier M, Süslü I, Altınöz S. (2011). Simultaneous determination of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. *Lat. Am. J. Pharm.*, 30 (4), 753–758.
16. Dongre VG, Shah SB, Karmuse PP, Phadke M, Jadhav VK. (2008). Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC. *J. of Phar. and Bio. Analy.*, 46, 583–586.

17. Gazy AAK. (2004). Determination of amlodipine besylate by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on glassy carbon electrode in tablets and biological fluids. *Talanta*, 62, 575–582.
18. Goyal RN, Bishnoi S. (2010). Voltammetric determination of amlodipine besylate in human urine and pharmaceuticals, *Bioelectrochem*, 79, 234–240.
19. Joshi HV Patel JK. (2011). New spectrophotometric methods for simultaneous determination of amlodipine besylate and lisinopril in tablet dosage forms. *J. of App. Pharma Sci.*, 1 (6), 162–164.
20. Juyall V, Chaudhary M, Kumar P, Gnanarajan G, Yadav PK. (2008). Method development and its validation for simultaneous estimation of atorvastatin and amlodipine in combination in tablet dosage form by uv spectroscopy, using multi-component mode of analysis. *J. of Pharm. Res.*, 1 (2), 182–187.
21. Kardile DP, Kalyane NV, Thakkar TH, Patel MR, Moradiya RK. (2010). Simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil drug formulations by HPLC and UV-spectrophotometric methods. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 2 (9), 599–514.
22. Kaveri K, Saravanan C, Mozhi MT. (2011). Simultaneous Estimation of losartan Potasyum and amlodipine besylate in tablet dosage form by uv spectrophotometer. *Int. Res. J. of pharm.*, 2 (4), 96–100.
23. Ma Y, Qin F, Sun X, Lu X, Li F. (2007). Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J of Pharm. and Bio. Ana.*, 43, 1540–1545.
24. Mehulkumar P, Ramesh V, Kumar VV, R Srinivas, Diwanl PV. (2009). Simultaneous spectroscopic estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoximil in tablet dosage form. *Asian J. Res. Chem.* 2 (2), 127–130.

25. Mohammadi A, Rezanour N, Dogahehc MA, Bidkorbeh FG, Hashem M, Walker RB. (2007). A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. *J. Chromatogr. B*, 846, 215–221.
26. Muthu AK, Chidalla RS, Prasad S, Kumar DS, Manavala R. (2011). Simultaneous estimation of telmisartan and amlodipine by UV-spectrophotometric method using multi component mode analysis. *Int. Res. J. Pharm.*, 2 (5) 175–180.
27. Muthu AK, Sankhla R, Gupta SH, Smith AA, Manavalan R. (2010). Development and validation of a reversed phase HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and telmisartan in pharmaceutical dosage form. *J. Appl. Chem. Res.*, 12, 43–52.
28. Naidu KR, Kale UN, Shingare MS. (2005). Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product. *J. Pharm. and Bio. Ana*, 39, 147–155.
29. Nalwade S, Reddy VR, Rao DD, Rao IK. (2011). Rapid simultaneous determination of telmisartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in a combined poly pill dosage form by stability-indicating ultra performance liquid chromatography. *Sci Pharm.*, 79, 69–84.
30. Nirogi RVS, Kandikere VN, Mudigonda K, Shukla M, Maurya S. (2006). Sensitive and rapid liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the quantification of amlodipine in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, 20, 833–842.
31. Qutaba SS, Razzaqa SN, Ashfaq M, Khanb IU, Mumtaz AM. (2009). Simultaneous quantitation of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate in combined tablets using hplc. *J. Chil. Chem. Soc.*, 54, 234–237.
32. Pachauri S, Paliwal S, Srinivas KS, Singh Y, Jain V. (2010). Development & validation of HPLC method for analysis of some antihypertensive agents in their pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Sci. and Res.* 2(8), 459–464.

33. Patil P, Barge V, More H, Piswkar S. (2011). Spectrophotometric method for simultaneous determination of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate from tablet dosage form. *Int J Curr Pharm Res*, 3 (2), 74–79 .
34. Patil PR, Rakesh SU, Dhabale PN, Burade KB. (2009). Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form. *Asian J. Res. Chem.* 2(1), 183–187.
35. Patil PR, Rakesh SU, Dhabale PN, Burade KB. (2009). Simultaneous estimation of ramipril and amlodipine by UV spectrophotometric method. *Research J. Pharm. and Tech.*, 2 (2), 304–307.
36. Patil PS, Kulkarni PD, Burkul MS, More HN, Pishawkar SA. (2011). Simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil by First Order derivative spectroscopy from tablet. *Int.J. PharmTech Res.*, 3 (2), 668–675.
37. Patil PS, More HN, Achin SA, Pishwkar A. (2011). RP-HPLC Method for simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil from tablet. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3 (3), 146–149.
38. Patel SB, Chaudhari BG, Buch MK, Patel AB. (2009). Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of valsartan and amlodipine from their combination drug product. *Int.J. ChemTech Res*, 1(4), 1257–1267.
39. Prasad CVN, Parihar C, Chowdhary TR, Purohit S, Parimoot P. (1998). Simultaneous Determination of Atenolol-Amlodipine and Haloperidol-Trihexyphenidyl in Combined Tablet Preparations by Derivative Spectroscopy. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 4, 325–330.
40. Prasad CVN, Saha RN, Parimoo P. (1999). Simultaneous Determination of Amlodipine, Enalapril Maleate and Amlodipine, Lisinopril in Combined Tablet Preparations by Derivative Spectrophotometry. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 5, 383–388.

41. Pedroso CF, Oliveira JG, Campos FR, Goncalves AG, Trindade ACLB, Pontarolo R, (2009). A validated RP–LC method for simultaneous determination of losartan potassium and amlodipine besilate in pharmaceutical preparations. *Chromatogr. Supp.*, 69, 201–206.
42. Pilli NR, Inamadugu JK, Mullangi R, Karra VK, Vaidyad JR and Seshagiri Rao JVLN. (2011). Simultaneous determination of atorvastatin, amlodipine, ramipril and benazepril in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.*, 25, 439–449.
43. Ragno G, Garofalo A, Vetuschi C. (2002). Photodegradation monitoring of amlodipine by derivative spectrophotometry. *J Pham. and Biomed. Ana.*, 27, 19–24.
44. Rahman N, Azmi SNH. (2001). Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate with ninhydrin in drug formulations. *Il Farmaco*, 56, 731–735.
45. Rahman N, Hoda MdN. (2003). Validated spectrophotometric methods for the determination of amlodipine besylate in drug formulations using 2,3-dichloro 5,6-dicyano 1,4-benzoquinone and ascorbic acid. *J Pharm. and Biomed. Ana.*, 31, 381–392.
46. Rahman N, Singh M, Hoda N. (2004). Application of oxidants to the spectrophotometric determination of amlodipine besylate in pharmaceutical formulations. *Il Farmaco*, 59, 913–919.
47. Ramani AV, Sengupta P, Mullangi R. (2009). Development and validation of a highly sensitive and robust LC-ESI-MS/MS method for simultaneous quantitation of simvastatin acid, amlodipine and valsartan in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.*, 23, 615–622.

48. Ramesh D, Ramakrishna S. (2011). New spectrophotometric methods for simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatin calcium in tablet dosage forms. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2 (4), 215–219.
49. Rao L, Rajeswari KR, Sankar GG. (2010). Spectrophotometric method for simultaneous estimation of atorvastatin and amlodipine in tablet dosage form. *Research J. of Pharma., Bio. and Chem. Sci.*, 1 (2), 66.
50. Rao CHMMP, Rahaman SA, Prasad YR, Reddy PG. (2010). RP-HPLC method of simultaneous estimation of amlodipine besylate and metoprolol in combined dosage form. *Int. J. Pharm. Res. and Dev.*, 2 (9), 69–76.
51. Rasha AS, Tarek BS. (2010). Simultaneous spectrofluorimetric determination of amlodipine besylate and valsartan in their combined tablets. *Drug Test Ana.*, 2, 489–493.
52. Rathee P, Rathee S, Thakur S, Kumar V. (2010). Simultaneous estimation of Amlodipine Besylate and Lisinopril Dihydrate as A.P.I. and in tablet dosage forms by modified form of simultaneous equation method using derivative UV-spectrophotometry. *Int. J PharmTech Res.*, 2 (1), 556–562.
53. Sangoi W, Sangoi M, Oliveira MS, Secretti PR, Rolim LT. (2011). Determination of Aliskiren in tablet dosage forms by a validated stability-indicating RP-LC method. *J Chromatogr. Sci.*, 49 (2), 170–175.
54. Sangoi MW, Secretti LT, Rolim IFDCMB. (2010). Development and validation of an uv spectrophotometric method for the determination of aliskiren in tablets. *Quim. Nova*, 33(6), 1330–1334.
55. Sarkar AK, Ghosh D, Das A, Selvan PS, Gowda KV, Mandal U, Bose A, Agarwal S, Bhaumik U, Pal TK. (2008). Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method and its application in bioequivalence study. *J. Chromatogr.*, 873, 77–85.

56. Singh JBS, Subbaiah G, Shah B, Kambli S, Ameta S. (2007). A rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the estimation of amlodipine in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, 21, 169–175.
57. Sivakumar T, Manavalan R, Sekharan C, Kannappan M. (2007). Valliappan an improved HPLC method with the aid of a chemometric protocol: Simultaneous analysis of amlodipine and atorvastatin in pharmaceutical formulations. *J. Sep. Sci.*, 30, 3143–3153.
58. Streela B, Laine C, Zimmera C, Sibenalerb R, Ceccatoa A. (2002). Enantiomeric determination of amlodipine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 54, 357–368.
59. Swamy GK, Sheshagiri RJVLN, Kumar JMR, Kumar UA, Bikshapathi DVRN, Kumar DV. (2011). Analytical method development and validation of aliskiren in bulk and tablet dosage form by RP- HPLC method. *J. Pharm. Res.* , 4 (3), 865–867.
60. The Merck Index, aliskiren, 11th Ed, 247
61. The Merck Index, amlodipine, 14th Ed, 491.
62. Yasuda T, Tanaka M, Iba K. (1996) Quantitative determination of amlodipine in serum by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. mass spectro.*, 31, 879–884.
63. Yu Q, Hu ZY, Zhu FY, Zhu JH, Wan LL, Li Y, Guo C. (2011). HPLC–MS–MS for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in plasma of hypertensive patients. *Chromatogr.* 73, 257–262.
64. Zarghi A, Foroutan SM, Shafaati A, Khoddam A. (2005). Validated HPLC method for determination of amlodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Il Farmaco*, 60, 789–792.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ATALAY	Soyadı	AKYÜZ
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	ÜSKÜDAR
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	14579913166
E-mail	ATALAY_AKYUZ@HOTMAIL.COM	Tel	05438490799

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	MERSİN ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ	2009
Lise	İSTANBUL BURHAN FELEK LİSESİ FEN BÖLÜMÜ	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	KİMYAGER	PETER-LACKE KİMYA AŞ.	-2012-HALEN
2.	KLİNİK ARAŞTIRMA ASİSTANI	METABOLİK SENDROM DERNEĞİ	-2010-2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	87	-	-

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
WORD	ÇOK İYİ
EXCELL	ÇOK İYİ
POWER POINT	ÇOK İYİ