

**NEBİVOLOL'ÜN KAPİLER  
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE  
TABLETLERİNDE MİKTAR TAYİNİ**

**Zeynep Oktayer**

Yüksek Lisans Tezi

**NEBİVOLOL'ÜN KAPİLER  
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE  
TABLETLERİNDE MİKTAR TAYİNİ**

**Zeynep Oktayer**

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Eylül 2010

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK

## Jüri ve Enstitü Onayı

Zeynep Oktayer'in "Nebivolol'ün Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tabletlerinde Miktar Tayini" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi,.....tarhinde, aşğıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	..... .....Üniversitesi	.....
Üye	..... .....	.....
Üye	..... .....	.....
Üye	..... .....	.....
Üye	..... .....	.....

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Zeynep Oktayer  
Doğum tarihi ve yeri : 1985, Eskişehir  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekâr  
İletişim adresleri : Akarbaşı Mah. Akyıl Sk. No:72/2 ESKİŞEHİR  
e-posta : zoktayer@anadolu.edu.tr

### Eğitim Durumu

İlkokul : Murat Atılğan İlkokulu, Eskişehir, 1995  
Ortaokul : Eskişehir Anadolu Lisesi, Eskişehir, 1999  
Lise : Eskişehir Anadolu Lisesi, Eskişehir, 2002  
Üniversite : Marmara Üniversitesi Eğitim Fakültesi,  
Kimya Öğretmenliği Bölümü, İstanbul, 2008  
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Analitik Kimya ABD, Eskişehir, 2010  
Yabancı dil : İngilizce

### Yayınlar

#### **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler**

Oktayer, Z., Dal, A.G., Doğrukol-Ak, D., Piroksikamın Kapiler Elektroferez ile Miktar Tayini, Validasyonu ve Yöntemin Tabletlere Uygulanması, V. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Erzurum, Türkiye.

#### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler**

Oktayer, Z., Doğrukol-Ak, D., Determination of Nebivolol Hydrochloride in Tablets Using Capillary Electrophoresis with UV Detection, Drug Analysis 2010, 21-24 Eylül 2010, Antwerp, Belçika.

#### **Diğer Sanatsal Etkinlikler**

9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-9), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 23-26 Haziran 2009, Ankara, Türkiye.

## ÖNSÖZ

Tez çalışmasında, antihipertansif bir ajan olan nebivololün tabletlerinde miktar tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirildi ve geçerliliği gösterildi. Diğer yöntemlere göre oldukça düşük hacimlerle çalışıldı. Bu sayede numune sarfiyatı azaltılmış oldu. Deneyler sırasında ufak yüzey problemleri dışında herhangi bir soruna rastlanmadı.

Kapiler elektroforez basit, doğru, kesin, hızlı ve ucuz bir yöntemdir ve nebivololün tabletlerindeki miktar tayini için önerilmektedir.

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

Bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarımı her zaman destekleyen, her konuda yol gösteren Sayın Hocam Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL’e,

Yüksek lisans sürem boyunca bendeki emeği için minnet borçlu olduğum, her zaman yanımda olan, sabır ve hoşgörüsüyle bugünlere gelmemde çok büyük katkısı olan değerli hocam Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL-AK’a,

Varlığıyla her an güç veren, birlikte geçirdiğimiz zamanların giderek daha da anlam kazandığı dostum ve sevgili hocam Araş. Gör. Dr. Arın Gül DAL’a,

Tez deneylerim sırasında laboratuvar zamanlarımızı paylaştığımız, her zaman moral veren, her türlü yardımına koşan hocalarım Araş. Gör. Dr. Erol ŞENER ve Araş. Gör. Dr. Duygu YENİCELİ’ye,

Yüksek lisansım boyunca verdikleri desteği hiçbir zaman unutmayacağım hocalarım Prof. Dr. Kadriye BENKLİ, Yar. Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN ve Öğr. Gör. Dr. İlham ERÖZ POYRAZ’a,

Bize bıraktığı en büyük miras olan dürüstlikle, her zaman dürüst olmayı, emek vererek kazanmayı öğreten canım dedem Selahattin AKTAŞ’a,

Beni bugünlere getiren ailem ve her zaman yanımda olan Özkan ÇOLAK’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## NEBİVOLOL'ÜN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TABLETLERİNDE MİKTAR TAYİNİ

### ÖZET

Nebivolol üçüncü nesil beta bloker ajandır ve hipertansiyon tedavisi için kullanılır. Bu çalışmada basit, doğru ve hızlı bir kapiler elektroforez yöntemi nebivolol hidroklorür'ün tablet dozaj formunda tayini için geliştirilmiştir. İç standart olarak 3-4 dihidroksibenzil amin kullanılmıştır. Tampon derişimi, tampon pH sı, organik çözücü miktarı ve tampon tipi sistematik olarak araştırılmış ve nebivolol tayini için en uygun koşullar belirlenmiştir. Bu koşullar çalışma tamponu için %10 metanol (h/h) içeren 40 mM sodyum asetat ve 66 mM glasiyel asetik asit (pH 4.2) çözeltisi, ayırım voltajı için 25 kV, enjeksiyon süresi için 0.5 sn'dir. Analiz UV detektörle 200 nm de yürütülmüştür. Belirtilen koşullarda iç standardın 4.2 dk, nebivolol hidroklorür'ün 5.3 dk göç zamanına sahip olduğu gözlenmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliği için doğrusallık, kesinlik, seçicilik, doğruluk ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Nebivolol hidroklorür'ün doğrusallığı 9.72 – 49.51 µg/mL aralığında incelenmiş 5 basamaklı kalibrasyon seti ile yöntemin gün içi ve günler arası doğrusallığı gösterilmiştir. Saptama ve tayin sınırları sırasıyla 2.61 ve 7.91 µg/mL olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem tablet dozaj formunda nebivolol hidroklorür'ün tayini için uygulanmış ve içeriği  $5.166 \pm 0.087$  bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** nebivolol, kapiler elektroforez, 3-4 dihidroksibenzil amin, tablet

## **DETERMINATION OF NEBIVOLOL IN ITS TABLETS WITH CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

### **ABSTRACT**

Nebivolol is a third-generation  $\beta_1$ -selective  $\beta$ -blocker that is approved for the treatment of hypertension. In this study simple, accurate and rapid capillary electrophoretic method was developed and validated for the quantitation of nebivolol hydrochloride in tablets. 3,4-Dihydroxybenzyl amine was used as an internal standart. The effect of the buffer concentration, buffer pH, amount of organic solvent and buffer type was systematically investigated on the separation. The optimum conditions determined were as following, 40 mM sodium acetate and 66 mM glacial acetic acid (pH 4.2) consisted of %10 (v/v) methanol for run buffer, 25 kV for separation voltage and 0.5 sec for injection time. Analysis was carried out with UV detection at 200 nm. The migration times were 4.2 min for internal standard and 5.3 min for nebivolol hydrochloride. The method was validated in terms of accuracy, precision, linearity, selectivity and robustness. The method was linear over the range of 9.72 – 49.51  $\mu\text{g/mL}$ . Limit of detection and quantification were 2.61 and 7.91  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The method was applied to tablet dosage forms and nebivolol hydrochloride content of the tablets was found  $5.166 \pm 0.087$ .

**Key Words:** nebivolol, capillary electrophoresis, 3-4 dihydroxybenzyl amine, tablet

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Nebivolol Hidroklorürün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	2
Nebivololün Farmakolojik Özellikleri	2
Nebivololün Farmakodinamiği	4
<i>Nitrik Oksid Salınımının Modülasyonu</i>	4
Nebivololün Farmakokinetiği	4
<i>Emilim</i>	4
<i>Dağılım</i>	5
<i>Metabolizma ve Atılım</i>	5
Kullanılan Yöntemler	5
<i>Kapiler Elektroforez</i>	5
Nebivolol Tayini ile İlgili Çalışmalar	7



<b>GEREÇLER</b>	12
<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	12
<b>Kullanılan Cihazlar</b>	13
<b>YÖNTEMLER</b>	14
<b>NBV ve IS ile Yapılan Çalışmalar</b>	14
<i>Nebivolol Standart Çözeltisi</i>	14
<i>İç Standart Çözeltisi</i>	14
<i>Çalışma Tamponu</i>	15
<b>Kullanılan Cihazlar</b>	15
<i>Kapiler Elektroforez</i>	15
<i>Cihazla İlgili Koşullar</i>	15
<i>Yıkama İşlemleri</i>	16
<b>Optimizasyon Çalışmaları</b>	16
<i>pH</i>	16
<i>Tampon derişimi</i>	16
<i>Organik Çözücü Yüzdesi</i>	17
<i>Tampon Tipi</i>	17
<i>Enjeksiyon süresi ve potansiyel</i>	17
<b>Validasyon Çalışmaları</b>	17
<i>Doğrusallık</i>	18
<i>Kesinlik</i>	18
<i>Saptama ve tayin sınırı</i>	19
<i>Doğruluk</i>	19
<i>Sağlamlık</i>	20

<b>Piyasa tabletlerinden NBV tayini</b>	21
<b>BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	22
<b>Kapiler Elektroforez Yönteminin Optimizasyonu</b>	22
<i>pH</i>	22
<i>Tampon derişimi</i>	23
<i>Organik Çözücü Yüzdesi</i>	24
<i>Tampon Tipi</i>	25
<i>Enjeksiyon süresi ve potansiyel</i>	25
<b>Kapiler Elektroforez Yönteminin Validasyonu</b>	26
<i>Kesinlik</i>	26
<i>Doğrusal Aralık</i>	28
<i>Saptama ve tayin sınırı</i>	28
<i>Doğruluk</i>	29
<i>Sağlamlık (Robustness)</i>	30
<b>NBV İçeren Tabletlerde Miktar Tayini</b>	31
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	33
<b>KAYNAKLAR</b>	34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA	
Çizelge 1	Tablet matriks çözeltisini hazırlamak için kullanılan yardımcı maddeler ve yüzdeleri	21
Çizelge 2	$3.23 \times 10^{-5}$ NBV çözeltisi için pH incelemesi	22
Çizelge 3	$3.69 \times 10^{-5}$ NBV ve IS çözeltileri için tampon derişimi etkisinin incelemesi	23
Çizelge 4	Metanol derişiminin NBV ve IS göç zamanı ve pik alanlarına etkisi	24
Çizelge 5	Standart NBV Çözeltisi ve IS için Elde Edilen Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları	27
Çizelge 6	Kapiler Elektforez Yöntemi ile Doğrusal Aralık için Elde Edilen Sonuçlar	28
Çizelge 7	Kapiler Elektforez Yöntemin Doğruluğu ile İlgili İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları	30
Çizelge 8	Kapiler Elektforez Yönteminin Sağlamlık Testi Sonuçları	31
Çizelge 9	Kapiler Elektforez Yöntemi ile Tabletlerde NBV Miktar Tayini Sonuçları	32

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	RSSS – ya da l-nebivolol hidroklorürün yapısı	2
Şekil 2	SRRR – ya da d-nebivolol hidroklorürün yapısı	2
Şekil 3	Tipik bir KE cihazının görünümü	6
Şekil 4	Elektroosmotik akış şeması	7
Şekil 5	Validasyon Parametreleri	18
Şekil 6	NBV göç zamanı ve alan değerlerinin pH ile değişimi	23
Şekil 7	Tampon derişiminin NBV ve IS göç zamanı ve pik alanları üzerine etkisi	24
Şekil 8	Metanol derişiminin NBV ve IS göç zamanı ve pik alanlarına etkisi	25
Şekil 9	Optimum koşullarda IS ( $1.26 \times 10^{-5}$ M) ve NBV ( $9.32 \times 10^{-5}$ M) için elde edilen elektroferogram	26
Şekil 10	Matriks Ortamında NBV Çözeltilisinin ( $6.72 \times 10^{-5}$ M) Elektroferogramı	29
Şekil 11	NBV İçermeyen Matriks Ortamının Elektroferogramı	29
Şekil 12	NBV Tablet Çözeltilisinin Elektroferogramı	32

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$	: Alfa
AcAc	: Asetik asit
$\beta$	: Beta
BH	: Bağlı hata
BSS	: Bağlı standart sapma
CH <sub>3</sub> COONa	: Sodyum asetat
DHBA	: 3,4-Dihidroksibenzil amin
dk	: Dakika
h	: Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
HClO <sub>4</sub>	: Perklorik asit
IS	: İç standart
KE	: Kapiler elektroforez
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: Potasyum dihidrojen fosfat
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Alt tayin sınırı
M	: Molar
MAO	: Monoamin Oksidaz
n	: Deney sayısı
NaAc	: Sodyum asetat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NBV	: Nebivolol Hidroklorür
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
pKa	: Asitlik sabiti
PNO	: Pik normalizasyon oranı
r	: Korelasyon katsayısı
rpm	: Döngü/dakika
R <sub>f</sub>	: Ayrılma faktörü
sn	: Saniye
SH	: Standart hata

SS	: Standart sapma
USP	: Amerikan farmakopesi
UV	: Ultra viyole
YPI TK	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

## GİRİŞ ve AMAC

Nebivolol hidroklorür (NBV), yüksek düzeyde seçici bir  $\beta_1$  blokerdir. İlk kez 1995 yılında Hollanda'da esansiyel hipertansiyon endikasyonu için ruhsat almıştır. Damar düz kasları üzerine nitrik oksit (NO) etkili gevşetici etkiye sahiptir. Üçüncü nesil beta bloker ajandır (Sneha, 2009).

NBV'ün tabletlerindeki tayini için çoğunlukla ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ve UV detektör kullanılmıştır (Doshi ve ark., 2008; Sneha ve ark., 2009; Sahoo ve ark., 2009; Tarte ve ark., 2009; Kokil ve ark., 2009; Srinivasulu ve ark., 2009; Gupta ve ark., 2009; Patel ve ark., 2007; Dhandapani ve ark., 2010; Gowda ve ark., 2009; Joshi ve ark., 2009; Yılmaz, 2010). Bu çalışmaların dışında NBV analizleri için çeşitli analitik yöntemlerin kullanıldığı araştırmalar yapılmıştır. Geliştirilen bu yöntemlerin arasında, tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografi yöntemi (Ramakrishna ve ark., 2005; Selvan ve ark. 2007) ile insan plazmasında, spektrofotometri yöntemi (Shah ve ark., 2009; Shirkhedkar ve ark., 2008; Rao ve ark., 2010; Gowda ve ark., 2009; Mishra ve ark., 2007; Parambi ve ark., 2010) ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemi (http-1, Patel ve ark., 2007; Shirkhedkar ve ark., 2010; Reddy ve ark., 2007; Dhandapani ve ark., 2010) ile farmasötik tabletlerde NBV miktar tayini önerilmektedir. Yapılan kaynak araştırmasında NBV'ün kapiler elektroforez yöntemi ile tabletlerinde miktar tayinine olanak sağlayan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Kapiler elektroforez, elektriksel bir alan altında ve iletken bir ortamda yüklü veya yüksüz parçacıkların kendi elektroforetik hareketleri ve ek olarak elektroosmotik akış etkisi ile göç etmelerine dayanan bir yöntemdir. Yüksek seçicilik, hızlı ayırım, kapilerin uzun ömürlü ve ucuz olması, az miktarda numune ve reaktiflere gerek duyulması ve otomasyona uygunluğu ile kapiler elektroforez yöntemi birçok analitik yöntemle göre üstünlük taşımaktadır.

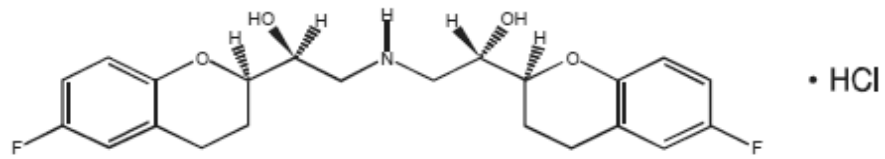
Kapiler elektroforezin bilinen dezavantajı, kısa ışık yolu nedeniyle saptama limitinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde olduğu kadar düşük olmamasıdır. Katı ve sıvı faz ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak fiziksel olarak bu olumsuzluğun ortadan kaldırılması yoluna gidilebildiği gibi, literatürde rastlanan biriktirme tekniği (stacking) ve kapiler elektroforezin diğer çalışma tarzları olan izotakoforez ve izoelektrik odaklama tekniklerinin uygulanması ile  $10^{-6}$  M altındaki saptama sınırlarına ulaşılabilmektedir (Shihabi, 2000).

Bu çalışmada, NBV'ün kapiler elektroforez yöntemi kullanılarak tabletlerinde NBV içeriğinin tayini için hızlı ve kolay bir yöntem geliştirilmesi ve geçerliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Kapiler elektroforez yönteminin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla seçicilik, kesinlik ve doğruluk, doğrusal aralık, tayin ve saptama sınırı ve sağlamlık gibi geçerlik parametreleri incelenmiştir. Bulunan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

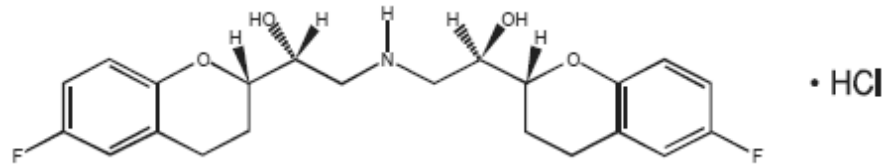
## KAYNAK BİLGİSİ

### Nebivolol Hidroklorürün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

NBV kimyasal olarak 2H-1-benzopiran-2-metanol, alfa, alfa-[iminobis(metilen)]bis[6-floro-3,4-dihidro- ya da 1-(6-flurochroman-2yl) – {[2-(6-flurochroman-2-yl)-2 hydroxyethyl] amino} ethanol, HCl olarak adlandırılır. Kapalı kimyasal formülü  $C_{22}H_{26}ClF_2NO_4$  'tür. Gerçekte d-nebivolol (SRRR OSR<sub>3</sub>'lü dekstro-izomer konfigürasyonu) ile l-nebivolol (RSSS OSR<sub>2</sub> konfigürasyonu) enantiyomerlerinin eşit oranlı, rasemik karışımıdır (Güngör, 2006). Açık kimyasal formülü Şekil 1 ve Şekil 2' de verilmiştir (http-2).



Şekil 1. RSSS – ya da l-nebivolol hidroklorür



Şekil 2. SRRR – ya da d-nebivolol hidroklorür

Molekül ağırlığı 441.94' tür. Beyaz kristal yapılıdır. N-N dimetil formamid, metanol ve dimetil sülfoksitte çözünür. Polipropilen glikol, polietilen glikol ve etanolde eser miktarda çözünür. Diklorometan, hekzan ve metil benzende az miktarda çözünür (http-3). pKa değeri 8.22 olarak bildirilmektedir (Joshi ve ark, 2009).

### Nebivololün Farmakolojik Özellikleri

Hipertansiyon, sistemik arteriyel kan basıncının devamlı yükselmesi ile kendini gösteren bir kalp-damar hastalığıdır. Hipertansiyon, zamanla kalpte ve arterlerde geri dönüşsüz değişiklikler yaparak ciddi kardiyovasküler komplikasyonlara yol açması ve sık görülmesi nedeniyle önemli bir klinik sorun ve sağlığı bozucu önemli bir etken sayılır (Kayaalp, 2009).

Esansiyel (veya primer) ve sekonder hipertansiyon olmak üzere hipertansiyonun iki tipi mevcuttur. Temel nedeni belli olmayan esansiyel hipertansiyon, olguların yaklaşık %95 'ini oluşturur. Olguların geri kalan %5 'inde görülen hipertansiyon ise başta bazı böbrek hastalıkları, renovasküler hastalıklar, bazı endokrin hastalıkları (bazı tiroid, adrenal, paratiroid ve ön hipofiz hastalıkları gibi) olmak üzere arteriyel kan basıncını yükselttiği bilinen primer patolojik bozukluklara bağlıdır. Kombinasyon tipi oral kontraseptifler, kortikosteroidler, siklosporin, MAO inhibitörleri, eritropoietin ve sempatomimetik ilaçlar veya efervesan dozaj



şekilleri içinde aşırı sodyum alınmasına bağlı olarak ilaca-bağımlı geçici sekonder hipertansiyon da gelişebilir. Esansiyel hipertansiyon uzun yıllar semptomsuz veya komplikasyonsuz olarak seyreder. Bu sırada hastalığın tek göstergesi diyastolik ve/veya sistolik kan basıncının yükselmiş olmasıdır. Daha sonra, uzun süren kan basıncı yüksekliğinin kalp, böbrek ve beyin gibi organların arterleri, diğer yapılar ve miyokard üzerindeki zararlı etkisine bağlı olarak yukarıda sayılan ciddi komplikasyonlar ortaya çıkmaya başlar (Kayaalp, 2009).

Vazodilatör etkilerini oluşturma mekanizmaları ve primer etki yerleri bakımından antihipertansif ilaçlar, 8 gruba ayrılırlar: 1. Diüretikler, 2. Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiotensin reseptör blokerleri, 3. Kalsiyum kanal blokörleri, 4. Adrenerjik reseptör blokerleri, 5. Adrenerjik nöron blokerleri, 6. Santral etkili sempatotolitik ilaçlar ve diğer sempatotolitikler, 7. Direkt etkili vazodilatörler ve potasyum kanal açıcı ilaçlar, 8. Sadece hipertansif kriz tedavisinde kullanılan ilaçlar. Adrenerjik reseptör blokerleri, beta-adrenerjik reseptör blokerleri ve alfa-adrenerjik reseptör blokerleri olmak üzere ikiye ayrılırlar (Kayaalp, 2009).

Beta reseptör antagonistleri farmakolojik özelliklerine göre 3 kuşak halinde sınıflandırılır. Birinci kuşak beta reseptör antagonistleri nonselektif beta bloke edici ilaçlar olarak bilinirler. İkinci kuşak olanlar, kardiyoselektif beta reseptör bloke edici ajanlardır. Üçüncü kuşak beta reseptör antagonistlerinin ise sayılan özelliklere ek olarak vazodilatör etkileri vardır. Bu etki kan basıncındaki düşmeye katkı sağlar. Üçüncü kuşak beta reseptör antagonistlerinin vazodilatasyon mekanizmalarında; NO üretimi,  $\beta_2$  reseptör agonistik etki,  $\alpha_1$  reseptör antagonistik etki, kalsiyum blokajı, potasyum kanallarının açılması ve antioksidan etki rol oynar (Okutucu ve Aytemir, 2008).

NBV üçüncü nesil beta bloker ajandır ve hipertansiyon tedavisi için kullanılır (Judy ve Cheng, 2009). Hem NO salınımının modülasyonu yoluyla vazodilatör etki, hem de  $\beta_1$  – adreseptör antagonisti etkisiyle çift etki mekanizması sunar (Güngör, 2006).

Rasemik karışımdaki enantiyomerlerin (d- ve l-nebivololün) farklı özellikleri vardır. Her ikisi de NO salınımıyla vazodilatasyon gerçekleştirir. Ancak d-nebivolol enantiyomeri yüksek  $\beta_1$  –adreseptör seçiciliği ile karakterizeyken, l-nebivolol’de yüksek dozlarda bile  $\beta$ -blokaj özelliği yoktur, l-NBV vazodilatasyon üretir ve d-izomerin negatif inotropik etkilerini azaltır (Güngör, 2006).

NBV’ün NO sistemi aktivasyonu aracılığıyla arter ve venlerde doğrudan vazodilatör etki gösterdiği bildirilmiştir. NO’ya bağlı vazodilatasyon NBV ile sağlanabilmekte, ancak alprenolol, nadolol, propranolol, karvedilol, seliprolol gibi diğer  $\beta$ -blokerler ile sağlanamamaktadır (Güngör, 2006).

Antihipertansif ajan olan NBV’ün, NO aracılığıyla oluşturdukları sistemik vazodilatasyon, selektif  $\beta_1$  bloker özellikleri ile kan basıncı kontrolü sağlamanın yanında hedef organda koruyucu etki sağladığı ileri sürülmektedir. Diğer beta-blokerlerden daha iyi tolere edildiği ve yan etkisinin daha az olduğu

bilinmektedir. Bu özellikleriyle güvenilir bir antihipertansif ajandır (Dağlı ve Karaca, 2006).

Beta-blokerlerin glüköz metabolizmasının dengesini bozdukları bilinmektedir. NBV'ün insülin duyarlılığına herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı ve geleneksel beta-blokerlerin aksine glüköz metabolizmasını bozmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada NBV'ün diğer beta-blokerlerin aksine plazma lipidleri üzerine etkisiz olduğunu bildirilmiştir (Dağlı ve Karaca, 2006).

### **Nebivolol'ün Farmakodinamiği**

#### ***Nitrik Oksid Salınımının Modülasyonu***

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

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

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

### **Nebivolol'ün Farmakokinetiği**

#### ***Emilim***

NBV'ün her iki enantiomeri de oral uygulamadan sonra hızla absorbe edilir. NBV'ün absorpsiyonu yiyeceklerden etkilenmez; NBV yemeklerle veya aç karnına alınabilir (http-4).

Oral uygulama sonrasında pik plazma derişimine 0,5–2 saat içinde ulaşılmaktadır. Bu plazma derişimleri 1-2 saatlik yarılanma ömrü ve bunu takip eden 10-44 saatlik terminal yarılanma ömrüyle azalır. Aktif hidroksi metabolitin yarılanma ömrü ortalama 20 saattir (Güngör, 2006).

## ***Dağılım***

Plazmada, her iki NBV enantiomeri albumine bağlanabilmektedir. Plazma proteinlerine bağlanma SRRR-nebivolol için %98.1, RSSS-nebivolol için ise %97.9 dur (http-4).

## ***Metabolizma ve Atılım***

Ana metabolik yolu aromatik hidroksilasyondur. Diğer yollar ise alisiklik, oksidasyon, glukronidasyon ve N-dealkilasyon (artı aromatik hidroksilasyon)'dur (Güngör, 2006).

Metabolizması hızlı olan kişilerde, NBV enantiomerlerinin eliminasyon yarı-ömürleri ortalama 10 saattir. Yavaş olanlarda ise, bunların yarı-ömürleri 3-5 misli daha uzundur. Metabolizması hızlı olan kişilerde, her iki enantiomerin hidroksi metabolitlerinin eliminasyon yarı-ömürleri ortalama 24 saattir ve metabolizması yavaş olan kişilerde bu süre iki kat daha uzundur (http-4).

NBV'ün plazma proteinlerine bağlanma oranı %98'dir ve ilaç öncelikle albümine bağlanır. Uygulamadan 1 hafta sonra, dozun %38'i idrarla, %48'i feçesle atılır. NBV'ün farmakokinetiği yaş ile etkilenmez (Güngör, 2006).

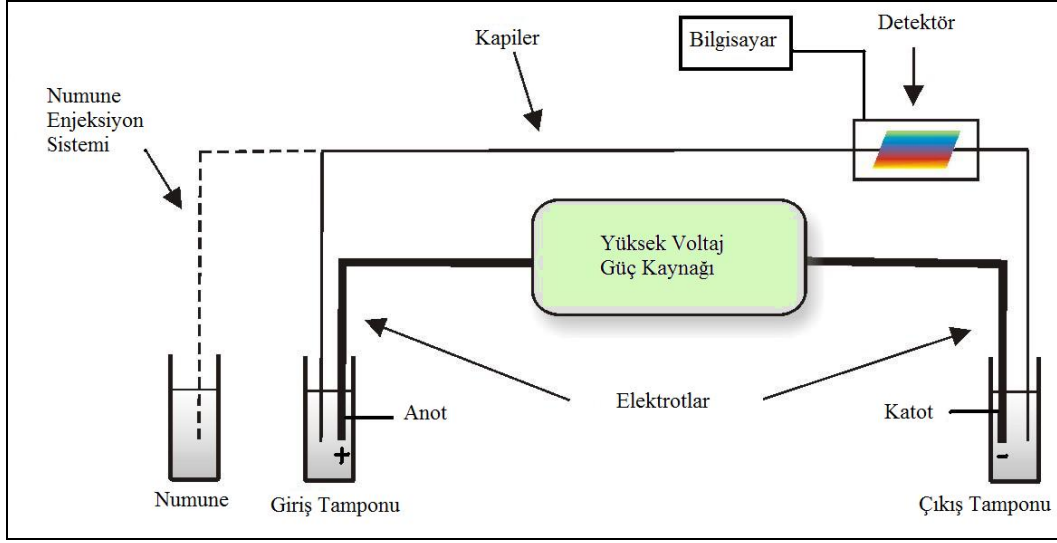
## ***Kullanılan Yöntemler***

### ***Kapiler elektroforez***

Kapiler elektroforez (KE), yüklü kimyasal bileşiklerin ayrılmaları ve tayinlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiş modern bir analitik yöntemdir. Ayırmada kullanılan diğer yöntemlere göre küçük hacimli örnekler ile çalışılabilme, reaktif sarfiyatının az olması, ucuz ve dayanıklı kapiler kolonlar, yüksek verimlilikte ve hızlı ayırımlar gibi bazı üstünlükleri vardır (Baker, 1995).

KE, kapiler bir kolon içine konan bileşenlerin, kolonun her iki ucundan uygulanan yüksek doğru akım potansiyeli ile ayrılması üzerine kurulmuş bir ayırma tekniğidir. Bu teknikte moleküller, yük/kütle oranlarına göre farklı hızlarda göç ederek birbirlerinden ayrılırlar. Bu oranın büyük olduğu iyonlar elektrik alanda daha hızlı hareket ederler ve böylece daha erken elüe olurlar. Yük/kütle oranının küçük olduğu iyonlar ise daha yavaş hareket ederek, kapileri daha geç terk ederler (Baker, 1995).

Aşağıdaki şekilde bir KE cihazı için genel bir gösterim görülmektedir (http-5).

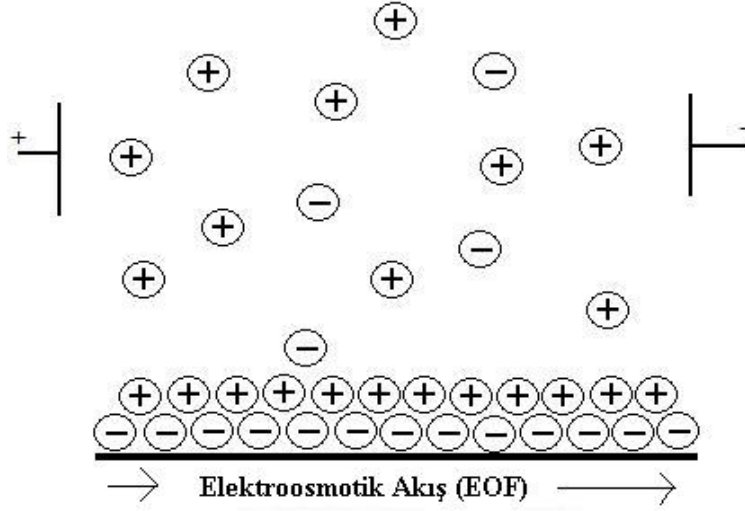


Şekil 3. KE cihazının şematik görünümü

Kapiler kolon tampon çözeltiyle doldurulur. Kapilerin uçları içinde aynı tampon çözeltisiyle doldurulmuş şişelere daldırılırlar. Daldırılmış olan bu elektrotlara güç kaynağından elektrik alan uygulanır. Tampon çözeltiye daldırılan elektrotlar uygulanan yüksek gerilimden etkilenmemeleri için platinden yapılmışlardır. Numune kapilerin pozitif ucundan enjekte edilir. İçerisindeki bileşenler uygulanan elektrik alanın etkisiyle negatif elektroda geçmeye başlarlar. Bileşenler dedektör önünden geçerken tayin edilirler (Baker, 1995).

Kapiler elektroforezde bileşenlerin göç hızları üzerine etki eden iki kuvvet bulunmaktadır. Bunlar elektroforetik etki ve elektroosmotik etkidir. Elektroforetik göç, yüklü taneciklerin hareketliliklerinin farklı olması temeline dayanır. Her bileşen kendi yüküne ters işaretteki elektroda gitme eğilimindedir. Uygulanan elektriksel alan kapilerdeki çözelti üzerinde bir kuvvet yaratır ve çözelti kapiler içerisinde hareket eder. Bu hareket de elektroosmotik göç olarak isimlendirilir. Elektroosmotik hareketlilik, bileşenlerin elektroforetik hareketliliklerinden daha büyüktür. Kapiler girişi anot olarak kabul edildiğinde negatif yüklü anyonlar pozitif yüklü anoda doğru çekilirler. Elektroosmotik akış, bileşenin elektroforetik hareketliliğinden daha büyük olduğu için anyonlar tamponla katota doğru sürüklenirler. Anyonlar bir taraftan anot tarafından çekilmeye devam edildikleri için elektroosmotik akışa göre daha yavaş hareket ederler. Böylece kapileri daha geç terk ederler. Pozitif yüklü tanecikler ise elektroosmotik akıştan daha hızlı hareket ederler. Çünkü bir yandan negatif yüklü katotun etkisi altındadırlar. Hem elektroosmotik akış hem de elektroforetik hareketlilikle katota doğru hızla sürüklenir ve kapileri daha erken terk ederler. Yüksüz parçacıklar elektroforetik hareketlilik göstermedikleri için elektroosmotik akış hızıyla hareket ederler (Baker, 1995).

Aşağıdaki şekilde elektroosmotik akış şeması gösterilmektedir (http-6).



Şekil 4. Elektroosmotik akış şeması

Kapiler kolonun yüzeyinde bulunan negatif yük, tampon çözeltiden pozitif iyonları çeker. Bunun sonucu elektriksel çift tabaka oluşur. Kapiler borunun orta kısmında toplanan hareketli pozitif tanecikler, negatif elektroda doğru çekilerek hızla hareket ederler. Bu esnada kendisine bağlanmış çözücü moleküllerini de sürüklerler. Böylece katoda doğru bir sıvı akımı oluşur. Elektroosmotik akışı voltaj, pH, tampon derişimi ve sıcaklık gibi faktörler etkiler. Bu akış sayesinde anyon ve katyonlar tek bir analizle ayrılabilirler. Aynı kapiler ile polar bileşiklerin, nonpolar bileşiklerin, kiral bileşiklerin, suda çözünen ve çözünmeyen moleküllerin, proteinler gibi büyük moleküllerin oda sıcaklığında, bir sıvı pompasına gerek duyulmaksızın düşük basınçta ayırma ve analizleri yapılabilmektedir (Baker, 1995).

#### Nebivolol Tayini ile İlgili Çalışmalar

Son yıllarda NBV tayinine yönelik çalışmalar aşağıdaki gibi derlenmiştir.

Ramakrishna ve arkadaşları (2004), NBV'ün insan plazmasındaki miktar tayini için bir elektrosprey tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografi yöntemi geliştirmiş ve geçerliliğini göstermişlerdir. NBV'ün plazmadan ekstraksiyonu için çözücü olarak dietil eter/diklorometan'ın (70/30) kullanıldığı tek basamaklı sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi önerilmektedir. Analiz C<sub>18</sub> ters faz analitik kolonda su: asetonitril: formik asit (30:70:0.03, h/h) hareketli faz sisteminde izokratik elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi 2 dk ve kalibrasyon eğrisi 50–10,000 pg/mL derişim aralığında doğrusal ölçülmüştür. Yöntemin doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve tekrar edilebilirliği bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı 10 ve 50 pg/mL olarak bulunmuştur. NBV ve iç standart olarak kullanılan tamsulosin için ortalama geri kazanım değerleri % 73.4 ± 3.7 ve % 72.1 ± 2.0 olarak bulunmuştur.

Selvan ve arkadaşları (2007), NBV ve valsartanın eşzamanlı tayinine olanak sağlayan tandem kütle spektrometre detektörlü sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiş ve bunu farmakokinetik çalışmalara uygulamışlardır. NBV ve valsartan plazmadan asetonitril kullanılarak ekstrakte edilmiş ve ayırırda C<sub>18</sub> kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz sistemi asetonitril ve 0.05 mM formik asit (50:50 h/h, pH 3.5) karışımından oluşmaktadır ve akış hızı 0.25 mL/dk olarak ayarlanmıştır. NBV ve valsartan için doğrusallık sırasıyla 0.01–50.0 ng/mL ve 1.0–2000.0 ng/mL derişim aralığında sağlanmıştır. Yöntemin alt tayin sınırı NBV için 0.01 ng/mL, valsartan için 1.0 ng/mL bulunmuştur. Bu yöntem, NBV ve valsartanın sabit doz kombinasyonlarının farmakokinetik çalışmalarına başarıyla uygulanmıştır.

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

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

Rao ve arkadaşları (2010), NBV'ün farmasötik formülasyonlarında miktar tayini için basit, duyarlı ve yüksek doğrulukta spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin 4–60 µg/mL derişim aralığında Beer yasasına uygunluğu gösterilmiştir. Eğim, kesim noktası ve korelasyon katsayısı değerleri de hesaplanmıştır. Önerilen yöntem NBV'ün basit ve tablet formlarında analizi için uygun bulunmuştur. NBV'ün analiz yüzdesi 98.75- 99.02 olarak hesaplanmıştır.

Chaudhary ve arkadaşları (2010), valsartan ve NBV'ün tabletlerdeki miktar tayini için yeni bir absorpsiyon oran yöntemi geliştirmiş ve geçerliliğini göstermişlerdir. Valsartan ve NBV için kalibrasyon eğrisi 4–80 µg/mL derişim aralığında

belirlenmiş NBV'ün maksimum dalga boyu 281 nm, eş absorpsiyon noktası 276.5 nm olarak bulunmuştur. Geri kazanım çalışmalarında valsartan için % 98.74–101.27, NBV için % 98.06–102.96 sonuçları elde edilmiştir. Yöntem basit, hızlı ve doğru olarak belirlenmiş ve NBV analizleri için uygulanabilir olduğu bildirilmektedir. Bu sonuçlara dayandırılarak önerilen yöntemin söz konusu ilaçların kombine dozaj formlarının analizinde kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Dhandapani (2006), NBV'ün tayini için basit, hızlı, özgün ve hassas bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografi (YPİTK) yöntemi geliştirmiştir (http-1). Ayırım için silika jel G60F<sub>254</sub> sabit faz olarak seçilmiştir. Hareketli faz sistemi olarak, etil asetat: metanol: amonyak (8.5:1:0.5, h/h) karışımı kullanılmıştır. Analiz 285 nm' de fotometrik olarak yürütülmüştür. NBV'ün R<sub>f</sub> değeri 0.52 ± 0.02 olarak bulunmuştur. Doğrusallık 250–1250 ng/spot derişim aralığında bulunmuş ve korelasyon katsayısı da 0.9994 olarak hesaplanmıştır. Sonuçların doğruluk ve kesinlik bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Yöntemin gözlenebilme sınırı 20 ng/spot, alt tayin sınırı ise 50 ng/spot olarak bulunmuştur. Etkin madde miktar tayini USP ölçütlerine göre yapılmıştır. Geliştirilen YPİTK yöntemi NBV'ün tablet analizleri için hızlı, ucuz ve etkin bir yöntem olarak önerilmektedir.

Shirkhedkar ve arkadaşları (2010), NBV'ün miktar tayinine olanak sağlayan yüksek performanslı ince tabaka kromatografi yöntemi geliştirmiş ve geçerliliğini göstermişlerdir. Yöntemde sabit faz olarak 60F<sub>254</sub> silika jel kaplı kromatografik alüminyum plakaları kullanılmıştır. Hareketli faz olarak toluen: metanol: trietilamin (3.8: 1.2: 0.2, h/h/h) sistemi kullanılmıştır. Analiz 281 nm'de gerçekleştirilmiştir. NBV için R<sub>f</sub> değeri 0.33 ± 0.02 olarak bulunmuştur. Doğrusallık, 500–3000 ng/spot derişim aralığında bulunmuş, korelasyon katsayısı 0.9994 ± 0.0002 olarak hesaplanmıştır. Eğim ve kesim noktası değerleri, 127.39 ± 19.53 ve 3.761 ± 0.017 bulunmuştur. Yöntemin gözlenebilme sınırı 63.10 ng/spot, alt tayin sınırı ise 191.23 ng/spot olarak bulunmuştur. İstatiksel veriler, yöntemin ilaç analizinde uygulanması için tekrar edilebilir, seçici ve doğru bir yöntem olduğunu göstermiştir. Geliştirilen YPİTK yöntemi NBV'ün teşhisi ve miktar tayini için önerilmektedir.

Sahoo ve arkadaşları (2009), NBV'ün tabletlerindeki miktar tayini için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz Hypersil ODS C<sub>18</sub> kolonunda, hareketli faz olarak metanol-su (80:20, h/h) sisteminde, 1.0 mL/dk akış hızıyla, 282 nm de gerçekleştirilmiştir. IS olarak klorzoksazon kullanılmıştır. Alıkonma zamanları NBV için 3.175 dk, klorzoksazon için 4.158 dk'dır. Doğrusallık 1–400 µg/mL derişim aralığında elde edilmiştir. Yöntemin gözlenebilme sınırı 0.0779 µg/mL, alt tayin sınırı ise 0.2361 µg/mL bulunmuştur. Ortalama NBV miktarı % 99.974 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin hassaslık, doğruluk ve kesinlik bakımından geçerliliği gösterilmiştir. Yöntem NBV'ün tabletlerindeki rutin miktar tayini çalışmaları için önerilmiştir.

Parambi ve arkadaşları (2010), NBV'ün tabletlerindeki miktar tayini için basit, duyarlı ve özgün bir spektrofotometri yöntemi geliştirmiş ve geçerliliğini göstermişlerdir. Tetrahidrofuran içinde ilaç en yüksek absorpsiyonunu 301 nm de göstermiştir. Doğrusallığı 0.9999 korelasyon katsayısı ile 5–60 µg/mL derişim

aralığında sağlamıştır. Yöntemin gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı 0.82 µg/mL ve 2.76 µg/mL olarak bulunmuştur. Ortalama geri kazanım değeri % 99.3 olarak hesaplanmış ve 2'nin altında standart sapmayla iyi bir tekrar edilebilirlik sağlamıştır. Yöntem NBV'ün miktar tayini çalışmaları için önerilmektedir.

Mishra ve arkadaşları (2009), 1:1 oranda NBV ve amlodipin besilat içeren tablet için iki maddenin eşzamanlı tayinine olanak sağlayan iki spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Çözücü olarak metanol kullanılmıştır. NBV en yüksek absorbansını 281 nm'de, amlodipin besilat ise 238 nm ve 360 nm'de göstermiştir. Geliştirilen 1. yöntem için dalga boyu çalışma aralığı 238–281 nm seçilmiştir. Geliştirilen 2. yöntem için ise dalga boyu aralığı 281–360 nm olarak seçilmiştir. İstatistiksel olarak yöntemin geçerliliği gösterilmiş ve geri kazanım çalışmalarıyla doğruluğu onaylanmıştır. Geri kazanım çalışmaları ve istatistiksel veriler geliştirilen 1. yöntemin iki maddenin eş zamanlı tayini için daha doğru, kesin ve duyarlı bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Tarte ve arkadaşları (2009), aynı formulasyonda NBV ve hidroklorotiyazid içeren tabletlerde bu iki etken maddenin eşzamanlı tayini için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz ODS C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm) kolonunda, pH 'sı ortofosforik asit ile 3.2 'ye ayarlanmış metanol: su (60: 40, h/h) hareketli faz sisteminde gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1.0 mL/dk 'ya ayarlanmış ve pikler 281 nm' de izlenmiştir. NBV ve hidroklorotiyazid için alıkonma zamanları 2.628 dk ve 7.042 dk'dır. Doğrusallık NBV için 5–50 µg/mL derişim aralığında, hidroklorotiyazid için 12.5–125 µg/mL derişim aralığında bulunmuştur. Yöntemin geçerliliği gösterilmiştir.

Kokil ve arkadaşları (2008), NBV ve valsartanın tabletlerinde eşzamanlı tayinlerine olanak sağlayan bir ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz HIQ sil C<sub>18</sub> kolonunda, 289 nm'de, 1mL/dk akış hızıyla, UV detektörle gerçekleştirilmiştir. İyon çifti ajanı olarak kullanılan hekzan-1-sülfonik asit monohidrat sodyum tuzunun % 0.1 lik çözeltisinden eklenerek hareketli faz metanol:su (80:20, h/h) olarak hazırlanmıştır. Yöntemin LOD değerleri NBV için 2.28 µg/mL, valsartan için 17.58 µg/mL hesaplanmıştır. LOQ değerleri NBV için 6.92 µg/mL, valsartan için 53.29 µg/mL hesaplanmıştır.

Shirkhedkar ve arkadaşları (2008), NBV'ün tabletlerdeki tayini için UV-spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. Çözücü olarak metanol:su (3:7) kullanılmıştır. Doğrusallık 291 nm'de 0.9997 korelasyon katsayısıyla 10–70 µg/mL derişim aralığında bulunmuştur.

Srinivasulu ve arkadaşları (2009), NBV'ün tablet formundaki miktar tayini için ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırım C<sub>18</sub> kolonunda, su: metanol (40:60) hareketli faz sisteminde, 1mL/dk akış hızında 282 nm'de gerçekleştirilmiştir. Klorzoksazon IS olarak kullanılmıştır. Doğrusallık 0.9999 korelasyon katsayısıyla 5-100 µg/mL derişim aralığında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri % 99.6-100.8 hesaplanmıştır.

Gupta ve arkadaşları (2009), NBV ve hidroklorotiyazidin eşzamanlı miktar tayini için ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. UV detektör kullanılmış



ve asetonitril: potasyum dihidrojen fosfat (50:50, h/h) hareketli faz sistemi oluşturulmuştur. Akış hızı 1.2 mL/dk ve dalga boyu 282 nm olarak ayarlanmıştır. Alıkonma zamanları hidroklorotiyazid için 3.57 dk, NBV için 6.66 dk bulunmuştur. Yöntemin doğrusallığı NBV ve hidroklorotiyazid için 8–32 mg/mL ( $r=0.9995$ ) ve 20–80 mg/mL ( $r=0.9998$ ) olarak bulunmuştur.

Patel ve arkadaşları (2007), NBV'ün miktar tayini için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografi yöntemi (YPİTK) olmak üzere 2 yöntem geliştirmişlerdir. YPSK yöntemi için, C<sub>18</sub> Lichrospher kolonu, 50 mM potasyum dihidrojen fosfat: asetonitril (45:55, h/h) hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Hareketli fazın akış hızı 1.0 mL/dk ve saptama dalga boyu 282 nm'ye ayarlanmıştır. Alıkonma zamanı  $3.76 \pm 0.02$  bulunmuştur. YPİTK yöntemi için hareketli faz olarak etil asetat: toluen: metanol: amonyum hidroksit (1:6:2:0.1 h/h) sistemi kullanılmıştır. Analiz 282 nm'de yürütülmüş ve R<sub>f</sub> değeri  $0.33 \pm 0.02$  bulunmuştur. Doğrusallık YPSK için 10–150 µg/mL, YPİTK için 100–600 ng/spot bulunmuştur. Saptama ve tayin sınırı değerleri sırasıyla YPSK yöntemi için 2.0 ve 10 µg/mL ve YPİTK yöntemi için 30 ve 100 ng/spot olarak bulunmuştur. Geliştirilen her iki yöntem de NBV'ün tabletlerindeki miktar tayini için başarıyla uygulanmıştır.

## **GEREÇLER**

### **Kullanılan Kimyasal Maddeler**

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	: Merck, Almanya
3-4 dihidroksibenzil amin	: Sigma, Amerika
Glasiyel asetik asit	: Merck, Almanya
HCl	: Merck, Almanya
$\text{HClO}_4$	: Merck, Almanya
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	: Merck, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
Nebivolol hidroklorür İstanbul, Türkiye	: Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş,

## **Kullanılan Cihazlar**

Hassas Terazî	: Ohaus, E12140, İsviçre
Kapiler silika	: Agilent Technologies, Amerika 75 µm iç çap, 363 µm dış çaplı ergitilmiş
KE	: Thermo Separation Products, Spectra Phoresis 100, Amerika
UV Detektör	: Shimadzu, SPD-10A, Japonya
Kaydedici (integratör)	: Shimadzu, CR-7A, Japonya
pH Metre	: Electro-mag, M822, Türkiye
Ultra Saf Su Cihazı	: Millipore, Amerika
Ultrasonik Banyo	: Ultrasonic, LC30, Almanya
Vorteks Karıştırıcı	: Nuvemix, NM110, Türkiye

## YÖNTEMLER

### NBV ve IS ile Yapılan Çalışmalar

Analitik çalışmalarda bir maddenin analizini gerçekleştirebilmek için ilk önce madde için en uygun çözücü ortamının belirlenmesi gerekir. Kapiler elektroforez yöntemi ile neбивololün analizini gerçekleştirebilmek için kullanılan standart maddenin çözünürlüğü araştırıldı.

NBV stok çözeltisi için uygun çözücünün metanol olduğu belirlendi (http-3).

Analitik çalışmalarda güvenilirliği arttırabilmek için IS yöntemi kullanılmaktadır. Yapılan deneyler sonucu 3-4 dihidroksibenzil aminin (DHBA) göç zamanının uygun olması nedeniyle IS olarak kullanılmasına karar verildi.

Yöntemde IS olarak kullanılan DHBA'nin çözünürlük araştırması yapıldığında 0.1 M HClO<sub>4</sub> içinde iyi çözündüğü belirlendi.

Analizin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi için stok çözeltiler belirlenen çözücülerde çözülerek deney boyunca saklandı.

#### *Nebivolol Standart Çözeltisi*

Analizde kullanılan NBV standart çözeltisi Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A.Ş (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edildi.

Standart NBV'den 10.2 mg tartıldı ve 25 ml balon jöje içerisinde bir miktar metanol ile çözüldükten sonra 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Daha sonra banyodan alınan çözelti metanol ile 25 mL'ye tamamlandı.

Stok derişimi  $9.232 \times 10^{-4}$  M olarak hesaplandı. Hazırlanan stok oda sıcaklığında ve karanlıkta saklandı. Gerekli bütün seyreltme işlemlerinde stok NBV çözeltisi kullanıldı.

#### *İç Standart Çözeltisi*

Kullanılan DHBA (M.A. 220.07) standart çözeltisi Sigma (Amerika) firmasının ürünüdür.

İç standart olarak DHBA'nin analize hazırlanması için 57.3 mg DHBA tartıldı ve 0.1 M HClO<sub>4</sub> içerisinde çözüldükten sonra 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Banyodan alınan ve tamamen çözünen DHBA balon jöjede 50 mL ye 0.1 M HClO<sub>4</sub> kullanılarak tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan çözeltinin derişimi  $5.20 \times 10^{-3}$  M olarak hesaplandı. Bu çözeltinin analizlerde uygun derişimlerde kullanılması için çözelti 1/4 oranında seyreltilerek ve analizler sırasında daima aynı miktarda kullanılarak analizler yürütüldü.

IS çözeltisi daima  $1.26 \times 10^{-5}$  M son derişimi sağlayacak şekilde kullanıldı. Enjekte edilen her örneğe 10 µL IS çözeltisinden eklendi.

### ***Çalışma Tamponu***

546.5 mg sodyum asetat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) tartıldı ve üzerine 0.4 mL glasiyel asetik asit eklendi. Daha sonra ortama 10 mL metanol eklendi ve çözünmenin tam olarak gerçekleşebilmesi için çözelti ultrasonik banyoda 20 dk bekletildi. Çözünmenin gerçekleştiğinden tam olarak emin olduktan sonra hazırlanan çözelti ultra saf su ile 100 mL hacme balon jodede tamamlandı.

Bu çözeltinin pH sı 4.16 olarak ölçüldü. Bu şekilde hazırlanan çözelti 40 mM sodyum asetat (NaAc) ve 66 mM asetik asit (AcAc) ve %10 (h/h) metanol içermektedir. Tüm deneyler boyunca bu çözelti çalışma tamponu olarak kullanıldı.

Çözelti ultrasonik banyoda bekletilerek hem çözünme tam olarak gerçekleştirildi hem de çözelti içindeki çözünmüş olan gazlar ortamdaki uzaklaştırıldı. Çözünmüş olan gazlar analiz sırasında girişim yapıp analizi olumsuz etkileyeceğinden sisteme verilmeden önce kullanılacak tüm çözeltiler ve çalışma tamponu ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmüş gazlar ortamdaki uzaklaştırıldı.

### ***Kullanılan Cihazlar***

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

Bütün çözeltilerdeki çözünmüş gazlar ultrasonik banyo (Ultrasonic LC30, Almanya) kullanılarak uzaklaştırıldı.

Analize hazırlanan örnekler sisteme verilmeden vorteks karıştırıcı (Nuvemix, NM110, Türkiye) kullanılarak karıştırıldı.

Deneylerde kullanılan ultra saf su ultra saf su cihazı (Millipore, Amerika) ile üretildi ve kullanıldı.

Çözeltisi hazırlanacak ve hassas tartım gerektiren maddeler hassas terazi (Ohaus, E12140, İsviçre) ile tartıldı ve ölçümler kaydedildi.

### ***Kapiler Elektroforez***

#### ***Cihazla İlgili Koşullar***

Thermo Separation Products, SpectraPhoresis 100 (Amerika) kapiler elektroforez, Shimadzu CR-7A integratör (Japonya) ve TSP yüksek voltaj güç kaynağı ve Shimadzu SPD-10A (Japonya) UV detektör kullanıldı.

NBV'nin analizi KE'ye bağlı UV detektör ile belirlenen 200 nm dalga boyunda, IS olarak DHBA kullanılmasıyla gerçekleştirildi. Ayırma işlemleri için 25 kV potansiyel uygulandı. İnjesiyon için 0.5 s süre kullanıldı.

Yöntemde kapiler olarak Agilent Technologies, Amerika firması ürünü ve toplam boyu 65.4 cm, etkin uzunluğu 50.8 cm olan kapiler kullanıldı.

### *Yıkama işlemleri*

Kapiler ilk kullanımda 30 dk 1 M NaOH çözeltisi, 10 dk 0.1 M NaOH çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkanarak koşullandırıldı.

KE cihazı her açılışında 10 dk 0.1 M NaOH çözeltisi, 10 dk distile su ve 10 dk çalışma tamponu ile yıkandı.

Örneklerin analizleri arasında kullanılan yıkama programı sırasıyla 2 dk 0.1 M NaOH çözeltisi ve 4 dk çalışma tamponu şeklinde belirlendi.

Günlük kullanımların sonunda 10 dk 0.1 M NaOH çözeltisi, 10 dk distile su ile yıkandıktan sonra hava çekilerek bırakıldı.

### **Optimizasyon Çalışmaları**

Çalışmada KE yönteminin optimizasyonu için incelenen parametreler pH, tampon derişimi, organik çözücü miktarı ve tampon cinsidir.

Yöntemin optimizasyonu için standart bir örnek hazırlandı ve tüm incelemelerde bu örnek kullanıldı. Elde edilen veriler arasında en uygun değere karar verebilmek için göç zamanları, pik alanları ve pik normalizasyon oranı (PNO) değerleri dikkate alındı.

#### ***pH***

Analiz için uygun pH değerini belirlemek için 4 farklı pH değerine sahip asetik asit/sodyum asetat ve %10 (h/h) metanol içeren çalışma tamponu hazırlandı. Hazırlanan tamponların pH değerleri 1M HCl ile ayarlandı.

Çalışılan tamponların pH değerleri sırasıyla 3.75, 4.16, 4.35, 5.16 olarak ayarlandı.

Her bir örnek bu tamponlar içerisinde 0.5 sn enjeksiyon süresi ve 25 kV potansiyel uygulanarak analiz edildi. Her pH düzeyi için standart örnek 2 kez analiz edildi.

Pik göç zamanları ve morfolojileri göz önüne alınarak uygun pH belirlenmiştir.

#### ***Tampon derişimi***

Uygun tampon derişimini belirlemek için asetik asit/ sodyum asetat oranları ve pH değerleri sabit kalmak koşuluyla asetik asit ve sodyum asetat derişimlerinde değişiklikler yapılarak 5 ayrı derişimde tampon çözelti hazırlandı. Her bir tampon %10 (h/h) metanol içerecek şekilde hazırlandı.

Hazırlanan tamponlar sırasıyla, (80mM NaAc/122mM AcAc), (60mM NaAc/99mM AcAc), (40mM NaAc/66mM AcAc), (20mM NaAc/33mM AcAc) ve (10mM NaAc/17mM AcAc) bileşimindedir.

0.5 sn enjeksiyon süresi ve 25 kV potansiyel ayarlanarak örnekler analiz edildi. Her bir derişim için 2 analiz, toplam 10 analiz yapıldı.

Pik göç zamanları ve morfolojileri göz önüne alınarak uygun tampon derişimi belirlendi.

### ***Organik çözücü yüzdesi***

NBV çözücüsü olarak metanol kullanıldığı için tampon bileşiminde belirli miktar metanol kullanılmasına karar verildi. Uygun metanol yüzdesini belirlemek için tampon derişimi ve pH değerleri aynı kalmak koşuluyla 5 ayrı tampon çözelti hazırlandı.

Kullanılan tampon çözeltiler % 0, 5, 10, 20, 30 (h/h) metanol içerecek şekilde hazırlandı.

Enjeksiyon süresi 0.5 sn ve potansiyel 25 kV ayarlanarak her bir tampon için 2 analiz toplam 10 enjeksiyon yapıldı.

Pik göç zamanları ve morfolojileri göz önüne alınarak uygun yüzdede metanol içeren tampon çözelti belirlendi.

### ***Tampon tipi***

Tampon tipinin NBV'ün üzerindeki etkisini görebilmek için kullanılan asetat tamponu ile aynı pH (4.2) ve aynı metanol yüzdesine (%10, h/h) sahip 100 mM fosfat tamponu hazırlandı.

Pik göç zamanları, pik morfolojileri ve zemin gürültüsü dikkate alınarak uygun tamponla çalışmalara devam edildi.

### ***Enjeksiyon süresi ve potansiyel***

Analize olanak sağlayan ve uygun bulunan 25 kV potansiyel dışında potansiyel değeri uygulanmadı.

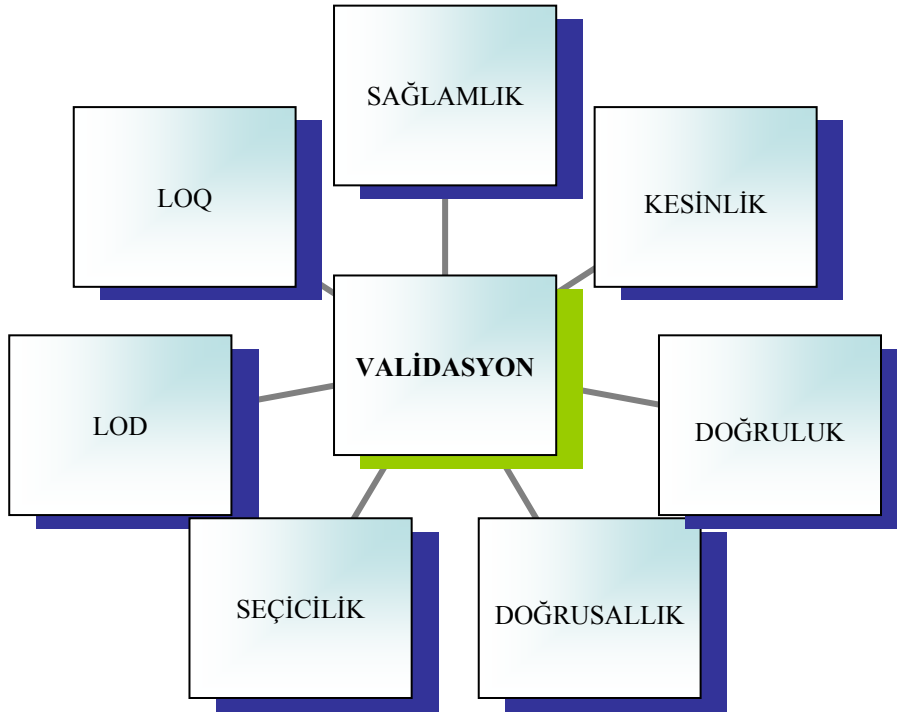
Uygulanan 0.5 sn enjeksiyon süresi üzerindeki enjeksiyonlar pik tabanlarının keskinliğini bozduğu için tercih edilmedi.

### ***Validasyon Çalışmaları***

Optimizasyonu gerçekleştirilen kapiler elektroforetik yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi amacıyla seçicilik, kesinlik ve doğruluk, doğrusal aralık, tayin ve saptama sınırı ve sağlamlık gibi validasyon parametreleri incelenerek gerekli deneyler gerçekleştirildi.

Geliştirilen KE yönteminin geçerliliğinin kanıtlanması için belirtilen validasyon parametrelerine göre testte belirtilen geçerlilik kriterleri kullanıldı. NBV ve IS'nin ayrılmalarına olanak sağlayan yöntemin geçerliliği belirtilen parametre çalışmalarıyla gösterildi.

Yöntemin geçerliliğini gösterebilmek ve çalışmaları bilimsel bir temele oturtabilmek için validasyon çalışmaları deneylerin en önemli kısmını oluşturur. Bir validasyon çalışmasında incelenmesi ve hesaplanması gereken parametreler Şekil 5' te verilmektedir.



**Şekil 5. Validasyon Parametreleri**

### ***Doğrusallık***

Yöntemin validasyonu için doğrusal bir bölgede çalışma gerekliliği nedeniyle doğrusallık incelemesi yapıldı. Bunun için NBV'nin 5 farklı derişimde çözeltileri hazırlandı. Derişim değerleri  $2.2 \times 10^{-5}$  M ile  $1.12 \times 10^{-4}$  M arasında belirlendi. Hazırlanan 5 farklı derişimdeki çözeltiler, 3 set halinde hazırlanarak kalibrasyon setleri oluşturuldu. Üç ayrı günde örnekler cihaza verildi. Her gün 5 analiz olmak üzere toplamda 15 analiz gün içi ve günler arası olacak şekilde yapıldı.

Derişim aralığı belirlenen setler,  $2.2 \times 10^{-5}$ ,  $4.48 \times 10^{-5}$ ,  $6.72 \times 10^{-5}$ ,  $8.96 \times 10^{-5}$  ve  $1.12 \times 10^{-4}$  M NBV içerek şekilde hazırlandı ve analiz edildi. IS derişimi  $1.26 \times 10^{-5}$  olacak şekilde kullanıldı.

Her set 3 farklı günde analiz edilerek kalibrasyon eğrilerine ait eğim, kesim noktası, korelasyon katsayısı, eğim ve kesimin standart hata değerleri hesaplandı.

### ***Kesinlik***

Yöntemin kesinliğini belirlemek için NBV ve IS için göç zamanı ve pik alanı tekrar edilebilirlikleri incelendi. Hazırlanan standart NBV ve IS çözeltileri, üç gün boyunca 6 defa kapiler elektroforez cihazına verildi.

Enjeksiyonlar sonucu yöntemin gün içi ve günler arası kesinliği araştırıldı ve istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. Değerlendirmeden göç zamanları ve pik alanları dikkate alındı. Pik alanlarının değerlendirilmesinde yöntemin kesinliğini arttırmak amacıyla pik normalizasyon oranı (PNO) değerleri kullanıldı.

Analizde kullanılan NBV 'nin son derişimi  $6.72 \times 10^{-5}$  M, IS 'nin son derişimi ise  $1.26 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde hazırlandı



### ***Saptama ve tayin sınırı (LOD-LOQ)***

Yöntemin saptama ve tayin sınırları hesaplamalarında günler arası kesinliğe karşılık gelen standart sapma değerinin kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünmesiyle elde edilen oran kullanıldı. Saptama sınırı (LOD), bu oranın 3.3 ile çarpılmasıyla, tayin sınırı ise aynı oranın 10 ile çarpılmasıyla hesaplandı. İlgili hesaplamalar bulgular kısmında verilmiştir.

### ***Doğruluk***

Yöntemin doğruluğunu araştırmak için, tableti oluşturan etken madde dışındaki maddelerden oluşan bir matriks ortamı (plasebo) hazırlanması, etken maddenin bu matrikse eklenmesi ve yapılan ölçüm sonunda matriks ortamındaki yüzde geri kazanım belirlenmesi yolu izlendi. Çizelge 1’de verilen yardımcı maddeler; ortalama tablet ağırlığı ve NBV içeriği göz önüne alınarak belirtilen oranlarda karıştırıldı ve tablet matriks çözeltisi hazırlandı.

**Çizelge 1. Tablet matriks çözeltisini hazırlamak için kullanılan yardımcı maddeler ve yüzdeleri**

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

Doğrusallık aralığından seçilen 3 farklı derişimdeki NBV çözeltisi ( $3.36 \times 10^{-5}$ ,  $6.72 \times 10^{-5}$  ve  $1.01 \times 10^{-4}$ ) matriks ortamına eklenerek karıştırılmasıyla elde edilen 3 çözelti sırayla sisteme verildi. Her bir derişim için 6 analiz yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

Her bir derişim için yapılan 6 analiz sonucu, % geri kazanım, % bağıl hata (%BH) ve % bağıl standart sapma (% BSS) değerleri hesaplandı.

## ***Sağlamlık***

Yöntemin sağlamlığının incelenmesi için optimum deneysel parametrelerde küçük değişiklikler yapıldı.

Tüm parametrelerin incelenmesi için analizde kullanılan standart NBV çözeltisi  $6.72 \times 10^{-5}$  M olarak hazırlandı.

Optimizasyon deneyleri sonucu karar verilen pH değeri olan 4.2 değeri, sağlamlık çalışmalarında  $\pm 0.2$  değiştirilerek denendi. Çalışılan tampon pH değerleri 4.0 ve 4.4 olarak ayarlandı ve standart NBV çözeltisi ile iki farklı pH değerine sahip çalışma tamponları ile 3 enjeksiyon gerçekleştirildi.

Ayrı pH değerlerinde yapılan analizler sonucu standart hata (SH) ve % BSS değerleri hesaplandı.

Bir diğer parametre olan tampon derişiminde de küçük değişiklikler yapılarak analizler yapıldı. Optimizasyonda 40 mM NaAc/66 mM AcAc olarak belirlenen tampon derişimi sağlamlık testinde 38 mM NaAc/68 mM AcAc ve 42 mM NaAc/64 mM AcAc olarak değiştirilerek çözeltiler bu değerlere göre hazırlandı. Her bir tampon için standart NBV ile 3 ayrı analiz yapıldı.

Ayrı derişimdeki tamponlarda gerçekleştirilen analiz sonuçlarının SH ve % BSS değerleri hesaplandı.

Tampon içindeki metanol (MeOH) miktarı değiştirilerek analizlere devam edildi. Optimizasyon deneylerinde uygun bulunan %10 (h/h) MeOH değeri sağlamlık çalışmalarında  $\pm 2$  değiştirilerek denendi. %8 (h/h) MeOH ve % 12 (h/h) MeOH içeren iki ayrı çalışma tamponu hazırlandı.

Hazırlanan tampon çözeltilerinin her birinde standart NBV ile 3 ayrı enjeksiyon yapıldı ve sonuçların SH ve % BSS değerleri hesaplandı.

Diğer bir parametre olan dalga boyunda da küçük değişikliklerle analizler yapıldı. NBV ve IS 'nin ayrılmasına olanak sağlayan ve düzgün pik morfolojileri ile uygun bulunan 200 nm dalga boyu, sağlamlık çalışmalarında  $\pm 2$  olacak şekilde değiştirildi. Cihaz üzerinden yapılan bu değişikliklerde ilk olarak dalga boyu 198 nm'ye düşürüldü. Standart NBV ile bu dalga boyunda 3 analiz gerçekleştirildi. Daha sonra cihaz üzerinden dalga boyu 202 nm olarak değiştirildi. Aynı standart NBV çözeltisi bu dalga boyunda da 3 kez analiz edildi.

İki farklı dalga boyunda yapılan 6 analiz sonuçlarının SH ve % BSS değerleri hesaplandı.

Yöntemin başka bir parametresi olan enjeksiyon süresi ile de değişiklikler yapılarak sonuçlar değerlendirildi. Optimizasyon çalışmalarında uygun bulunan 0.5 sn enjeksiyon süresi sağlamlık deneylerinde  $\pm 0.1$  değiştirildi. Cihaz üzerinden yapılan değişikliklerde ilk olarak enjeksiyon süresi 0.4 sn olarak ayarlandı. Standart NBV çözeltisi ile 3 analiz gerçekleştirildi. Daha sonra enjeksiyon süresi 0.6 sn olarak değiştirildi. Bu enjeksiyon süresi ile de standart NBV çözeltisi ile 3 analiz yapıldı.

Yapılan toplam 6 analiz sonuçları değerlendirildi ve SH ve % BSS değerleri hesaplandı.

Bir diğer cihaz parametresi olan potansiyel üzerinde de değişiklikler yapılarak sağlamlık deneylerine devam edildi. Optimizasyon deneyleri sonunda uygun

görülen 25 kV potansiyel sağlamlık çalışmasında  $\pm 1$  kV değiştirilerek analizler yürütüldü. İlk olarak sistem potansiyeli cihaz üzerinden 24 kV olarak ayarlandı. Girilen bu potansiyel değerinde standart NBV özeltisi ile 3 analiz gerçekleştirildi. Sonuçlar kaydedildikten sonra sistem potansiyeli bu sefer 26 kV olarak cihaz üzerinden değiştirildi. Ayarlanan bu potansiyel değerinde de standart NBV özeltisi ile 3 analiz yürütüldü.

Enjeksiyon değerlerinin değiştirilmesiyle yapılan toplam 6 standart NBV analizinin sonuçları değerlendirildi. Yapılan analizler için SH ve % BSS değerleri hesaplandı.

Sağlamlık testi için yapılan tüm değerlendirmelerin sonuçları izelge 7'de sunulmaktadır.

### **Piyasa tabletlerinden NBV tayini**

Geliştirilen KE yönteminin NBV açısından uygulanabilirliğini göstermek amacıyla farmasötik preparatında nebivololün analizi gerçekleştirildi. Bunun için yerel eczanelerden sağlanan İbrahim Ethem Ulagay (İstanbul, Türkiye) firmasının üretimi olan ve etken maddesi 5 mg nebivolol içerdiği bilinen Vazoxen® tabletleri analiz edildi. Tablet numunelerinin hazırlanması için 5 mg nebivolol içeren 10 adet tablet ağırlığı tam olarak tartıldıktan sonra ortalama tablet ağırlığı 231.05 mg olarak bulundu. Daha sonra tabletler havanda toz edildi ve ağzı sıkı kapanan koyu renkli cam bir şişeye konuldu. Bir tabletin ortalama ağırlığına karşılık gelen miktar tam olarak tartıldıktan sonra 10 mL metanol ile çözüldü ve 10 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 25 mL'ye metanol ile tamamlandı. Tablet özeltisi analize hazırlanmak üzere seyreltilmeden önce 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. KE yöntemi ile yapılacak tayinlerde, söz edilen tablet stok çözeltisi kullanılarak NBV son derişimi belirtilen doğrusal aralıktaki olacak şekilde  $5.68 \times 10^{-5}$  M olarak seyretmeler yapıldı ve örnekler analiz edildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Sulu metanollü tampon sistemlerinde beta blokerlerin hareketlilik verilerini kullanarak yapısal olarak benzer bileşiklerin elektroforetik hareketliliğinin tahmin edilmesi amacıyla matematik model uygulamalarını içeren bir kapiler elektroforez çalışmasında (Jouyban ve ark, 2003), çeşitli derişimlerde metanol içeren 66 mM asetik asit ve 40 mM asetat çözeltisi çalışma tamponu olarak önerilmektedir. NBV ile ilgili herhangi bir sonuç içermeyen bu çalışma temel alınarak 66 mM asetik asit, 40 mM asetat ve %10 metanol içeren çalışma tamponu çözeltisi ile yapılan kapiler elektroforez çalışmasında 200 nm saptama dalga boyu kullanılarak NBV için 5 dk dolayında beliren bir pik gözlenmiştir.  $1.84 \times 10^{-5}$  M NBV çözeltisi kullanılarak elde edilen pik göç zamanı ve pik alanı tekrar edilebilirliği değerleri sırasıyla  $5.12 \pm 0.028$  (% 0.55 RSD, n= 4) ve  $1460 \pm 95.78$  (% 6.56 RSD, n= 4) bulunmuştur. Belirtilen koşullarda tekrar edilebilir sonuçlar gözlemlendikten sonra yöntemle ilgili optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

### Kapiler Elektroforez Yönteminin Optimizasyonu

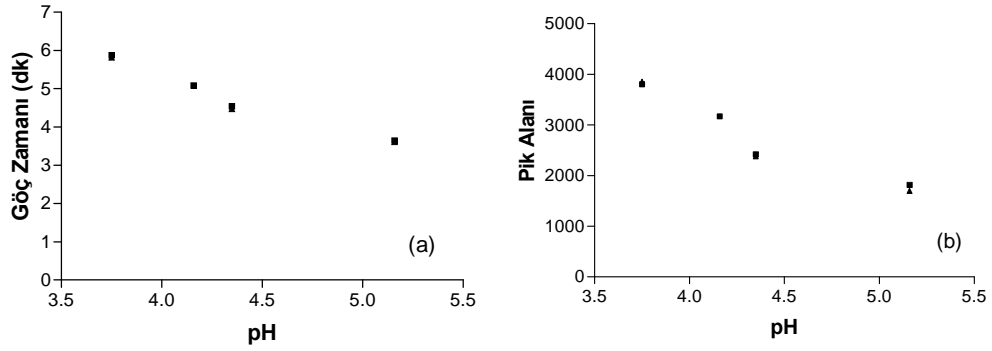
Kapiler elektroforez yönteminin optimize edilmesi amacıyla çalışma tamponunun pH değerinin, çalışma tamponunun derişiminin, organik çözücü miktarının, tampon tipinin NBV piklerinin göç zamanı, pik alanı ve pik şekli üzerine olan etkileri incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

#### *pH*

pH etkisinin incelenmesi amacıyla pH 3.75-5.16 aralığında dört farklı pH değerine sahip asetik asit/ sodyum asetat çözeltisi ve % 10 metanol (h/h) içeren çalışma tamponu hazırlanmıştır. Çizelge 2 de verildiği gibi çeşitli tampon bileşimlerinde NBV çözeltisi için elde edilen sonuçlar Şekil 6 da gösterilmektedir.

Çizelge 2.  $3.23 \times 10^{-5}$  NBV çözeltisi için pH incelemesi

pH	% 10 metanol içeren çalışma tamponu	NBV Göç zamanı	NBV Pik Alanı
3.75	80 mM Asetik asit 20 mM Sodyum Asetat	5.875 5.821	3802 3852
4.16	66 mM Asetik asit 40 mM Sodyum Asetat	5.084	3169
4.35	40 mM Asetik asit 60 mM Sodyum Asetat	4.539 4.469	2417 2380
5.16	20 mM Asetik asit 80 mM Sodyum Asetat	3.647 3.605	1814 1697



Şekil 6. NBV göç zamanı ve alan değerlerinin pH ile değişimi

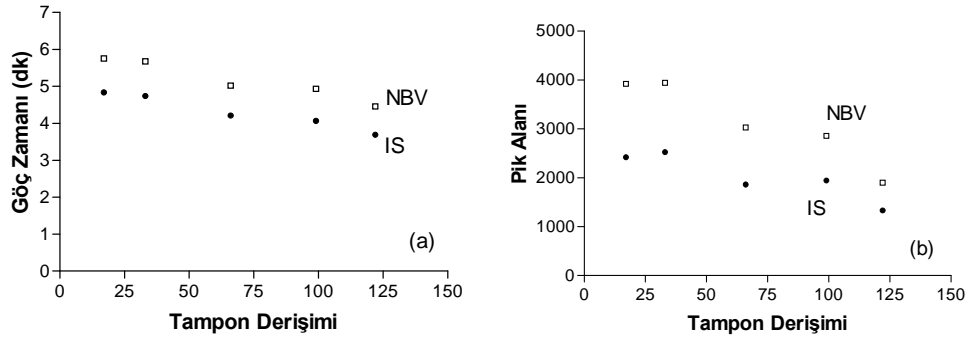
Çalışma tamponunun pH değerleri arttıkça NBV göç zamanının azaldığı ancak pik alanının da azaldığı gözlenmiştir. pH 3.75 in altında NBV göç zamanlarının artması ve asetat tampon çözeltisinin kapasitesi dikkate alınarak pH 3.75 altında çalışmanın uygun olmaması nedeniyle daha düşük pH değerleri incelenmemiştir. pH 5.15 üzerindeki pH değerleri ise küçük pik alanları vermesi nedeniyle daha fazla değerlendirilmemiştir. Çalışılan pH aralığında pik şekilleri de dikkate alınarak yapılan değerlendirmede en uygun pH değeri olarak 4.16 değeri seçilmiştir.

### ***Tampon Derişimi***

Tampon derişiminin etkisini incelemek için aynı pH değerlerini sağlayan asetat tamponu içerisinde % 10 metanol (h/h) içerecek ve asetik asit ve asetat oranları aynı kalacak şekilde miktarlarını değiştirerek NBV göç zamanı ve pik alanına olan etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3 ve Şekil 7 de verilmektedir.

Çizelge 3 .  $3.69 \times 10^{-5}$  NBV ve IS çözeltileri için tampon derişimi etkisinin incelemesi

% 10 metanol (h/h) içeren çalışma tamponu	IS Göç zamanı	IS Pik Alanı	NBV Göç zamanı	NBV Pik Alanı
122 mM Asetik asit	3.748	1454	4.530	2053
80 mM Sodyum Asetat	3.630	1206	4.386	1740
99 mM Asetik asit	4.094	1970	4.974	2920
60 mM Sodyum Asetat	4.036	1917	4.888	2797
66 mM Asetik asit	4.187	1799	4.985	2959
40 mM Sodyum Asetat	4.231	1922	5.056	3100
33 mM Asetik asit	4.728	2586	5.654	3964
20 mM Sodyum Asetat	4.756	2460	5.703	3918
17 mM Asetik asit	4.752	2358	5.639	3832
10 mM Sodyum Asetat	4.927	2479	5.876	4002



**Şekil 7. Tampon derişiminin NBV ve IS göç zamanı ve pik alanları üzerine etkisi**

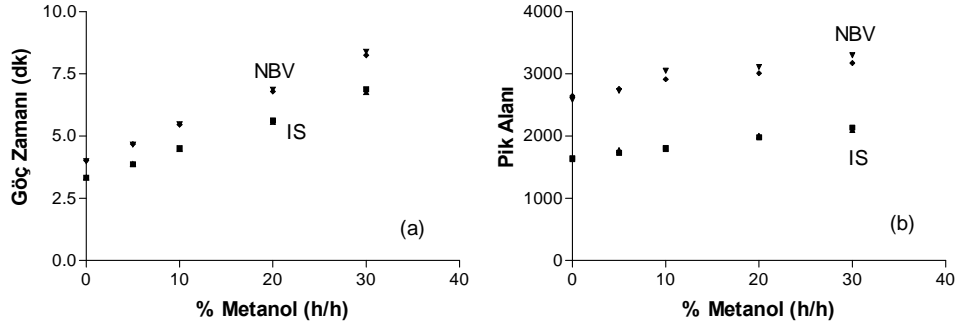
Tampon derişimi azaldıkça pik alan değerleri artmasına karşın göç zamanının da arttığı gözlenmiştir. 66/40 oranının üzerindeki çözeltilerde pik alanlarının tekrarlanabilir olmadığı ve zemin gürültüsünün fazla olduğu gözlenmiştir. Bu oranın altındaki çözeltilerde tekrarlanabilirlik daha iyi ve pik şekilleri simetrik. Silika yüzeyini asetat tamponu ile doymak ve uygun göç zamanları elde etmek amacıyla 66/40 oranında asetik asit/sodyum asetat içeren çalışma tamponu ile deneysel çalışmalara devam etmeye karar verilmiştir.

### **Organik Çözücü Yüzdesi**

Çalışma tamponu içindeki metanol derişiminin etkisini incelemek için metanol oranı 0-30 (h/h) aralığında değişen çalışma tamponu çözeltileri hazırlanmıştır.  $3.69 \times 10^{-5}$  M NBV çözeltisi kullanılarak kaydedilen elektroferogramlarda Çizelge 4'te verilen sonuçlar elde edilmiştir.

**Çizelge 4. Metanol derişiminin NBV ve IS göç zamanı ve pik alanlarına etkisi**

% Metanol (h/h)	IS Göç zamanı	IS Pik Alanı	NBV Göç zamanı	NBV Pik Alanı
0	3.332	1646	3.987	2585
	3.347	1632	4.019	2645
5	3.868	1731	4.661	2728
	3.877	1779	4.676	2759
10	4.514	1808	5.483	3053
	4.482	1793	5.459	2914
20	5.627	1982	6.87	3113
	5.568	2004	6.796	3012
30	6.886	2138	8.395	3301
	6.770	2099	8.255	3174



**Şekil 8. Metanol derişiminin NBV ve IS göç zamanı ve pik alanlarına etkisi**

Metanol içermeyen ve % 5 metanol (h/h) içeren çalışma tamponu içerisinde pik morfolojisinin bozulduğu ve piklerin kuyruklandığı gözlenmiştir. Metanol içeriğinin artması NBV göç zamanlarının hemen hemen doğrusal artışına neden olmuştur. NBV pik alanları ise % 10 metanol (h/h) içeriği üzerinde değişmemektedir. Kısa analiz süresi bakımından % 10 metanol içeren çalışma tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.

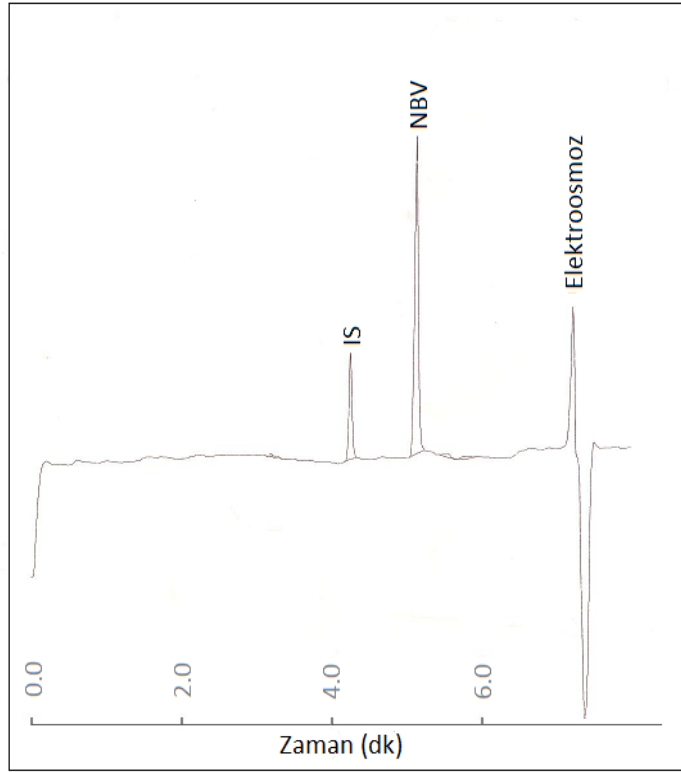
### ***Tampon Tipi***

Tampon tipinin NBV pikleri üzerine etkisinin incelenmesi için % 10 metanol içeren 100 mM fosfat tamponu (pH 4.2) hazırlanmıştır. Bu çalışma tamponunda ardışık kaydedilen elektroferogramlarda göç zamanlarının arttığı ve tekrarlanabilir olmadığı, zemin gürültüsünün çok fazla olduğu, elektroosmozdan itibaren çok sayıda yabancı pik oluştuğu, elektroforetik ayırma koşullarında çok yüksek akım değerleri (199 mA) oluştuğu gözlenmiş ve çalışma tamponu olarak uygun olmadığına karar verilmiştir.

### ***Enjeksiyon süresi ve potansiyel***

25 kV dışında potansiyel değerleri uygulanmamıştır. 0.5 sn üzerindeki enjeksiyon süreleri pik tabanlarının keskinliğinin azalmasına neden olduğu için tercih edilmemiştir.

Özetle, %10 metanol içeren asetat tamponu (66 mM asetik asit + 40 mM sodyum asetat) ve pH sı 4.16 olan çalışma tamponunun en uygun koşulları sağladığı sonucuna varılmış ve bu çözelti ile validasyon deneylerinin yürütülmesine karar verilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen NBV ve IS elektroferogramları Şekil 9’da verilmektedir. Söz edilen çalışma tamponu ile elektroozmotik hareketlilik  $3.07 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , IS için elektroforetik hareketlilik  $1.96 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ve NBV için ise  $9.55 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Yöntemin seçiciliği 1.64, resolüsyon (ayırma gücü) ise 5.46 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 9. Optimum koşullarda IS ( $1.26 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) ve NBV ( $9.32 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) için elde edilen elektroferogram.

## Kapiler Elektroforez Yönteminin Validasyonu

### *Kesinlik*

Ayrılmanın sağlanmasının ardından, yöntemin kesinliğini belirlemek amacıyla NBV ve IS için tekrar edilebilirlik değerleri incelenmiştir. Bu amaçla, standart NBV ( $6.72 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) ve IS ( $1.26 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) çözeltileri, üç gün boyunca altı defa kapiler elektroforez cihazına verilerek elde edilen göç zamanları ve pik alanları değerlendirilmiştir. Pik alanlarının değerlendirilmesinde, yöntemin kesinliğini artırmak amacıyla pik normalizasyon oranı  $[(\text{Alan}_{\text{NBV}} / \text{Göç zamanı}_{\text{NBV}}) / (\text{Alan}_{\text{IS}} / \text{Göç zamanı}_{\text{IS}})]$  değerleri kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5’te verilmektedir.



**Çizelge 5. Standart NBV Çözeltisi ( $6.72 \times 10^{-5}$  M) ve IS için Elde Edilen Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Sonuçları<sup>1,2</sup>**

	Gün İçi Ortalama Kesinlik			Günler Arası Kesinlik
	I. Gün	II. Gün	III. Gün	
Ortalama NBV Göç Zamanı (dk)	5.370	5.303	5.498	5.390
SS	0.0662	0.0908	0.0704	0.1101
% BSS	1.23	1.71	1.28	2.04
SH	0.027	0.037	0.029	0.026
Ortalama IS Göç Zamanı (dk)	4.265	4.485	4.382	4.377
SS	0.0580	0.0943	0.0574	0.1149
% BSS	1.36	2.10	1.31	2.62
SH	0.024	0.039	0.023	0.027
Ortalama Pik Normalizasyon Oranı	2.104	2.187	2.216	2.169
SS	0.0220	0.0111	0.0192	0.05154
% BSS	0.97	0.51	0.89	2.38
SH	0.083	0.0045	0.0080	0.0122

<sup>1</sup> n = 6 (deney sayısı); k = 3 (gün);

<sup>2</sup> Tekraredilebilirlik % Bağlı Standart Sapma ile ifade edilmiştir.

Çizelge 5'e göre, incelenen NBV ve IS çözeltilerinin göç zamanları ve pik normalizasyon oranları için gün içi tekrar edilebilirlik değerleri % 2' nin oldukça altındaki % bağlı standart sapma değeri ile tekrar edilebilirlik kriterlerine uygun görülmektedir. Günler arası tekrar edilebilirlik değerlendirildiğinde, söz konusu derişim değerleri için % 15 bağlı standart sapmanın altında elde edilen sonuçlar yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir (Shah ve ark., 1992).

### ***Doğrusal Aralık***

Doğrusal aralığının incelenmesi için,  $2.2 \times 10^{-5}$  M ile  $1.12 \times 10^{-4}$  M derişim aralığında beş farklı derişimdeki NBV çözeltileri kapiler elektroforez cihazına verilerek üç ayrı günde elektroferogramları kaydedilmiş ve elde edilen sonuçlar en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilmiştir. Yöntemin belirtilen derişim aralığında elde edilen yüksek korelasyonlu doğrusallığını gösteren sonuçlar Çizelge 6'da verilmektedir.

**Çizelge 6. Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Doğrusal Aralık için Elde Edilen Sonuçlar**

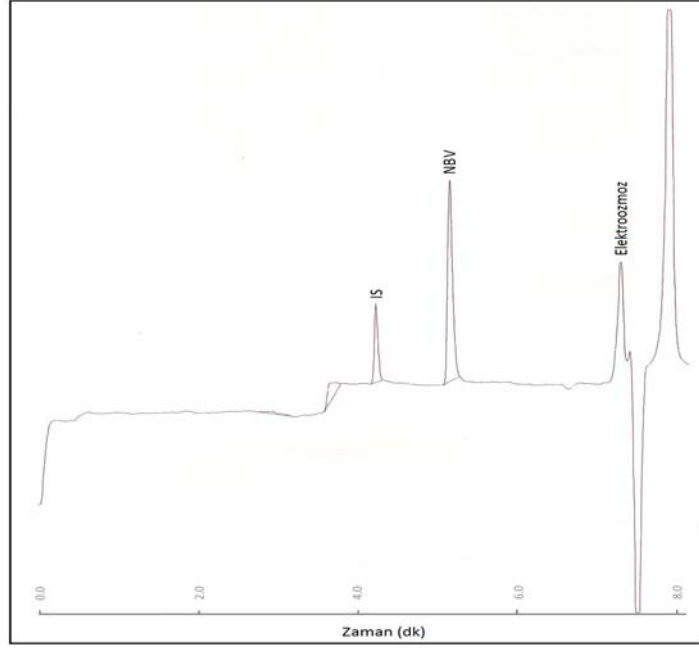
	Gün İçi			Günler Arası (n = 15)
	1. Gün (n = 5)	2. Gün (n = 5)	3. Gün (n = 5)	
Eğim (a)	31210	28780	28260	28760
Kesim (b)	0.1010	0.4125	0.4637	0.3840
Korelasyon Katsayısı ( $r^2$ )	0.9996	0.9997	0.9999	0.9965
Eğimin Standart Hatası (SS)	485.5	398.8	257.9	698.9
Kesimin Standart Hatası (SS)	0.0361	0.02963	0.0192	0.05358

### ***Saptama ve tayin sınırı***

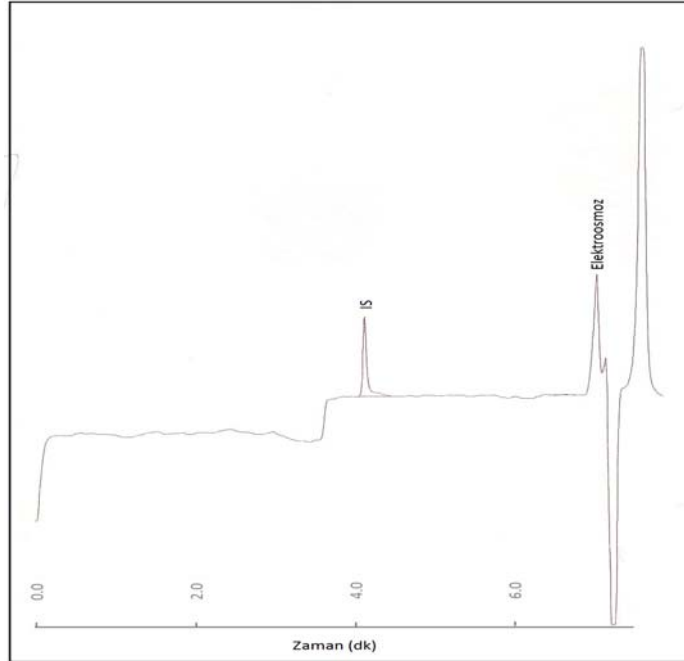
NBV'ün kapiler elektroforez yöntemi ile saptama ve tayin sınırlarının belirlenmesi için saptama sınırı, pik normalizasyon oranının günler arası kesinliğine karşılık gelen standart sapma değerinin (Çizelge 5) kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünmesi ile elde edilen değer 3.3 ile çarpımı kullanılarak  $5.91 \times 10^{-6}$  M olarak hesaplanmıştır. Tayin sınırı ise, aynı oranın 10 ile çarpımı kullanılarak  $1.79 \times 10^{-5}$  M olarak hesaplanmıştır.

### ***Doğruluk***

Kapiler elektroforez yönteminin doğruluğunu incelemek için Yöntemler bölümünde söz edilen matriks ortamına eklenen NBV çözeltileri kullanılmıştır. Matriks ortamındaki NBV çözeltisinin elektroferogramında tabletin aktif olmayan içeriğinden kaynaklanan bir girişimin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 10).



**Şekil 10. Matriks Ortamında NBV Çözeltisinin ( $6.72 \times 10^{-5}$  M) Elektroferogramı**



**Şekil 11. NBV İçermeyen Matriks Ortamının Elektroferogramı**

Şekil 11 de görüldüğü gibi NBV içermeyen matriks ortamında kaydedilen elektroferograma dayanarak geliştirilen kapiler elektroforez yönteminin NBV tayini için seçici olduğu söylenebilir.

Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki NBV çözeltilisinin ( $3.36 \times 10^{-5}$ ,  $6.72 \times 10^{-5}$  ve  $1.01 \times 10^{-4}$  M) matriks çözeltilisine eklenerek karıştırılması, her bir derişim için 6 defa kapiler elektroforez yöntemi ile analiz edilmesi ve NBV içeriğine karşılık gelen pik normalizasyon oranlarının kalibrasyon eşitliğinde çözülmesi ile hesaplanan yüzde geri kazanım ve yüzde bağıl hata değerleri Çizelge 7 de verilmektedir.

**Çizelge 7. Kapiler Elektroforez Yöntemin Doğruluğu ile İlgili İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları\***

Matrikse eklenen NBV (M)	Bulunan NBV (M) (ortalama $\pm$ SS)	Geri kazanım (%)	BH (%)	BSS (%)
$3.36 \times 10^{-5}$	$3.36 \times 10^{-5} \pm 2.18 \times 10^{-7}$	100.00	0.03	0.65
$6.72 \times 10^{-5}$	$6.78 \times 10^{-5} \pm 2.73 \times 10^{-7}$	101.50	0.89	0.40
$1.01 \times 10^{-4}$	$9.99 \times 10^{-5} \pm 5.26 \times 10^{-7}$	98.18	0.99	0.53

\* n = 6

Çizelge 7 de görüldüğü gibi yöntemin doğruluğunu gösteren % BH ve kesinliği gösteren % BSS değerleri % 2 nin oldukça altındadır ve validasyon kriterlerine uygun bulunmaktadır (ICH, 2005). Bu sonuçlara göre tablet içindeki yardımcı maddelerin NBV tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı söylenebilir.

### **Sağlamlık (Robustness)**

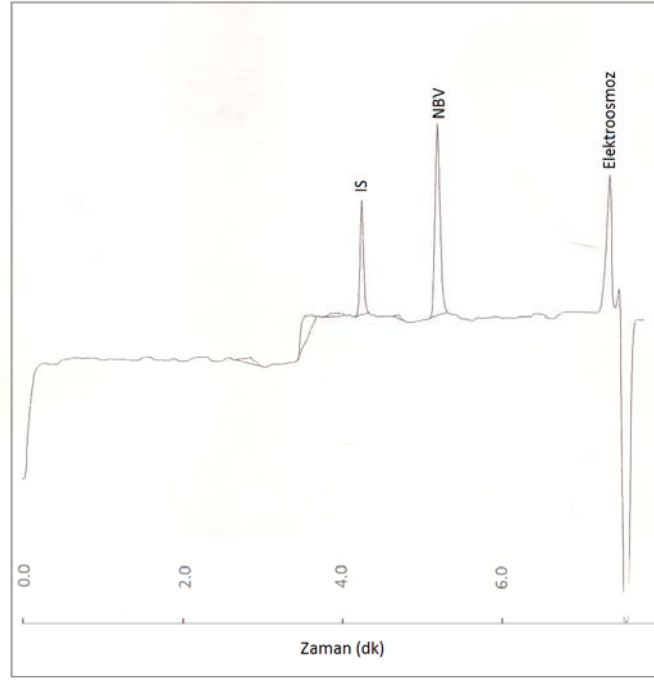
Sağlamlık, yöntem parametrelerinde küçük değişkenliklerle ilgili olarak analitin yanıtının güvenilirliğini gösterir. Kapiler elektroforez yönteminin sağlamlığının test edilmesi için optimum deneysel parametrelerde küçük değişiklikler yapılarak kaydedilen NBV çözeltilerinin ( $6.72 \times 10^{-5}$  M) normalize pik alan oranlarının % bağıl standart sapma ve standart hata değerleri hesaplanmış ve Çizelge 8 de sunulmuştur. 202 nm dalga boyu değişkeni dışında elde edilen düşük % BSS değerleri (<2) yöntemin sağlamlığını göstermektedir.

**Çizelge 8. Kapiler Elektroferez Yönteminin Sağlamlık Testi Sonuçları ( $6.72 \times 10^{-5}$  M NBV, n=3)**

Değiştirilen Parametre	SH	% BSS
Çalışma Tamponu pH pH 4.00 pH 4.40	1.121 0.832	1.78 1.61
Çalışma Tamponu Derişimi 38 mM Sodyum Asetat/68 mM Asetik Asit 42 mM Sodyum Asetat/64 mM Asetik Asit	0.349 0.328	0.59 0.54
Organik Çözücü Miktarı (% MeOH, h/h) % 8 % 12	0.329 0.532	0.56 0.84
Dalga Boyu (nm) 198 nm 202 nm	0.023 2.332	0.04 3.88
İnjeksiyon Süresi (s) 0.6 s 0.4 s	0.503 0.966	0.95 1.83
Potansiyel (kV) 24 26	0.528 0.192	0.89 0.32

### **NBV İçeren Tabletlerde Miktar Tayini**

Kapiler elektroferez yönteminin uygulaması, 5.0 mg NBV içerdiği bilinen ticari tabletlerde miktar tayini yapılarak gösterilmiştir (Şekil 12). Deneysel kısımda tarif edildiği şekilde hazırlanan tablet numuneleri optimum koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, doğrusallık bölümünde verilen günler arası eşitlikte çözülerek NBV içeren tabletlerdeki miktarlar ve karşılık gelen yüzdeleri hesaplanmıştır. Tablet bileşenlerinden kaynaklanan ve ölçümleri etkileyecek düzeyde girişim gözlenmemiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler, Çizelge 9'da sunulmaktadır.



**Şekil 12. NBV Tablet Çözeltisinin Elektroferogramı**

**Çizelge 9. Kapiler Elektrozefrez Yöntemi ile Tabletlerde NBV Miktar Tayini Sonuçları.**

Deney Sayısı	Bulunan NBV (mg)	% NBV
1	5.08	101.60
2	5.28	105.51
3	5.06	101.13
4	5.15	102.94
5	5.21	104.27
6	5.22	104.51
Ortalama	5.166	103.3
SS	0.087	1.733
% BSS	1.68%	1.68%
Güven Aralığı (p<0.05)	5.075-5.257	101.5-105.1

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

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Kapiler elektroforez, son yıllarda basitliği, hızlı oluşu, az miktarda numune gerektirmesi ve ucuz olması gibi nedenlerle analitik kimyada önem kazanmış bir yöntemdir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kolay otomasyonu, duyarlılığı, yüksek tekrar edilebilirliği ve kısa analiz süresi sağlaması nedenleriyle daha çok tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Bu çalışmada, öncelikle NBV tayini önerilen kapiler elektroforez yöntemi için en uygun cihaz ve analitik koşullar belirlenmiştir. Bu koşulların belirlenmesi için çalışma tamponu pH'sı, çalışma tamponu derişimi, organik çözücü miktarı, çalışma tamponu tipi gibi parametreler incelenerek NBV göç zamanı ve pik alanı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Kısaca % 10 metanol (h/h) içeren asetat tamponundan (66 mM asetik asit + 40 mM sodyum asetat, pH 4.16) oluşan çalışma tamponunun en uygun koşulları sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu koşullarda IS olan 3,4-dihidroksibenzil amin için 4.3 dk ve NBV için 5.3 dk da beliren pikler elde edilmiştir.

NBV analizi için en uygun koşullar belirlendikten sonra kesinlik, doğrusallık, saptama ve tayin sınırı, doğruluk, seçicilik ve sağlamlık gibi geçerlilik parametreleri incelenerek yöntemin geçerliliği gösterilmiştir. Tüm geçerlilik parametreleri için % BH ve % BSS değerlerinin %2'nin altında olduğu belirlenmiştir.

Önerilen kapiler elektroforez yöntemi ile ticari tabletlerde yapılan NBV içerik analizi sonucunda % NBV içeriğinin USP 29'da belirtilen içerik koşullarını sağladığı belirlenmiştir.

NBV analizi için önerilen spektrofotomerik çalışmalarda, doğrusal aralık 5-80 µg/mL ve sırasıyla 0.8 ve 2.76 µg/mL saptama ve tayin sınırlarına karşılık gelen sonuçlar görülmektedir (Mishra ve ark., 2007; Chaudhary ve ark., 2010; Parambi ve ark., 2010). Kapiler elektroforez yöntemi de spektrofotometrik yöntemlerde belirtilen aralıkta (10-50 µg/mL) ve sırasıyla 2.61 µg/mL ve 7.91 µg/mL saptama ve tayin sınırı değerleri ile tayin olanağı sunmaktadır. Ayrıca spektrofotometrik çalışmalarda söz konusu olmayan seçicilik özelliği önerdiğimiz yöntemde üstünlük olarak karşımıza çıkmaktadır. Literatürde rastlanan YPSK yöntemlerinde ise 5-200 µg/mL derişim aralığında doğrusal olan yöntemler önerilmekte ve sırasıyla 0.01 µg/mL ve 0.05 µg/mL'ye karşılık gelen saptama ve tayin sınır değerleri verilmektedir (Joshi ve ark., 2008; Yılmaz, 2010; Tarte ve ark., 2009; Srinivasulu ve ark., 2009; Gupta ve ark., 2009). Önerilen kapiler elektroforez yönteminin doğrusal aralığı YPSK yöntemine göre daha dardır ve saptama ve tayin sınırı değerleri YPSK yöntemi kadar düşük değildir. Ancak tablet analizi söz konusu olduğunda YPSK yöntemlerine göre daha ekonomik, kolay ve çabuk bir yöntemdir.

Burada önerilen yöntem ile NBV analizi 6 dk içinde doğru ve kesin olarak sonuçlandırılabilir. Ayrıca yöntem basit ve ucuzdur. Bu nedenle tabletlerde yapılacak rutin NBV içerik tayini için önerilebilir.

## KAYNAKLAR

Baker, D.R., Capillary Electrophoresis, Wiley-Interscience A John Wiley&Sons, Inc. Publication, New Jersey, 1-51 (1995).

Chaudhary Ankit, B., Patel Rakesh, K., Chaudhary Sunita, A., Estimation of Valsartan and Nebivolol in pharmaceutical dosage forms by absorption ratio method, *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 1 (2), 108-112 (2010).

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

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

Doshi, A.S., Bhagwan, S.S., Mehta, T.N., Gupta, V.K., Subaaiah, G., Determination of nebivolol and valsartan in a fixed-dose combination by liquid chromatography, *J. AOAC Int.*, 91 (2), 292-298 (2008).

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

Gupta, Y., Shrivastava, A., Duggal, D., Patel, A., Agrawal, S., A new RP-HPLC method for simultaneous estimation of nebivolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in dosage forms, *J. Young Pharmacists*, 1 (3), 264-269 (2009).

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



http-1 HPTLC Method Development and Validation for the Estimation of Nebivolol Hydrochloride, <http://www.pharmainfo.net/reviews/hptlc-method-development-and-validation-estimation-nebivolol-hydrochloride>, (05.08.2010).

http-2 Bystolic Tablets, <http://www.rxlist.com/bystolic-tablets-drug.htm>, (09.08.2010).

http-3 Bystolic, <http://www.pharmacy.cuhk.edu.hk/ampoule/zh/monograph/nebivolol.pdf>, (06.08.2010).

http-4 Vasoxen tablet, <http://www.ilacprospektusu.com/ilac/89/vasoxen-5-mg-28-tablet>, (14.08.2010).

http-5 Zacharis, C., Capillary Electrophoresis. SciTopics., [http://www.scitopics.com/Capillary\\_Electrophoresis.html](http://www.scitopics.com/Capillary_Electrophoresis.html), (11.08.2010).

http-6 Capillary electrophoresis, [http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Capillary\\_Electrophoresis](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis), (12.08.2010).

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

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

Jouyban, A., Khoubnasabjafari, M., Chan, H.K., Altria, K.D., Clark, B.J., Predicting Electrophoretic Mobility of Beta-blockers in a Water-Methanol Based Electrolyte System, *J. Chrom. A*, 57 (3-4), 191-195 (2003).

Judy, W.M., Cheng, B.S., PharmD, MPH, FCCP, BCPS, Nebivolol: A-Third Generation  $\beta$ -Blocker for Hypertension, *Clinic. Therap.*, 31 (3), 447-462 (2009).

Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Pelikan Yayıncılık Ltd.Şti, Ankara, 357-375, (2009).

Kokil, S., Bhatia, M.S., Simultaneous estimation of nebivolol hydrochloride and valsartan using RP-HPLC, *Indian. Pharm. Sci.*, 71 (2), 111-114 (2009).

Mishra, P., Shah, K., Gupta, A., UV and extractive spectrophotometric methods for the determination of Nebivolol hydrochloride in tablets, *J. Ind., Chem., Soc.*, 84 (12), 1242-1245 (2007).

Okutucu, S., Aytemir, K., Hipertansiyon Tedavisinde Beta Reseptör Antagonistleri, *Gün. İç Has.Der.*, 1 (1), 107-119 (2008).

Parambi, T. D.G., Sr. Mathew, M., Jose, A., Dr. Revikumar, K.G., A validated UV spectrophotometric determination of an antihypertensive drug-nebivolol from tablet formulations, *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 3 (2), 139-141 (2010).

Patel, L.J., Suhagia, B.N., Shah, P.B., RP-HPLC and HPTLC methods for the estimation of nebivolol hydrochloride in tablet dosage form, *Indian J. Pharm. Sci.*, 69 (4), 594-596 (2007).

Ramakrishna, N.V.S., Vishwottam K. N., Koteswara M., Manoj S., Santosh M., Varma D.P., Rapid quantification of nebivolol in human plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, 1006-1013 (2005).

Rao, A.L., Rajeswari, K.R., Sankar, G.G., Spectrophotometric Method for the determination of nebivolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulations, *E-J. Chem.*, 7 (2), 445-448 (2010).

Reddy, T.S., Devi, P.S., Validation of a high-performance thin-layer chromatographic method, with densitometric detection, for quantitative analysis of nebivolol hydrochloride in tablet formulations, *J., Planar Chromatogr., Mod. TLC*, 20 (2), 149-152 (2007).

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

Senthamil Selvan, P., Veeran Gowda, K., Mandal, U., Sam Solomon, W.D., Pal, T.K., Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartan in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B.*, 858, 143-150 (2007).

Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., Mcgliveray, I.J., Skelly, J.P., Jacobi, T.A., Layoff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., Mc Dowall, R.D., Pittman, K.A., Spector, S., Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies, *J. Pharm. Sci.*, 81, 309–312 (1992).

Shah, K., Mishra, P., Gupta, A., Spectrophotometric methods for simultaneous estimation of nebivolol hydrochloride and amlodipine besylate in tablets, *Int. J. Pharm. and Pharm. Sci.*, 1 (2), 55-61 (2009).

Shihabi, Z.K. Stacking in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.*, 902 (1), 107-117 (2000).

Shirkhedkar, A.A., Bugdane, P.M., Surana, S.J., First Order Derivative Spectrophotometric Determination of Nebivolol in Bulk and Tablets, *The Pharma Review*, (February-March, 2008).

Shirkhedkar, A.A., Bugdane, P.M., Surana, S.J., Stability-Indicating TLC-densitometric determination of nebivolol hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage form, *J. Chromatogr. Sci.*, 48 (2), 109-113 (2010).

Sneha, J.J., Pradnya, A.K., Suvarna, I.B., RP-LC Simultaneous Determination of Nebivolol Hydrochloride and Amlodipine Besilate in Bi-Layer Tablets, *Chromatographia*, 70, 557-561 (2009).

Srinivasulu, D., Sastry, B.S., Ramana, H., Reverse phase HPLC method for the analysis of nebivolol in pharmaceutical dosage forms, *J. Pharm. Res. Health Care*, 1 (1), 25-33 (2009).

Tarte, P.S., Wate, S.P., Bondre, A.V., Paunekar, G.V., Simultaneous determination of nebivolol and hydrochlorothiazide in tablet dosage form by RP-HPLC, *Int. J. Pharm. Res.*, 1 (3), 720-724 (2009).

The United States Pharmacopeia XXIX, Marck Printing Co., Easton, (2006).

Yılmaz, B., Reverse Phase HPLC Method For Determination of Nebivolol in Pharmaceutical Preparations, *Int. J. Pharm. Sci.*, 1 (2), 14-17 (2010).