

**NKUBAP.00.GA.16.026 nolu proje**  
**RİLMENİDİN'İN TÜREV**  
**SPEKTROSKOPİSİ İLE**  
**FARMASÖTİK PREPARATLARDA**  
**MİKTAR TAYİNİ VE VALİDASYONU**

**Yürütücü: Dr. Ayça Karasakal**

**2017**

## ÖNSÖZ

Rilmenidin'in kimyasal adı; N-(disiklopropilmetil)-4,5-dihidro-1,3-oksazol-2-amindir. Antihipertansif özellikli bir oksazolün olan Rilmenidin, gerek meduller gerekse periferel vazomotor yapılar üzerinde etkilidir. Bu çalışmada, Rilmenidin tayini için basit, hızlı, güvenilir, UV türev spektroskopisi ile yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Optimum şartların sağlanması amacıyla, çözücü, türev derecesi, dalga boyu aralığı seçimi yapılmıştır. İlacın etken maddesinde beklenilenden daha az miktarda etken madde bulunması gibi meydana gelecek olan değişiklikler hastanın sağlığını tehlike altına atabileceği için değişen çevre koşullarındaki ilaç etken maddelerinde olabilecek değişiklikler bozundurma çalışmaları ile incelenmiştir. Bu çalışma da Rilmenidin etken maddesi asidik ve bazik bozunmaya uğratılarak bozunma yüzdesi geliştirilen UV türev spektroskopisi ile analiz edilerek hesaplanmıştır. Ayrıca geliştirilen UV türev spektroskopisi yöntemi ile Rilmenidin'in farmasötik tablet preparatlarda miktar tayinine uygulanmış ve bu yöntem doğruluk, kesinlik, geri kazanım yönünden valide edilmiştir.

Bu çalışma; NKÜ-BAP birimi tarafından desteklenen NKUBAP.00.GA.16.026 numaralı bir araştırma projesidir

# **İÇİNDEKİLER**

## **1.GENEL BİLGİLER**

- 1.1. Rilmenidin molekülü hakkında genel bilgi** 1
- 1.2.UV Türev spektroskopisi** 1
- 1.3.Türev spektroskopik yöntemle yapılan literatür çalışmaları** 5

## **2.DENEYSEL KISIM**

- 2.1.Optimum koşulların sağlanması** 8
  - 2.1.1. Uygun çözücünün belirlenmesi** 8
  - 2.1.2. Uygun türev seçimi** 10
  - 2.1.3. Ölçü eğrisinin çizilmesi** 10
- 2.2.Farmasötik tablet preparatlarda miktar tayini** 14
- 2.3.Degradasyon çalışmaları** 14
- 2.4.Metod validasyonu** 17

## **3.SONUÇLAR**

19

## **Tablo Listesi**

**Tablo 1.** Rilmenidin'in ölçü eğrisi değerleri

**Tablo 2.** Bozundurma sonucu absorbans ve türev spektrumundaki değişimleri

**Tablo 3.** Gün içi günler arası konsantrasyon değerleri

## **Şekil Listesi**

**Şekil 1.** Rilmenidin kimyasal yapısı

**Şekil 2.** Rilmenidin 0,1 M NaOH ile dönüştürülmüş bazına ait spektrum

**Şekil 3.** Rilmenidin 0,1 M NH<sub>3</sub> ile dönüştürülmüş bazına ait spektrum

**Şekil 4.** 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki rilmenidin etken maddelerinin spektrum grafikleri

**Şekil 5.** Rilmenidinin absorbans değerlerine göre çizilen ölçü eğrisi grafiği

**Şekil 6.** Rilmenidinin 1. türev değerlerine göre çizilen ölçü eğrisi grafiği

**Şekil 7.** 200 µg Rilmenidin 1.türev grafiği

**Şekil 8.** 200 µg Rilmenidin 2.türev grafiği

**Şekil 9.** 200 µg Rilmenidin 3.türev grafiği

**Şekil 10.** Asidik degradasyon sonucunda oluşan rilmenidinin spektrumu

**Şekil 11.** Bazik degradasyon sonucunda oluşan rilmenidinin spektrumu

**Şekil 12.** Oksidatif degradasyon sonucunda oluşan rilmenidinin spektrumu

## ÖZET

Hipertansiyon veya yüksek tansiyon, bazen arteriyel hipertansiyon, atardamarlardaki kan basıncının yükseldiği kronik bir tıbbi durumdur. Bu basınç artışı sonucu, kalp kanın damarlarda dolaşımını sağlamak için normalden daha fazla çalışmak zorunda kalır. Kan basıncı iki, sistolik ve diyastolik ölçümü içermekte olup bunlar kalp kaslarının kalp atışları arasında kasılması (sistol / büyük tansiyon) veya gevşemesine (diyastol / küçük tansiyon) bağlıdır. Dinlenme halinde normal kan basıncı, büyük tansiyon 100–140 mmHg (en yüksek nokta) ve küçük tansiyon 60–90 mmHg (en alt nokta) arasında seyreder. Yüksek tansiyon, tansiyonun sürekli 140/90 mmHg ve üzerinde bir seviyede olmasıdır. Hipertansiyon birincil (sürekli) hipertansiyon veya ikincil hipertansiyon olarak sınıflandırılır. Vakaların yaklaşık %90–95'i "birincil hipertansiyon" olarak sınıflandırılmış olup bu, altta yatan herhangi belirli bir sebep olmadan kan basıncının yüksek olması anlamına gelir. Böbrekleri, atardamarları, kalbi veya endokrin sistemini etkileyen diğer durumlar ise vakaların geri kalan %5-10'luk dilimini oluşturur (ikincil hipertansiyon). Günümüzde hipertansiyon tedavisinde kullanılan ve genel olarak antihipertansif ilaçlar olarak anılan çeşitli ilaç tedavisi sınıflandırmaları bulunmaktadır

Rilmenidin'in kimyasal adı; N-(disiklopropilmetil)-4,5-dihidro-1,3-oksazol-2-amindir. Antihipertansif özellikli bir oksazolün olan Rilmenidin, gerek meduller gerekse periferel vazomotor yapılar üzerinde etkilidir. Imidazolin reseptörlerine, serebral alfa-2-adrenerjik reseptörlerden daha fazla afinite göstermesi nedeniyle alfa-2 agonistlerden ayrılır [1].

Rilmenidin'in farmasötik preparatlarda miktar tayini için, türev spektroskopisi yöntemine dayanan hızlı,duyarlı ve ekonomik yeni spektrofotometrik yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntem, rilmenidin'in farmasötik preparatlarda miktar tayinine uygulanacak , doğruluk, kesinlik ve geri kazanım yönünden valide edilmesiplanlanmaktadır.

## ABSTRACT

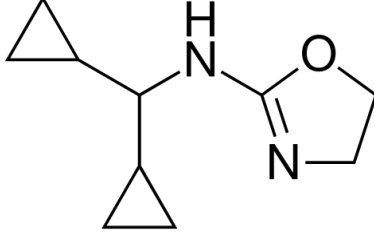
Hypertension (HTN) or high blood pressure, sometimes called arterial hypertension, is a chronic medical condition in which the blood pressure in the arteries is elevated. Blood pressure is summarised by two measurements, systolic and diastolic, which depend on whether the heart muscle is contracting (systole) or relaxed between beats (diastole). This equals the maximum and minimum pressure, respectively. Normal blood pressure at rest is within the range of 100–140mmHg systolic (top reading) and 60–90mmHg diastolic (bottom reading). High blood pressure is said to be present if it is often at or above 140/90 mmHg. Hypertension is classified as either primary (essential) hypertension or secondary hypertension; about 90–95% of cases are categorized as "primary hypertension" which means high blood pressure with no obvious underlying medical cause. The remaining 5–10% of cases (secondary hypertension) are caused by other conditions that affect the kidneys, arteries, heart or endocrine system.

Rilmedine's chemical formula is N-(dicyclopropylmethyl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-2-amine. Rilmenidine, an oxazoline compound with antihypertensive properties, acts on both medullary and peripheral vasomotor structures. Rilmenidine shows greater selectivity for imidazoline receptors than for cerebral alpha<sub>2</sub>-adrenergic receptors, distinguishing it from reference alpha<sub>2</sub>-agonists [1].

In this study, for derivative spectroscopic method, we will analyse the derivatives of UV/VIS spectra curves of Rilmenidine. The developed methods will be applied to rilmenidine pharmaceutical preparations and the results will be statistically compared. In addition, the developed methods were validated for linearity, precision, accuracy and recovery.

## 1.1. Rilmenidin molekülü hakkında genel bilgi

Rilmenidin, (N-(disiklopropilmetil)-4,5-dihidro-1,3-oksazol-2-amin) [1]



Şekil 1: Rilmenidin kimyasal yapısı

Farmakolojik özellikleri incelendiğinde, Farmakoterapötik grup: İmidazolin reseptör Agonistleridir

Etki mekanizması;antihipertansif özellikli bir oksazolün olan Rilmenidin 1 mg, gerek meduller gerekse periferel vazomotor yapılar üzerinde etkilidir, imidazolin reseptörlerine, serebral alfa-2-adrenejik reseptörlerden daha fazla afinite göstermesi dolayısıyla alfa-2 agonistlerden ayrılır. Rilmenidin 1 mg, genetik olarak hipertansif sıçanlarda, doza bağımlı olarak antihipertansif etki gösterir. Alfa-2 agonistleri ile görülen santral nörofarmakolojik etkiler, hayvanlarda sadece antihipertansif etki dozlarının üzerindeki dozlarda görülür, özellikle sedatif etki daha az belirgindir. Farmakodinamik etkiler; Rilmenidin 1 mg, normal tedavi dozlarında kardiyak fonksiyonları değiştirmemekte, tuz ve su retansiyonuna neden olmamakta, metabolik dengeyi bozmamaktadır. [2]

## 1.2. UV Türev Spektroskopisi

x bağımsız, y bağımlı değişken olmak üzere, bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi  $dx/dy$ 'dir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda türev  $dA/d\lambda$  olacaktır. Spektrumun her bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp dalga boyunun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde 2.,3.,...n. türev spektrumları sırasıyla  $d^2A/d\lambda^2$ ,  $d^3A/d\lambda^3$ ,  $d^nA/d\lambda^n$  değerleri ile dalga boyları arasında oluşturulabilir. Şekil 1'de basit bir pikin 1. 2. 3. ve 4. türev spektrumları verilmiştir. Pikin birinci türevi alındığında yükselen bölgeler pozitif, inen bölgeler negatif pikler oluşturmakta, dönüm noktalarının bulunduğu dalga boylarında ekstremumlar oluşmakta, orijinal pikteki ekstremumların karşılığı olan dalga boylarında ise türev eğrisi sıfırdan geçmektedir. Orijinal spektrumdaki bir pike karşılık n. Türev spektrumunda n+1 adet pik oluşmakta, türevin derecesi arttıkça pikler keskinleşmekte ve daralmaktadır



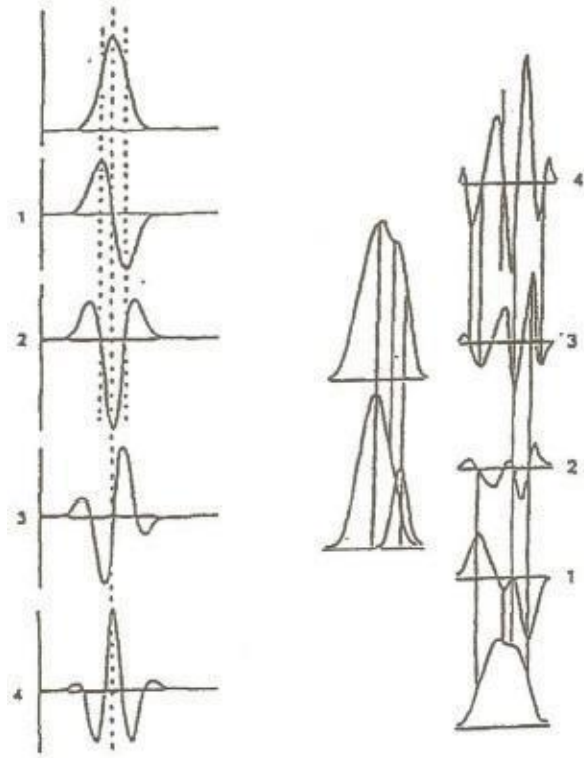
Türev derecesi arttıkça spektral ayrıntıların aydınlatılmasında yararlanır, bu durum da saflık testleri ve piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla ayırıcılık (rezolüsyon) artmaktadır. Bundan teşhiste önemlidir. Orijinal spektrumda bulunan omuzlar tek sayılı türev spektrumlarında ekstremumlara dönüşmektedir.

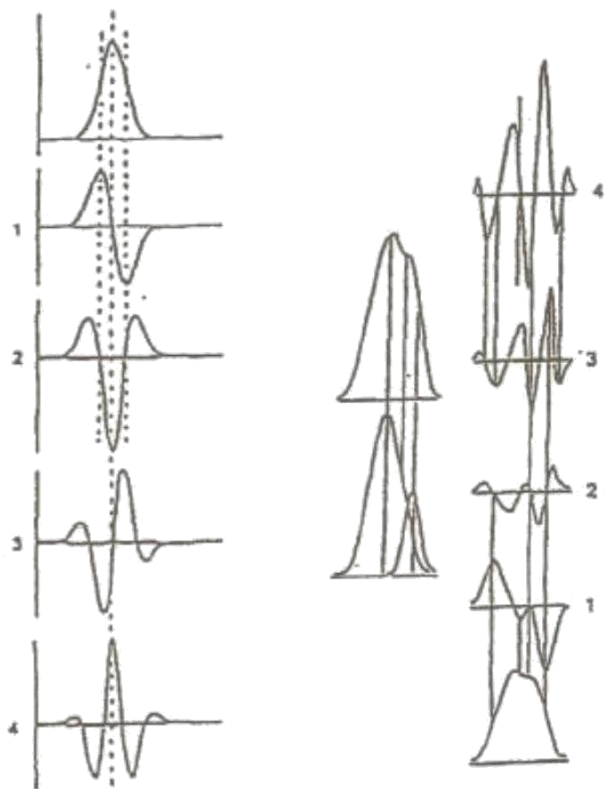
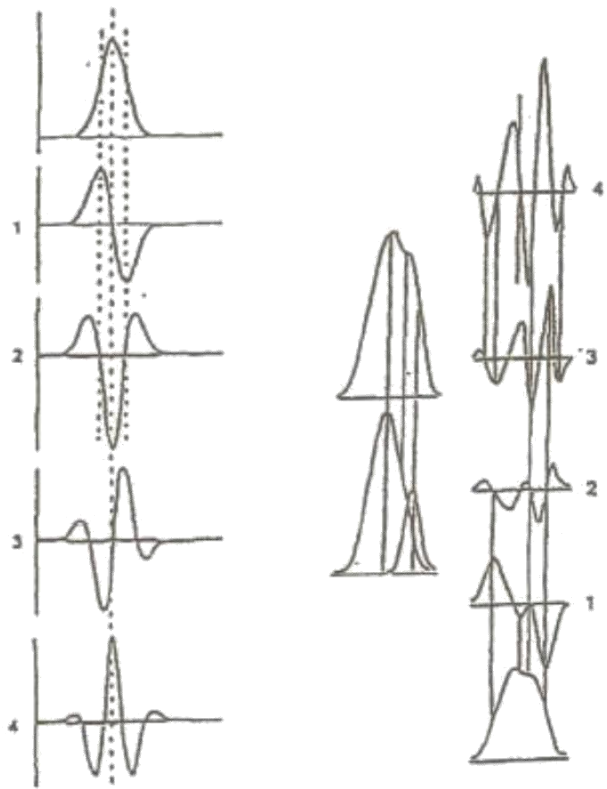
Orijinal spektrumda absorpsiyon maksimumunun bulunduğu dalga boyunda 2. türev spektrumunda bir minimum, 4. türev spektrumunda bir maksimum ortaya çıkmakta, 1. ve 3. türev spektrumları ise bu dalga boyunda sıfırdan geçmektedir.

Bu durumdan ise çakışan piklerin çözülmesinde yararlanır. Şekil 2'de görüldüğü gibi iki maddenin absorpsiyon pikleri üst üste geldiği zaman orijinal spektrumda küçük pik omuz şeklinde görülür. Bu omuzdan tek dereceli türev spektrumlarında oluşan ekstremumlar her iki maddenin diğerinin etkisi olmaksızın nicel tayinine olanak sağlar. Bu durum eser analizlerde önemlidir.

Absorpsiyon spektrumunda herhangi bir dalga boyunda Lambert Beer yasası geçerli ise n. dereceden türev spektrumunda türev absorbansı,  $D_n$  aşağıdaki eşitlik ile verilebilir.

$$D_n = dnA/\lambda^n = (dn\epsilon/\lambda^n)I.C$$





Görüldüğü gibi Lambert-Beer yasasının geçerli olması koşuluyla türev absorbans değerleri ile derişim arasında doğrusal bir ilişki vardır. Türev spektrofotometrisi ile kantitatif analizin temelini bu eşitlik oluşturur. Direkt spektrofotometride derişim ile absorbans arasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri türev spektrofotometrisinde standart çözeltilerin derişimi (C) ile karşılık olan türev absorbans değerleri (Dn) arasında çizilir.

Türev absorbans değerlerinin ölçülmesinde çeşitli teknikler uygulanmaktadır.:

**1.Tanjant Tekniğı:** Birbirini izleyen iki maksimum ya da iki minimuma ortak teğet çizilir. Bu teğetin aradaki ekstremuma olan uzaklığı ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik, doğrusal bir zemin olduğu zaman daha tatminkar sonuçlar verir ve zeminin spesifik olmayan etkilerinin elimine edilmesinde ya da azaltılmasında yararlıdır.

**2.Pik-Pik Tekniğı:** Birbirini izleyen iki ekstremum arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik genellikle zemin absorbansının giderilmesinde, çok bileşenli karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.

**3.Pik-Sıfır Tekniğı:** Peak-zero ya da zero-crossing tekniğı olarak adlandırılan bu teknik pik tepesinin absise olan uzaklığının ordinata paralel olarak ölçülmesidir. Çok bileşenli karışımların analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Zemin etkisinin giderilmesinde yararı olmaz.

**4.Pik-Pik Oranı Tekniğı:** Birbirine komşu iki pikin oranı alınır. Bu teknik ikili karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.

### **UV-Türev Spektrofotometrisinin Avantajları ve Kullanım Alanları**

**Maksimum Absorpsiyon Dalga Boyunun Kesin Olarak Belirlenmesi:** Özellikle geniş absorpsiyon bantlarının bulunduğu absorpsiyon spektrumlarında absorpsiyonun maksimum olduğu dalga boyunun kesin bir şekilde saptanmasında 1. türev spektrumu çok yararlıdır. Orijinal spektrumda  $\lambda_{max}$ 'un bulunduğu dalga boyunda 1.türev eğrisi sıfırdan geçeceği için bu dalga boyu çok daha kesin bir şekilde kolayca saptanabilir.

**Rezolüsyonda Artış:** Türev spektrumlarının ikinci avantajı da orjinal spektrumda zor görülebilen spektral ayrıntıların ortaya çıkması yani ayırıcılığın artmasıdır. Bunun için çift sayılı türev spektrumları daha avantajlıdır. Çünkü orjinal spektrumda bulunan maksimum ve minimumlar bu spektrumlarda yine aynı dalga boylarında birer ekstremum halinde ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde türev spektrumlarının alınması ile spektral ayrıntıların netleştirilmesi tanıma, saflık testleri ve eser analizde çok yararlı olmaktadır.

**Teşhis:** Özellikle absorpsiyonu görünür bölgede olan renkli maddelerin absorpsiyon spektrumlarının geniş bantlar halinde olduğu için bu spektrumlar maddenin karakterizasyonu ve saptanmasında önem taşımaz. Buna karşın orijinal spektrumdaki omuzların türev spektrumlarında, özellikle yüksek dereceli olanlarda

ekstremum haline dönüşmesi, piklerin sayısının artması ve keskinleşmesi ile spektral ayrıntılar ortaya çıkar ve infrared parmak izi spektrumlarına benzeyen spesifik spektrumlar elde edilir. Bu şekilde absorpsiyon spektrumları birbirine çok benzeyen benzer kimyasal yapıdaki bileşiklerin türev spektrumlarının alınması bunların farklılandırılmasına olanak sağlar.

**Saflik Kontrolü:** Türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar maddelerin saflik testlerinde de avantaj sağlamaktadır. Eser miktardaki safsızlıklara ait küçük absorpsiyon pikleri türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür. Test edilen numune spektrumlarının, saf maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumlarıyla karşılaştırılmasıyla ham madde, ara ürün ve nihai ürünlerde saflik kontrolü yapılır.

**Eser Analiz:** İlaç maddeleri, besinler vb. maddelerde bulunabilen eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarlarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır.

**Karışımların Bir Arada Analizi:** Türev Spektrofotometrisinin oldukça yaygın bir kullanım alanı da absorpsiyon bantları çakışan ve bu sebeple bir ön ayırma yapmaksızın doğrudan tayin edilemeyen karışımların eş zamanlı analizidir. Bu analizlerde pik-sıfır, pik-pik ve pik-pik oranı teknikleri kullanılmaktadır. Her üç teknikte de kalibrasyon eğrileri, derişim ile bu parametrelerden biri arasında hazırlanır. Burada önemli nokta standart ve bilinmeyen çözeltilerin spektrumlarının aynı enstrümantal parametrelerle alınmasıdır.

**Bulanık Çözeltilerde Nicel Analiz:** Bulanık çözeltiler ve süspansiyon veya emülsiyon şeklindeki çözeltilerde spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur. Özellikle ultraviyole alanda ışın saçılması sebebiyle analitin spektrumu kuvvetli ya da zayıf bir zemin absorpsiyonu ile örtüşür. Bulanıklığın sebep olduğu geniş bantlı zemin absorpsiyonu dalga boyu ile hafif bir derişim gösterir. Türev spektrumlarındaki karakteristik pik-pik mesafeleri değerlendirilerek bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi yok edilebilir.

**Matriks Etkisinin Giderilmesi:** Türev spektrumları alınması ile orjinal spektrumdaki keskin spektral özellikler kuvvetlenmekte buna karşın geniş ve yaygın bantlar daha da basıklaşmaktadır. Bu özellik analit piki ile çakışan derişken zemin absorpsiyonunun düzeltilmesine ve bu şekilde matriks etkisinin giderilmesine olanak sağlar[3-4]

### 1.3.Türev spektroskopik yöntemle yapılan literatür çalışmaları

Ketoprofen içeren jel ve ampullerde, jel ve ampul katkı maddeleri yanında Ketoprofen tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla UV Spektrofotometrisi, UV Türev Spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri kullanılmıştır. Jellerde Ketoprofen'in UV Spektrofotometrisi ile tayini 255 nm ve 268 nm (1. türev, n=5)'de çözücü olarak metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jel katkı maddeleri Karboksipolimetilen ve Trietanolamin'in spektrofotometrik girişimleri gözlenmemiştir.

Ampullerde Ketoprofen'in UV Spektrofotometrisi ile tayini 261 nm ve 276 nm (1. türev, n=5)'de çözücü olarak pH 6.5 tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ampul katkı maddeleri benzil alkol ve Arjinin'in spektrofotometrik girişimleri gözlenmemiştir. Jel ve ampullerde HPLC ile Ketoprofen tayininde HP ODS hipersil kolon (10 cm x 3.9 mm iç çap, 5 µm parçacık boyutlu) ve Asetonitril : Fosfat tamponu (40:60) karışımı mobil faz olarak kullanılmış, UV-visible dedektör 261 nm'ye ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ortalamaya standart sapma olarak, jellerde UV spektrofotometrisi ile  $25.10 \pm 0.29$ , UV türev spektrofotometrisi ile  $24.46 \pm 0.13$ , HPLC ile  $24.78 \pm 0.31$ , ampullerde UV spektrofotometrisi ile  $100.16 \pm 0.75$ , UV türev spektrofotometrisi ile  $99.92 \pm 0.55$ , HPLC ile  $99.3 \pm 1.23$ 'dür ve sonuçlar belirtilen miktarlarla uyumludur. Önerilen yöntemlerle doğruluk ve kesinlik açısından uygun sonuçlar elde edilmiştir. [5]

Ambroksol içeren tabletler, şuruplar ve pediatrik şuruplardaki etken madde miktarı, direkt UV spektroskopisi ve UV türev spektroskopisi yöntemleriyle tayin edilmiştir. Tabletlerde tayinler, 10-35 µg/mL derişim aralığında 245 nm'de ve birinci türev 255 nm'de gerçekleştirilmiştir. Şuruplarda ve pediatrik şuruplarda ise girişime neden olan koruyucular mevcuttur. Şuruplarda Ambroksol tayini, 33-88 µg/mL derişim aralığında 308 nm'de ve birinci türev 256.4 nm'de gerçekleştirilmiştir. Şuruplarda koruyucu olarak bulunan ve Ambroksol girişimi nedeniyle direkt yöntemle tayin edilemeyen paraben için seçilen dalga boyu, birinci türev 277,2 nm ve derişim aralığı 3,88-11.64 µg/mL'dir. Pediatrik şuruplarda da aynı yöntem izlenmiş, Ambroksol, 33- 88 µg/mL derişim aralığında 308 nm'de ve birinci türev 265 nm'de tayin edilmiştir. Pediatrik şuruplarda koruyucu olarak bulunan benzoik asit için tayinin yapıldığı dalga boyu birinci türev 244,6 nm ve derişim aralığı 5,1-15,3 µg/mL'dir. Önerilen yöntemlerin işlerliği, geri kazanım çalışmalarıyla kontrol edilmiştir. Tüm çalışmalarda çözücü olarak distile su kullanılmıştır. Sonuçlar doğruluk, kesinlik ve tekrarlanabilirlik ve hassasiyet açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. [6]

Bu çalışmada etken maddesi Piroksikam olan jel preparatlarda Piroksikam ve jellerde koruyucu olarak bulunan benzil alkol tayini bir arada gerçekleştirilmiştir. Piroksikam, etanol - pH 7.8 fosfat tamponu (10:90) karışımı içinde direkt UV spektroskopisi (354.4 nm) ve 2.türev spektroskopisi yöntemiyle (258.6 nm, n=5) tayin edilmiştir. benzil alkol tayini ise normal spektrumdaki girişim nedeniyle 2.türev spektroskopisi (261.8 nm, n=5) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. [7]

Flukonazol içeren kapsüller, I.V. solüsyonlar ve şuruplardaki etken madde miktarı direkt UV spektroskopisi ve UV türev spektroskopisi yöntemleriyle tayin edilmiştir. Kapsüller ve I.V. solüsyonlarda tayinler, direkt UV spektroskopisi yöntemiyle 261.6 nm.de, ayrıca 2. türev (n=5) 274 nm.de gerçekleştirilmiştir. Şuruplarda ise girişime neden olabilecek katkı maddeleri incelenmiş ve girişimin olmadığı uygun türev derecesi ve dalga boyu, girişime neden olan madde bilinmemesine karşın geliştirilen bir deneysel yöntemle 1. türev (n=9) 271.6 nm. olarak belirlenmiş ve bu koşullarda

4.0x10<sup>-4</sup> M-1.5x10<sup>-3</sup> M derişim aralığında miktar tayini yapılmıştır. Tüm çalışmalarda çözücü olarak distile su kullanılmıştır. Sonuçlar doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik ve hassasiyet açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. [8]

Omeprazole'un farmasötik preparatlarda analizi için yeni bir uv türev spektroskopik metot geliştirilmiş ve yapılan çalışmada ikinci türev spektrumu 200-400nm, N=9, Δλ=31.5 dalga boyu aralığında meydana geldiği ve 0.2–40.0 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyonlarından ikinci türev alınarak elde edilen ölçü eğrisi grafiği çizilmiştir. Geliştirilen metot 5 farklı ticari kapsül farmasötik preparatına uygulanmıştır. Standart sapma değerleri 5 farklı ticari preparat için 1,87-4,55% olarak bulunmuş.Bulunan datalardan biri literatürde verilen polarografik metot verilerinden biri ile kıyaslanmış ve istatikselsel olarak aralarında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir [9]

Yapılan bir diğer çalışmada , türev spektroskopi ve zero crossing türev spektroskopi ile yeni yöntem geliştirerek eş zamanlı olarak tablet formundan Cefixime and Ofloxacin'in miktar tayinine dayanmaktadır. Yapılan analizlere göre Cefixime and Ofloxacin sırasıyla birinci türevi 270.5nm ve 296.7 nm'de görülmüştür. İkinci metotla yapılan zero crossing türev spektroskopisi ölçümlerinin absorbansı ise Cefixime and Ofloxacin sırasıyla 257.11 ve 284.07 nm okunmuştur.Beer kanununa göre yapılan hesaplamalar sonucunda miktar tayini sonuçları Cefixime için 5-30 µg/mL ve ofloxacin için ise 4-26 µg/mL oranlarında etken madde miktarı saptanmıştır. Bulunan sonuçlar F ve t testi için geçerli aralıklarda bulunmuş ve iki metot gezi kazanım çalışmaları yapılarak istatikselsel olarak valide edilmiştir. [10]

Bu çalışmada eş zamanlı olarak HMG Co-A reductase inhibitörlü clopidogrel bisulfat'ın iki metotla analizi incenmiş. 37 vücut sıcaklığında ; pH 1, 4 (mide pH „ı), pH 7.4 (kan pH „ı) and pH 9 (bağırsak pH „ı ) gibi değişen pH aralıklarında UV/VIS spektrofotometre kullanarak HMG Co-A reductase inhibitörlü clopidogrel bisulfat'ın miktar tayini yapılmıştır. Clopidogre'nin girişim yapan dalga boylarını ayırmak için zero-crossing'li türev spektroskopi metodu kullanılmıştır.Bir diğer metot olan ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi metodu ile aynı koşullarda analiz edilmiş ve iki metot birbiri ile kıyaslanmıştır. [11]

herhangi bir önayırma tekniği kullanmadan türev spektroskopisi ile sarımsak , yeşil biber ve fındıkda bulunan askorbik asit miktar tayinine bakılmıştır.Metot pik –pik tekniğine dayanarak 2. ve 3. Türevleri incelenmiştir. Değişik çözücülerle çalışılmış ve en uygun olarak 10% Trikloroasetik asit çözücü olarak seçilmiştir.Sarımsak için ikinci türev absorpsiyon spektrumları sırasıyla 253.2nm ,256.4 nm , yeşil biber ve fındık için üçüncü türev absorpsiyon spektrumları sırasıyla 256.4 ve 261.6nm bulunmuştur. 2.0-

10.0 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyon aralıklarında ölçü eğrisi çizilmiş ve diğer metotlarla bu bitkiler üzerinde yapılmış askorbik asit miktar tayini sonuçları ile bulunan sonuçlar istatikselsel olarak kıyaslanmıştır.Standart ilave metodu ile geri kazanım değerlerine bakılmıştır. [12]

## DENEYSEL KISIM

### 2.1.OPTİMUM KOŞULLARIN SAĞLANMASI

#### 2.1.1.UYGUN ÇÖZÜCÜNÜN BELİRLENMESİ

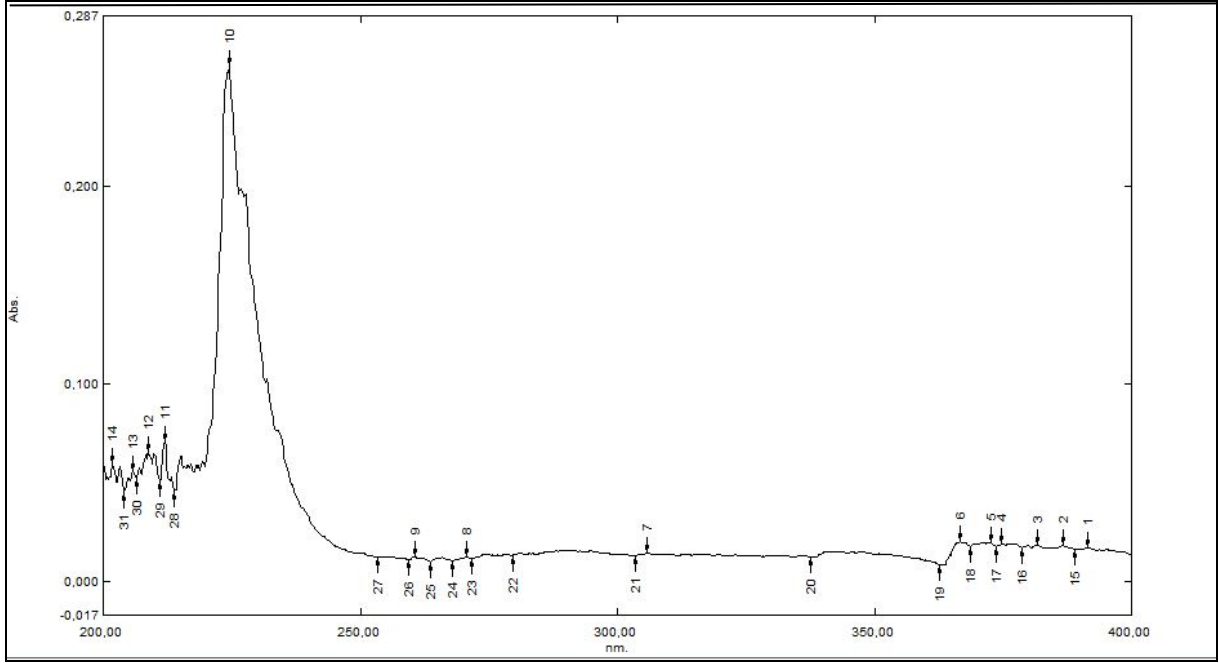
Rilmenidin (RİL) etken maddesi ile türev spektrofotometrik yöntem geliştirmede önce uygun çözücüyu belirlemek için su, etanol ve metanol ile UV/Vis spektrumlarına bakıldı. En yüksek absorbands değeri metanol ile bulundu. Sudaki rilmenidin çözeltilisinin çizilen absorpsiyon spektrumu 201 nm de maksimum absorpsiyon göstermiştir. Ancak bu dalga boyunda çalışmak çok hassas olmadığı için rilmenidin dihidrojen fosfat önce baz haline getirildi ve daha sonra baz hali organik çözücüye alınarak daha hassas analiz yapılması hedeflendi.

**Stok çözelti hazırlanması:** 50 mg rilmenidine eşdeğer miktarda rilmenidin dihidrojen fosfat tuzu hassas olarak tartıldı. 10 mL'lik balon jodede hacmine saf suyla tamamlandı.

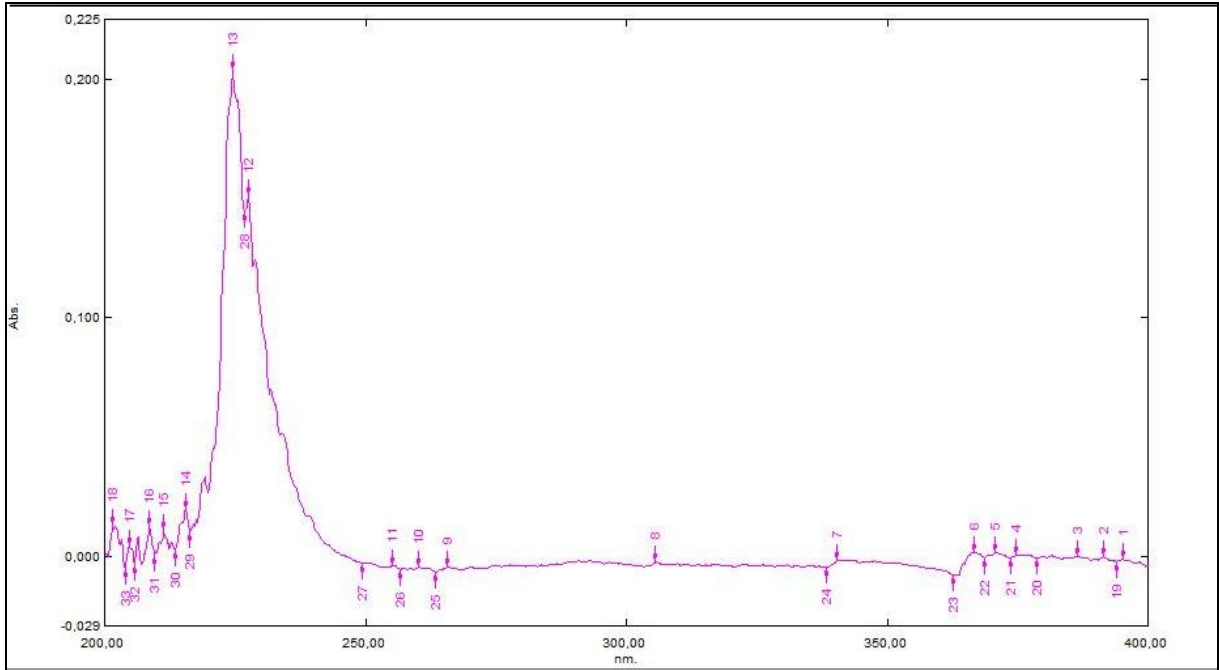
**Seyreltik stok çözelti:** Hazırlanan stok çözeltilinin su ile seyreltilmesiyle 500 µg/mL konsantrasyonda rilmenidin çözeltisi hazırlandı.

##### 2.1.1.1. Rilmenidin etken maddesini baz haline çevirmek için uygun çözücü seçimi

Rilmenidin dihidrojen fosfatın 100 µg/mL suda hazırlanmış çözeltilisinden 1 mL alındı. Üzerine hazırlanan 0,1 M NaOH ve 0,1M NH<sub>3</sub> çözeltilerinden ayrı tüplere 1 mL ilave edildi. 2 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 5 mL diklorometan çözeltisi ilave edilerek 2000 devirde 2 dakika santrifüj edildi. Daha sonra bu çözeltilerin maksimum absorbands gösterdikleri dalga boyunda spektrumları alındı. En yüksek absorbands değeri şekilden de görüldüğü gibi 0,1 M NaOH çözeltilisinde sağlandı.



**Şekil2:** Rilmenidin 0,1 M NaOH ile dönüştürülmüş bazına ait spektrum



**Şekil 3:** Rilmenidin 0,1 M NH<sub>3</sub> ile dönüştürülmüş bazına ait spektrum

Rilmenidin tuzu halinde bulunan bir etken madde olduğu için önce maddenin baz hâle dönüştürülmesi ve sonra tayin yapılması gerekmektedir. Seyreltik stok çözeltiden 1 mL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerine 0,5 mL 0,1 M NaOH çözeltisi eklendi.



Girdap karıştırıcı ile 1 dakika karıştırıldı, Üzerlerine 5 mL etilasetat, diklorometan ve kloroform çözücülerinden eklendi, 2 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve santrifüj edildi. Ayrılan organik fazlara susuz sodyum sülfat ilave edildi. Organik fazın 4,5 mL'si alınarak hazırlanan blank çözeltilisine karşı UV spektrofotometrede spektrumları alındı. Uygun organik çözücü yüksek absorbands gösterdiği için diklorometan olarak belirlendi.

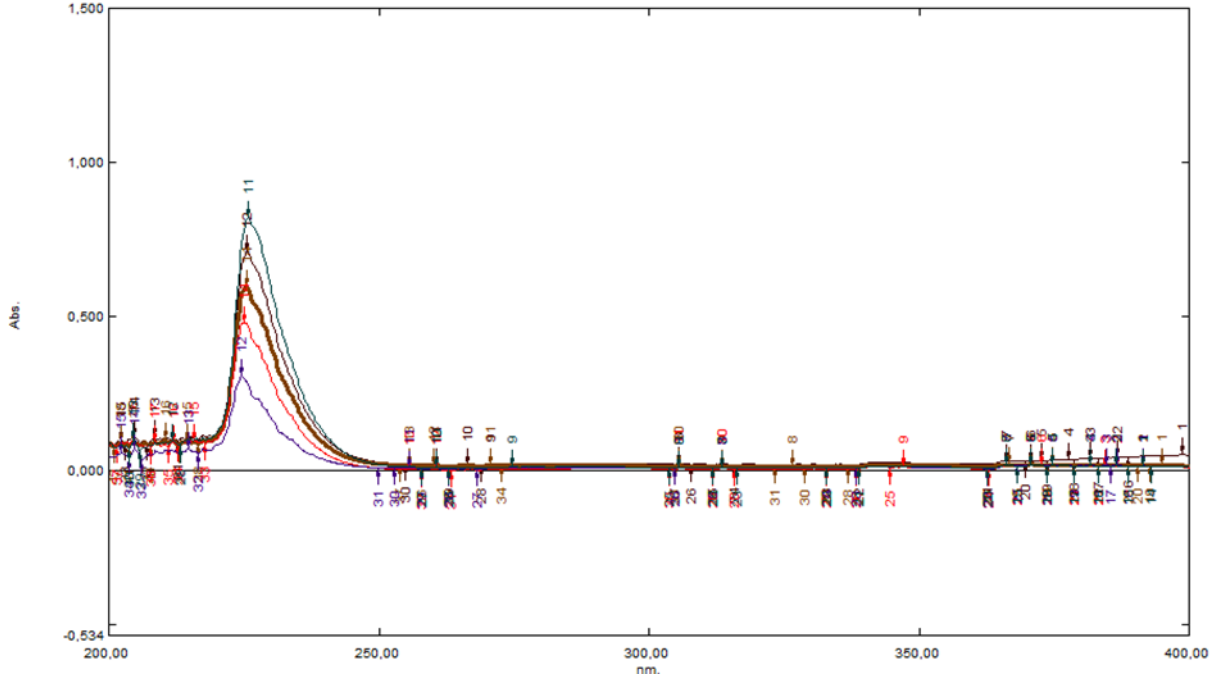
### **2.1.2.UYGUN TÜREV SEÇİMİ**

500 µg/mL RİL çözeltilisinin spektrumu alındıktan sonra 1.,2.,3..türevleri her bir türev için sırasıyla  $\Delta\lambda=2, 4, 8$  ve 16nm olacak şekilde alındı. Uygun türev 1.türev ve uygun genlikte  $\Delta\lambda=2$  nm seçildi. 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde 2.1.1.de anlatıldığı gibi hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinin önce spektrumu daha sonra  $\Delta\lambda=2$  nm „de 1. 2., 3. türevleri alındı. Bu türev spektrumlarına örnekler Şekil 7, 8, 9'de verildi.

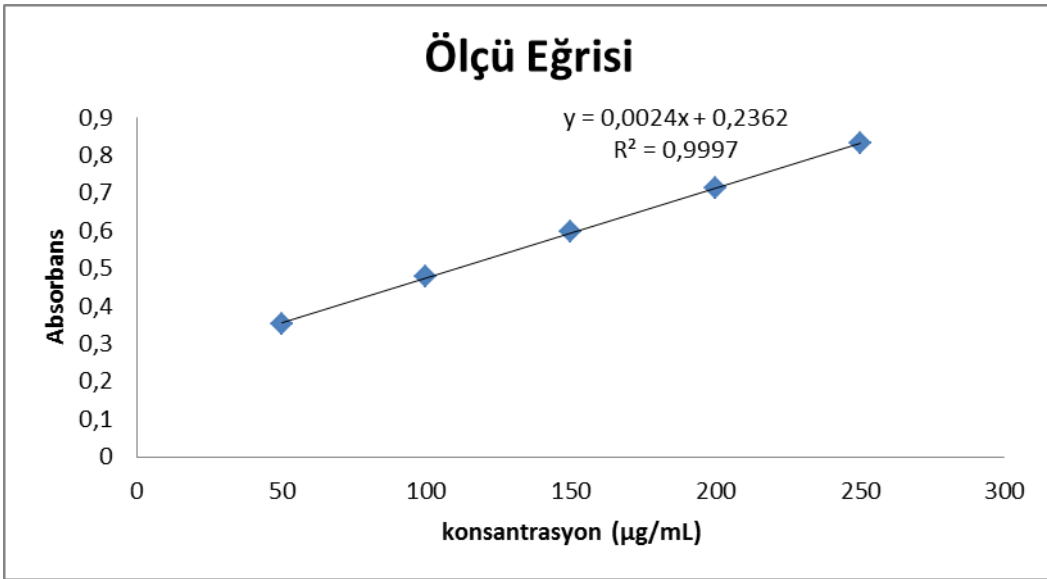
En uygun türevin 1.türev olduğu gözlemlendiği için çalışmalar 1.türevle yürütüldü. İki pik arasındaki dalga boyları 223,20-230,20 nm okundu. 50-250 µg/mL aralığındaki çözeltilerin alınan türevleri peak to peak yöntemi ile uzaklık mesafeleri belirlendi. Herbir konsantrasyona ait olan pik uzaklıkları Excel'de grafiğe geçirilerek ölçü eğrisi grafiği çizildi. Bu grafikten LOD, LOQ, korelasyon katsayısı, eğim ve intercept değerleri hesaplanmıştır. Tablo 1' de bu değerler gösterilmiştir.

### **2.1.3.ÖLÇÜ EĞRİSİNİN ÇİZİLMESİ**

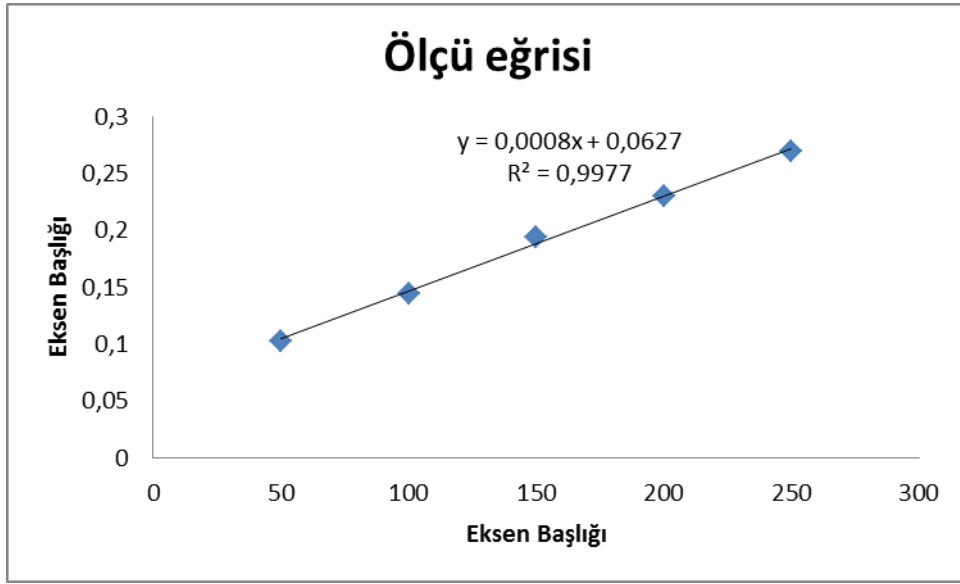
500 µg/mL rilmenidin etken maddesi su ile hazırlandı. Konsantrasyon aralığı 50-250 µg/mL olacak şekilde çeşitli hacimlerde kapaklı tüplere hazırlanan rilmenidin çözeltilisinden eklendi. Daha sonra üzerine 0,5 mL 0,1M NaOH çözeltilisi ilave edildi. UV/Vis spektrofotometrede spektrumları alındı. Spektrumları şekil 2' de gösterilmektedir. Ölçü eğrisi grafiğini çizmek için spektrumları alınan rilmenidin çözeltilerinin  $\Delta\lambda=2$  nm'de 1. Türevleri alındı. İki pik arası uzaklıkları ölçülerek Excel'de grafiğe geçirildi. Ölçü eğri grafikleri Şekil 6'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.** 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki rilmidenin etken maddelerinin spektrum grafikleri



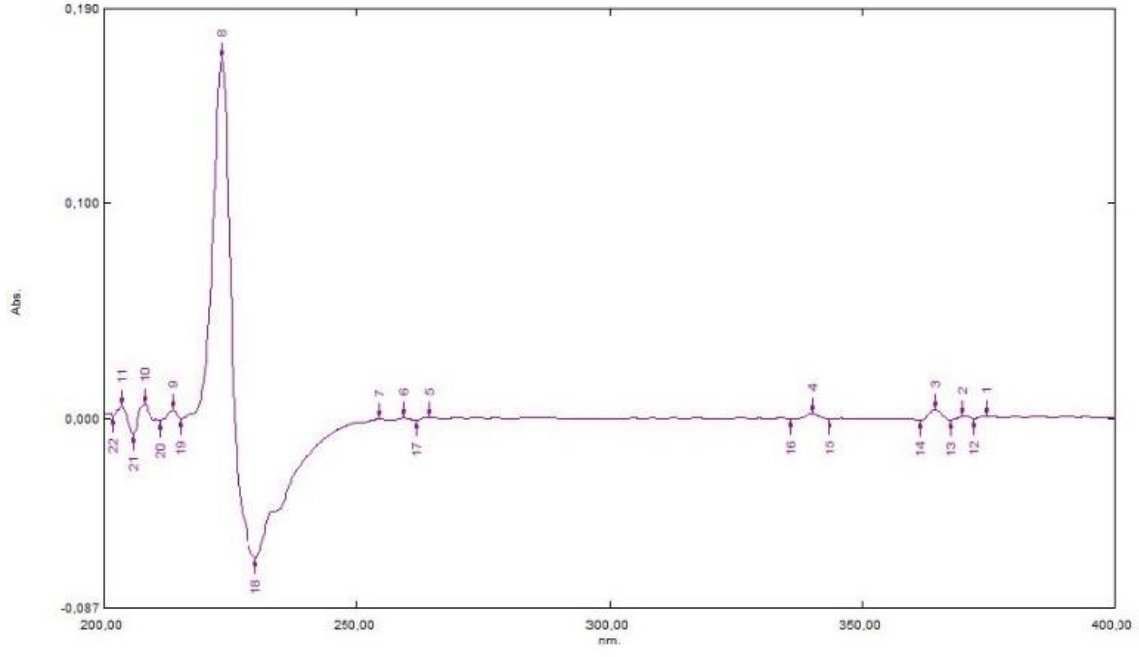
**Şekil 5.** Rilmideninin absorbans değerlerine göre çizilen ölçü eğrisi grafiği



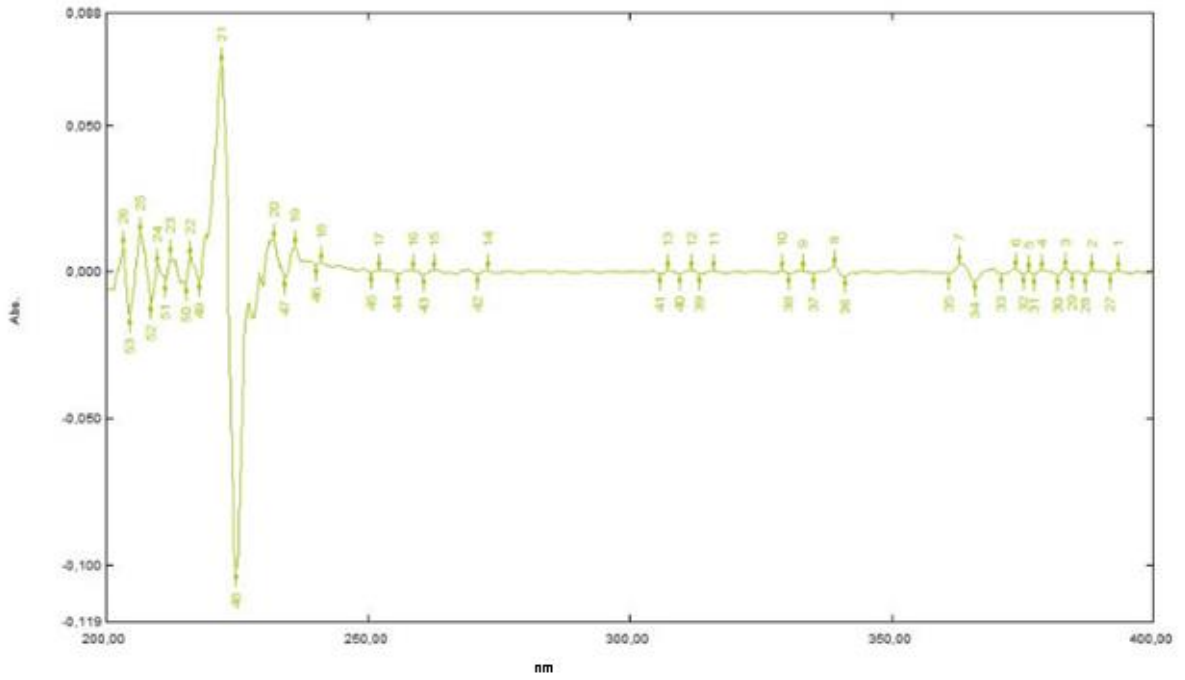
**Şekil 6.** Rilmenidinin 1. türev değerlerine göre çizilen ölçü eğrisi grafiği

**Tablo 1.** Rilmenidinin ölçü eğrisi parametreleri

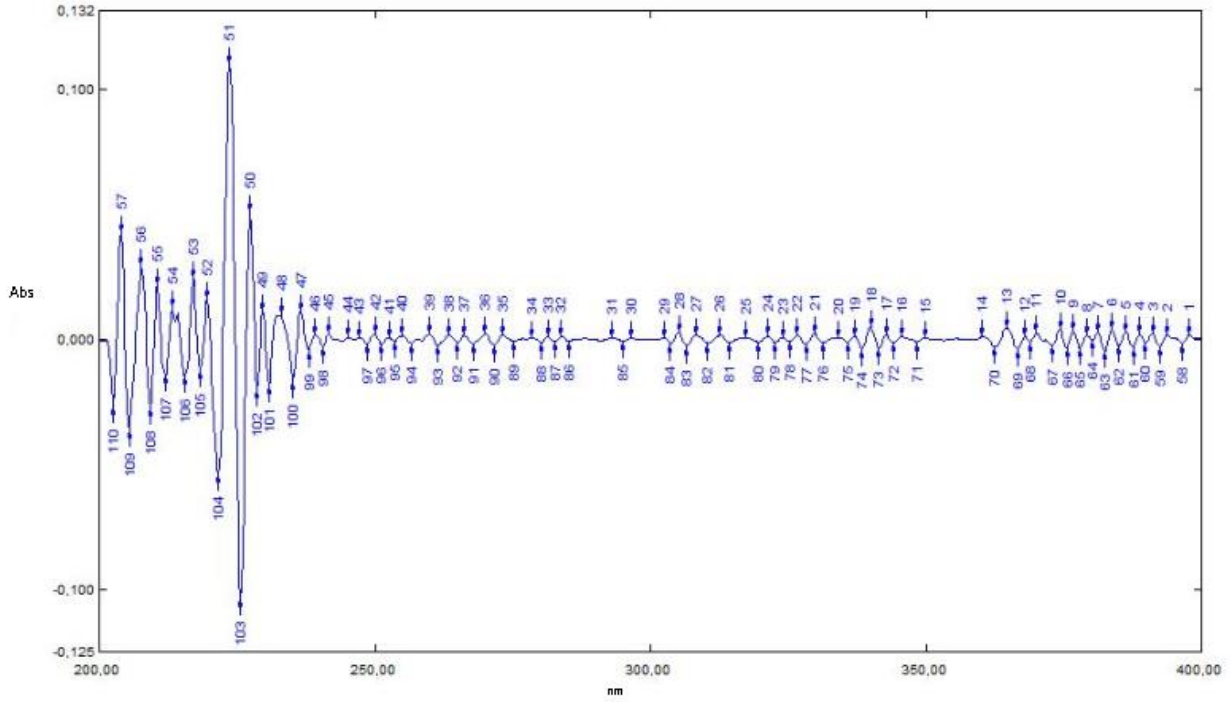
	RİL
Konsantrasyon aralığı	50-250 µg/mL
LOD	0,97 µg/mL
LOQ	2,9 µg/mL
Regrasyon eşitliği	$0,0024x+0,2362$
Eğim	0,0024
İntercept	0,2362
Korelasyon katsayısı	0.9997



Şekil 7. 200 µg Rilmenidin 1.türev grafiği



Şekil 8. 200 µg Rilmenidin 2.türev grafiği



**Şekil 9.** 200 µg Rilmenidin 3.türev grafiği

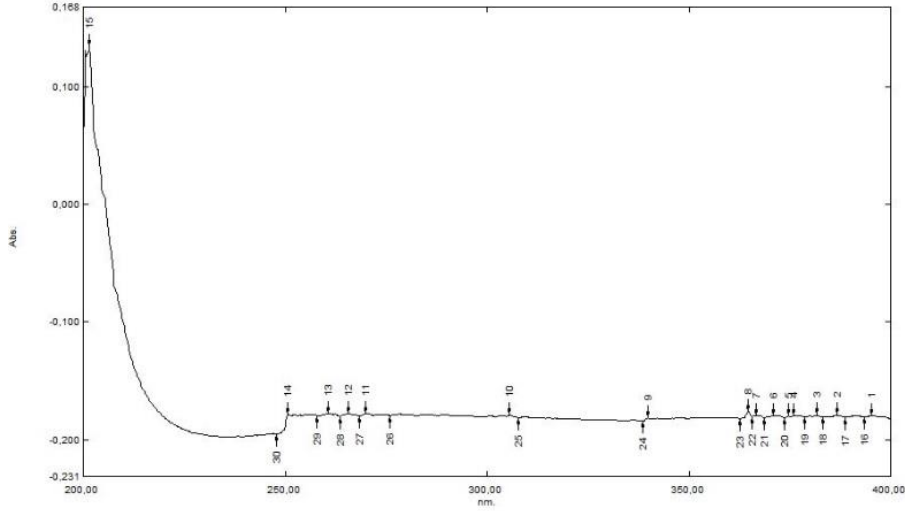
## 2.2.FARMASÖTİK TABLET PREPARATLARDA MİKTAR TAYİNİ

Eczaneden Hyperium 1 mg tablet preparat alındı. 30 tablet tartıldı ve toz haline getirildi. Bir tabletteki etken madde miktarına eşdeğer olacak şekilde alınarak 500 µg/mL Hyperium tablet çözeltisi hazırlandı. Ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi. 500 µg/mL Hyperium tablet çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin spektrumları ve  $\Delta\lambda=2\text{nm}$ 'de 1.türevi alındı. Alınan türevler, peak to peak yöntemi ile uzaklık mesafeleri belirlendi. Çizilen ölçü eğrisinde iki pik arası yükseklikler yerine konularak konsantrasyonlar bulundu. Konsantrasyon değerlerinden geri kazanım değeri ortalama olarak  $105,61\% \pm 3,61$  olarak bulundu.

## 2.3.DEGRADASYON ÇALIŞMASI

### 2.3.1.Asidik degradasyon

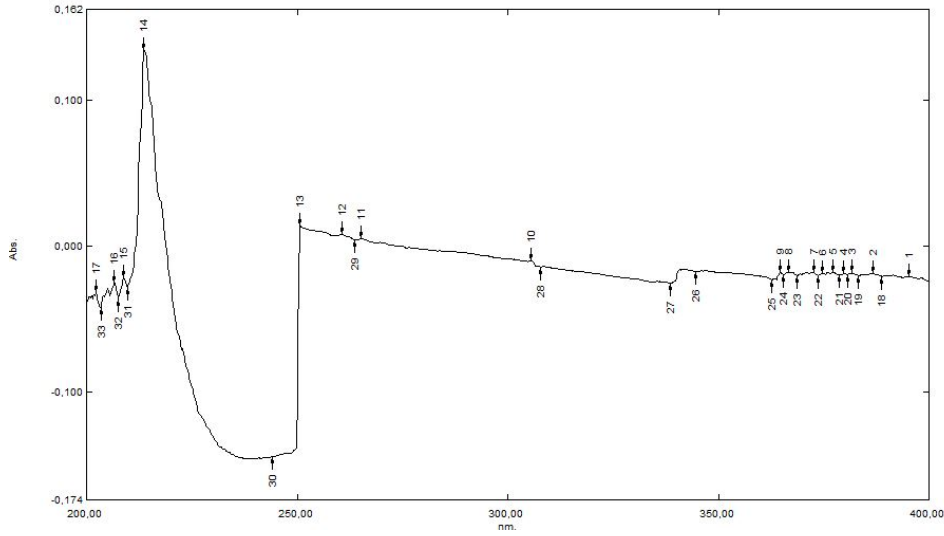
0.05 g Rilmenidin etken maddesi 5ml 0,1M HCl ile oda sıcaklığında 8 saat bekletildi. Bu çözeltinin spektrumu alındı. Spektrum ve  $\Delta\lambda=2\text{nm}$ 'de 1.türevi alındı. Bozunma yüzdesi; bozundurulmamış ve bozundurulmuş rilmenidin etken maddeleri peak to peak yöntemine göre iki pik arası uzaklık ölçüldü. Bozundurulmamış rilmenidin mesafesi 100 olarak kabul edilerek asidik degradasyonla bozundurulmuş rilmenidin ölçülen mesafesi ile kıyaslanarak yüzde bozunma miktarı hesaplandı. Asidik degradasyonla 29% bozunduğu saptandı. Tablo 2'de sonuçlar gösterilmektedir.



**Şekil 10.** Asidik degradasyon sonucunda oluşan rilmenidinin spektrumu

### 2.3.2. Bazik degradasyon

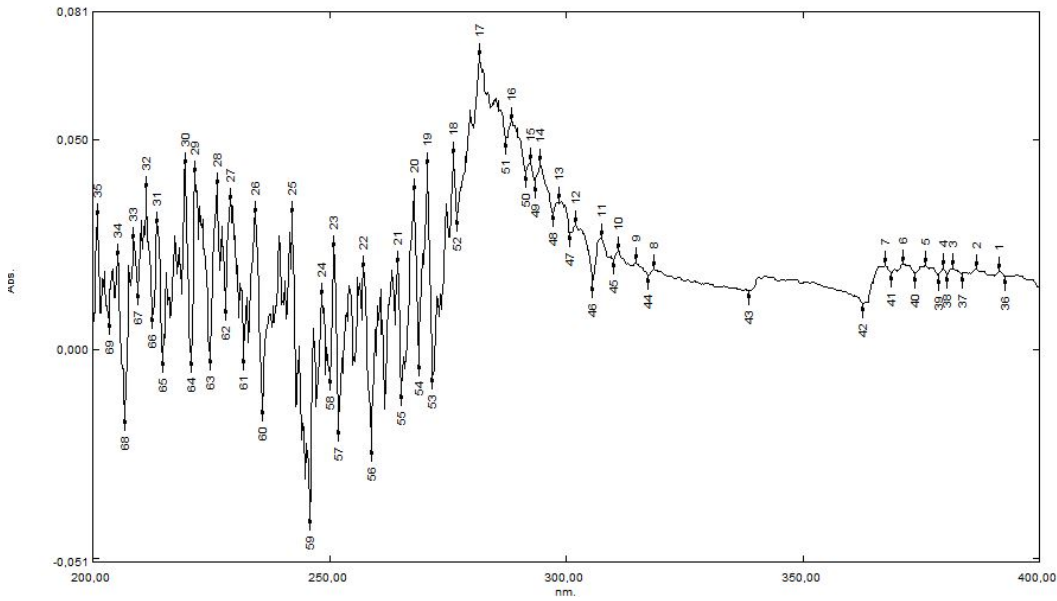
0.5 g RİL etken maddesi 5ml 0.1M NaOH ile 1 saat bekletildi. Bu çözeltinin spektrumu alındı. Spektrum  $\Delta\lambda=2\text{nm}$ 'de 1.türevi alındı. Bozunma yüzdesi; bozundurulmamış ve bozundurulmuş rilmenidin etken maddeleri peak to peak yöntemine göre iki pik arası uzaklık ölçüldü. Bozundurulmamış rilmenidin mesafesi 100 olarak kabul edilerek bazik degradasyonla bozundurulmuş rilmenidinin ölçülen mesafesi ile kıyaslanarak yüzde bozunma miktarı hesaplandı. Bazik degradasyonla hemen bozunduğu saptandı. Tablo 3'de sonuçlar gösterilmektedir.



**Şekil 11.** Bazik degradasyon sonucunda oluşan rilmenidinin spektrumu

### 2.3.4.Oksidatif degradasyon

0.5 g RİL etken maddesi 5ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildi. Hemen bozunma gözlemlendi. Bu çözeltinin spektrumu alındı. Spektrum  $\Delta\lambda=2\text{nm}$ 'de 1.türevi alındı. Bozunma yüzdesi; bozundurulmamış ve bozundurulmuş rilmenidin etken maddeleri peak to peak yöntemine göre iki pik arası uzaklık ölçüldü. Bozundurulmamış rilmenidin mesafesi 100 olarak kabul edilerek degradasyonla bozundurulmuş rilmenidinin ölçülen mesafesi ile kıyaslanarak yüzde bozunma miktarı hesaplandı. Oksidatif degradasyonla 100% bozunduğu saptandı. Tablo 3'de sonuçlar gösterilmektedir.



**Şekil 12.** Oksidatif degradasyon sonucunda oluşan rilmenidinin spektrumu

**Tablo 2. Bozundurma sonucu absorbands ve türev spektrumundaki değişimleri**

<b>Bozundurma</b>					
	0,1 MHCl 1.türev değeri	0,1 MHCl absorbands	%bozunma	0,1 M NaOH	%3H2O2
BAŞLANGIÇ	0,145	0,562	0	Hemen bozundu	Hemen bozundu
1 SAAT SONRA	0,135	0,525	6,6		
2 SAAT SONRA	0,130	0,473	10		
4 SAAT SONRA	0,121	0,469	16,55		
6 SAAT SONRA	0,121	0,469	16,55		
8 SAAT SONRA	0,103	0,400	29		

#### **2.4.METOD VALİDASYONU**

Metod validasyonu ICH rehberine göre gerçekleştirildi.



### 2.4.1. Lineerlik

Ölçü eğrisinden lineerlik Tablo 1’de gösterildiği gibi  $R^2=0,9997$  bulunmuştur.

### 2.4.2.Güniçi – günler arası ölçüm

Aynı günde üç kez ve günler arası üç farklı günde hazırlanan çözeltilerin spektrumları alındı. Bu spektrumlardan  $\Delta\lambda=2$  nm’de 1.türevleri alındı. Peak to peak yöntemine göre iki pik arası uzaklık ölçüldü.Bu değerler kendi aralarında gün içi ve günler arası olarak bağıl standart sapma (RSD)% ve bağıl ortalama hata (RME)% değerlerine bakıldı. RSD% 50,150,250  $\mu\text{g/mL}$  rilmenidin konsantrasyonları için sırasıyla 0,38; 2,16; 1,88 olarak bulundu.

**Tablo 3.** Gün içi günler arası konsantrasyon değerleri

#### Güniçi

	konsantrasyon( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	150	50
Bulunan Konsantrasyon	250,24	150,74	50
( $\mu\text{g/mL}$ )	249,51	150,68	50,62
	248,7	147,13	48,65
	250,5	146,38	49
	251,78	151,23	51,44
	249,68	156,4	50,23
Ortalama	250,07	150,43	49,99
Standart Sapma	0,96	3,26	0,94
Değişme katsayısı ( % RSD )	0,38	2,16	1,88

## Günler arası

	konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	250	150	50
Bulunan	249,7	149,15	50,02
Konsantrasyon			
(ng/mL)	250,23	149,65	50,35
	249,3	149,21	50,67
	248,7	150,71	50,27
	250	150,78	51,18
	250,1	148,16	51,75
Ortalama	249,67	149,61	50,71
Standart Sapma	0,53	0,85	0,59
Değişme katsayısı			
( % RSD )	0,21	0,56	1,16

### 2.4.3. Standart ilave etme yöntemi ile geri kazanım hesaplanması

Geri kazanım % değeri aşağıda yazılan formülden hesaplandı.

$$\% \text{ geri kazanım} = [(C2-C1)/C3].100$$

C1: ölçülen örnek derişimi

C2: ölçülen örnek +standart derişimi

C3: örneğe eklenen standart derişimi

Geri kazanım yüzde değeri;  $99,33 \pm 0,21$  bulunmuştur.

## 3.SONUÇLAR

Eczacılık alanında yapılan kapiler elektroforez, HPLC,gaz kromatografisi ,spektroflorimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle ilaç etken maddelerinin miktar tayinlerine yönelik pek çok çalışma mevcuttur. Ancak Rilmenidin etken maddesi ile ilgili yapılan türev spektrofotometri ve bozundurma çalışmalarına literatürde rastlanmamaktadır. Bu çalışma da Rilmenidin etken maddesi asidik, bazik ve oksidatif bozunmaya uğratarak bozunma yüzdesi değerleri incelenmiş ve geliştirilen UV Türev spektroskopisi yöntemi farmasötik tablet preparatlara uygulanarak Rilmenidin miktar tayini yapılmıştır. Ayrıca Rilmenidin etken maddesinin değişik konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin gün içi ve günler arası okumaları yapılarak validasyonu sağlanmıştır.

## Kaynaklar

[1]. [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

[2]. [www.kub.ilacprospektus.com](http://www.kub.ilacprospektus.com)

[3]. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Enstrümantal Analiz. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H, (Çev.) 1.Basım, Ankara: Bilim Yayıncılık; 1998.

[4]. Levillain P, Fompeydie D. Spectrophotometric Derive Interet Limiteset Applications. Analysis 1986; 14 (1): 1-

20.

[5]. Ozlu, C., Basan, H., Satana, E., Ertas, N., Goger, N.G. 2005. "Quantitative determination of ketoprofen in gels and ampules by using flow-injection UV spectrophotometry and HPLC", Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 39, 606-611

[6]. Dincer, Z., Basan, H., Goger, N.G. 2003. "Quantitative determination of ambroxol in pharmaceuticals by UV derivative spectroscopy", Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 31, 867-872

[7]. Goger, N.G., Zahtep, L.M., Berkkan, A., Senturk, Z. 2005. "Simultaneous spectrophotometric determination of piroxicam and benzyl alcohol in gel forms", Chemia Analityczna, 50, 1059-1067

[8]. Aboul-Enein, H.Y., Goger, N.G., Turkalp, A. 2002. "Quantitative determination of fluconazole in syrups by first order derivative spectrophotometry", Analytical Letters, 35, 1193-1204

[9] Ozaltın, N., Kocer, A. 1997. "Determination of omeprazole in pharmaceuticals by derivative spectroscopy", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 16, 337-342

[10] Sivakumar, C.H.V., Gupta, S., Chandan, A.K., Gunturu, C., Indracanti, M. 2012. "Determination of cefixime and ofloxacin by ratio spectra and zero crossing difference spectrophotometry", International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 4, 118-123

[11] Najma, S., Muhammad, S.A., Muhammad, N., Kiran, A.A. 2013. "Zero-crossing derivative spectrophotometry and liquid chromatographic method for the quantitative determination of clopidogrel in presence of hmg co-a reductase inhibitors", Journal of the Chilean Chemical Society, 58, 1584-1589

[12]. Aydogmus, Z., Cetin, M.S., Ozgur, M. 2002. "Determination of Ascorbic Acid in Vegetables by Derivative Spectrophotometry", Turkish Journal of Chemistry, 26, 697-704