

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. Lale Ersoy

79947

**AMLODİPİN BESİLATIN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA VE BİYOLOJİK SIVILARDA
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
(HPLC) İLE ANALİZİ**

Doktora Tezi


**Uzm. Kimyager
Sevgi TATAR**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**Danışman
Prof. Dr. Sedef ATMACA**

İstanbul -1999

79947



Bu araştırmanın yapılmasına olanak sağlayan Prof.Dr. Sedat İMRE 'ye, Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Lale ERSOY'a, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Sedef ATMACA'ya teşekkür ve saygılarımı sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca tezimi destekleyen İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Ayrıca, tezin yazılması aşamasında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen End. Müh. Mehmet Ali Altıntaş'a, Ezc. Atilla Önal'a, Ar. Gör. Olcay Sağırli'ya ve Kimyager Nevin Olgun'a içtenliğimle teşekkür ederim.



**Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi,
Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: T-457/071197**

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. GENEL BÖLÜM.....	2
2.1. AMLODİPİN BESİLAT.....	2
2.1.1. Özellikleri.....	2
2.1.2. Farmakolojisi.....	4
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	6
2.1.3.1. Kalitatif Analiz Yöntemleri.....	6
2.1.3.2. Kantitatif Analiz Yöntemleri.....	7
2.2. 7-KLORO-4-NİTROBENZOFURAZAN (NBD-Cl) HAKKINDA GENEL BİLGİ VE BU BELİRTEÇLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	12
3. DENEYSEL BÖLÜM.....	17
3.1. KİMYASAL MADDELER, ÇÖZÜCÜLER ve ÇÖZELTİLER.....	17
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	17
3.1.2. Çözeltiler.....	18
3.2. ALETLER ve DİĞER GEREÇLER.....	19
3.3. ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....	20
3.3.1. Amlodipin NBD-Cl ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi.....	20

3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü.....	21
3.3.1.2. pH.....	21
3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi.....	22
3.3.1.4. Belirteç Miktarı.....	22
3.3.1.5. Türevin Dayanıklılığı.....	22
3.3.1.6. Asit Miktarı.....	23
3.3.2. Amlodipinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi.....	23
3.3.2.1. Mobil Faz ve Detektör Dalga Boyu Seçimi.....	23
3.3.2.2. İnternal Standart Seçimi.....	24
3.3.2.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisi Hazırlanması.....	24
3.3.2.4. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Ekstraksiyon İşlemi.....	25
3.3.2.5. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması.....	26
3.4. TABLETLERDE AMLODİPİN MİKTAR TAYİNİ.....	27
3.4.1. HPLC Yöntemi.....	27
3.4.2. Kıyas Yöntemi.....	28
3.5. PLAZMADA AMLODİPİN MİKTAR TAYİNİ.....	29
4. SONUÇLAR.....	30
4.1. ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....	30
4.1.1. Amlodipinin NBD-Cl ile Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi.....	30
4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü.....	30
4.1.1.2. pH.....	32
4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi.....	33
4.1.1.4. Belirteç Miktarı.....	34
4.1.1.5. Türevin Dayanıklılığı.....	36
4.1.1.6. Asit Miktarı.....	37
4.1.2. Amlodipinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi.....	37
4.1.2.1. Mobil Faz ve Detektör Dalga Boyu Seçimi.....	38

4.1.2.2. Internal Standart Seçimi.....	38
4.1.2.3. Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi.....	38
4.1.2.4. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Ekstraksiyon İşlemi.....	42
4.1.2.5. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi.....	46
4.1.2.6. Plazmadan Geri Kazanılabılme Oranı.....	50
4.1.2.7. Aynı Gün İçinde ve Farklı Günlerde Yapılan Plazma Analizlerinin Tekrarlanabilirliği.....	50
4.1.3. Geliştirilen Yöntem ile Tabletlerde Amlodipin Tayini ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması.....	52
4.1.4. Geliştirilen Yöntem ile Plazmada Amlodipin Tayini ve Farmakokinetik Parametreler.....	54
5. TARTIŞMA.....	57
6. ÖZET.....	64
7. SUMMARY.....	66
8. KAYNAKLAR.....	69
9. ÖZGEÇMİŞ.....	80

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Amlodipin dihidropiridin sınıfı bir kalsiyum kanal blokeridir. Hipertansiyon ve anjina pektoris tedavisinde son yıllarda yaygın olarak kullanılan bu ilaç, diğer dihidropiridin sınıfı kalsiyum antagonistlerine kıyasla daha uzun etkilidir ve biyoyararlanımı daha fazladır.

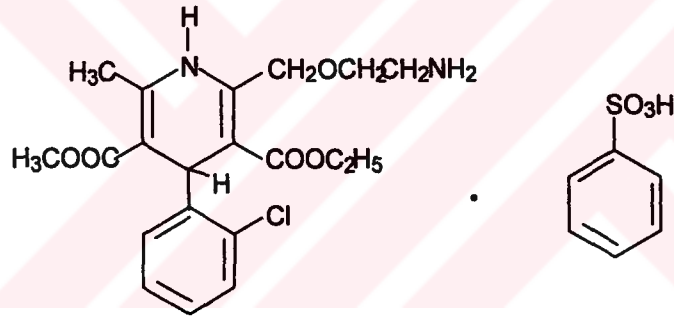
Plazma eliminasyon yarı ömrü (35-45 saat) uzun olan amlodipin vücutta geniş bir dağılım hacmine (21 L/kg) sahiptir. Ayrıca plazma proteinlerine bağlanma oranı da yüksek (>% 95) olduğu için amlodipinin plazma konsantrasyonları 1 ng/mL nin altına düşebilmektedir.

Henüz farmakopelerde kayıtlı olmayan bu maddenin tabletlerde ve insan plazmasında tayini için literatürde az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bildirilen birkaç gaz kromatografik ve sıvı kromatografik çalışmanın tayin sınırı plazmada amlodipin miktar tayini için yeterli olmakla birlikte bu yöntemler, işlemlerin uzun sürmesi veya amlodipinin plazmadan geri kazanılabilme oranının az olması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle yeni bir ilaç etken maddesi olan amlodipinin gerek tabletlerde gerek plazmada tayini için hem çok duyarlı hem de kolay uygulanabilir ve güvenilebilir analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Dolayısıyla bu çalışmada amlodipinin yapısında alifatik primer amin grubu bulunmasından yararlanılarak, amin grubu içeren maddeler için spesifik bir belirteç olan 7-kloro-4-nitrobenzodioksazol (NBD-Cl) ile fluoresans gösteren bir türev oluşumuna dayanan yüksek performanslı sıvı kromatografik bir yöntem geliştirilmesi düşünüldü.

2. GENEL BÖLÜM

2.1. AMLODİPİN BESİLAT

2.1.1. Özellikleri



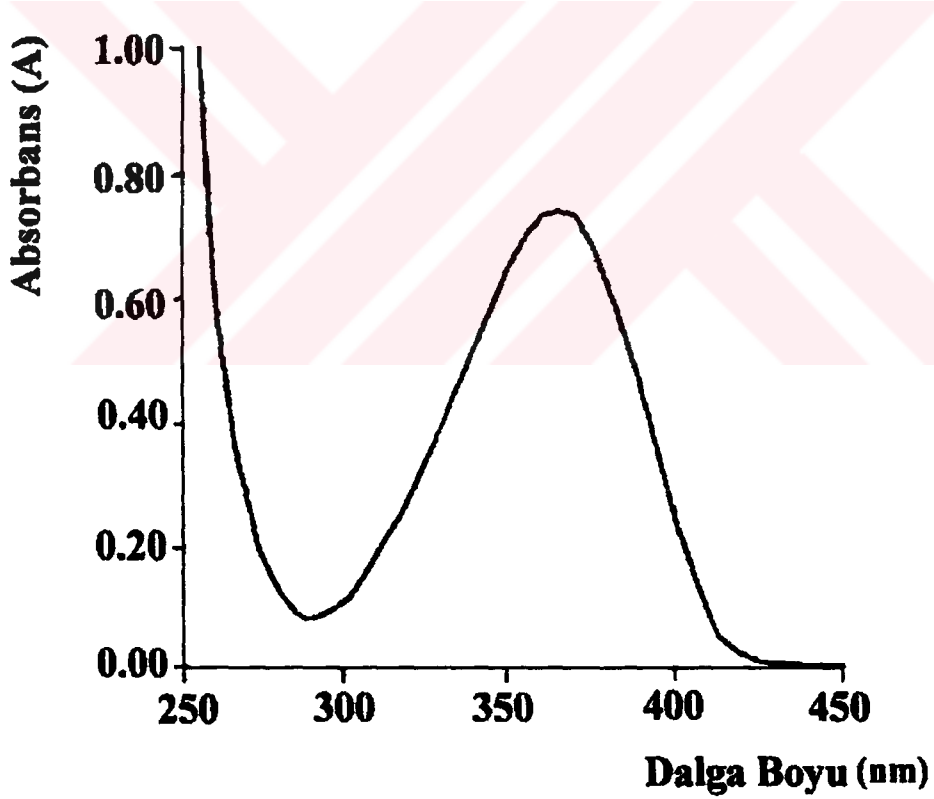
Kimyasal adı (R,S) -2- [(2-aminoetoksi)-metil]-4-(2-klorofenil) -3-etoksikarbonil-5-metoksikarbonil-6-metil-1,4 - dihidropiridin benzen sülfonattır. Kapalı formülü C₂₆H₃₁ClN₂O₈S olan amlodipin besilatın molekül ağırlığı 567.1 dir. Baz haldeki amlodipinin kapalı formülü C₂₀H₂₅ClN₂O₅ , molekül ağırlığı 408.88 dir. Maleat tuzu halinde de bulunmaktadır. Patenti Pfizer ilaçları A.Ş. ye aittir. Elementel analizine ait değerler C % 58.75 , H % 6.16 , Cl % 8.67 , N % 6.85 , O % 19.56 olarak bildirilmiştir (1) .

Sentezi Alker ve arkadaşları (2) tarafından yapılmıştır. Beyaz renkte, kokusuz, kristalize tozudur. 203 °C de dekompoze olarak erir (3). Etanol, metanol ve kloroform gibi organik çözücülerde çok iyi, sulu asidik çözeltilerde (0.1 N

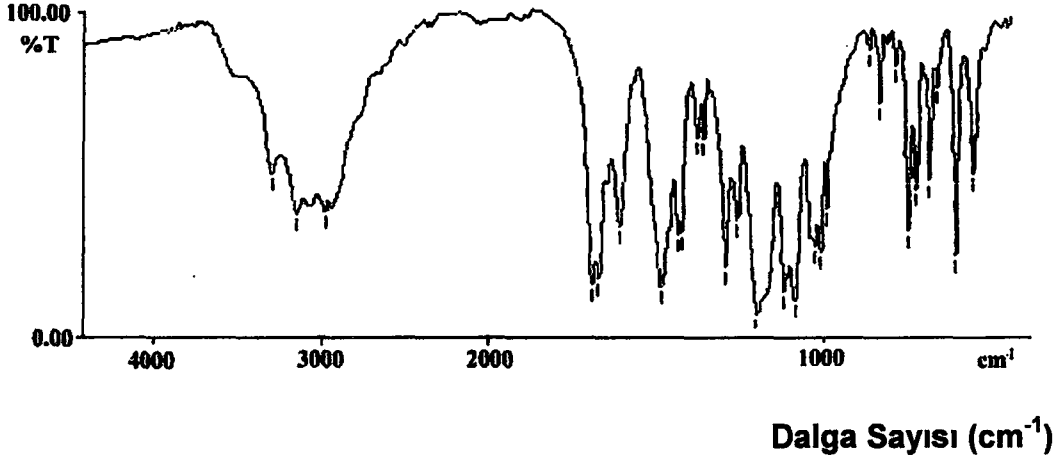
HCl) iyi çözünür, sulu bazik çözeltilerde (0.1 N NaOH) zor çözünür, etilasetat, eter ve suda çözünmez (4), pK_a değeri 8.6 dır (5).

Amlodipin besilatın etanolde alınan UV spektrumuna ait $\log \epsilon$ değerleri 239 nm de 4,376, 365 nm de 3,951 dir. 0.1 N HCl deki çözeltilisi ise UV spektrumunda 212 nm de $\log \epsilon = 4,428$, 238 nm de $\log \epsilon = 4,308$ ve 363 nm de $\log \epsilon = 3,869$ olan üç tane maksimum göstermektedir (4).

Amlodipin besilatın 0.1 N HCl deki çözeltilisinin UV spektrumu Şekil 1 de, KBr diskinde alınan FT-IR spektrumu Şekil 2 de görülmektedir.



Şekil 1 : Amlodipin besilatın 0.1 N HCl de hazırlanan 70 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki çözeltilisinin UV spektrumu



Şekil 2 : Amlodipin besilatın KBr diskinde alınan FT-IR spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

Hipertansiyon ve anjina pectoris tedavisinde kullanılan amlodipin, dihidropiridin sınıfı bir kalsiyum kanal blokeridir. Kardiyak kaslar ve düz kaslara gelen kalsiyum iyonunun membranı geçerek akışını inhibe eder. Amlodipinin antihipertansif etki mekanizması, vasküler düz kaslar üzerindeki direkt gevşetici etkiye bağlıdır (5).

Molekülünde iyonize olabilen aminoetoksimetil grubu içermesi nedeniyle kalsiyum kanalları içindeki dihidropiridin reseptörü ile etkileşmesi nifedipin, nitrendipin, nisoldipin gibi nötral dihidropiridin türevlerinkinden farklıdır. Nötral dihidropiridin türevleri sadece voltaja bağlı blok yaptıkları halde amlodipin hem voltaja, hem de frekansa bağlı blok yapar (6).

Günlük kullanım dozu 2.5 - 10 mg arasındadır. Terapötik dozların oral uygulamasından sonra amlodipin yavaş absorbe edilir (5) ve maksimum plazma konsantrasyonlarına (C_{maks}) 6 - 12 saat (t_{maks}) sonra ulaşır (5,7).

Biyoyararlanımı (% 64) diğer dihidropiridin türevlerine kıyasla yüksektir (5) ve yiyeceklerden etkilenmez (8). Vücutta geniş bir dağılım hacmine (21 L/kg)

sahiptir ve yüksek oranda (> % 95) plazma proteinlerine bağlanır. Plazma eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) 35 - 45 saattir (5,9). Hem eliminasyon yarı ömrünün uzun oluşu hem de kalsiyum kanallarındaki reseptörlere bağlanma ve onlardan ayrılmanın yavaş oluşu nedeniyle terapötik etkinliği yavaş gelişen uzun etki süreli bir dihidropiridin türevidir. Yinelerek verildiğinde etkin plazma konsantrasyonuna erişmesi bir haftalık uygulamadan sonra olur (6).

Amlodipin karaciğerde ileri derecede ve yavaş şekilde metabolize olarak inaktif metabolitlerine dönüşür. Ana ilacın % 10 u, metabolitlerinin % 60 ı idrarla atılır (5,7). Amlodipin metabolizmasının karmaşık olduğu, biyotransformasyonunda başlıca yolun yan zincirde bulunan 2-aminoetoksimetil grubunun oksidatif deaminasyonu veya 5-metoksikarbonil grubunun deesterifikasyonu ile piridin analoguna oksidasyonu içerdiği bildirilmiştir (9). Beresford ve arkadaşları (10) amlodipinin 18 metabolitini sıçan, köpek ve insan idrarından izole ederek gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) yöntemleriyle tanımlamışlardır.

Kiral yapıda bir kalsiyum antagonisti olan amlodipinin S-(-)- enantiomeri farmakolojik olarak aktiftir (11,12). Amlodipin farmasötik preparatlar içinde rasem şeklinde bulunmaktadır. Sağlıklı gönüllüler tarafından oral olarak ayrı ayrı tek doz S-(-) - , R -(+) - ve rasemik amlodipin alımından sonra yapılan bir araştırmada her üç formun farmakokinetik davranışlarının benzer olduğu ve enantiomerlerin in vivo olarak rasemize olmadığı belirtilmiştir (13).

Amlodipin diğer dihidropiridin türevlerinininkine benzer şekilde baş ağrısı, yüzde kızarma, baş dönmesi, ayak bileği ödemi ve yorgunluk gibi yan etkilere sahiptir (5,6).

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. Kalitatif Analiz Yöntemleri

Kiral yapıda bir ilaç maddesi olan amlodipinin enantiomerlerinin ayrılması ve tanınması için geliştirilen yöntemlerin başında HPLC gelmektedir.

Josefsson ve arkadaşları (14) amlodipini kiral bir belirteç olan (-)-(1R)-mentil kloroformat ile türevlendirerek, Hypercarb-S poröz grafitik kolonda asetonitril-diklormetan-formik asit (20 : 50 : 30) ve fotodiyod array detektör ile 265 nm de ayırmışlardır. Yine Hypercarb-S kolon ve 250 nm de UV detektör kullanılarak yapılan bir çalışmada (15) amlodipin enantiomerlerini ayırmak için metanol-diklormetan (75 : 25) mobil faz sistemine bir kiral karşıt iyon olan (1S) - (+) -10 - kamforsülfonik asit katılarak iyon çifti oluşturulmuştur.

Tesarova ve arkadaşları (16) tarafından bildirilen bir çalışmada aralarında amlodipinin de bulunduğu 5 tane kiral kalsiyum antagonistinin enantiomerlerinin β - siklodekstrin kiral kolon yardımıyla ayrılması anlatılmıştır.

Owens ve arkadaşları (17) da amlodipinin enantiomerlerini, asetonitril-potasyum dihidrojenfosfat (pH 3.93) (26.5 : 73.5) mobil faz sistemine bir kiral katkı maddesi olan sülfobutileter- β - siklodekstrin (SBE - β - CD) ilave ederek, Hypersil BDS C₈ kolonda 238 nm de UV detektör kullanarak ayırmışlardır. Aynı araştırmacılar (18) R-(+) - ve S-(-) - amlodipini ayırmak amacıyla HPLC yanında kapiller elektroforez (CE) yönteminden de yararlanmışlardır. HPLC de mobil faza, kapiller elektroforez yönteminde de elektrolit sistemine katılan yüklü ve yüksüz kiral katkı maddelerinin enantiomerlerin ayrılması üzerine etkilerini incelemişler, SBE- β -CD ile en iyi sonucun alındığını belirtmişlerdir.

Kapiller elektroforez yöntemi ayrıca amlodipinin de aralarında bulunduğu 6 tane kardiovasküler ilacın ayrılmasında kullanılmıştır. Bu amaçla miseller elektrokinetik kromatografi ile çalışılarak optimum ayırma koşulları

araştırılmıştır. pH 8.1 borat tamponu, yüzey aktif maddesi olarak sodyumdodesilsülfat ve % 15 (h/h) aseton içeren elektrolit sistemiyle fused silika kapillerde fotodiod array detektör (200 nm de) kullanılarak ilaç maddelerinin başarıyla ayırdığı (19) bildirilmiştir.

İnsan saçında bulunabilecek birçok ilacın (antidepresanlar, analjezikler, β - blokerler, antikonvülsanlar, kalsiyum kanal blokerleri vb) teşhisi için HPLC-fotodiod array detektör ve GC-MS sistemleriyle bir kütüphane oluşturulmuş ve amlodipin katı-faz ekstraksiyonundan sonra C_8 kolonda, asetonitril-fosfat tamponu (pH 3.8) ile analiz edilmiştir (20).

2.1.3.2. Kantitatif Analiz Yöntemleri

Farmasötik Preparatlarda Amlodipin Tayini

Amlodipin yeni bir ilaç maddesi olduğundan henüz farmakopelerde kayıtlı değildir.

Literatürde rastlanan spektrofotometrik çalışmalardan birinde tabletler içinde bulunan amlodipin metanol ile çözüldürüldükten sonra 0.03 M KH_2PO_4 ile seyreltilmiş ve elde edilen çözeltinin absorbansı 366 nm de ölçülerek 12.0 - 97.4 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında çalışılmıştır (21). Bir başka spektrofotometrik çalışma ise, amlodipin besilatın N,N - dimetilformamitte çözüldürüldükten sonra sodyum hidroksitli ortamda oluşan sarı renkli ürünün absorbansının 456 nm de ölçülmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada Lambert - Beer kanununun geçerli olduğu konsantrasyon aralığı 20-100 $\mu\text{g/mL}$ olarak bildirilmiş, yöntem tabletlerin analizine uygulanmıştır (22). Amlodipin miktar tayini için iyon çifti oluşumuna dayanan spektrofotometrik yöntemler de geliştirilmiştir. Reddy ve arkadaşları (23) tarafından hammadde ve farmasötik preparatların analizleri için bildirilen bir çalışmada eriokrom siyahı T ve indigo karmin endikatörleriyle sırasıyla pH 3 ve 2.8 de oluşturulan iyon çiftleri kloroforma ekstre edilerek absorbansları ölçülmüştür. Sungur ve Gülten (24) ise

amlodipinin 1,2-naftokinon-4-sülfonik asit sodyum tuzu (NQS) ile oluşturduğu kırmızı renkli türevi n-butanda ekstre ettikten sonra absorbanasını 494 nm de ölçmüşlerdir.

Amlodipinin metanoldeki çözeltisinin doğal fluoresans göstermesine dayanan fluorimetrik bir çalışma Mohamed ve arkadaşları (25) tarafından bildirilmiştir. Tabletlerin analizine de uygulanan bu yöntemde maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 318 nm ve 550 nm olarak belirtilmiş, doğrusallık 7.0-24.5 µg/mL konsantrasyon aralığında sağlanmıştır.

Tabletlerde amlodipin tayini için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) nden de yararlanılmıştır. Chandrashekar ve arkadaşları (26) tarafından bildirilen bir çalışmada, tabletlerdeki amlodipin metanol ile alınarak silikajel 60 F₂₅₄ kaplı HPTLC plağa tatbik edilmiş ve kloroform-asetik asit-toluen-metanol (8:1:1:1) mobil faz sisteminde geliştirildikten sonra, oluşan lekelerin fluoresans şiddeti 366 nm de fluorodansitometrik olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada miktar tayini 0.2-1.2 µg/mL konsantrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir. Farmasötik preparatların analizi için önerilen başka bir çalışmada silikajel F₂₅₄ kaplı plak ve toluen-aseton-etanol-amonyak (56:34.5:6:3.5) mobil faz sistemi kullanılarak yapılan kromatografi işlemi sonucu bilgisayar kontrollü HPTLC tarayıcısı ile dansitometrik bir tayin yapılmıştır (27).

Amlodipin içeren tabletlerin analizi için literatürde HPLC yöntemleri de kayıtlıdır. Bu yöntemlerde genellikle ters fazlı kolonlar kullanılmıştır. Patki ve arkadaşları (28), C₁₈ kolon ve 20 mM potasyum dihidrojenortofosfat (pH 4.6)-asetonitril (1:1) mobil faz sistemiyle, 238 nm de UV detektör kullanılarak önerdikleri yöntem için çalışma aralığını 2-10 mg/mL olarak belirtmişlerdir. Avadhanulu ve arkadaşları (29) tarafından bildirilen buna benzer bir tayinde 0.5-16 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır.

Amlodipin ve atenololü birlikte içeren tabletlerin analizi için geliştirilen HPLC yönteminde ayrılma trietilamin (% 0.1)-metanol (32:68) (pH 3.8) mobil faz sistemi ile C₁₈ kolonda gerçekleştirilmiş, internal standart (felodipin besilat) kullanılarak yapılan tayinlerde maddeler 238 nm de saptanmıştır (30). Halkar ve arkadaşları (31) amlodipin ve enalapril maleatın birarada bulunduğu tabletlerin tayini için, 0.025 M KH₂PO₄-asetonitril (60:40) mobil faz sistemi ve C₁₈ kolon kullanarak 238 nm de çalışmışlardır.

Biyolojik Materyelde Amlodipin Tayini

Amlodipinin insan, fare, köpek, tavşan plazması ve diş eti oluğu sıvısı gibi biyolojik örneklerde tayininde kromatografik yöntemlerden yararlanılmıştır.

İnsan serumunda ve plazmasında % 7 si serbest % 93 ü protein ve dokulara bağlı bulunan amlodipinin total miktarı HPTLC ile dansitometrik olarak tayin edilmiştir. Pandya ve arkadaşları (32) tarafından bildirilen bu yöntemde proteinlerin proteolizi için plazma, pepsin çözeltisiyle 2 saat bekletildikten sonra, pH 10 da proteinler çöktürülmüş ve diklorometana ekstre edilen serbest amlodipin silikajel 60 F₂₅₄ plaklarda önce kloroform sonra kloroform-metanol-asetik asit (15:2.5:0.4) sistemiyle kromatografiye edildikten sonra lekelerin floresans şiddeti ölçülmüştür.

Biyolojik örneklerde amlodipin tayini için bildirilen gaz kromatografik yöntemlerde kapiller kolon ve elektron yakalama detektörü (ECD) kullanılmıştır. Beresford ve arkadaşları (33) tarafından bildirilen ilk çalışmada insan plazması, borat tamponu (pH 9) ile bazik duruma getirildikten sonra amlodipin, metil tersiyer butil eter ile ekstre edilmiş ve trimetilasetil klorür ile türevlendirilmiştir. Bu yöntemde 1 mL plazma örneği ile 0.2-2 ng/mL ve 2-20 ng/mL konsantrasyon aralıklarında, pik alanları oranı (amlodipin/internal standart) hesaplanarak çalışılmış, plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi de hazırlanmıştır. Scharpf ve arkadaşları (34) da insan, sıçan, köpek plazması ile çeşitli sıçan dokularında (akciğer, kalp, beyin ve kas) amlodipin tayini için önceki çalışmaya benzer

şekilde baziklendirme ve ekstraksiyon işlemlerini takiben kiral bir belirteç olan (+)-(S)- α -metoksi- α -trifluorometilfenilasetil klorür ile türevlendirmeye dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir. R-(+)- ve S-(-)-amlodipinin ayrılmasını sağlayan bu yöntem oral olarak ilaç alımından sonra enantiomerlerin plazmada takibine de olanak vermektedir. Tayin sınırı plazma için 0.02 ng/mL, doku örnekleri için 0.5 ng/g olarak belirtilmiştir. Başka bir gaz kromatografik çalışma plazmada ve amlodipinin yan etkilerinden biri olan diş eti büyümelerinde salgılanması artan diş eti oluşu sıvısında amlodipin tayini için bildirilmiştir. Bu çalışmada örnekler, NaOH ile baziklendirilip toluen ile ekstre edildikten sonra trifluoroasetik anhidrit ile türevlendirilmiştir (35).

Biyolojik sıvılarda amlodipin tayini için sıvı kromatografik analizler de bildirilmiştir. Yeung ve arkadaşları (36) bazik ortamda, tavşan plazmasından tersiyer butil metil etere ekstre edilen amlodipinin analizini C₁₈ kolon ve pH sıvı glasiyal asetik asit ile 7.1 e getirilmiş ve % 0.02 trietilamin içeren metanol-amonyum asetat (0.04 M)-asetonitril (30:30:40) mobil faz sistemi ile 240 nm de yapmışlardır. Bu çalışmada 2.5-100 ng/mL konsantrasyon aralığında çalışılmış, internal standart olarak desipramin kullanılmıştır.

Luksa ve arkadaşları (37) tarafından bildirilen bir çalışmada insan plazmasında amlodipin enantiomerlerinin ayrılması ve tayini kiral (AGP kolon) ve akiral (C₈ kolon) kolonları birlikte içeren (column swiching) yarı preparatif HPLC sisteminde 240 nm de fotodiod array detektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kiral kolonda 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 4.5)-%1 (h/h) n-propanol mobil faz sistemiyle ayrılan enantiomerler, iki ayrı analitik kolonda (C₈) 10 mM asetat tamponu (pH 4.5)-asetonitril (55:45) mobil faz sistemiyle analiz edilmişlerdir. Bu çalışmada, enantiomerlere ait fraksiyonların optik çevirmesi bir polarimetre de tayin edilmiştir, ayrıca silika kolon ve 20 mM tris-HCl (pH 3.2), 18 mM α -siklodekstrin ve % 0.05 (a/h) metilseluloz elektrolit sisteminde CE ile de çalışılarak HPLC ile elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Yine Luksa ve arkadaşları (13) yukarıda anlatılan HPLC yönteminden yararlanarak sağlıklı gönüllüler tarafından tek doz oral R-(+)-, S-(-)- ve rasem

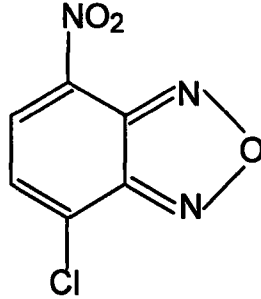
amlodipin alımından sonra plazmadaki ilaç seviyesini tayin ederek farmakokinetik çalışmalar yapmışlardır.

İnsan, köpek, sıçan ve farelerde amlodipin metabolizması ve farmakokinetiğinin incelendiği bir çalışmada Spherisorb-nitril ve ODS kolonlar, metanol-100 mM N, N, N', N' - tetrametiletildiamin fosfat tamponu (pH 5) mobil faz sistemi ve $\lambda_{\text{eks}}=230$ ve $\lambda_{\text{em}}=370$ nm dalga boylarında floresans detektör kullanılmıştır (9).

Sıvı kromatografik analizlerde elektrokimyasal detektörlerle de çalışılmıştır. Shimooka ve arkadaşları (38) serumda amlodipin tayini için C₁₈ kolon ve 0.05 M fosfat tamponu (pH 3.1) - asetonitril (13:7) (Bu sistem 5 mM sodyumoktansülfonat ve 5 mg/mL EDTA içermektedir) mobil faz sistemi ile çalışmışlardır. Amperometrik deteksiyon camısı karbon çalışma elektrodu ve Ag-AgCl referans elektrodu ile yapılmıştır. Bu çalışmada doğrusallık 0.2-2 ng/mL konsantrasyon aralığındadır. Biyolojik örneklerin analizinde örnek hazırlanması işlemlerinde çoğunlukla uygulanan sıvı-sıvı ekstraksiyonu yerine Josefsson ve arkadaşları (39) tarafından Bond Elut C₂ ekstraksiyon kolonlarıyla katı-faz ekstraksiyonu önerilmiştir. Bu çalışmada da elektrokimyasal detektör kullanılmış, analiz Zorbax SB-fenil kolon ve 2 mM sodyum dodesilsülfat ve 1 mg/L EDTA içeren metanol-0.1 M asetat tamponu (pH 4) (65:35) mobil faz sisteminde gerçekleştirilmiştir. Çalışma aralığı 0.5-20 ng/mL plazma olarak belirtilmiştir. Josefsson ve Norlander (40) tarafından bildirilen bir çalışmada yine elektrokimyasal detektör kullanılarak kiral ve akiral kolonlar yardımıyla amlodipin enantiomerlerin tayini yapılmıştır.

İnsan ve sıçan serumunda amlodipin tayini için, dietileter ile ekstraksiyondan sonra birbirleriyle bağlantılı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi sistemiyle çalışılmış, internal standart olarak dötorolanmış amlodipin kullanılmıştır (41).

2.2. 7-KLORO-4-NİTROBENZOFURAZAN (NBD-Cl) HAKKINDA GENEL BİLGİ VE BU BELİRTEÇLE YAPILAN ÇALIŞMALAR



7-kloro-4-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) alifatik primer aminlerle sarı, alifatik sekonder aminlerle turuncu-pembe renkte fluoresans gösteren türevler oluşturan ve kendisi fluoresans göstermeyen bir maddedir.

Sentezi 1966 yılında Boulton ve arkadaşları (42) tarafından yapılmıştır. Dikloronitrosobenzen aracılığıyla 2,6-dikloroanilinden elde edilen 4-klorobenzofurazanın nitrolanmasıyla elde edilmiştir.

Metanol ve etanolde kolay çözünen NBD-Cl, soluk sarı renkli bir maddedir ve 97 °C de erir.

NBD-Cl ün primer ve sekonder amin grubu içeren maddelerle ve amino asitlerle kuvvetli fluoresans gösteren türevler oluşturduğu, -OR, -SR, -SH gibi ortaklanmamış elektron çifti içeren gruplarla da amin türevlerine kıyasla oldukça düşük fluoresans gösteren bileşikler verdiği ilk kez Ghosh ve Whitehouse (43) tarafından bildirilmiştir. Aynı çalışmada çeşitli amin-NBD türevlerinin fluoresans özellikleri incelenmiş, en şiddetli fluoresansın az polar çözücülerde gözlemlendiği belirtilmiştir.

NBD-Cl, bir çok primer ve sekonder aminin ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılmıştır. Sülfonamitlerin (44),

amino asitler ve peptidlerin (45) tanınmalarında püskürtme belirteci olarak yararlanılmıştır. Bazı çalışmalarda ise amin-NBD türevleri oluşturulduktan sonra ince tabakaya uygulanmıştır. Örneğin tek boyutlu İTK ile amino asitlerin ve peptidlerin (46), çok kullanılan bazı ilaç maddelerinin (47) ve hidroksifenilalkil aminlerin (48); iki boyutlu İTK ile feniletilamin bileşiklerinin (49) ve biyolojik aminlerin (50) teşhisi bu şekilde yapılmıştır.

Literatürde NBD-Cl ile oluşan türevlerin absorbanlarının ölçülmesine dayanan spektrofotometrik analizler de bulunmaktadır. Örneğin bazı primer ve sekonder aminlerin (51), farmasötik preparatlarda fenilpropanolamin hidroklorür (52) ve praziquantelin (53) tayinleri bu şekilde yapılmıştır. Abdelmageed ve arkadaşları (54) çeşitli farmasötik preparatlarda ve besinlerde bulunan askorbik asidin tayininde; alkali hidroliz ile elde edilen askorbat anyonunu NBD-Cl ile türevlendirerek oluşan mavimsi yeşil renkli ürünün absorbanını 582 nm de ölçmüşlerdir. Başka bir çalışmada (55) tiyol grubu içeren 8 ilaç maddesinin tabletlerde analizi yine spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Ayrıca, yine spektrofotometrik olarak bazı primer ve sekonder aminlerin (56,57) farmasötik preparatlarda nortriptilinin (58) ve tiyol grubu içeren glutation transferaz enziminin (59) NBD-Cl ile reaksiyonuna dayanan hem kolorimetrik hem de fluorimetrik miktar tayini yöntemleri literatürde kayıtlıdır.

Bir çok ilaç maddesinin farmasötik preparatlarda ve biyolojik örneklerde tayini için NBD-Cl belirteci kullanılarak spektrofluorimetrik analizler yapılmıştır. N,3,3-trimetil-1-fenil-1-indonpropilaminhidroklorür (60), norpsödoefedrin, p-hidroksinorefedrin ve fenilefrin (61), baklofen (62), L-lisin hidroklorür (63), tranilsipromin sülfat (64), sodyum levotroksin (65), nortriptilin hidroklorür (66), traneksamik asit (67), aspartam (68), fluoksetinin (69) alkali pH larda genellikle sıcakta elde edilen NBD türevleri etilasetat, kloroform, dioksan gibi organik çözücüye alınarak fluoresans şiddetleri ölçülmüş ve farmasötik analizler yapılmıştır. Valentour ve arkadaşları (70) idrar, kan ve doku örneklerinde bulunan propeksifenin miktar tayini için benzer şekilde çalışmışlardır. Tersiyer bir amin içeren propeksifenin NBD-Cl ile beklenmeyen bu reaksiyonu,

araştırcılara göre reaksiyon koşullarında propeksifenin N-demetilize olması sonucu oluşan sekonder aminin (norpsdoefedrin), NBD-Cl ile reaksiyonuna girmesi nedeniyle yürümektedir. Becker (71) tarafından bildirilen fluorimetrik bir çalışmada plazma ve serumda bulunan glibornurid NBD-Cl ile trevlendirilmeden önce amin grubu içeren bir bileşiğe dnştrlmştir. Kan ve idrar örneklerinde amfetamin (72) ile gıda maddelerinde bulunan biyolojik aminlerin (73) analizi, İTK da ayrılmayı takiben NBD-Cl ile türevlendirme ve fluoresans gösteren lekelerin ele edilerek fluoresans şiddetlerinin ölçülmesini esas almaktadır.

NBD-Cl, fluorodansitometrik çalışmalarda da belirteç olarak kullanılmıştır. N-metil- ve N,N-dimetilkarbammat (74) ile ditiyo- ve tiyolkarbammat insektisitler (75) hidroliz edildikten sonra elde edilen alkilaminler NBD-Cl ile trevlendirilerek bu yöntemle tayin edilmiştir. Nitrozaminler (76) de denitrozasyondan sonra türevlendirilmiştir. Ayrıca bazı alkilaminlerin (56), fermantasyon sıvısında gentamisin komponentlerinin (77), gıdalarda ve suda uçucu aminler ve N-nitrosaminlerin (78) fluorodansitometrik olarak tayin edildiği bildirilmiştir. Sungur ve arkadaşları (79) tarafından tabletlerde metoprolol tartarat tayini için bildirilen bir çalışma, bu ilacın NBD-Cl ile 0.1 M NaHCO₃-metilisobutylketon iki fazlı sisteminde 80°C de 30 dakika da reaksiyonuna ve oluşan türevin İTK ya uygulandıktan sonra fluoresans şiddetinin 540 nm de llmesine dayanmaktadır. Neomisin B ve C komponentlerinin preparatlarda analizi ise İTK da ayırmadan sonra lekelerin NBD-Cl zeltisi püskürtülerek deteksiyonuna dayanmaktadır (80). Biyolojik örneklerde amfetamin (81), metilhistidin izomerleri (82), hidroksi prolinler (83,84), sarkosin (85) ve baklofen (86) tayini için bildirilmiş fluorodansitometrik yöntemler de literatürde kayıtlıdır.

NBD-Cl ile yapılmış çalışmalar arasında sıvı kromatografik analizler önemli bir yer tutmaktadır. Wolfram ve arkadaşları (87) n-nitrozoprolinin nitrozo grubunu indirgedikten sonra NBD türevini hem İTK ya uygulayıp lekeyi ele ederek fluorimetrik olarak, hem de HPLC ile analiz etmişlerdir. Total amino asit analizlerinde, primer amino asitler o-ftalaldehit ile trevlendirilerek

maskelendikten sonra sekonder amino asitler de NBD-Cl ile türevlendirilmiş ve aynı kolonda sıvı kromatografik olarak analiz edilmişlerdir (88-90). Çeşitli doku örneklerindeki kollajen tayini, asit hidroliz sonucu elde edilen ve sekonder amin grubu içeren prolin ve hidroksprolinin NBD-Cl ile türevlendirilmesine dayanmaktadır (91-98). Bu tayinlerde genellikle, türevlendirme kolon öncesi yapılmış ters fazlı sistemlerde ve floresans detektör kullanılarak çalışılmıştır. İki çalışmada (96,97) kolon sonrası türevlendirme yapılmıştır. Welch ve arkadaşları (98) tarafından hidroksprolin tayini için bildirilen bir çalışmada elektrokimyasal (kulometrik) detektör kullanılmıştır.

NBD-Cl belirteci kullanılarak HPLC ile biyolojik sıvılarda ilaç analizleri de yapılmıştır. Serumda glibenklamid tayini için silika kolonda ve $\lambda_{em} = 522$ nm de çalışılmış, doğrusallık 5-300 ng/mL konsantrasyon aralığında sağlanmıştır (99). Schweitzer ve arkadaşları (100) bazik ortamda insan plazmasından organik çözücüye ekstre ettikleri fluvoksamin ve kloksamini NBD-Cl ile türevlendirilip hem HPTLC ye uyguladıktan sonra fluorodansitometrik, hem de silika kolon ve kloroform-isopropil alkol (250:2) mobil faz sistemi ile $\lambda_{em} = 513$ nm de sıvı kromatografik olarak tayin etmişlerdir. Tosunoğlu ve Ersoy (101) tarafından bildirilen bir çalışmada plazma ve idrarda baklofen tayini için kolon öncesi türevlendirme işlemiyle elde edilen ürün kromatografik analizden önce katı faz ekstraksiyonu ile temizlenmiş, C_{18} kolon ve metanol-su (45:55) mobil faz sistemi ile floresans detektör ($\lambda_{eks} = 463$ nm, $\lambda_{em} = 524$ nm) kullanılarak analiz edilmiştir. Netilmisin sülfatın farmasötik preparatlarda ve plazmada tayini için bildirilen bir HPLC yönteminde, reaksiyon karışımından bazik ortamda diklormetana ekstre edilen NBD-netilmisin türevi silikajel sütunda kloroform-metanol-amonyak (60:30:0.5) mobil faz sistemiyle $\lambda_{eks} = 470$ nm ve $\lambda_{em} = 520$ nm de analiz edilmiştir (102). Estradiol, estron, estriol gibi östrojenlerin idrarda HPLC ile tayini için literatürde kayıtlı bir çalışmada, hidroliz ve 18-crown-6-eter ve K_2CO_3 lı ortamda türevlendirme işlemleri sonucu elde edilen NBD-östrojen-eter türevi ters fazlı sistemde kromatografi edilmiş ve 380 nm dalga boyunda UV detektör kullanılmıştır (103).

Ayrıca, kozmetik ürünlerde tiyoglikolik asidin (104) birada bulunan aminlerin (105), havadaki düşük molekül ağırlıklı alifatik aminler (106) ile alkiltiyollerin (107) ve aminofosfolipitlerin (108) analizinde HPLC yönteminden yararlanılmıştır.

Whiteside ve Worsfold (109) flow injection analiz (FIA) yöntemi ile sulu olmayan çözeltilerde primer aminleri OPA, sekonder aminleri NBD-CI ile türevlendirerek tayin etmişlerdir. Bu tayin benzer şekilde aynı araştırmacılar tarafından flow injection manifoldu içeren HPLC sistemi ile de yapılmıştır (110).

Miseller elektrokinetik kapiller kromatografisi yöntemiyle proteinlerin (111) ve birada bulunan aminlerin (112) analizinde NBD-CI belirtecinden yararlanılmış ve bu çalışmalarda argon-laser kaynaklı fluoresans detektör kullanılmıştır.

Ayrıca bu belirteç ile biyolojik sıvılarda amino asitlerin tayini için katodik sıyrma voltammetrisi yöntemi de literatürde bildirilmiştir (113).

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. KİMYASAL MADDELER, ÇÖZÜCÜLER VE ÇÖZELTİLER

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Amlodipin besilat¹, Norvasc[®] tablet², 7-kloro-4-nitrobenzofurazan (NBD-Cl)³, nortriptilin hidroklorür⁴, borik asit³, disodyum hidrojen fosfat³, potasyum dihidrojen fosfat³, potasyum klorür³, sodyum bikarbonat³, susuz sodyum sülfat³, sodyum hidroksit³, sodyum klorür³, silika jel³.

Etanol, HPLC saflığında metanol ve asetonitri³, etilasetat³, n-heptan³, isopropil alkol³, diklormetan³, metilisobutilketon³, hidroklorik asit (% 37ağ/ağ)³ ve KMnO₄ üzerinden distillenmiş deiyonize su kullanıldı.

^{1,2} Pfizer İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul .

Amlodipin besilat ve Norvasc[®] tabletlerinin sağlanmasında yardımları için firmaya teşekkür ederim.

³ Merck , E.Merck A.G.Darmstadt, Almanya.

⁴ Mustafa Nevzat İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul.

3.1.2. Çözeltiler

1. Amlodipin Besilat Çözeltileri

Stok çözelti: 10 mg amlodipin baza eşdeğer miktarda besilat tuzu tam olarak tartıldı, 2 mL etanolde çözüldürüldü ve hacmi distillenmiş deiyonize su ile 100 mL ye tamamlandı.

Spektrofluorimetre ve HPLC ile yapılan deney koşullarının belirlenmesi ve ölçü eğrilerinin hazırlanması çalışmalarında stok çözeltinin su ile seyreltilmesiyle hazırlanan 1 µg/mL ve 0.025 µg/mL konsantrasyonda amlodipin baz içeren çözeltiler kullanıldı.

2. NBD-Cl Çözeltisi

Deney koşullarının saptanması ve ölçü eğrilerinin hazırlanması çalışmalarında NBD-Cl ün 1.2, 3.3, 4.4, 97.8 µg/mL ve 6 mg/mL konsantrasyonlardaki metanolde taze hazırlanmış çözeltileri kullanıldı.

3. Nortriptilin Hidroklorür (Internal standart) Çözeltisi

Ölçü eğrilerinin hazırlanması çalışmalarında nortriptilin hidroklorürün 0.5 µg/mL konsantrasyonda nortriptilin baz içeren sudaki çözeltisi kullanıldı.

4. Tampon Çözeltiler

Fosfat tamponu çözeltileri:

pH sı 7.0 ve 7.5 olan tampon çözeltileri hazırlamak için 50 mL 0.2 M potasyum dihidrojen fosfat çözeltisine gerekli miktar 0.2 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve pH sı ayarlanan çözeltilerin hacimleri suyla 200 mL ye tamamlandı.

Borat tamponu çözeltileri:

pH sı 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 olan tampon çözeltilerini hazırlamak için 0.6189 g borik asit ve 0.7456 g potasyum klorür 50 mL suda çözülüp gerekli miktarlarda 0.2 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve hacimleri suyla 200 mL ye tamamlandı.

5. Mobil faz çözeltisi

Mobil faz çözeltisi olarak, ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra süzölmüş, metanol-su (80 : 20) çözücü karışımı kullanıldı.

3.2. ALETLER VE DİĞER GEREÇLER

1. HPLC aleti

Model 6000 A pompa

Rheodyne enjektör (İnjesiyon hacmi 20 μ L)

Model 470 floresans detektör (Waters Assoc. Milford, Mass. A. B. D.)

Model 355 yazıcı (Linear)

Analitik kolon: Waters, μ - Bondapak C₁₈ kolon (10 μ m, 3.9 x 300 mm)

Koruyucu kolon: Waters, Symmetry C₁₈ kolon

2. Spektrofluorimetre (Shimadzu RF-1501)

Emisyon ve eksitasyon spektrumlarının alınmasında kullanıldı.

3. Spektrofotometre (Shimadzu UV-160 A)

4. FT-IR (Perkin-Elmer)

5. UV lamba (Desaga UVIS, 254 ve 366 nm)

6. Silika jel plak (Merck, Kieselgel 60, 0.2 mm, 5x10 cm)

7. C₁₈ plak (Merck, RP-18, 0.25 mm, 5x10 cm)

8. pH - metre (Metrohm Herisau E 603)

9. Terazi (Mettler, H 20)

10. Girdap karıştırıcı (Elektro-mag)

11. Mekanik karıştırıcı (Kottermann)
12. Santrifüj (Janetzki T.32 B ve Hettich EBA 8S
13. Su banyosu (Nüve 400 SB)
14. Reaksiyon şişeleri (5 ml lik)
15. Ultrasonik banyo (Bransonic 221)
16. Reaksiyon tüpleri (Vidalı kapaklı, dibi yuvarlak 5 ml lik ve şilifli, cam kapaklı, dibi sivri 12 ml lik)
17. Isıtıcı blok (Pierce)
18. 1 cm lik cam küvetler (OS 1000) (10x10x45 mm)
19. 1 cm lik kuartz küvetler (QS 1000) (10x10x45 mm)
20. Enjektör (Hamilton, 25 ve 100 μ L lik)
21. Filtre (Milipor, 0.50 μ m)
Mobil fazın süzülmesinde kullanıldı.
22. Enjektör filtresi (Anotec, 0.20 μ m)
Örneklerin süzülmesinde kullanıldı.
23. Otomatik pipetler (Fisher, 25, 50, 100, 250 ve 500 μ L lik)
24. Hesap makinası (Casio, fx - 10 f)

3.3. ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

3.3.1. Amlodipinin NBD-CI İle Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

Bu belirteç ile daha önce yapılan analizler incelendiğinde NBD-CI ile alifatik amin grubu içeren maddeler arasındaki reaksiyonun alkali pH larda, sıcakta yürüdüğü ve oluşan türevin genellikle asitli ortamda organik bir çözücü ile ekstre edildikten sonra floresans ölçümünün yapıldığı görülmüştür. Literatürdeki bilgiler doğrultusunda, amlodipin ile NBD-CI arasındaki reaksiyonun en iyi hangi koşullarda yürüdüğünü saptamak amacıyla aşağıdaki denemeler yapıldı.

3.3.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

1 µg/mL amlodipine eşdeğer besilat tuzu içeren 250 µL çözelti 0.5 mL 0.1 N NaOH çözeltisi ile baziklendirildi.

Elde edilen amlodipin baz, 5 mL n-heptan-isopropil alkol (99 : 1) çözücü karışımına ekstre edildi. 4 mL organik faz alındı ve uçuruldu. Üzerine 100 er µL pH 8.5 borat tamponu ve NBD-Cl (97.8 µg/mL) çözeltilerinden ilave edilerek 70°C de 30 dakika ısıtıldı. Soğutulan sistemin 100 µL 0.1 N HCl çözeltisiyle asitlendirilmesini takiben ya metanol ile çözeltinin hacmi 10 mL ye tamamlandı ya da türev etilasetat, diklormetan, metilisobutylketon gibi organik çözücülerle ekstre edildi (3 x 2 mL). Birleştirilen organik fazlar susuz Na₂SO₄ üzerinde kurutuldu ve hacmi 10 mL ye tamamlandı. Çözeltilerin spektrumları aynı koşullarda hazırlanmış boş denemeye karşı Shimadzu RF-1501 spektrofotometre yardımıyla alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.1. de belirtilmiştir.

3.3.1.2. pH

Dibi sivri ve kapaklı 12 mL lik reaksiyon tüplerine 0.025 µg/mL amlodipine eşdeğer besilat tuzu içeren çözeltiden 300 er µL alınarak üzerine 0.5 mL 0.1 N NaOH çözeltisi ve 5 mL n-heptan-isopropil alkol (99:1) çözücü karışımı katıldı. Ekstraksiyondan sonra 4.5 mL organik faz azot akımında uçuruldu. Elde edilen kalıntı (6.75 ng amlodipin) üzerine çeşitli pH lardaki (7.0-10.0) tampon çözeltilerden 100 µL ve 100 µL NBD-Cl çözeltisi (3.3 µg/mL) ilave edilerek 70 °C de 30 dakika ısıtıldı. 100 µL 0.1 N HCl çözeltisiyle asitlendirilen çözelti, 3x1.5 mL etilasetat ile ekstre edildi. Susuz sodyum sülfat ile kurutulan organik fazın 4 mL si, 45 °C deki bir ısıtıcı blokta azot akımında buharlaştırıldı. Kalıntı 200 µL metanol-su (80 : 20) mobil faz sisteminde çözündürüldü ve bu çözeltinin 20 µL si 0.8 mL/dak mobil faz akış hızında, 2000 psi basınçta µ-Bondapak C₁₈ kolona injekte edildi (duyarlık: 16x1000, yazıcı hızı: 1 cm/dak). Alıkonma zamanı 7 dakika, maksimum eksitasyon ve emisyon

dalga boyları sırasıyla 459 nm ve 528 nm olan türeve ait piklerin alanları hesaplandı. Alınan sonuçlar Bölüm 4.1.1.2. de bildirilmiştir.

3.3.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

0.025 µg/mL amlodipine eşdeğer besilat tuzu içeren çözeltinin 300 er µL sinden -Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak- elde edilen kalıntılar üzerine pH 8.5 borat tamponu ve NBD-Cl (3.3 µg/mL) çözeltilerinden 100 er µL katıldı. Tüpler 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 dakika süreyle bekletildi. Çalışmaya yine Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi devam edildi. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.1.3. te bildirilmiştir.

3.3.1.4. Belirteç Miktarı

0.025 µg/mL amlodipine eşdeğer besilat tuzu içeren çözeltiden alınan 300 er µL lik hacimler Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Türevlendirme reaksiyonları için 6.75 ng amlodipin içeren kalıntılar üzerine 100 µL pH 8.5 borat tamponu çözeltisi ve 10 - 150 µL arasında değişen hacimlerde NBD-Cl çözeltisi (3.3 µg/mL) katıldı, çözeltilerin hacimleri metanolle 150 µL ye tamamlandı. Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışmaya devam edildi. Elde edilen sonuçlar 4.1.1.4. Bölümünde bildirilmiştir.

3.3.1.5. Türevin Dayanıklılığı

1 µg/mL amlodipin baz içeren çözeltiden 250 µL alındı ve Bölüm 3.3.1.1. de anlatıldığı gibi çalışılarak 4 paralel deneme yapıldı. Elde edilen amlodipin-NBD türevlerinin etilasetattaki çözeltilerinin floresans şiddeti ($\lambda_{\text{eks}} = 462$ nm ve $\lambda_{\text{em}} = 532$ nm) boş denemeye karşı ölçüldü. Sonra bu çözeltiler oda temperaturünde, gün ışığında ve karanlıkta, +4 °C de karanlıkta 6, 24, 48, 72 saat ve ksenon lamba ışığı altında 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika sürelerde

bekletilerek fluoresans şiddetleri ölçüldü. Alınan sonuçlar Bölüm 4.1.1.5. de belirtilmiştir.

3.3.1.6. Asit Miktarı

Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak oluşturulan amlodipin-NBD nin sulu ortamdan etilasetata ekstre edilebilmesi için, reaksiyon karışımı 25, 50, 100 ve 150 µL glasiyal CH₃COOH ve 0.1 N HCl çözeltileriyle asitlendirildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.6. da belirtilmiştir.

3.3.2. Amlodipinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analizi

3.3.2.1. Mobil faz ve Detektör Dalga Boyu Seçimi

Mobil fazın seçiminde ince tabaka kromatografisi ile yapılan ön denemelerde, reaksiyon ürünü C₁₈ kaplı plaklarda değişik mobil faz sistemleri kullanılarak kromatografi edildi. 7:3, 8:2, 9:1 oranlardaki metanol-su karışımları ile yapılan kromatografi işlemlerinde türeve ait R_f değerlerinin sırasıyla 0.6, 0.75, 0.90 olduğu gözlemlendi.

İnce tabaka kromatografisi ile yapılan incelemeler dikkate alınarak HPLC çalışmaları için çeşitli oranlarda metanol-su ve asetonyitril-su mobil faz sistemleri denendi. Bu denemelerde 300 µL 0.025 µg/mL amlodipin baz içeren çözelti Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen ürün µ-Bondapak C₁₈ kolona uygulandı. Amlodipin-NBD türevinin gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları türeve ait pikin detektörde saptandığı anda değerlendirilmesiyle belirlendi. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.2.1. de yer almaktadır.

3.3.2.2. İnternal Standart Seçimi

Kantitatif analizler için gerekli internal standardı belirlemek üzere öncelikle meksiletin, tranilspromin, efedrin, lisin, glisin, traneksamik asit, nortriptilin, maprotilin ve baklofen gibi maddeler ayrı ayrı NBD-Cl ile türevlendirildi. Elde edilen ürünler ve amlodipin-NBD, C₁₈ kaplı plaklarda, metanol-su (80 : 20) mobil faz sisteminde kromatografiye edildi. Bu denemeye bir ön eleme yapıldı ve HPLC analizi için traneksamik asit, nortriptilin ve baklofen seçildi. Bu maddelerin 1 µg/mL konsantrasyondaki çözeltilerinden 100 µL alınarak amlodipinle birlikte türevlendirildi ve Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen kromatogramlar, plazma çalışması sonucu elde edilen kromatogram da dikkate alınarak değerlendirildi. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.2.2. de yer almaktadır.

3.3.2.3. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisi Hazırlanması

İki farklı konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi çalışmalarında amlodipin besilatın 0.025 µg/mL konsantrasyonda amlodipin baz içeren çözeltilerinden 20 - 100 µL ve 60 - 360 µL arasında değişen hacimler 12 mL lik dibi sivri kapaklı reaksiyon tüplerine alındı. Hacimleri suyla 900 µL ye tamamlanan çözeltilerin üzerine çalışılan konsantrasyon aralığına göre 25 µL veya 75 µL nortriptilin hidroklorür (internal standart) çözeltisi (0.5 µg/mL) ve 500 µL 0.1 N NaOH çözeltisi ilave edildi, çözelti 5 saniye karıştırıldı. Oluşan amlodipin ve nortriptilin bazları 5 mL n-heptan- isopropil alkol (99 : 1) çözücü karışımı ile 2 dakika girdap karıştırıcıda karıştırılarak organik faza ekstre edildi. Karışım fazların ayrılması için 2 dakika santrifüjlendi (1500 rpm).

Organik fazın 4.5 mL si, 45 °C deki bir ısıtıcı blokta azot akımında buharlaştırıldı. Kalıntıya 100 µL pH 8.5 borat tamponu ve 100 µL NBD-Cl çözeltisi (çalışılan konsantrasyon aralığına göre 1.2 µg/mL veya 4.4 µg/mL) ilave edilerek 70 °C de 30 dakika termostatlı su banyosunda ısıtıldı. Reaksiyon ürünü soğutulduktan sonra üzerine 100 µL 0.1 N HCl çözeltisi katıldı ve 3 defa

1.5 mL etilasetat ile girdap karıştırıcıda 1 dakika karıştırılarak ekstre edildi. Her ekstraksiyondan sonra karışım 2 dakika santrifüjlendi. Birleştirilen organik fazlar susuz Na_2SO_4 ile kurutuldu ve bu çözeltinin 4 mL si 5 mL lik reaksiyon şişelerine alınarak 45°C deki ısıtıcı blokta azot akımında buharlaştırıldı.

Kalıntı 200 μL metanol-su (80 : 20) mobil faz sisteminde çözündürüldü, süzüldü ve süzüntünün 20 μL si 0.8 mL/dak akış hızında 2000 psi basınçta μ -Bondapak C_{18} kolona uygulandı. 0.04 - 0.20 ng/20 μL konsantrasyondaki örnekler için 8x1000, 0.12 - 0.72 ng/20 μL konsantrasyondaki örnekler için 16x1000 duyarlılıkta çalışıldı. Yazıcının hızı 1 cm/dak ya ayarlandı.

$\lambda_{\text{eks}} = 459 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ dalga boylarında floresans detektör ile saptanan piklerin alanları hesaplandı.

Alıkonma zamanı 7 dakika olan amlodipin-NBD nin herbir konsantrasyon için hesaplanan pik alanları, alıkonma zamanı 19 dakika olan nortriptilin-NBD nin pik alanına oranlandı. Her konsantrasyon için 4 kez çalışıldı. Ortalama pik alanları oranı değerleri ile karşılık olan konsantrasyon değerleri arasında ölçü eğrileri çizildi. Ölçü eğrilerine ait regresyon analizleri Bölüm 4.1.2.3. de yer almaktadır.

3.3.2.4. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Amlodipinin Plazmadan Ekstraksiyonu (Ekstraksiyon İşlemi)

0.5 mL plazma örnekleri iki şekilde çalışıldı (Bu çalışmalarda 6 mg/mL konsantrasyondaki NBD-Cl çözeltisi kullanıldı).

a) Plazma üzerine 500 μL amlodipin çözeltisi (0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve 2 mL metanol ilave edildi. Çöken proteinler 30 dakika 4500 rpm de santrifüjlenerek ayrıldıktan sonra üstteki berrak kısımdan alınan 1.62 mL lik hacim 45°C de azot akımında yaklaşık 200 μL ye kadar yoğunlaştırıldı ve Bölüm 3.3.2.3. de anlatıldığı gibi NBD - Cl ile türevlendirilerek analiz edildi.

b) 300 µL amlodipin çözeltisi (0.025 µg/µL) içeren plazma örneklerinin herbirine pH 7.0 fosfat, pH 10.0 borat tamponu ve 0.1 N NaOH çözeltilerinden 0.5 mL ilave edildi. 5-6 saniye karıştırdıktan sonra herbir örnek için ayrı ayrı 5 er mL etilasetat, n-heptan-isopropil alkol (99 : 1) ile girdap karıştırıcıda 2 dakika süreyle ekstraksiyon yapıldı. 30 dakika 4500 rpm de yapılan santrifüj işleminden sonra Bölüm 3.3.2.3. de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Bu çalışmalara ait değerlendirmeler Bölüm 4.1.2.4. de yer almaktadır.

3.3.2.5. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması

İki farklı konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi çalışmalarında 12 mL lik dibi sivri ve kapaklı reaksiyon tüplerinde bulunan 0.5 mL plazma örnekleri üzerine 5 - 70 µL ve 60 - 360 µL arasında değişen hacimlerde amlodipin besilatın 0.025 µg/mL amlodipin baz içeren çözeltisinden katıldı ve hacimler suyla 900 µL ye tamamlandı. Tüplere çalışılan konsantrasyon aralığına göre 25 µL veya 75 µL nortriptilin hidroklorür (0.5 µg/mL) ve 500 µL 0.1 N NaOH çözeltileri ilave edildi ve 5 saniye karıştırıldı. 100 mg NaCl katıldıktan sonra karışım, 5 mL n-heptan-isopropil alkol (99 : 1) ile 2 dakika girdap karıştırıcıda karıştırılarak ekstre edildi. 30 dakika 4500 rpm de santrifüjlendikten sonra organik faz ayrıldı. Bu işlemle NaOH ilavesiyle çöken plazma proteinlerinin ayrılması da sağlanmış oldu. Çökelti üzerindeki berrak organik tabakanın 4.5 mL si Bölüm 3.3.2.3. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yalnız bu çalışmalarda plazmada NBD-Cl ile reaksiyona girebilecek başka maddelerde bulunduğundan daha yüksek konsantrasyonda (6 mg/mL) NBD-Cl içeren çözelti kullanıldı.

NBD türevlerini içeren etilasetat ekstresinin 4 mL si 45 °C de azot akımında yoğunlaştırıldı ve katı faz ekstraksiyonu için laboratuarda hazırlanan silika jel sütuna (10 X 70 mm boyutlarında plastik bir borunun dar olan uç kısmına küçük bir cam pamuğu yerleştirildi ve etilasetatla ıslatılmış 600 mg

silika jel muntazam olarak doldurulduktan sonra üst kısmına 200 mg susuz sodyum sülfat ilave edildi) uygulandı. Yaklaşık 4 mL etilasetat ile elde edilen eluat 5 mL lik reaksiyon şişelerine toplandı ve çözücüsü 45 °C deki bir ısıtıcı blokta azot akımında buharlaştırıldı. Kalıntı 200 µL metanol-su (80 : 20) mobil faz sisteminde çözündürüldü, süzüldü ve çözeltinin 20 µL si 0.8 mL/dak akış hızında (2000 psi basınçta) sıvı kromatografa injekte edildi. Detektör dalga boyları $\lambda_{eks}=459$ nm ve $\lambda_{em}=528$ nm de, yazıcı hızı 1 cm/dak da tutuldu .

0.01 - 0.14 ng/20 µL konsantrasyon aralığındaki örnekler için 4x1000, 0.12 - 0.72 ng/20 µL konsantrasyon aralığındaki örnekler için 16x1000 duyarlıkta çalışıldı.

Aynı koşullarda 4 kez çalışılarak, her bir konsantrasyon için hesaplanan amlodipin-NBD nin pik alanı, internal standarda ait pik alanına oranlandı. Ortalama pik alanları oranı değeri ile amlodipin baz konsantrasyonları arasında ölçü eğrileri çizildi. Bu çalışmaya ait sonuçlar Bölüm 4.1.2.5. de bildirilmiştir.

3.4. TABLETLERDE AMLODİPİN MİKTAR TAYİNİ

3.4.1. HPLC Yöntemi

10 adet tablet tek tek tartılıp, ortalama bir tablet ağırlığı saptandı ve tabletler porselen havanda ince toz haline getirildi. 10 mg amlodipin baza eşdeğer miktarda tablet tozu hassas olarak tartılıp 100 mL lik balonjojeye aktarıldı, 2 mL etanol ve 50 mL deiyonize su ile 30 dakika mekanik karıştırıcıda çalkalandı. Deiyonize su ile hacmine tamamlandıktan sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 25 mL si atıldı. Geri kalan kısımdan 1 mL alınıp 10 mL lik balonjojede deiyonize su ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 25 µL alınıp, deiyonize su ile 10 mL ye tamamlandı, bu çözeltiden 300 µL alınarak 0.12 - 0.72 ng/20 µL konsantrasyon aralığına ait ölçü eğrisinin çalışma koşullarında Bölüm 3.3.2.3. de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Analiz işlemi 6 kez

tekrarlandı. Amlodipin baz miktarı daha önce bu konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi ($A=1.8786C-0.0117$) yardımıyla hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.3. de belirtilmiştir.

3.4.2. Kıyas Yöntemi

Standart Çözelti:

5.0 mg amlodipin baza eşdeğer miktarda (6.95 mg) amlodipin besilat referans standardı tartıldı, 100 mL lik balonjojeye aktarıldı, 0.01 M HCl çözeltisi ile çözüldürülerek hacmine tamamlandı.

Örnek Çözeltisi:

Bölüm 3.4.1. de anlatıldığı gibi toz haline getirilen tablet örneğinden 10 mg amlodipin baza eşdeğer miktarda tablet tozu tartıldı, 100 mL lik balonjojeye aktarıldı. 0.01 M HCl çözeltisi ile çözüldürülüp hacmine tamamlandı, karıştırıldı ve mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntünün ilk 25 mL si atıldı. Kalan kısımdan alınan 10 mL hacim 20 mL lik balonjojeye aktarılarak 0.01 M HCl ile hacmine tamamlandı.

Örnek ve standart çözeltilerin absorbanları 0.01 M HCl çözeltisine karşı 360 nm de spektrofotometre ile ölçüldü. Tabletlerdeki madde miktarı aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\frac{A_{\delta}}{A_{st}} \times \frac{(\text{Standart madde miktarı, mg / 100})}{(\text{Tablet tozu miktarı, mg / 100})} \times \frac{408.9}{567.1} \times \text{Ortalama tablet ağırlığı}$$

A_{δ} = Örnek Absorbansı

A_{st} = Standart Absorbansı

Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.3. de bildirilmiştir.

3.5. PLAZMADA AMLODİPİN MİKTAR TAYİNİ

10 mg amlodipin baz içeren bir tabletin (Norvasc[®]) 28 yaşında sağlıklı bir gönüllü tarafından içilmesinden 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 30, 37, 61, 85 ve 109 saat sonra, içinde sitrat tamponu bulunan tüplere 6-7 mL venöz kan örnekleri alındı ve 4500 rpm de 30 dakika santrifüjlendi. Bu işlem sonunda elde edilen plazmadan alınan 0.5 mL lik örnekler -20 °C de saklandı. Bu örnekler, plazmada ölçü eğrisi hazırlanması bölümünde (Bölüm 3.3.2.5.) anlatıldığı gibi analiz edildi ve farmakokinetik parametreler hesaplandı. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.4. de yer almaktadır.



4. SONUÇLAR

4.1. ANALİZ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

4.1.1. Amlodipinin NBD-Cl İle Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi

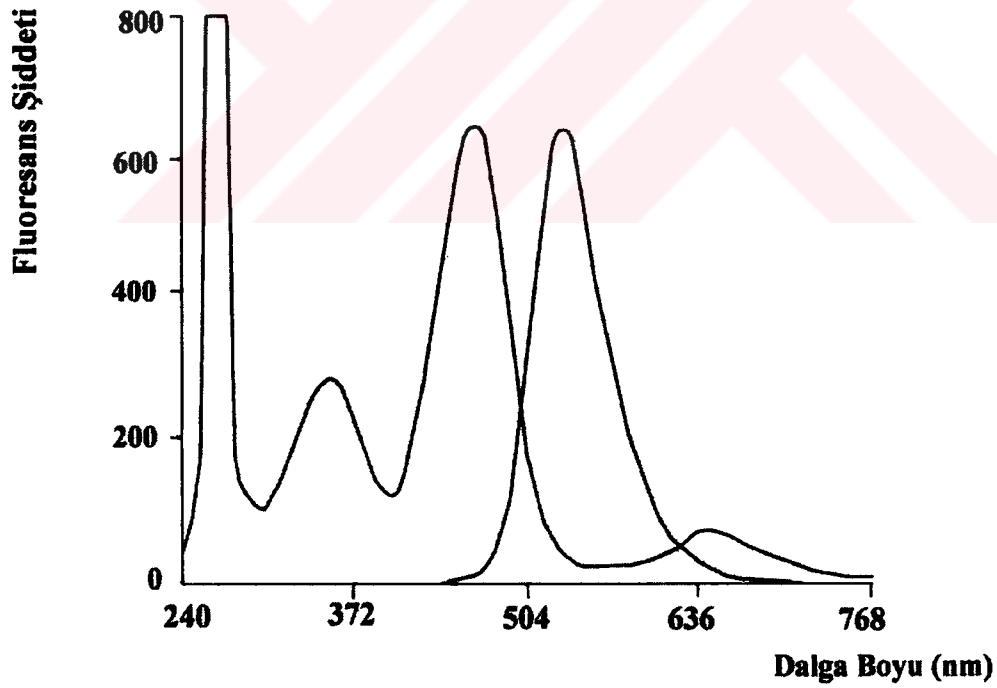
Amlodipin ile NBD-Cl arasındaki reaksiyon sonucu meydana gelen ve sarı-yeşil renkli floresans gösteren amlodipin - NBD türevinin sulu ortamdan ekstre edilebilmesi için en uygun organik çözücü araştırıldı ve türevin oluşumu üzerine pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, belirteç miktarı gibi parametrelerin etkisi incelendi.

4.1.1.1. Ekstraksiyon Çözücüsü

Amlodipinin NBD-Cl ile oluşturduğu türevin sulu ortamdan ekstraksiyonu için en uygun organik çözücüyü saptamak üzere Bölüm 3.3.1.1. de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen türevin çeşitli çözücülerde floresans spektrumları alındı. Bu spektrumlarda amlodipin - NBD nin denenen organik çözücülerde gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları ve floresans şiddeti değerleri elde edilmiştir. Tablo 1 de yer alan bu değerler incelendiğinde türevin ekstraksiyonu için en uygun çözücünün etilasetat olduğu saptanmıştır. Şekil 3 de amlodipin - NBD nin etilasetattaki eksitasyon ve emisyon spektrumları görülmektedir.

Tablo 1 : Amlodipin - NBD nin çeşitli organik çözücülerdeki maksimum eksitasyon (λ_{eks}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boyları ile fluoeresans şiddeti değerleri

	$\lambda_{eks} / \lambda_{em}$ (nm)	Fluoeresans şiddeti (Serbest birim)
Metanol	472 / 536	357
Etilasetat	462 / 532	685
Diklormetan	460 / 525	666
Metilisobutilketon	465 / 527	512



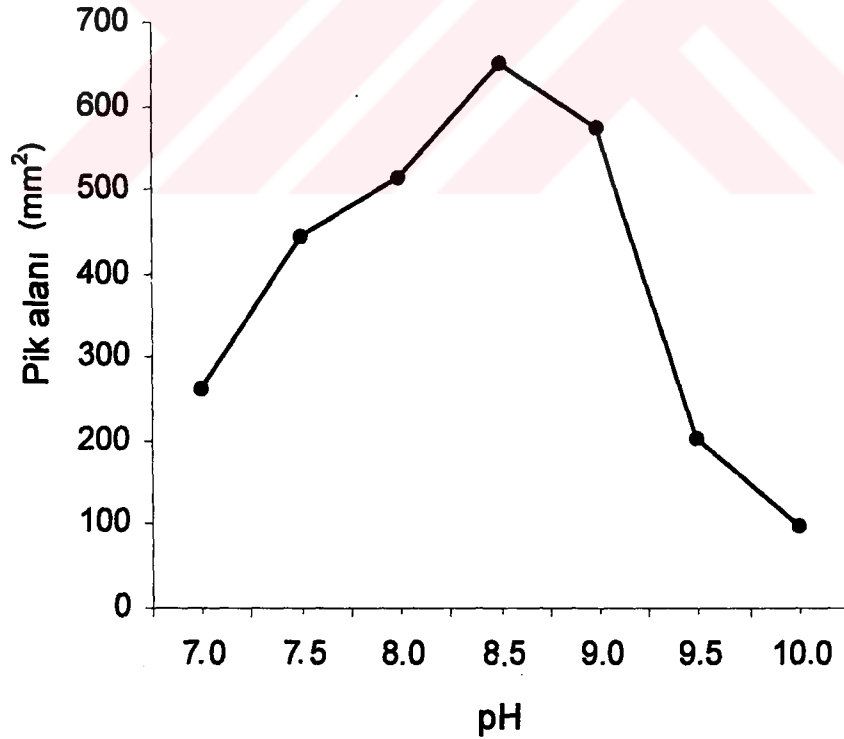
Şekil 3 : 20 ng/mL amlodipine eşdeğer amlodipin-NBD türevinin etilasetattaki eksitasyon ve emisyon spektrumları ($\lambda_{eks} = 462$ nm, $\lambda_{em} = 532$ nm)

4.1.1.2. pH

Amlodipin besilat ile NBD-Cl arasındaki reaksiyonun en iyi hangi pH da yürüdüğünü saptamak amacıyla pH 7.0 - 10.0 arasında hazırlanmış bir seri tampon çözeltiyle Bölüm 3.3.1.2. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yapılan denemelerin sonuçları Tablo 2 ve Şekil 4 de görülmektedir. Elde edilen veriler incelendiğinde amlodipin-NBD nin pH 8.5 da kantitatif olarak oluştuğu belirlenmiştir.

Tablo 2 : Çeşitli pH larda oluşturulan amlodipin-NBD ye ait pik alanları

pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
Pik alanı (mm ²)	263	445	514	652	574	203	99



Şekil 4 : Amlodipin-NBD türevinin oluşumu üzerine pH nın etkisi

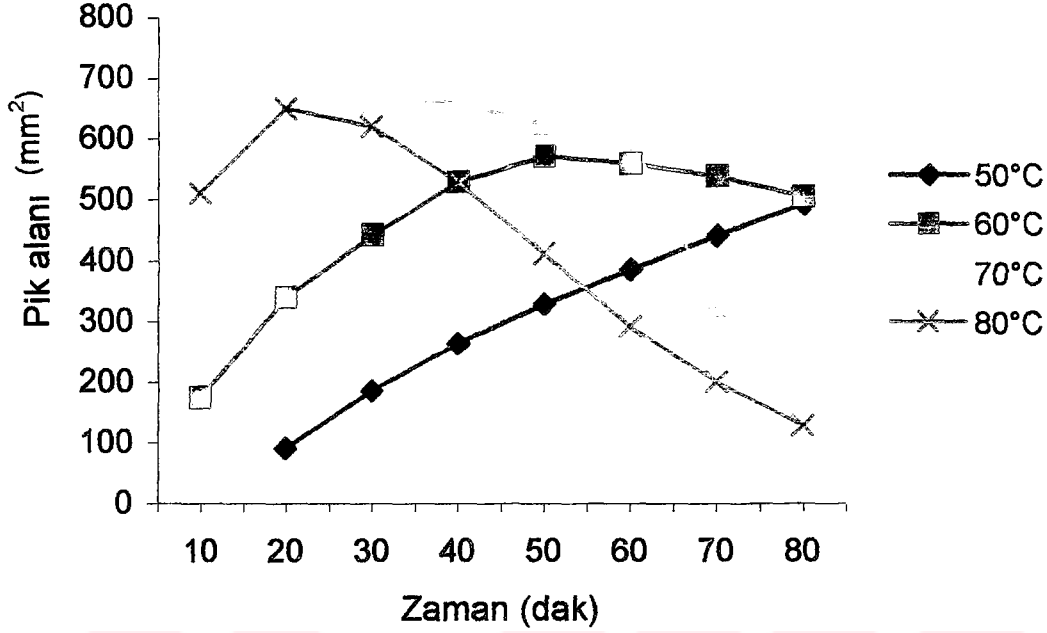
4.1.1.3. Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi

Amlodipin-NBD türevinin kantitatif olarak oluşması için en uygun sıcaklık ve reaksiyon süresini saptamak amacıyla Bölüm 3.3.1.3. de anlatıldığı gibi 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda çalışıldı. Her sıcaklıkta 10 ile 80 dakika arasında türev oluşumu izlendi.

Elde edilen amlodipin - NBD türevlerine ait pik alanlarının, sıcaklık ve zamana karşı gösterdiği değişim Tablo 3 ve Şekil 5 de görülmektedir. Bu verilere dayanılarak, amlodipin ile NBD-Cl arasındaki reaksiyonun tamamlanması için 70 °C de 30 dakika süreyle ısıtmanın yeterli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3 : Çeşitli sıcaklık ve zamanlarda oluşturulan amlodipin - NBD türevine ait pik alanları (mm²)

Zaman (dak) Sıcaklık (° C)	10	20	30	40	50	60	70	80
50	-	90	185	263	328	385	440	493
60	173	338	441	528	570	559	538	505
70	330	443	670	658	623	598	326	231
80	510	649	620	528	410	292	200	128



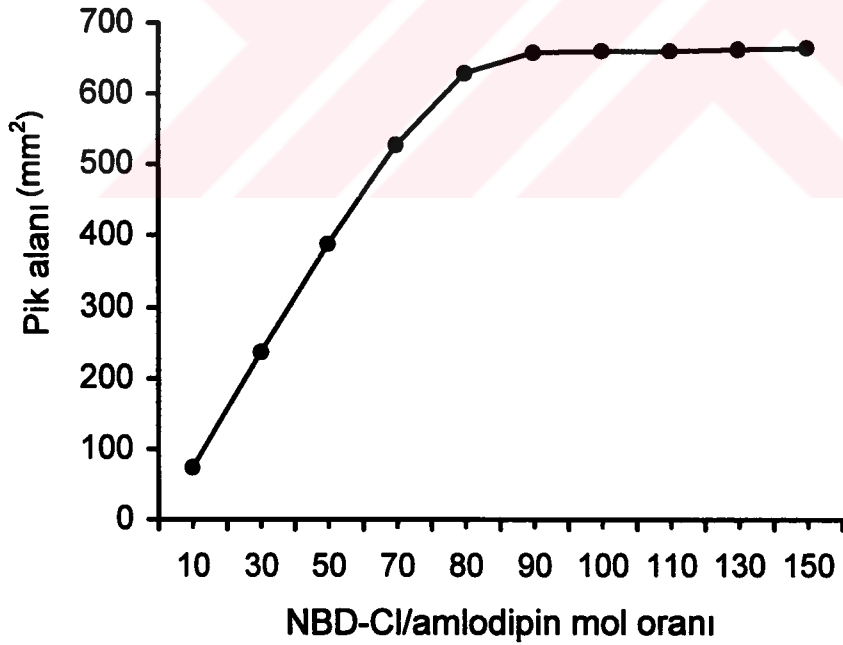
Şekil 5 : Amlodipin - NBD türevinin oluşması üzerine sıcaklık ve zamanın etkisi

4.1.1.4. Belirteç Miktarı

NBD-Cl ile amlodipin arasındaki reaksiyonun maksimum oranda ürün vermesi için gerekli belirteç / amlodipin mol oranını saptamak amacıyla madde miktarı sabit tutularak NBD-Cl mol katı 10 - 150 olacak şekilde hazırlanan bir seri belirteç çözeltisiyle Bölüm 3.3.1.4. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Tablo 4 de belirteç miktarının değiştirilmesiyle oluşturulan türevlere ait pik alanları değerleri, Şekil 6 da ise bu değerler yardımıyla elde edilen grafik görülmektedir. Veriler değerlendirildiğinde amlodipin - NBD türevinin oluşması için NBD-Cl / amlodipin mol oranı 100 olacak şekilde hazırlanan belirteç çözeltisinin yeterli olacağı belirlenmiştir.

Tablo 4 : Çeşitli mol oranlarında oluşturulan amlodipin - NBD türevine ait pik alanları

NBD-Cl/amlodipin mol oranı	10	30	50	70	80	90	100	110	130	150
Pik alanı (mm ²)	74	237	388	528	629	658	660	660	663	665



Şekil 6 : Amlodipin - NBD türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi

4.1.1.5. Türevin Dayanıklılığı

Amlodipin-NBD türevinin etilasetat çözeltisindeki dayanıklılığını incelemek üzere Bölüm 3.3.1.5. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta ve gün ışığında, +4 °C de karanlıkta ve ksenon lamba ışığı altında belirli sürelerde bekletilen çözeltilerin gösterdiği floresans şiddeti değerleri Tablo 5 ve 6 da görülmektedir. Elde edilen veriler incelendiğinde türevin +4 °C de karanlıkta en az 1 gün dayanıklı kaldığı belirlendi.

Tablo 5 : Oda sıcaklığında karanlıkta ve gün ışığında, +4 °C de karanlıkta bekletilen amlodipin-NBD türevinin etilasetattaki çözeltilerinin dayanıklılığı

	Fluoresans Şiddeti (Serbest birim)				
	Başlangıça	6 saat sonra	24 saat sonra	48 saat sonra	72 saat sonra
Oda sıcaklığı, karanlıkta	682	674	638	592	533
Oda sıcaklığı, gün ışığında	686	608	333	101	-
+4 °C de, karanlıkta	682	679	673	658	613

Tablo 6 : Amlodipin-NBD türevinin etilasetattaki çözeltisinin dayanıklılığına ksenon lamba ışığının etkisi

İşığa tutulma süresi (dak)	0	2	5	10	15	20	25	30
Fluoresans şiddeti (Serbest birim)	684	677	665	657	645	629	610	599

4.1.1.6. Asit Miktarı

NBD-Cl ile alifatik aminlerin fluoresans gösteren türevlerinin organik çözücüye ekstraksiyonu genellikle asitli ortamda olmaktadır.

Literatürde bunun için çoğunlukla CH_3COOH ve HCl çözeltileri kullanılmaktadır. Bölüm 3.3.1.6. da anlatıldığı gibi yapılan incelemeler sonucunda ekstraksiyon için 100 μL 0.1 N HCl çözeltisinin yeterli olduğu belirlenmiştir.

4.1.2. Amlodipinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Analizi

Amlodipinin NBD-Cl ile oluşturduğu fluoresans gösteren türevinin ters faz sıvı kromatografisi sisteminde analiz edilebilmesi için öncelikle detektör dalga boyları (eksitasyon ve emisyon) ve mobil faz sistemi belirlendi, internal standart madde araştırıldı. Daha sonra, optimum reaksiyon koşullarında elde edilen amlodipin - NBD nin gerek tabletlerde gerekse plazmada tayini yapıldı. Plazma çalışmalarında nisbeten temiz bir kromatogram elde etmek ve verimi arttırmak amacıyla sıvı-sıvı ve katı-faz ekstraksiyonları denendi.

4.1.2.1. Mobil Faz ve Detektör Dalga Boyu Seçimi

Yapılan literatür araştırmalarında NBD-CI ile oluşturulan türevlerin genellikle ters fazlı kromatografik sistemlerde analiz edildiği görülmüştür. Bu nedenle amlodipin - NBD türevi de C₁₈ stasyonier faz kaplı hazır plaklarda metanol-su çözücü sistemlerinde kromatografi edildi ve makul R_f değerleri gözlemlendi. Bu incelemeler gözönüne alınarak Bölüm 3.3.2.1. de anlatıldığı gibi yapılan çalışmaların sonucunda HPLC analizleri için en uygun mobil faz sisteminin metanol-su (80 : 20) olduğu belirlendi. Bu mobil faz sisteminde, μ - Bondapak C₁₈ kolonda ve 0.8 mL/dak mobil faz akış hızında (2000 psi basınçta) türevelere ait alıkonma zamanı 7 dakikadır. Türevin gösterdiği maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları, fluoresans detektörde sırasıyla 459 ve 528 nm olarak saptanmıştır.

4.1.2.2. İnternal Standart Seçimi

Amlodipin -NBD türevinin gerek sulu çözeltilerde gerek plazmada kantitatif tayini için en uygun internal standardı belirlemek üzere Bölüm 3.3.2.2. de anlatıldığı gibi çalışılarak çeşitli maddeler test edildi. En uygun internal standart madde olarak nortriptilin seçildi. Nortriptilin - NBD nin alıkonma zamanı 19 dakika olarak belirlendi.

4.1.2.3. Sulu Çözeltilerde Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

Bölüm 3.3.2.3. de anlatıldığı gibi çalışılarak, 0.04-0.20 ng/20 μ L ve 0.12-0.72 ng/20 μ L konsantrasyon aralıklarında her konsantrasyon aralığı için sırasıyla 5 ve 6 farklı konsantrasyonda, aynı şekilde 4 kez çalışıldı. Kromatogramların değerlendirilmesinde pik alanlarının hesaplanmasının daha uygun olduğu belirlendi ve bu değer pik yüksekliğinin yarı pik yüksekliğindeki pik genişliği ile çarpılmasıyla hesaplandı. Her bir konsantrasyon için amlodipin-NBD nin hesaplanan pik alanları, nortriptilin-NBD nin pik alanına oranlandı. Pik alanları oranının ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s) ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri Tablo 7 ve Tablo 9 da verilmiştir. Tablo 8 ve Tablo 10 da

ise ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler (a= eğim b= intersept, r=korrelasyon katsayısı) yer almaktadır. Ortalama pik alanları oranı değerlerinden çizilen ölçü eğrileri Şekil 7 ve Şekil 8 de görülmektedir.

Tablo 7 : Amlodipinin HPLC ile tayini için 0.04 - 0.20 ng/ 20 µL konsantrasyon aralığında sulu çözeltilerde hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı (mm²) değerleri ve istatistik verileri

No	C (ng/20µL)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	Ā	s	s /Āx100
1	0.04	0.195	0.200	0.205	0.220	0.205	0.011	5.27
2	0.08	0.398	0.408	0.415	0.430	0.413	0.013	3.26
3	0.12	0.600	0.618	0.628	0.648	0.624	0.020	3.21
4	0.16	0.793	0.808	0.815	0.848	0.816	0.023	2.85
5	0.20	1.020	1.030	1.040	1.060	1.038	0.017	1.65

Ā değerlerinden hesaplanan doğru denklemi :
 $A = 5.1725 C - 0.0015$
 $r = 0.9998$

Tablo 8 : Tablo 7 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	ortalama
a	5.1125	5.1500	5.1750	5.2450	5.1706
b	- 0.0123	- 0.0052	- 0.0004	0.0118	- 0.0015
r	0.9997	0.9998	0.9997	0.9999	0.9998

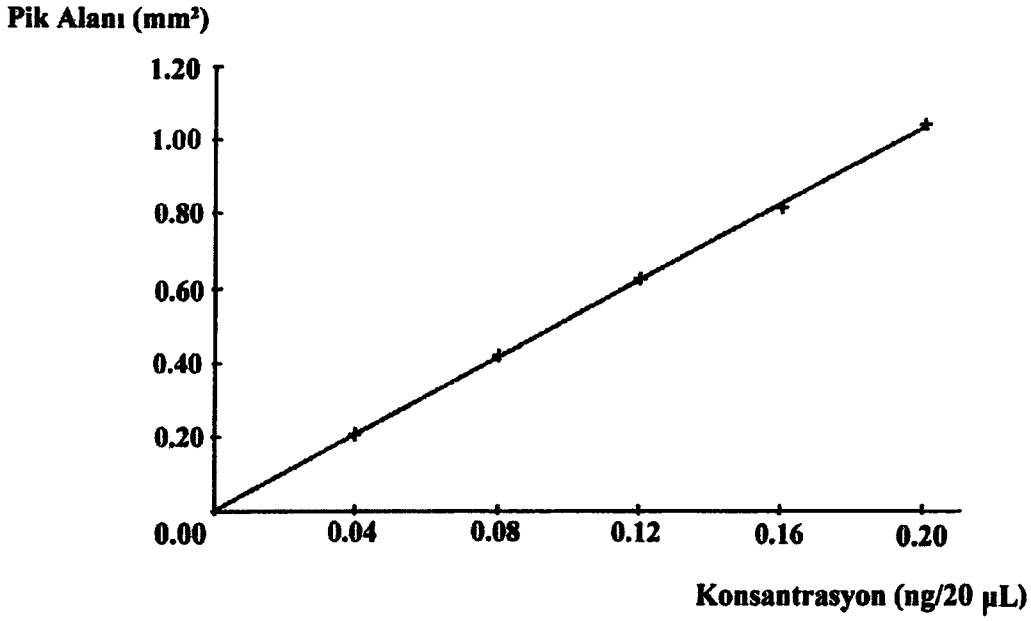
Tablo 9 : Amlodipinin HPLC ile tayini için 0.12 - 0.72 ng / 20 µL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı (mm²) değerleri ve istatistik verileri

No	C (ng/20µL)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	Ā	s	s /Āx100
1	0.12	0.209	0.216	0.219	0.227	0.218	0.007	3.42
2	0.24	0.430	0.434	0.441	0.455	0.440	0.011	2.50
3	0.36	0.644	0.655	0.657	0.669	0.656	0.010	1.56
4	0.48	0.869	0.880	0.892	0.904	0.886	0.015	1.70
5	0.60	1.113	1.120	1.127	1.138	1.125	0.011	0.95
6	0.72	1.324	1.329	1.343	1.359	1.339	0.016	1.17

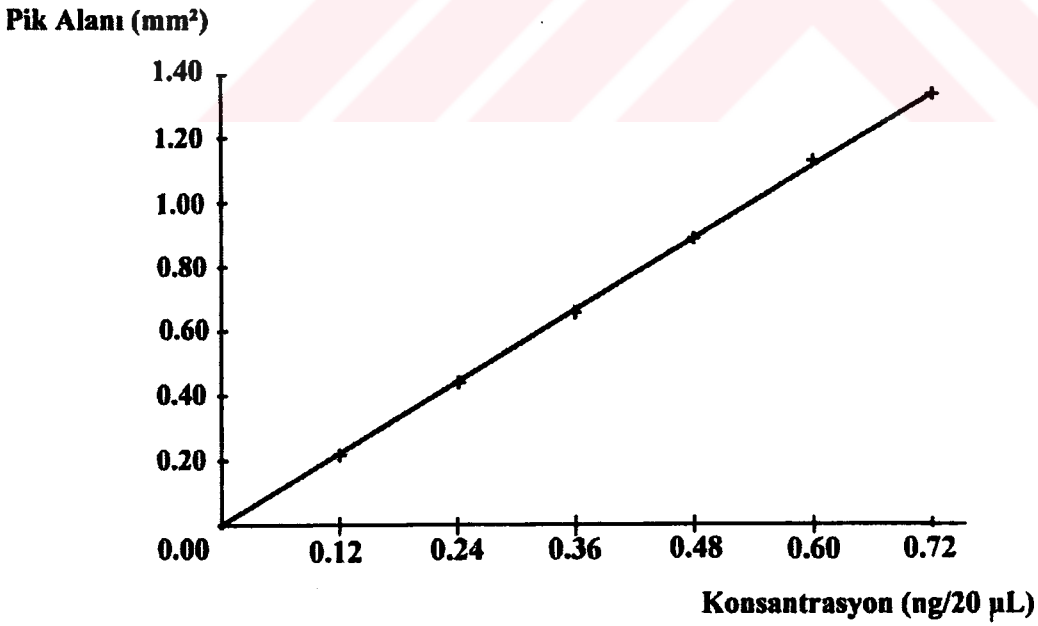
Ā değerlerinden hesaplanan doğru denklemi
 $A = 1.8786 C - 0.0117$
 $r = 0.9999$

Tablo 10 : Tablo 9 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	ortalama
a	1.8688	1.8686	1.8840	1.8914	1.8782
b	- 0.0201	- 0.0125	- 0.0115	- 0.0024	- 0.0116
r	0.9998	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999



Şekil 7 : Amlodipinin 0.04 - 0.20 ng / 20 µL konsantrasyon aralığında sulu çözeltilerde hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 8 : Amlodipinin 0.12 - 0.72 ng / 20 µL konsantrasyon aralığında sulu çözeltilerde hazırlanan ölçü eğrisi

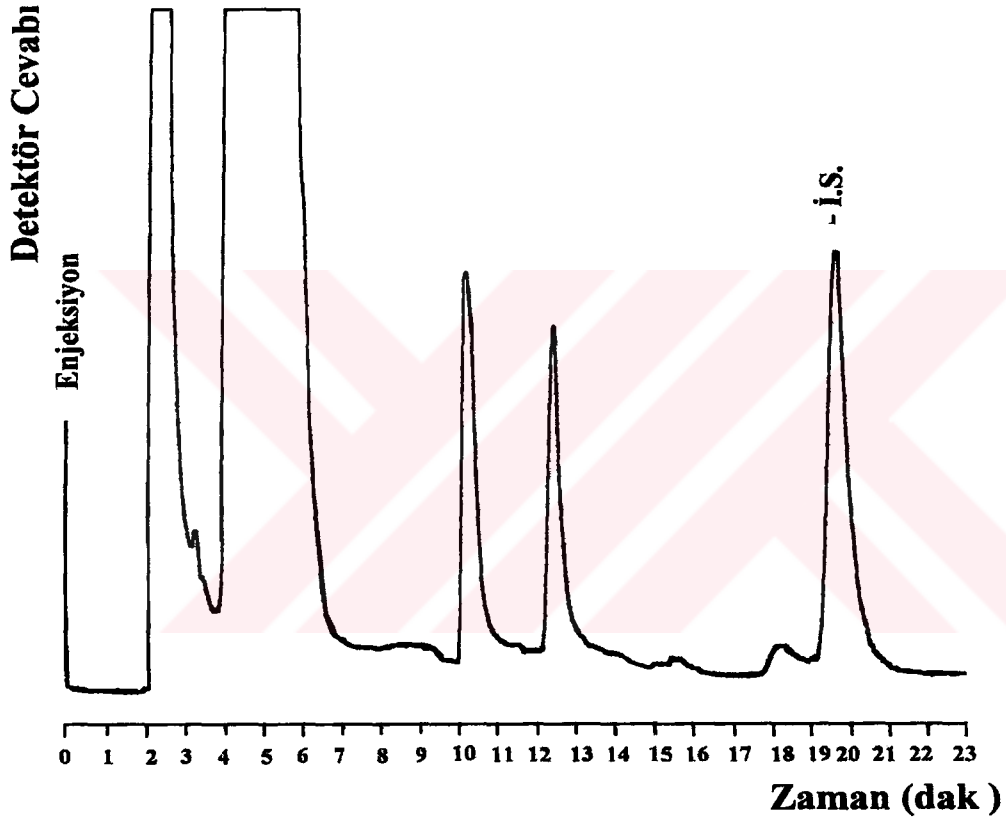
Bu çalışma sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde HPLC ye injekte edilen çözeltideki amlodipin - NBD ye eşdeğer amlodipin baz konsantrasyonları ile pik alanları oranları arasında 0.04 - 0.20 ng/20 µL ve 0.12 - 0.72 ng/20 µL konsantrasyon aralıklarında doğrusal bir ilişki olduğu belirlendi. Ortalama pik alanları oranı değerlerinden hesaplanan doğru denklemleri ile her bir ölçü eğrisinin kendi pik alanı oranı değeri kullanılarak hesaplanan doğru denklemlerine ait ortalama değerler arasındaki fark çok az olduğundan tabletlerde amlodipin tayininde ortalama pik alanları oranı değerlerinden elde edilen denklem kullanılmıştır.

4.1.2.4. Plazma Proteinlerinin Çöktürülmesi ve Ekstraksiyon İşlemi

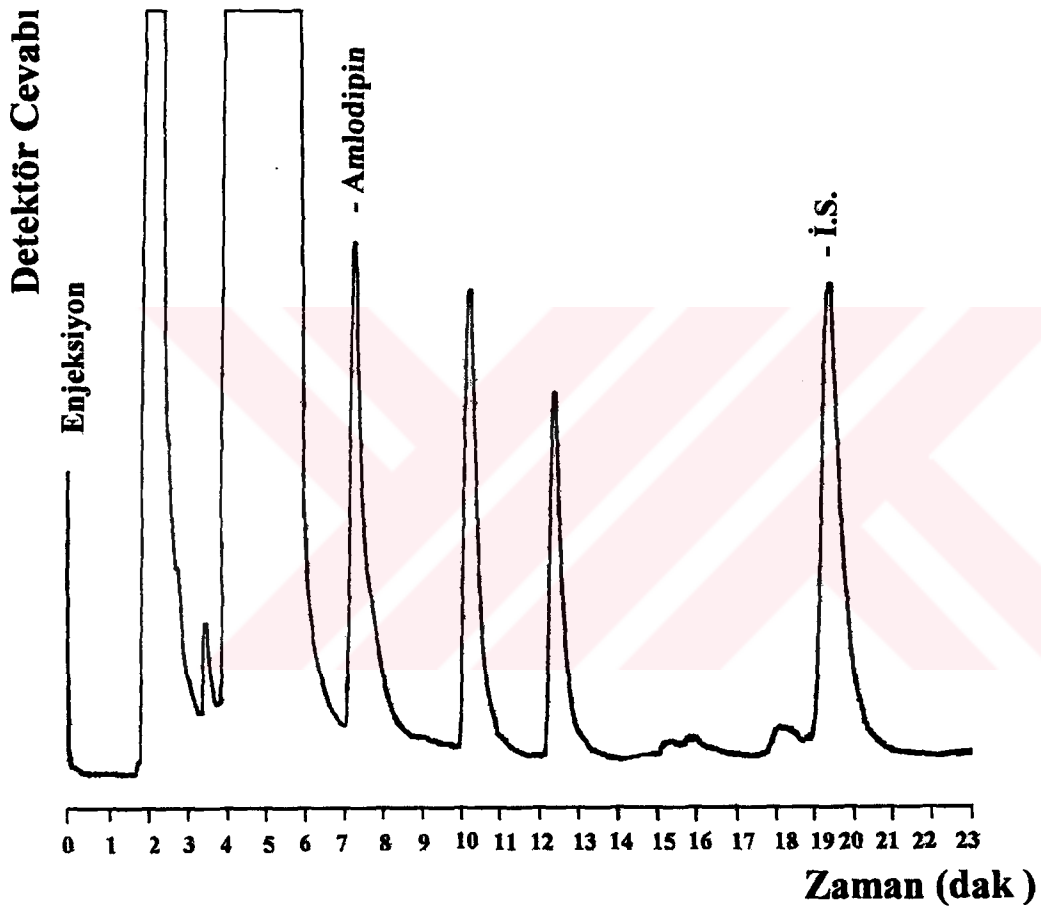
Plazma veya serum örneklerinde yapılan ilaç analizlerinde öncelikle ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu konudaki çalışmalar incelendiğinde proteinleri çöktürmek amacıyla en çok etanol, metanol, asetonitril, trikloroasetikasit, Na₂CO₃, NaHCO₃ çözeltileri, pH 7 fosfat tamponu, alkali pH (8.0 -10.0) larda fosfat, karbonat ve borat tamponları, NaOH çözeltileri kullanıldığı görülmüştür. Proteinlerin çöktürülmesinden sonra, bazı çalışmalarda çökelti üzerindeki berrak sıvı kısım analiz edilmiş, bazı çalışmalarda ise kısmi bir temizleme amacıyla organik bir çözücü veya çözücü karışımı ile ekstraksiyon yapılmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda Bölüm 3.3.2.4. de anlatıldığı gibi yapılan incelemeler sonucunda elde edilen veriler Tablo 11 de bildirilmiştir. Plazma proteinlerinin 0.1 N NaOH ile çöktürülmesinden sonra n-butanol-isopropil alkol (99:1) çözücü karışımı ile yapılan ekstraksiyon hem daha yüksek bir verim sağlamış hem de girişim yapan maddelerin azalmasına neden olmuştur. Şekil 9 da sadece internal standart katılmış (boş plazma), Şekil 10 da ise amlodipin ve internal standart katılmış plazma örneklerine ait kromatogramlar görülmektedir.

Tablo 11 : Amlodipinin analizinden önce plazma proteinlerinin çöktürülmesi ve ekstraksiyon işleminin pik alanı üzerine etkisi

Çöktürücü	Metanol	Fosfat tamponu (pH 7)		Borat tamponu (pH 10)		0.1 N NaOH	
		Etilasetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)	Etilasetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)	Etilasetat	n-heptan-isopropil alkol (99:1)
Ekstraksiyon çözücüsü	-						
Pik alanı (mm ²)	378	410	484	505	549	598	655



Şekil 9 : 75 ng/mL internal standart içeren, amlodipin katılmamış plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 10 : 8 ng/mL amlodipin ve 75 ng/mL internal standart katılmış plazma örneğine ait kromatogram

4.1.2.5. Plazmada Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi

Bölüm 3.3.2.5. de anlatıldığı gibi çalışılarak, 0.01-0.14 ng/20 µL ve 0.12-0.72 ng/20 µL konsantrasyon aralıklarında her konsantrasyon aralığı için sırasıyla 5 ve 6 farklı konsantrasyonda aynı şekilde 4 kez çalışıldı. İnjekte edilen çözeltideki amlodipin NBD ye eşdeğer amlodipin baz konsantrasyonu ile amlodipin ve internal standart madde olan nortriptilinin NBD türevlerinin pik alanları oranı arasındaki ilişki 0.01 - 0.72 ng/20 µL aralığında incelendi.

Pik alanları oranı ortalaması (\bar{A}), standart sapma (s) ve bağıl standart sapma ($s/\bar{A} \times 100$) değerleri Tablo 12 ve Tablo 14 de verilmiştir. Tablo 13 ve Tablo 15 de ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler (a=eğim b=intersept, r=korrelasyon katsayısı) yer almaktadır. Ortalama pik alanları oranı değerlerinden çizilen ölçü eğrileri Şekil 11 ve Şekil 12 de verilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre 0.01 - 0.14 ng/20 µL ve 0.12 - 0.72ng/20µL amlodipin baza eşdeğer amlodipin-NBD içeren çözeltiyle çalışıldığında konsantrasyon ile pik alanları oranı arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlendi. Çalışma koşullarında (2 x 1000 duyarlıkta) tayin edilebilen minimum amlodipin baz miktarı 0.005 ng/20 µL dir. Bu miktar, mililitresinde 0.125 ng amlodipin içeren plazmaya eşdeğerdir.

Tablo 12 : Amlodipinin HPLC ile tayini için 0.01 - 0.14 ng / 20 µL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı (mm²) değerleri ve istatistik verileri

No	C (ng/20µL)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	Ā	s	s / Āx100
1	0.01	0.036	0.037	0.042	0.046	0.040	0.005	11.54
2	0.03	0.141	0.152	0.168	0.171	0.158	0.014	8.91
3	0.06	0.283	0.296	0.312	0.328	0.305	0.020	6.40
4	0.10	0.563	0.570	0.596	0.617	0.587	0.025	4.23
5	0.14	0.736	0.757	0.767	0.785	0.761	0.020	2.68

Ā değerlerinden hesaplanan doğru denklemi :
 $A = 5.6689 C - 0.0153$
 $r = 0.9972$

Tablo 13 : Tablo 12 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	ortalama
a	5.5323	5.6366	5.6841	5.8190	5.6680
b	- 0.0244	- 0.0209	- 0.0095	- 0.0063	-0.0153
r	0.9971	0.9981	0.9969	0.9967	0.9972

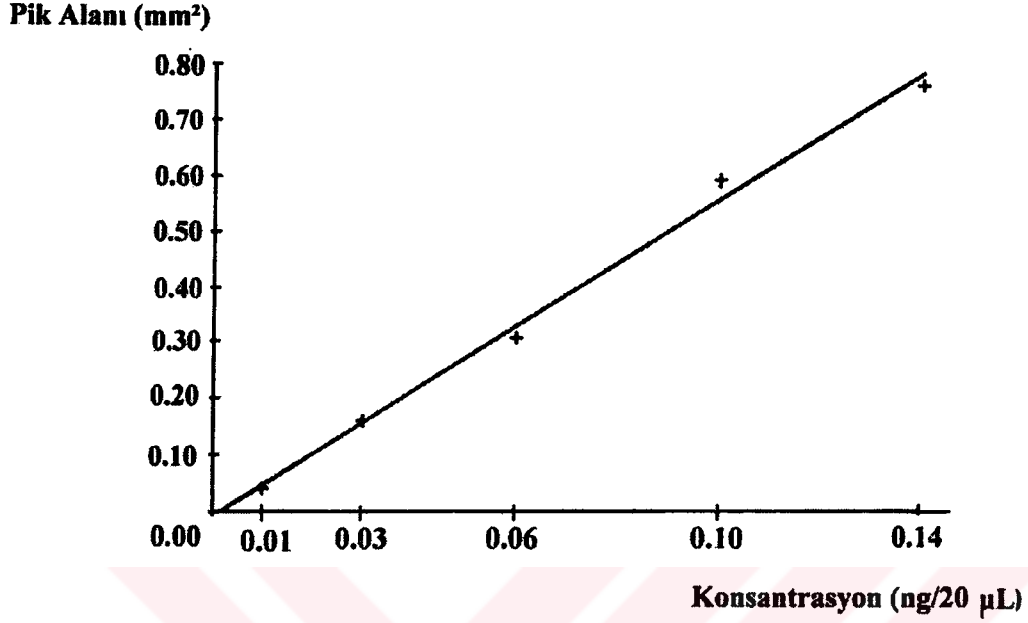
Tablo 14 : Amlodipinin HPLC ile tayini için 0.12 - 0.72 ng / 20 µL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı(mm²) değerleri ve istatistik verileri

No	C (ng/20µL)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	Ā	s	s/Āx100
1	0.12	0.199	0.204	0.214	0.228	0.211	0.013	6.05
2	0.24	0.382	0.391	0.404	0.416	0.398	0.015	3.74
3	0.36	0.595	0.611	0.634	0.650	0.623	0.024	3.91
4	0.48	0.796	0.812	0.819	0.842	0.817	0.019	2.34
5	0.60	0.998	1.018	1.027	1.050	1.023	0.022	2.11
6	0.72	1.184	1.200	1.218	1.239	1.210	0.024	1.96

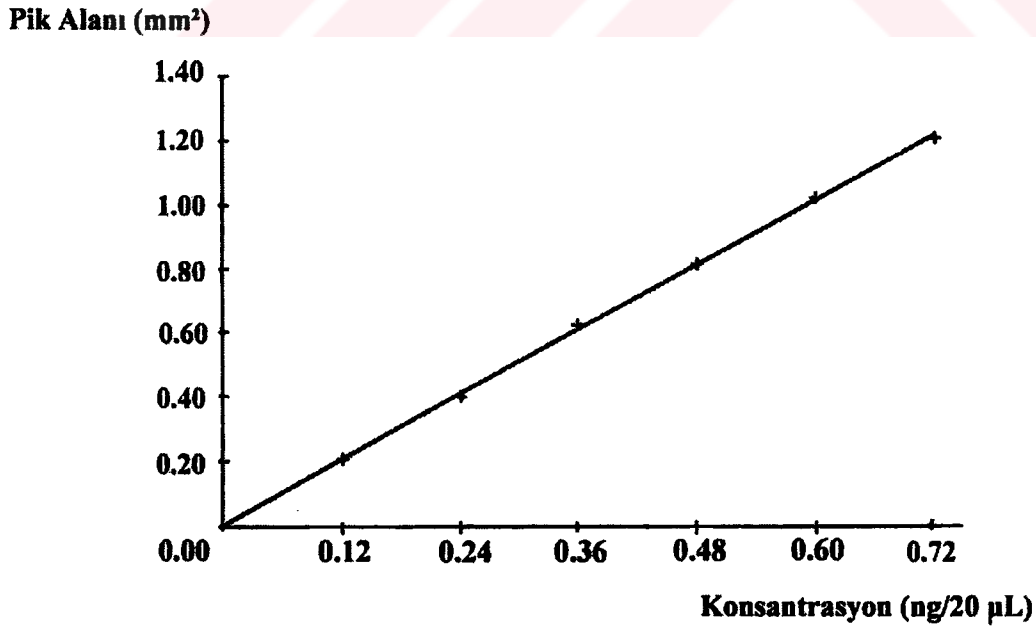
Ā değerlerinden hesaplanan doğru denklemi :
 $A = 1.6819 C + 0.0073$
 $r = 0.9997$

Tablo 15 : Tablo 14 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	ortalama
a	1.6605	1.6814	1.6843	1.7021	1.6821
b	-0.0051	-0.0002	0.0119	0.0226	0.0073
r	0.9998	0.9997	0.9997	0.9996	0.9997



Şekil 11 : Amlodipinin 0.01 - 0.14 ng / 20 µL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 12 : Amlodipinin 0.12 - 0.72 ng / 20 µL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi

4.1.2.6. Plazmadan Geri Kazanılabilme Oranı

Amlodipin bazın plazmadan geri kazanılabilme oranını (verim) saptamak amacıyla, plazmadan ölçü eğrisi hazırlanması bölümünde (Bölüm 3.3.2.5.) anlatıldığı gibi 0.12 - 0.72 ng/20 µL konsantrasyon aralığında 0.5 mL plazma örneği yerine su kullanılarak çalışıldı. Plazmadan elde edilen ölçü eğrisi denklemi ($A = 1.6819 C + 0.0073$) nin eğimi , sulu çözeltilerden elde edilen ölçü eğrisi denklemi ($A = 1.8786 C - 0.0117$) nin eğimi ile oranlandığında geri kazanılabilme oranı % 89.53 olarak bulundu.

4.1.2.7. Farklı Günlerde ve Aynı Gün İçinde Yapılan Plazma Analizlerinin Tekrarlanabilirliği

Üç farklı konsantrasyonda amlodipin içeren plazma örnekleri (0.75, 3.00, 7.50 ng / 0.5 mL) Bölüm 3.3.2.5. de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlerde her bir örnek 6 kez çalışıldı. Bağlı standart sapma değerleri % 2.12 - 7.29 arasında hesaplandı (Tablo 16).

4 ay içinde 6 farklı günde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağlı standart sapma değerleri ise % 2.19 - 9.46 arasındadır (Tablo 17).

Ayrıca, bu analizler sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde amlodipinin plazmadan geri kazanılabilme oranı % 85.33 – 100.27 arasında hesaplanmıştır.

Tablo 16 : Aynı gün içinde plazmada yapılan amlodipin analizlerinin tekrarlanabilirliği

	Plazmaya katılan amladipin miktarı (ng / 0.5 mL)		
	0.75	3.00	7.50
Bulunan	0.63	2.61	7.25
konsantrasyon	0.66	2.68	7.32
(ng / 0.5 mL)	0.69	2.76	7.34
	0.72	2.77	7.51
	0.75	2.81	7.59
	0.76	2.83	7.63
Ortalama	0.70	2.74	7.44
Standart sapma	0.051	0.083	0.157
Bağıl standart sapma (%)	7.29	3.03	2.12
Verim (%)	93.33	91.33	99.20

Tablo 17 : Farklı günlerde plazmada yapılan amlodipin analizlerinin tekrarlanabilirliği

	Plazmaya katılan amlodipin miktarı (ng / 0.5 mL)		
	0.75	3.00	7.50
Bulunan	0.56	2.52	7.31
konsantrasyon	0.59	2.57	7.36
(ng / 0.5 mL)	0.61	2.61	7.51
	0.66	2.72	7.58
	0.68	2.79	7.62
	0.72	2.88	7.75
Ortalama	0.64	2.68	7.52
Standart sapma	0.060	0.139	0.165
Bağıl standart sapma (%)	9.46	5.17	2.19
Verim (%)	85.33	89.33	100.27

4.1.3. Geliştirilen Yöntem İle Tabletlerde Amlodipin Tayini ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

5 mg amlodipin baz içeren Norvasc[®] tabletler ile Bölüm 3.4.1. ve 3.4.2. de anlatıldığı gibi geliştirilen HPLC yöntemi ve UV- spektrofotometrik yöntem (3) ile analiz edildi. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar ve 6 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{x}), standart sapma (s), bağıl standart sapma ($s/\bar{x}.100$) ve % 95 olasılık düzeyinde güven aralığı [$\bar{x} \pm (t.s / \sqrt{n})$] değerleri Tablo 18 de görülmektedir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemiyle elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması student (t), standart sapmalar yönünden karşılaştırılması Fisher (F) testi uygulanarak yapıldı. Tablo 18 in incelenmesinden de anlaşılacağı gibi hesaplanan t- ve F- değerleri %95 olasılık düzeyi ve 6 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen HPLC yöntemi ile kıyas yöntemi arasında gerek doğruluk gerek kesinlik dereceleri yönünden anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Tablo 18 : 5 mg amlodipin içeren tabletlerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi

n	Geliştirilen HPLC Yöntemi		UV-Spektrofotometrik Yöntem	
	mg / tablet	%	mg / tablet	%
1	4.89	97.76	4.95	99.00
2	5.00	100.00	5.01	100.20
3	5.01	100.16	5.01	100.20
4	5.02	100.40	5.04	100.80
5	5.04	100.80	5.07	101.40
6	5.08	101.60	5.07	101.40
\bar{x}	5.01	100.12	5.03	100.50
s	0.06		0.05	
$s / \bar{x} \cdot 100$	1.27		0.91	
$t \cdot s / \sqrt{n}$	0.06		0.05	
Güven sınırları	4.95 - 5.07		4.98 - 5.08	
t = 0.47	$n_1 = n_2 = 6$		$t_{\text{tablo}} = 2.23$	
F = 1.96	P = 0.05		$F_{\text{tablo}} = 5.05$	

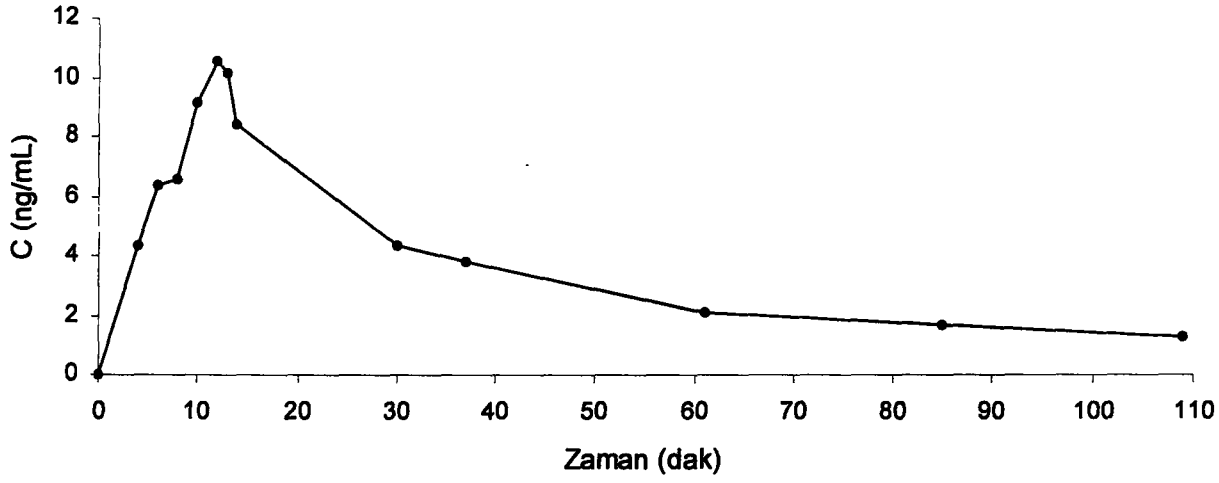
4.1.4. Geliştirilen Yöntem İle Plazmada Amlodipin Tayini ve Farmakokinetik Parametreler

Sağlıklı bir gönüllü tarafından 10 mg lık tek bir doz amlodipin içilmesinden sonra çeşitli zaman aralıklarında alınan kan örnekleri Bölüm 3.5 ve 3.3.2.5 de anlatıldığı gibi analiz edildi (n = 4). Bu örneklerin içerdiği amlodipin miktarı, 0.01-0.14 ng/20µL ve 0.12-0.72 ng/20µL plazma konsantrasyon aralıklarında hazırlanan ölçü eğrilerine ait doğru denklemleri yardımıyla tayin edildi (Tablo 19).

Plazma amlodipin konsantrasyonunun zamana karşı değişimini gösteren eğrinin (Şekil 13) incelenmesinden anlaşıldığı gibi ilaç alımından 12 saat (t_{maks}) sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ($C_{maks} = 10.60$ ng/mL) ulaşılmaktadır, eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) 40.7 saat ve eğri altında kalan alan (AUC) 258.68 ngxsaat/mL olarak hesaplanmıştır (Tablo 20). Şekil 14 de amlodipin tablet içilmesinden 8 saat sonra alınan kan örneğinin analizi sonucu elde edilen kromatogram görülmektedir.

Tablo 19 : Plazma amlodipin konsantrasyonunun zamana karşı değişimi

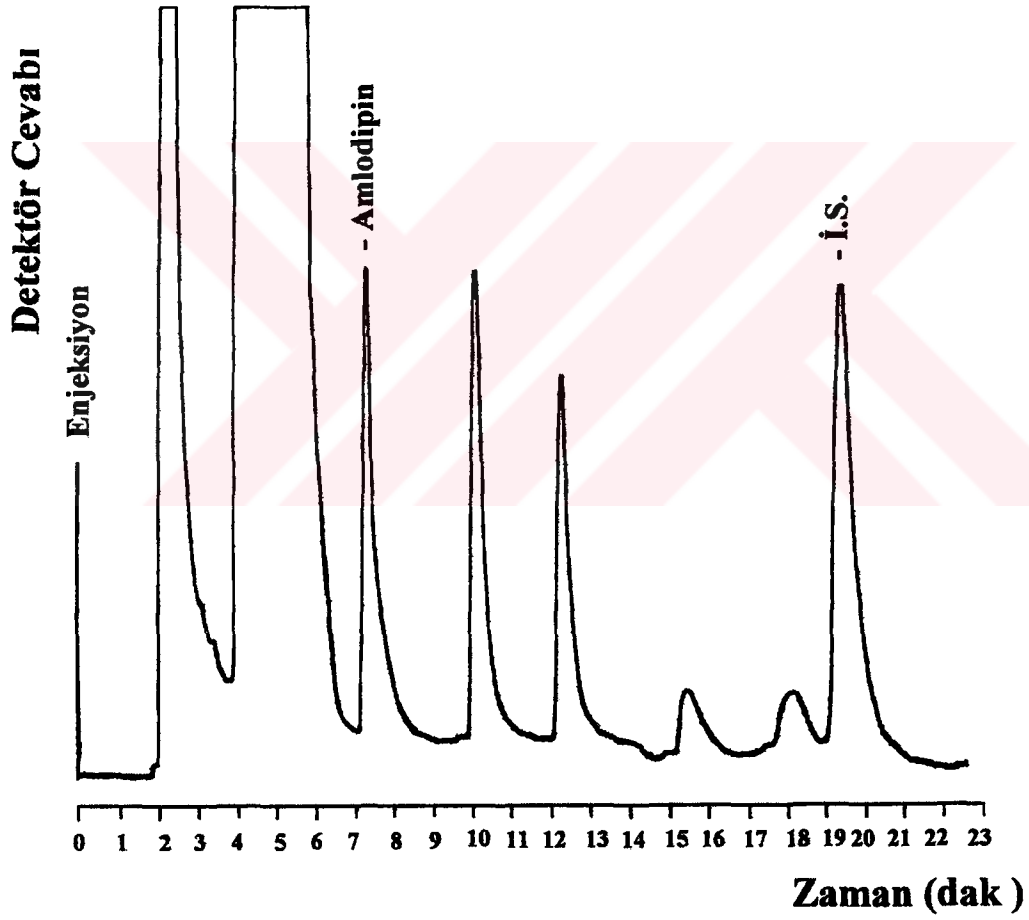
Zaman (saat)	Plazma amlodipin konsantrasyonu (ng / mL)
4	4.32
6	6.40
8	6.56
10	9.18
12	10.60
13	10.16
14	8.44
30	4.32
37	3.77
61	2.12
85	1.70
109	1.29



Şekil 13 : Plazma amlodipin konsantrasyonunun zamana karşı değişimi

Tablo 20 : Amlodipin tablet içilmesinden sonra hesaplanan farmakokinetik parametreler

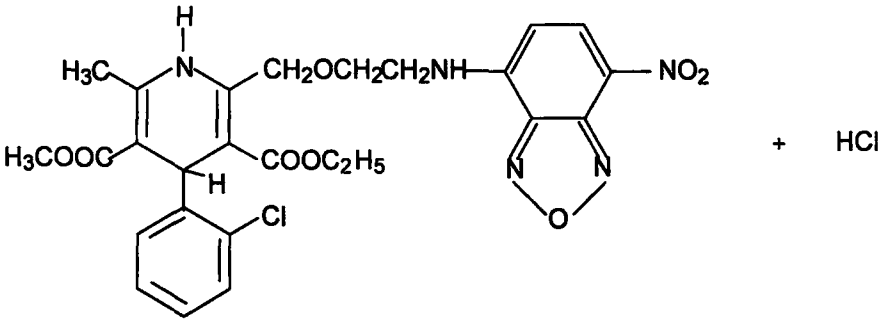
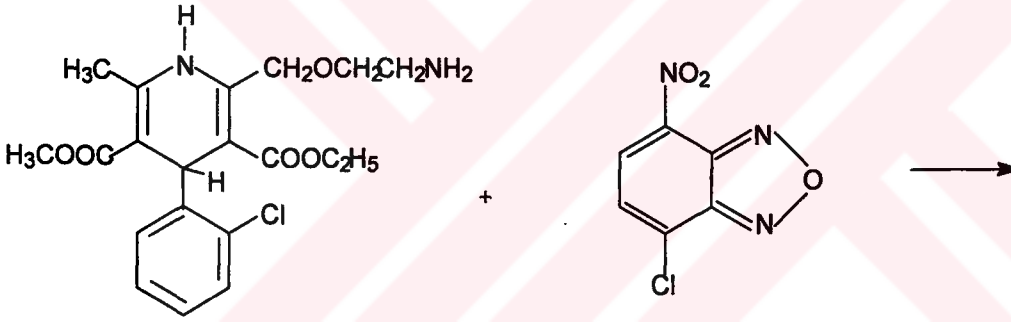
C_{maks} (ng / mL)	10.60
t_{maks} (saat)	12
$t_{1/2,\beta}$ (saat)	40.7
AUC (ng x saat / mL)	258.68



Şekil 14: Tek doz amlodipin içmiş sağlıklı bir gönüllünün 8 saat sonraki plazma örneğine ait kromatogram (Örnek 75 ng/mL internal standart içermektedir)

5. TARTIŞMA

Farmasötik preparatlarda ve plazmada amlodipin tayini için geliştirilen HPLC yöntemi, alifatik primer amin grubu içeren bu madde ile NBD-Cl arasındaki nükleofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonuna dayanmaktadır.



NBD-Cl primer ve sekonder aminlerle şiddetli fluoresans gösteren türevler oluşturur ve kendisi fluoresans göstermez. Belirteç aşırısının tayine zarar

vermemesi, reaksiyonunun sulu ortamda ve çok az miktarda aminle yürümesi bu belirtecin önemli bir avantajıdır.

Yapılan ön denemelerde amlodipin besilat çözeltisiyle çalışılarak elde edilen türevlerin floresans şiddetinin düşük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle amlodipin besilat 0.1 N NaOH ile bazikleştirildikten sonra elde edilen amlodipin baz, n-heptan-isopropil alkol (99:1) çözücü karışımına ekstre edildi. Organik fazın çözücüsü uçurulduktan sonra kalıntı türevlendirildi. Bu şekilde yapılan çalışmalar sonucunda hem verimin hem de analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin büyük oranda arttığı belirlendi.

NBD-Cl ile aminler arasındaki reaksiyonun alkali pH larda, sıcakta yürüdüğü ve oluşan ürünün genellikle reaksiyon ortamı asitlendirildikten sonra organik bir çözücüye ekstre edildiği daha önce bu belirteç ile yapılan araştırmalarda belirtilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda amlodipin-NBD türevinin kantitatif olarak elde edilebilmesi için en uygun reaksiyon koşulları araştırıldı. En iyi sonuçlar pH 8.5 borat tamponuyla çalışıldığında gözlemlendi. Optimum sıcaklık ve reaksiyon süresini saptamak amacıyla 50, 60, 70 ve 80°C de 10-80 dakika arasında çalışıldı ve amlodipin ile NBD-Cl arasındaki reaksiyonun tamamlanması için 70°C de 30 dakika süreyle ısıtmanın yeterli olduğu belirlendi. Reaksiyon oda temperaturünde yürümekte, 50°C de çalışıldığında 80 dakikada bile tamamlanamamaktadır. 80°C de reaksiyon süresi çok kısılmasına karşın türevin dayanıklılığı azalmaktadır. Türevin kantitatif oranda oluşması için gerekli belirteç miktarı NBD-Cl/amlodipin mol oranı olarak incelendiğinde 100 kat belirtecin yeterli olduğu görüldü.

Oluşan ürünün sulu çözeltiden ekstraksiyonu için reaksiyon ortamı 0.1 N HCl ile asitlendirildikten sonra çeşitli organik çözücüler denendi ve en yüksek floresans şiddeti etilasetat ile elde edildi. Bu çözücü içinde türeve ait maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 462 ve 532 nm dir. Bu değerler HPLC analizlerinde floresans detektörde belirlenen dalga boyları $\lambda_{eks} = 459 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ ile uyumludur.

Amlodipin-NBD nin dayanıklılığı araştırıldığında, etilasetat içinde +4°C de karanlıkta 24 saat dayanıklı kalırken, oda temperaturünde karanlıkta ve gün ışığında 24 saat bekletildiğinde fluoresans şiddetinin sırasıyla % 6.5 ve % 51.2 oranında azaldığı gözlenmiştir.

NBD türevlerinin HPLC yöntemiyle analizlerinde genellikle ters fazlı sistemler kullanıldığından amlodipin-NBD nin analizi için öncelikle bu sistemin koşulları araştırıldı. Mobil fazın seçiminde İTK ile yapılan ön denemelerde amlodipin-NBD türevi C₁₈ stasyonier faz kaplı plaklarda, çeşitli çözücü sistemleriyle kromatografi edildi. Bu incelemeler doğrultusunda yapılan sıvı kromatografik çalışmalarda en uygun mobil faz sisteminin metanol-su (80:20) olduğu belirlendi. Bu mobil faz sisteminde, µ-Bondapak C₁₈ kolonda ve 0.8 ml/dak akış hızında çalışıldı. Fluoresans detektörde türeve ait maksimum eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 459 nm ve 528 nm olarak saptandı. Internal standardı belirlemek amacıyla denenen maddeler arasında en uygununun nortriptilin hidroklorür olduğu gözlenmiştir. Diğer maddelere ait türevler kromatogramda ya amlodipin-NBD ile, ya da plazmada NBD-Cl ile reaksiyona giren maddelerle girişim yapmıştır. Nortriptilin-NBD nin alıkonma zamanı (19 dakika), amlodipin-NBD ninkine (7 dakika) kıyasla biraz uzundur. Fakat plazma örneklerinin analizinde elde edilen kromatogramda yaklaşık 19 dakikada tamamlanmaktadır ve nortriptilin-NBD ye ait pik kromatogramda alıkonma zamanı en uzun olan pikin hemen yanında çıkmaktadır.

Kromatogramların değerlendirilmesinde, özellikle nortriptilin-NBD ye ait pikin biraz geniş olması nedeniyle pik alanlarının hesaplanmasının daha uygun olacağı düşünüldü ve amlodipin-NBD ye ait piklerin alanı, nortriptilin-NBD ye ait piklerin alanına oranlandı.

Belirlenen optimum koşullarda çalışılarak iki farklı ölçü eğrisi hazırlandı ve HPLC ye injekte edilen çözeltideki (20 µL) amlodipin-NBD ye eşdeğer amlodipin baz konsantrasyonları ile pik alanları oranları arasındaki doğrusal ilişkinin 0.04-

0.20 ng/20 μ L ve 0.12-0.72 ng/20 μ L konsantrasyon aralıklarında olduğu belirlendi. Bu konsantrasyon aralıklarında bağıl standart sapma değerleri % 0.95 ile % 5.27 arasında değişmektedir.

Amlodipin besilat içeren tabletlerin geliştirilen bu yöntemle analizinden elde edilen sonuçlar, UV- spektrofotometrik yöntemle (3) elde edilen sonuçlarla % 95 olasılık düzeyinde ve 6 deneme üzerinden standart sapmalar yönünden F-testi, ortalamalar yönünden t-testi uygulanarak istatistiksel olarak kıyaslandığında her iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Yapılan araştırmalarda amlodipinin henüz farmakopelerde kaydına rastlanmamıştır. Bu nedenle ofisiyal bir yöntemde kıyaslama yapılamadı. Farmasötik preparatlarda amlodipin tayini için literatürde bildirilen analiz yöntemleri incelendiğinde gerek spektrofotometrik (21-24) gerek bu maddenin doğal floresans göstermesine dayanan fluorimetrik (25) ve fluorodansitometrik (26) çalışmaların duyarlılığının geliştirilen yönteminkine kıyasla oldukça az olduğu görülmektedir. Literatürde kayıtlı HPLC yöntemleriyle (28-31) kıyaslandığında bu tezde bildirilen yöntemde ilk kez floresans detektör kullanılmaktadır. Dolayısıyla UV detektörle yapılan bu çalışmalara göre duyarlık daha fazladır.

Amlodipin tayini için geliştirilen HPLC yöntemi, bu maddenin plazmada analizine de uygulanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde öncelikle plazma proteinlerini çöktürmek ve verimi arttırmak amacıyla çeşitli ön denemeler yapıldı. Bunun için plazma proteinleri ya metanol ile çöktürülüp üstteki berrak sıvı kısım analiz edildi, ya da pH 7 fosfat, pH 10 borat ve 0.1 N NaOH çözeltileriyle proteinler çöktürüldükten sonra sulu çözeltiden ekstraksiyon yapıldı. Bu amaçla etilasetat ve n-heptan-isopropil alkol (99:1) çözücü karışımı kullanıldı. Bu çalışma sonucunda en yüksek verim ve tekrarlanabilirlik plazma proteinlerinin 0.1 N NaOH çözeltisiyle çöktürülmesini takiben n-heptan-isopropil alkol (99:1) çözücü karışımı ile yapılan ekstraksiyon işlemi ile elde edildi. Gerek sulu çözeltide gerek plazmada yapılan analizlerde baziklendirmeden sonraki sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemin duyarlılığın

artmasına büyük ölçüde katkıda bulunduğu gibi bu işlem aynı zamanda kromatogramda girişim yapan maddelerin azalmasını da sağlamıştır.

Amlodipin besilat katkılı plazma örnekleri proteinlerin çöktürülmesinden ve ekstraksiyon çözücüsünün uçurulmasından sonra sulu çözeltide belirlenen en uygun koşullarda NBD-Cl ile reaksiyona sokuldu. Ancak, plazmada belirteç ile reaksiyona girebilecek amin ve amino asitler gibi maddeler bulunduğu için, sulu çözeltideki çalışmalarda kullanılanlardan daha fazla belirteç ile çalışıldı. Reaksiyon ortamından asit pH da etilasetat ile ekstraksiyon işleminden sonra katı-faz ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla laboratuarda hazırlanan küçük silika jel sütunlar (10x70 mm) kullanıldı. Bu işlemle amlodipin-NBD, belirteç ile reaksiyon veren plazmadaki diğer maddelerin bir kısmından ve belirteç aşırısından ayrılmış oldu. Amlodipin içermeyen plazma örneği ile elde edilen kromatogramda amlodipin-NBD ve nortriptilin-NBD türevlerine ait piklerin alıkonma zamanlarında herhangi bir pik gözlenmedi.

Ölçü eğrisi hazırlanması çalışmalarında belirli miktarlarda amlodipin ve internal standart katılmış 0.5 mL plazma örnekleri analiz edildi. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre 0.01-0.14 ng/20 µL ve 0.12-0.72 ng/20 µL amlodipin baza eşdeğer amlodipin-NBD çözeltileriyle çalışıldığında konsantrasyon ile pik alanları oranı arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlendi. Bu konsantrasyon aralıkları 0.25-3.5 ng/mL ve 3-18 ng/mL plazma amlodipin konsantrasyonuna eşdeğerdir. Çalışma koşullarında tayin edilebilen minimum amlodipin miktarı 0.125 ng/mL dir.

Amlodipinin plazmadan ortalama geri kazanılabilme oranı, 0.12-0.72 ng/20 µL konsantrasyon aralığında plazmadan ve sulu çözeltiden elde edilen ölçü eğrilerinin eğimleri oranlanarak hesaplanmıştır. % 89.53 gibi yüksek bir verimle çalışılması yöntemin duyarlılığını arttırmaktadır.

Geliştirilen yöntemin kesinlik derecesini belirlemek üzere aynı gün içinde ve farklı günlerde düşük (1.50 ng/mL), orta (6.00 ng/mL) ve yüksek (15.00 ng/mL)

konsantrasyonlarda amlodipin içeren plazma örnekleri 6 kez analiz edildi. Aynı gün içinde yapılan çalışmaların bağıl standart sapmaları 1.50 ng/mL ve 6.00 ng/mL konsantrasyonlardaki örnekler için sırasıyla % 7.29 ve % 3.03 dür, bu değerler farklı günlerde yapılan analizlerde biraz yükselmiş % 9.46 ve % 5.17 olmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda amlodipin içeren örneklerde ise birbirine yakın bağıl standart sapma değerleri (% 2.12 ve % 2.19) hesaplanmıştır. Bu değerler geliştirilen yöntem ile elde edilen analiz sonuçlarının tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Plazmada amlodipin tayini için geliştirilen HPLC yöntemi farmakokinetik çalışmalara başarıyla uygulandı. Bu amaçla sağlıklı bir gönüllü tarafından 10 mg lık tek bir doz amlodipin içilmesinden sonra belirli zamanlarda alınan kan örnekleri analiz edildi. Konsantrasyon zaman eğrisinin incelenmesiyle elde edilen farmakokinetik parametreler literatür bilgileriyle uygunluk göstermektedir.

Biyolojik örneklerde amlodipin tayini için bildirilen ilk HPLC çalışmasında (9) floresans detektör ($\lambda_{\text{eks}} = 230 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ nm}$) kullanıldığı kayıtlıdır. Bu çalışmaya ait ayrı baskı sağlanamadığından tayin sınırı hakkında bir veri elde edilememiştir, abstrakt bilgilerinden bir türevlendirme yapılmadığı anlaşılmaktadır. Literatür kayıtlarında bu çalışmadan başka fluorimetrik bir HPLC yöntemine rastlanmamıştır.

Geliştirilen yöntem, literatürdeki HPLC yöntemleriyle kıyaslandığında bir çalışma (38) dışında diğerlerinden daha duyarlıdır. Elektrokimyasal detektörün kullanıldığı sıvı kromatografik yöntemde (38) belirtilen tayin sınırı (0.2 ng/mL), geliştirilen yöntemdekiyle (0.25 ng/mL) hemen hemen aynıdır. Bu yöntemde amlodipinin plazmadan geri kazanılma oranı oldukça düşüktür (% 50.2), ayrıca mobil faz olarak sodyumoktansülfonat ve EDTA içeren fosfat tamponu (pH : 3.1)-asetonitril karışımı kullanılmıştır, geliştirilen yöntemde ise metanol-su karışımı ile kolonun yıkanmasına gerek kalmadan çalışılmıştır.

Bu tezde bildirilen yöntemin, insan plazmasında amlodipin analizi için bildirilen yöntemlerden bir üstünlüğü de 0.5 mL plazma örneğiyle çalışılmasıdır. Diğer yöntemlerde genellikle 1 mL (33-35, 37-39) ve daha fazla (32,36) plazma ile çalışılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada tabletlerde ve plazmada amlodipin tayini için tekrarlanabilirliği ve duyarlılığı yüksek yeni bir fluorimetrik HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada amlodipinin plazmadan geri kazanılma oranı yüksektir, türevlendirme ve ekstraksiyon işlemleri fazla zaman almamaktadır. Geliştirilen yöntem gerek rutin farmasötik analizlerde gerek amlodipinin plazma konsantrasyonlarının takibinde ve biyoyararlanım çalışmalarında rahatlıkla önerilebilir.



6. ÖZET

Amlodipin hipertansiyon tedavisinde kullanılan dihidropiridin türevi bir kalsiyum kanal blokeridir. Bu çalışmada amlodipinin tabletlerde ve insan plazmasında tayini için primer ve sekonder aminlerin analizinde spesifik bir belirteç olan 7-kloro-4-nitrobenzodioksazol (NBD-Cl) ile türev oluşumuna dayanan yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC) bir yöntem geliştirildi.

Hem tablet hem plazma örneklerinin analizinde amlodipin besilat çözeltisi üzerine 0.1 N NaOH çözeltisi ilave edildi ve amlodipin baz n-heptan-isopropil alkol (99:1) çözücü karışımına ekstre edildi. Bu işlem ile ayrıca plazma proteinleri de çöktürüldü ve plazmadaki girişim yapan maddelerin bir kısmı ayrıldı. Organik fazın azot akımında, 45 °C de uçurulmasından sonra kalıntı türevlendirildi.

Amlodipin ile NBD-Cl arasındaki reaksiyonun optimum koşulları araştırıldığına, reaksiyonun pH 8.5 da, 70 °C de 30 dakika içerisinde, belirteç amlodipin mol oranı 100 olduğunda kantitatif olarak yürüdüğü saptandı. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra türev, asitlendirilmiş reaksiyon ortamından etilasetat ile ekstre edildi. Belirli bir miktar ekstre, susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulduktan sonra, azot akımında 45 °C de yoğunlaştırıldı ve sonra silika jel katı-faz ekstraksiyonu sütunundan geçirildi (Tablet örneklerinin analizinde katı-faz ekstraksiyonu işlemi yapılmadı). Etilasetat ile elüsyondan sonra, çözücü kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntı mobil fazda çözündürüldü. Sıvı kromatografik analiz, μ -Bondapak C₁₈ kolon ve 0.8 mL/dak akış hızında metanol-su (80:20) çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İnjesiyon hacmi 20 μ L idi.

Internal standart olarak nortriptilin hidroklorür kullanıldı. Maddeler, floresans detektör ($\lambda_{\text{eks}} = 459 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$) ile saptandı. Bu koşullar altında amlodipin- ve nortriptilin-NBD türevlerine ait alıkonma zamanları 7 dakika ve 19 dakika olarak belirlendi.

Ölçü eğrileri, konsantrasyon ve pik alanları oranı (amlodipin/internal standart) arasında hazırlandı. Doğrusallık, sulu standart çözeltilerde 0.04 ile 0.72 ng/20 μ L, plazma örneklerinde 0.01 ile 0.72 ng/20 μ L amlodipin konsantrasyonları arasında iki farklı konsantrasyon aralığında gözlemlendi.

Amlodipinin plazmadan ortalama geri kazanılabilirlik oranının, 0.12-0.72 ng/20 μ L konsantrasyon aralığında, % 89.53 olduğu belirlendi.

Üç farklı konsantrasyonda amlodipin katkılı plazma örneklerinin aynı gündeki analiz sonuçlarının (n=6) tekrarlanabilirlikleri % 2.12-7.29 arasında bulundu. Aynı analizlerin farklı günlerde yapılmasıyla elde edilen sonuçların tekrarlanabilirlikleri ise % 2.19-9.46 arasındadır.

Geliştirilen yöntem tabletlerde amlodipin besilat miktar tayinine uygulandı. Tabletlerdeki ilaç miktarı 0.12-0.72 ng/20 μ L konsantrasyon aralığında, standart amlodipin çözeltileriyle hazırlanan ölçü eğrisinin doğru denkleminde hesaplandı. Sonuçlar UV-spektrofotometrik yöntem ile elde edilen sonuçlarla t- ve F- testleri kullanılarak istatistiksel olarak kıyaslandı. İki yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden % 95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark bulunmadı.

Önerilen HPLC yöntemi ayrıca plazmada amlodipin miktar tayinine uygulandı. İlaç konsantrasyonları plazma örneklerinden hazırlanan her iki ölçü eğrisine ait doğru denklemlerinden hesaplandı. Sağlıklı bir gönüllüye oral olarak 10 mg lık tek bir doz amlodipin verildiğinde 10.60 ng/mL maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{maks}) 12 saatte (t_{maks}) ulaşıldı. İlacın eliminasyon yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) 40.7 saat ve eğri altında kalan alan (AUC) 258.68 ngxsaat/mL olarak belirlendi.

7. SUMMARY

Amlodipine is a calcium channel blocking agent of the dihydropyridine derivative which is used in treatment of hypertension. In this study, a high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the determination of this drug in tablets and human plasma by means of the derivative formed with 7-chloro-4-nitrobenzodioxazole (NBD-Cl) which is a specific reagent in the analysis of primary and secondary aliphatic amines.

In the analysis of both tablet and plasma samples, 0.1 N NaOH solution was added to amlodipine besylate solution and the amlodipine base obtained was extracted with n-heptan-isopropil alcohol (99:1) solvent mixture. Furthermore, by this treatment the plasma proteins were also precipitated and some of the interfering substances in plasma were separated. After the organic layer was evaporated to dryness under nitrogen at 45°C, the residue was derivatised.

Optimum conditions of the reaction between amlodipine and NBD-Cl were investigated. It was found that the reaction proceeds quantitatively at pH 8.5 and 70°C in 30 min. when the mole ratio of the reagent to amlodipine is 100. After completion of the reaction, the derivative was extracted from the acidified reaction medium with ethylacetate. An aliquot of extract was condensed under nitrogen at 45°C after drying on anhydrous sodium sulphite and then passed through silica gel solid-phase extraction column (In the analysis of tablet samples no solid-phase extraction was processed). After elution with ethylacetate, the solvent was evaporated to dryness and the residue was dissolved in mobil phase. The liquid

chromatographic analysis was performed using μ -Bondapak C₁₈ column and methanol-water (80:20) solvent system at 0.8 mL/min flow rate. Nortriptyline hydrochloride was used as an internal standard. The substances were detected by a fluorescence detector ($\lambda_{\text{eks}}=459$ nm, $\lambda_{\text{em}}=528$ nm). The retention times of amlodipine- and nortriptyline-NBD derivatives were found to be 7 min and 19 min respectively.

Calibration curves were obtained by plotting the concentration against the peak area ratio (amlodipine/internal standard). The linearity was observed at two different concentration ranges between 0.04 and 0.72 ng/20 μ L amlodipine in aqueous standard solutions and between 0.01 and 0.72 ng/20 μ L amlodipine in plasma samples.

Mean recovery of amlodipine from plasma was determined to be 89.53 % in the concentration range 0.12-0.72 ng/20 μ L.

The within day reproducibilities were found to be 2.12-7.29 % by analysis of plasma samples spiked with amlodipine at three different concentrations (n=6) on the same day. Day-to-day reproducibilities were found to be 2.19-9.46 % by the same analysis, only on different days.

The developed method was applied to the determination of amlodipine besylate in tablets. The drug content in tablets was calculated from the regression equation of the calibration curve prepared from standard amlodipine solutions in concentration range 0.12-0.72 ng/20 μ L. The results were compared statistically with those obtained by the UV-spectrophotometric method using t- and F-tests. There was no significant difference between the two methods in the respect of mean values and standard deviations at 95 % confidence level.

The proposed HPLC method was also applied to the determination of amlodipine in plasma. The drug concentrations were calculated from the regression equations both of the calibration curves prepared from plasma

samples. After a single oral dose administration 10 mg of amlodipine to a healthy volunteer, a maximum plasma concentration (C_{max}) of 10.60 ng/mL was reached at 12 hours (t_{max}). The elimination half-life of the drug ($t_{1/2}$) and the area under the curve were found to be 40.7 hours and 258.68 ngxh/mL respectively.



8. KAYNAKLAR

1. The Merck Index, Rahway N. J., Eleventh Edition, Merck & CO. (1989).
2. Aiker, D., Cross, P. E., Campbell, S. F., Dihydropyridine anti - ischemic and antihypertensive agents, Eur. Pat. Appl. EP 119.050, (1984). -Ref : Chem. Abstr., 102 (3), 24492 n (1985).
3. Sanovel İlaç Sanayii ve Ticaret A. Ş. (Özel Görüşme)
4. Çetin G., Bazı antihipertansif ilaçların spektrofotometrik ve sıvı kromatografik analizi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, (1996).
5. Haria, M., Wagstaff, A. J., Amlodipine : a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disease, Drugs, 50 (3), 560 (1995).
6. Kayaalp, O., Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara, Cilt 1, 442 (1998).
7. Videbaek, L. M., Jacobsen, I. A., Crossover comparison of the pharmacokinetics of amlodipine and felodipine ER in hypertensive patients, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther, 35 (11), 514 (1997).
8. Faulkner, J. K., Hayden, M. L., Chasseaud, L. F., Taylor, T., Absorption of amlodipine unaffected by food, solid dose equivalent to solution dose, Arzneim. - Forsch. / Drug Res., 39 (2), 799 (1989).
9. Stopher, D. A., Beresford, A. P., Macrae, P. V., Humphrey, M. J., The metabolism and pharmacokinetics of amlodipine in humans and animals, J. Cardiovasc. Pharmacol. 12 (7), 55 (1988). - Ref : Chem. Abstr., 110 (15), 127951 f (1989). - Ref : Lunn, G., Schmuff, N. R., HPLC methods for pharmaceutical analysis, John Wiley & Sons, New York, 88 (1977).

10. Beresford, A. P., Macrae, P. V., Alker, D., Kobylecki, R. J., Biotransformation of amlodipine: Identification and synthesis of metabolites found in rat, dog and human urine / confirmation of structures by gas chromatography –mass spectrometry and liquid chromatography – mass spectrometry, *Arzneim. – Forsch. / Drug Res.*, **39** (1), 201 (1989).
11. Arrowsmith, J. E., Campbell, S. F., Cross, P. E., Stubbs, J. K., Burges, R. A., Gardiner, D. G., Blackburn, K. J., Long - acting dihydropyridine calcium antagonists. 2 - Alkoxyethyl derivatives incorporating basic substituents. *J. Med. Chem.* **29** (9), 1696 (1986). - Ref : *Chem. Abstr.*, **105**(19), 172250 j (1986).
12. Goldmann, S., Stoltefuss, J., Born, L., Determination of the absolute configuration of the active amlodipine enantiomer as (-)-S : a correction, *J. Med. Chem.* **35** (18), 3341 (1992). - Ref : *Chem. Abstr.*, **117** (18), 171154 s (1992).
13. Luksa, J., Josic, Dj., Kremser, M., Kopitar, Z., Milutinovic, S., Pharmacokinetic behaviour of R-(+)- and S-(-)- amlodipine after single enantiomer administration, *J. Chromatogr. B*, **703**, 185 (1997).
14. Josefsson, M., Carlsson, B., Norlander, B., Fast chromatographic separation of (-)- menthyl chloroformate derivatives of some chiral drugs, with special reference to amlodipine, on porous graphitic carbon, *Chromatographia*, **37** (3-4), 129 (1993).
15. Josefsson, M., Carlsson, B., Norlander, B., Chiral ion - pair chromatographic separation of two dihydropyridines with camphorsulfonic acids on porous graphitic carbon, *J. Chromatogr. A*, **684**, 23 (1994).
16. Tesarova, E., Gilar, M., Hobza, P., Kabelac, M., Deyl, Z., Smolkova - Keulemansova, E., Correlation between structure of dihydropyridine calcium antagonists and their retention behaviour and enantioseparation on the β -cyclodextrin stationary phase in HPLC, *J.- High - Resolut. - Chromatogr.*, **18**(9), 597 (1995). - Ref : *Chem. Abstr.*, **124** (19), 249472 k (1996).
17. Owens, P. K., Fell, A. F., Coleman, M. W., Berridge, J. C., Method development in liquid chromatography with a charged cyclodextrin additive for chiral resolution of rac - amlodipine utilising a central composite design, *Chirality*, **8**, 466 (1996).
18. Owens, P. K., Fell, A. F., Coleman, M. W., Berridge, J. C., Effect of charged and uncharged chiral additives on the resolution of amlodipine enantiomers in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **797**, 187 (1998).
19. Bretnall, A. E., Clarke, G. S., Investigation and optimisation of the use of micellar electrokinetic chromatography for the analysis of six cardiovascular drugs, *J. Chromatogr. A*, **700**, 173 (1995).

20. Gaillard, Y., Pepin, G., Screening and identification of drugs in human hair by high - performance liquid chromatography - photodiode - array UV detection and gas chromatography - mass spectrometry after solid - phase extraction : a powerful tool in forensic medicine, *J. Chromatogr. A*, 762, 251 (1997).
21. Lu, P. R., Bi, X, L., Xie, Y, Z., Improved determination of the homogeneity of the content of luohuoxi tablets, *Yaowu - Fenxi - Zazhi*, 15 (4), 42 (1995). - Ref : *Anal. Abstr.*, 57 (12), G080 (1995).
22. Meyyanathan, S. N., Joel, J., Scaria, S., Sowmya, S., Suresh, B., Simple spectrophotometric analysis of amlodipine besylate, *Indian - Drugs*, 35 (5), 296 (1998). - Ref : *Chem. Abstr.*, 129, 58907 (1998).
23. Reddy, M. N., Rani, G. T., Rao, K. V. S. P., Sankar, D. G., Sreedhar, K., Extractive spectrophotometric determination of amlodipine using Erichrome black - T and Indigo carmine, *Indian J. Pharm. Sci.*, 59 (4), 188 (1997). - Ref : *Chem. Abstr.*, 127 (19), 268117b (1997).
24. Çetin, G., Sungur, S., A spectrophotometric method for the determination of amlodipine in pharmaceutical formulation, *Sci. Pharm.*, 63, 93 (1995).
25. Mohamed, Y. E., Naglaa, M. E., Bahia, A. M., Nashwa, G. M., Fluorimetric determination of amiodarone, amlodipine and propafenone, *Bull. Fac. Pharm.*, 36(1), 1 (1998). - Ref : *Chem. Abstr.*, 129, 193792 (1998).
26. Chandrashekhar, T. G ., Rao, P. S. N ., Smrita, K ., Vyas, S. K., Dutt, C., Analysis of amlodipine besylate by HPTLC with fluorimetric detection : a sensitive method for assay of tablets, *J. - Planar - Chromatogr. - Mod. - TLC*, 7 (6), 458 (1994). - Ref : *Chem. Abstr.*, 122 (8), 89616 p (1995).
27. Ilango, K., Kumar, P. B., Prasad, V. R. V., Simple and rapid high-performance thin-layer chromatographic determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms, *Indian J. Pharm. Sci.*, 59 (6), 336 (1997). - Ref : *Chem. Abstr.*, 128, 184741 (1998).
28. Patki, R. V., Tamhankar, C. P., Tipnis, H. P., Simple and rapid high - performance liquid chromatographic estimation of amlodipine from pharmaceutical dosages, *Indian - Drugs*, 31 (12), 560 (1994). - Ref : *Chem. Abstr.*, 122 (14), 170339 x (1995).
29. Avadhanulu, A. B., Srinivas, J. S., Anjaneyulu, Y., Reverse phase HPLC determination of amlodipine besylate in drug and its pharmaceutical dosage forms, *Indian - Drugs*, 33 (1), 36 (1996). - Ref : *Chem. Abstr.*, 125 (2), 19199 t (1996).

30. Zarapkar, S. S., Kolte, S. S., Rane, S. H., High - performance liquid chromatographic determination of amlodipine and atenolol, simultaneously, from pharmaceutical preparations, *Indian - Drugs*, **34** (6), 350 (1997). - Ref : *Chem. Abstr.*, **127** (7), 99926 g (1997).
31. Halkar, U. P., Bhandari, N. P., Rane, S. H., HPLC simultaneous determination of amlodipine and enalapril maleate, from pharmaceutical preparations, *Indian - Drugs*, **35** (3), 168 (1998). - Ref : *Chem. Abstr.*, **128**, 299631 (1998).
32. Pandya, K. K., Satia, M., Gandhi, T. P., Modi, I. A., Modi, R. I., Chakravarthy, B. K., Detection and determination of total amlodipine by high - performance thin - layer chromatography : a useful technique for pharmacokinetic studies, *J. Chromatogr. B*, **667**, 315 (1995).
33. Beresford, A. P., Macrae, P. V., Stopher, D. A., Wood, B. A., Analysis of amlodipine in human plasma by gas chromatography, *J. Chromatogr. B*, **420**, 178 (1987).
34. Scharpf, F., Riedel, K. D., Laufen, H., Leitold, M., Enantioselective gas chromatographic assay with electron - capture detection for amlodipine in biological samples, *J. Chromatogr. B*, **655**, 225 (1994).
35. Monkman, S. C., Ellis, J. S., Cholerton, S., Thomason, J. M., Seymour, R. A., Idle, J. R., Automated gas chromatographic assay for amlodipine in plasma and gingival crevicular fluid, *J. Chromatogr. B*, **678**, 360 (1996).
36. Yeung, P. K. F., Mosher, S. J., Pollak, P. T., Liquid chromatography assay for amlodipine : chemical stability and pharmacokinetics in rabbits, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9** (7), 565 (1991).
37. Luksa, J., Josic, Dj., Podobnik, B., Furlan, B., Kremser, M., Semi - preparative chromatographic purification of the enantiomers S-(-)- amlodipine and R-(+)- amlodipine, *J. Chromatogr. B*, **693**, 367 (1997).
38. Shimooka, K., Sawada, Y., Tatematsu, H., Analysis of amlodipine in serum by a sensitive high - performance - liquid chromatographic method with amperometric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7** (11), 1267 (1989). - Ref : *Chem. Abstr.*, **112** (13), 111402 h (1990).
39. Josefsson, M., Zackrisson, A. L., Norlander, B., Sensitive high - performance liquid chromatographic analysis of amlodipine in human plasma with amperometric detection and a single - step solid - phase sample preparation, *J. Chromatogr. B*, **672**, 310 (1995).
40. Josefsson, M., Norlander, B., Coupled - column chromatography on a chiral - AGP phase for determination of amlodipine enantiomers in human plasma : an HPLC assay with electrochemical detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15** (2), 267 (1996). - Ref : *Chem. Abstr.*, **125** (25), 316083 v (1996).

41. Yasuda, T., Tanaka, M., Iba, K., Quantitative determination of amlodipine in serum by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **31** (8), 879 (1996). - Ref : *Chem. Abstr.*, **125** (15), 184735 x (1996).
42. Boulton, A. J., Ghosh, P. B., Katritzky, A. R., Rearrangement of 4-arylozo- and 4-nitrosobenzofuroxans: new synthesis of the benzotriazole and benzofurazan Ring systems, *J. Chem. Soc. (B)*, 1004 (1966).
43. Ghosh, P. B., Whitehouse, M. W., 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines, *Biochem. J.*, **108**, 155 (1968).
44. Reisch, J., Alfes, H., Kommert, H. J., 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) for thin-layer chromatographic detection of sulphonamides of the DAB 7, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **245**, 390 (1969).
45. Distler, W., 4-Chloro-7-nitrobenzo-[c]-1,2,5-oxadiazole-a spray reagent for fluorescence detection of amino acids and peptides on TLC, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **309** (2), 127 (1981).
46. Fager, R. S., Kutina, C. B., Abrahamson, E. W., The use of NBD-Cl (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) in detecting amino acids and as an N-terminal reagent, *Anal. Biochem.*, **53**, 290 (1973).
47. Hudson, J.C., Rice, W.P., Rapid detection of some basic drugs by thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.*, **117**, 449 (1976).
48. Dadish, G.L., Wolschann, P., Detection of hydroxyphenylalkylamines using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan. Identification of the reaction products, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **292**, 219 (1978).
49. Reisch, J., Kommert, H. J., Alfes, H., Moellmann, H., Thin-layer chromatography of NBD-derivatives of phenylethylamine compounds, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **247**, 56 (1969).
50. Clasing, D., Alfes, H., Moellmann, H., Reisch, J., Detection of biologically active amines in body fluids by TLC of their NBD derivatives: methamphetamine, *Z. Klin. Chem. Biochem.*, **7**, 748 (1969). - Ref : *Chem. Abstr.*, **72**, 98656 c (1970).
51. Evgen'ev, M. E., Evgen'eva, I. I., Moskva, N. A., Nikolaeva, N. G., Zheltukin, I. A., Budnikov, G. K., Selective spectrophotometric determination of amines with different degree of substitution in mixtures, *Zh. Anal. Khim.*, **48**, (7), 1226 (1993). -Ref : *Chem. Abstr.*, **120** (2), 22852c (1994).
52. Street, K. W., Abrenica, M. B., Spectrophotometric determination of phenylpropanolamine hydrochloride in pharmaceuticals after derivatization with NBD-Cl, *Anal. Lett.*, **19** (5-6), 597 (1986).

53. Saleh, H., Schnekenburger, J., Colorimetric method for the quantitative determination of the antibilharzial drug praziquantel and its application to pharmaceutical preparations, *Analyst*, 117, 87 (1992).
54. Abdelmageed, O. H., Khashaba, P. V., Askal, H. F., Saleh, G. A., Refaat, I. H., Selective spectrophotometric determination of ascorbic acid in drugs and foods, *Talanta*, 42 (4), 573 (1995).
55. Askal, H. F., Abdelmageed, O. H., Khashaba, P.Y., Analytical study of the reaction of certain thio compounds with NBD-Cl, *Egypt. J. Anal. Chem.* 4 (1), 89 (1995). - Ref : *Chem. Abstr.*, 124 (20), 270698 y (1996).
56. Klimisch, H. J., Stadler, L., Microquantitative bestimmung von aliphatischen aminen mit NBD-Cl, *J.Chromatogr.*, 90, 141 (1974).
57. IUPAC Analytical Chemistry Division (UK). *Pure Appl. Chem.* 56 (4), 467 (1984). - Ref : *Chem. Abstr.*, 101(8), 65259 q (1984).
58. De La Pena, L., Gomez-Hens, A., Bendito, D., Kinetic determination of nortriptyline in pharmaceutical samples by use of photometric and fluorimetric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (3), 199 (1995). - Ref : *Chem. Abstr.*, 122, 274222v (1995).
59. Ricci, G., Caccuri, A. M., Bello, M. L., Pastore, A., Piemonte, F., Federici, G., Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, *Anal. Biochem.*, 218, 463 (1994).
60. Turdiu, R., Penner, M. H., Chafetz, L., Reaction of N,3,3-trimethyl-1-phenyl-1-indonpropylamine hydrochloride with 7-chloro-4-nitrobenzofurazan and its application to spectrophotofluorometric assay, *J. Pharm. Sci.*, 63, 78 (1974).
61. Pochtova, M., Kakac, B., Fluorimetric determination of norpseudoephedrine, p-hydroxynorephedrine and phenylephrine hydrochlorides, *Cesk. Farm.*, 29, 191 (1980). - Ref : *Anal. Abstr.*, 40, 4E47 (1981).
62. Ersoy, L., Fluorimetric determination of baclofen, *Analyst*, 110, 881 (1985).
63. Iskender, G., Atmaca, S., A spectrofluorimetric method for the determination of L-lysine hydrochloride in syrups based on reaction with NBD-Cl, *J. Fac. Pharm.*, 22, 1 (1986).
64. Iskender, G., Atmaca, S., Spectrofluorometric determination of tranlylcypromine sulphate in tablets based on reaction with NBD-Cl, *Bull. Hacettepe Fac. Pharm.*, 5, 1 (1985).

65. Iskender, G., Atmaca, S., Spectrofluorometric determination of sodium levothyroxine in tablets based on reaction with NBD-Cl, J. Fac. Pharm. Istanbul, 23, 91 (1987).
66. Iskender, G., Atmaca, S., Spectrofluorometric determination of nortriptyline hydrochloride with NBD-Cl in pharmaceutical dosage forms, J. Fac. Pharm. Univ. Mar., 2, 69 (1986).
67. Iskender, G., Atmaca, S., Spectrofluorometric determination of tranexamic acid in pharmaceutical dosage forms, Pharmazie, 43, 290 (1988).
68. Atmaca, S., Iskender, G., Bayer, E., Spectrofluorimetric determination of aspartame in tablets, Acta. Pharm. Turc., 31, 37 (1989).
69. Atmaca, S., Fluorimetric determination of fluoxetine hydrochloride, Pharmazie, 50 (4), 300 (1995).
70. Valentour, J. C., Monforte, J. R., Sunshine, I., Fluorometric determination of propoxyphene, Clin. Chem., 20, 275 (1974).
71. Becker, R., Fluorimetrische bestimmung von glibornurid in plasma und serum mit 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3- diazol, Arzneim. Forsch., 27, 102 (1977).
72. Monforte, J., Bath, R. J., Sunshine, I., Fluorometric determination of primary and secondary amines in blood and urine after thin-layer chromatography, Clin. Chem., 18, 1329 (1972).
73. Voigt, M. N., Eitenmiller, R. R., Fluorescent quantitation of biologically active amines in foods with 7-chloro-4-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), J. Food Sci., 39, 420 (1974).
74. Lawrence, J. F., Frei, R. W., Fluorogenic labeling of N-methyl- and N,N-dimethyl-carbamates with 4-chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole, Anal. Chem., 44, 2046 (1972).
75. Van Hoof, F., Heyndrickx, A., Thin layer chromatographic-spectrophotofluorimetric methods for the determination of dithio- and thiolcarbamates after hydrolysis and coupling with NBD-Cl, Meded. Fac. Landbouwwetensch., Rijksuniv. Gent, 38, 911 (1973). - Ref : Chem. Abstr., 81, 22122 r (1974).
76. Klimisch, H. J., Stadler, L., Fluorimetrische bestimmung von nitrosaminen nach saurekatalysierter denitrosierung und derivatisierung mit NBD-Cl, J. Chromatogr., 90, 223 (1974).

77. Kabasakalian, P., Kalliney, S., Magatti, A. W., Determination of gentamicin complex components in fermentation broth by in-situ fluorimetric measurements of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, *Anal. Chem.*, **49**, 953 (1977).
78. Kostyukovskii, Y. L., Melamed, D. B., Determination of volatile amines and N-nitroso amines by TLC, *Zh. Anal. Khim.*, **42** (5), 924 (1987). - Ref : *Chem. Abstr.*, **107** (16), 146573 p (1987).
79. Sungur, S., Gürkan, T., Morgil, F. I., Fluorodensitometric determination of metoprolol tartrate after derivatization with NBD-Cl, *J. Pharm. Univ. Mar.*, **2** (2), 139 (1986).
80. Roets, E., Adams, E., Muriithi, I. G., Hoogmartens, J., Determination of the relative amounts of the B and C components of neomycin by thin-layer chromatography using fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, **696**, 131 (1995).
81. Van Hoof, F., Heyndrickx, A., Thin layer chromatographic-spectrophotofluorimetric analysis of amphetamine and amphetamine analogs after reaction 4-chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole, *Anal. Chem.*, **46**, 286 (1974).
82. Monboisse, J. C., Pierrelee, P. B., Quantitation of urinary methylhistidine isomers by a combination of thin-layer and fluorimetric techniques, *J. Chromatogr. B.*, **233**, 355 (1982).
83. Bellon, G., Bisker, A., Maquart, F. X., Thoanes, H., Borel, J. P., Improved method for evaluation of 3-hydroxyproline and 4-hydroxyproline in urine, *J. Chromatogr. B*, **230**, 420 (1982).
84. Bellon, G., Malgras, A., Randoux, A., Borel, J. P., Further improvement of the fluorimetric assay for hydroxyproline, *J. Chromatogr. B*, **278**, 167 (1983).
85. Bellon, G., Lundy, A. M., Malgras, A., Borel, J. P., Fluorimetric evaluation of sarcosine in urine and serum, *J. Chromatogr. B*, **311**, 405 (1984).
86. Ersoy, L., Fluorodensitometric determination of baclofen, *Analyst*, **115**, 1559 (1990).
87. Wolfram, J. H., Feinberg, J. I., Doerr, R. C., Fiddler, W., Determination of N-nitrosoproline at the nanogram level, *J. Chromatogr.*, **132**, 37 (1977).
88. Umagat, H., Kucera, P., Total amino acid analysis using pre-column fluorescence derivatization, *J. Chromatogr.*, **239**, 463 (1982).

89. Sumiyoshi, K., Murakita, H., HPLC analysis of physiological amino acids by automated pre column derivatization method, Shimadzu Hyoron, 47 (3), 295 (1990). - Ref : Chem. Abstr., 115 (3), 25238 g (1991).
90. Sumiyoshi, K., Murakita, H., Yagi, T., Simultaneous determination of primary and secondary amino acids by HPLC with pre column derivatization, Kuromatogurafi, 14 (2), 33 R (1993). - Ref : Chem. Abstr., 119(8), 85055 v (1993).
91. Ahnoff, M., Grundevik, I., Artwidsson, A., Fonselius, J., Persson, B., Derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan for liquid chromatographic determination of hydroxyproline in collagen hydrolysate, Anal. Chem., 53 (3), 485 (1981).
92. Lindblad, W. J., Diegelmann, R. F., Quantitation of hydroxyproline isomers in acid hydrolysates by high performance liquid chromatography, Anal. Biochem., 138, 390 (1984). - Ref : Chem. Abstr., 101, 19962 r (1984).
93. Bellon, G. H., Malgras, A., Chastang, F., Borel, J. P., Evaluation of the hydroxyproline isomers in blood serum, Clin. Chim. Acta., 143 (3), 309 (1984). - Ref : Chem. Abstr., 102 (1), 2821 s (1985).
94. Sessa, W. C., Rodgers, Jr., R. L., Chichester, C. O., Quantification of collagen synthesis by reversed phase high performance liquid chromatography utilizing NBD-Cl, J. Chromatogr. B, 382, 258 (1986).
95. Campa, J. S., Cambrey, A. D., Mc Anulty, R. J., Laurent, G. J., Measurement of fibroblast collagen synthesis and degradation by reverse-phase high-pressure liquid chromatography, Biochem. Soc. Trans., 17 (6), 1127 (1989). - Ref : Chem. Abstr., 111 (15), 130040 j (1989).
96. Yoshida, H., Sumida, T., Masujima, T., Imai, H., Post column fluorometric detection of amino acids with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) -a sensitive method especially suitable for proline and hydroxyproline, J. High Resolut. Chr. Commun., 5 (9), 509 (1982). - Ref : Chem. Abstr., 97 (26), 229490 k (1982).
97. Ozaki, A., Shibasaki, T., Mori, H., Specific proline and hydroxyproline detection method by post-column derivatization for high-performance liquid chromatography, Biosci., Biotechnol., Biochem., 59 (9), 1764 (1995). - Ref : Chem. Abstr., 123 (19), 250315 x (1995).
98. Welch, R. W., Acworth, I., Levine, M., Coulometric electrochemical detection of hydroxyproline using 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, Anal. Biochem., 210 (1), 199 (1993). - Ref : Chem. Abstr., 118 (21), 208825 k (1993).

99. Besenfelder, E., Glibenclamide in serum : HPLC determination with pre-column derivatization, *J. High Resolut. Chr. Chr. Commun.*, 4 (5), 237 (1981). - Ref : *Chem. Abstr.*, 95 (11), 90686 s (1981).
100. Schweitzer, C., Spahn, H., Mutschler, E., Fluorimetric determination of fluvoxamine or clovoxamine in human plasma after thin-layer chromatographic or high-performance liquid chromatographic separation, *J. Chromatogr.*, 382, 405 (1986).
101. Tosunoğlu, S., Ersoy, L., Determination of baclofen in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Analyst*, 120, 373 (1995).
102. Atilla, Ö., Netilmisin sülfatın 4-kloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ile yüksek basınçlı sıvı kromatografik miktar tayini, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, (1996).
103. Tirendi, S., Lancetta, T., Bousquet, E., Estrogens determination in urine by RP-HPLC with UV- detection, *Farmaco*, 49 (6), 427 (1994).
104. Rooselaar, J., Liem, D. H., High pressure liquid chromatography determination of thioglycolic acid in cold wave fluids and depilating creams, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 3 (1), 37 (1981). -Ref : *Chem. Abstr.*, 94 (22), 180484 h (1981).
105. Murray, G. M., Sepaniak, M. J., HPLC laser fluorometric determination of amines in beer, *J. Liq. Chromatogr.*, 6 (5), 931 (1983). - Ref : *Chem. Abstr.*, 99 (3), 20853 c (1983).
106. Nishikawa, Y., Kuwata, K., Liquid chromatographic determination of low molecular weight aliphatic amines in air via derivatization with NBD-Cl, *Anal. Chem.*, 56, 1790 (1984).
107. Nishikawa, Y., Kuwata, K., Liquid chromatographic determination of low molecular weight alkylthiols in air via derivatization with NBD-Cl, *Anal. Chem.*, 57 (9), 1864 (1985).
108. Kaneko, T., Ohta, Y., Machida, Y., Sensitive analysis of aminophospholipids with precolumn fluorescent derivatization by HPLC, *Agric. Biol. Chem.*, 51(7), 2023 (1987). - Ref : *Chem. Abstr.*, 107 (15), 130198 j (1987).
109. Whiteside, I. R. C., Worsfold, P. J., Flow injection determination of secondary amines in non aqueous solution with fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta.*, 204, 343 (1988).

110. Whiteside, I. R. C., Worsfold, P. J., Determination of alkylamines by high-performance liquid chromatography with post column fluorescence derivatization, *Anal. Chim. Acta.*, 212, 155 (1988).
111. Wise, E. T., Singh, N., Hogan, B. L., Argon laser induced fluorescence detection in sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoretic separations of proteins, *J. Chromatogr. A*, 746, 109 (1996).
112. Preston, L. M., Weber, M. L., Murray, G. M., Micellar electrokinetic capillary chromatography with laser induced fluorimetric detection of amines in beer, *J. Chromatogr. B*, 695, 175 (1997).
113. Nieto, O., Hernandez, P., Hernandez, L., Use of NBD-Cl as a derivative reagent for the determination of amino acids by cathodic stripping square wave voltammetry in biological fluids, *Talanta*, 43 (8), 1281 (1996). - Ref : Chem. Abstr., 125 (13), 162554 k (1996).



9. ÖZGEÇMİŞ

19.12.1969 tarihinde doğdum. İlk öğrenimimi Sancaktar Hayrettin İlkokulu, orta öğrenimimi Kocamustafapaşa Lisesinde tamamladım.

1987 yılında Yıldız Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü kazandım ve 1991 haziran döneminde mezun oldum.

1991 de İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans çalışmalarına başladım.

1992 de aynı kürsüde Araştırma Görevliliği sınavını kazandım.

1993 de Yüksek Lisans tezimi tamamladım.

1994 ten itibaren aynı kürsüde Doktora çalışmalarına başladım.

Halen Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda aynı görevime devam etmekteyim.