

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİR FARMASÖTİK PREPARATTAKİ PERİNDOPRİL
VE İNDAPAMİD'İN SİNYAL İŞLEME VE ÇOK
DEĞİŞKENLİ KALİBRASYON YÖNTEMLERİYLE
KANTİTATİF ANALİZİ**

Gözde PEKTAŞ

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Erdal DİNÇ**

2008-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Yüksek Lisans **Programı**

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: .../ .../ 2008

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
 GİRİŞ	 1
 1.1. Perindopril	 5
1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	5
1.1.2. Farmakolojik özellikleri	6
1.2. İndapamid	9
1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler	9
1.2.2. Farmakolojik özellikleri	10
1.3. Perindopril ve İndapamid İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri	12
1.3.1. Perindoprilin Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler	12
1.3.1.1. Spektrofotometri	12
1.3.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	13
1.3.1.3. Kapiller Elektroforez	14
1.3.1.4. Elektrokimyasal Yöntem	14
1.3.1.5. Gaz kromatografisi Yöntemi	15
1.3.2. İndapamidin Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler	16
1.3.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler	16
1.3.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	17
1.3.2.3. Elektrokimyasal Yöntem	21
1.3.2.4. Spektroflorometrik Yöntem	22
1.3.2.5. Kolorimetri Yöntemi	23

	Sayfa No.
2.GEREÇ VE YÖNTEM	24
2.1. Spektrofotometri	24
2.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi	29
2.2. Kemometri	33
2.2.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları	36
(Multivariate Calibration Algorithms)	
2.2.1.1. Klasik en küçük kareler yöntemi	36
(Classical Least Squares (K-matris) method)	
2.2.1.2. Ters en küçük kareler (P-matris) yöntemi	37
(Inverse Least Squares method)	
2.2.1.3. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi	37
(Principal component regression method)	
2.2.1.4. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi	39
(Partial Least Squares Regression Method)	
2.2.2. Kalibrasyon (Konsantrasyon) Setinin Tasarımı	41
2.2.3. Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-validation Procedure)	42
2.2.4. Sürekli Dalgacık Dönüşümü (SDD) (wavelet transform)	42
2.2.5. Dalgacıklar Ailesi	43
2.2.6. Sürekli dalgacık dönüşümü-sıfır kesim yöntemi	43
2.3. Gereçler	45
2.3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	45
2.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
2.3.3. Analiz edilen bileşiklerin ticari preaparatları	46

	Sayfa No.
3.BULGULAR	47
3.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri	47
3.1.1. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	48
3.1.2. Çok Değişkenli Kalibrasyonların Absorpsiyon Spektrumlarına Uygulamasında Spektral Koşulların Optimizasyonu	50
3.1.3. Çok Değişkenli Kalibrasyonların Türev Spektrumlarına Uygulamasında Spektral Koşulların Optimizasyonu	53
3.1.2.1. Orijinal Absorpsiyon Spektrum-Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi .	55
3.1.2.1.1. Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu	55
(Original Absorption Spectra-Principal Component Regression Calibration)	
3.1.2.1.2. OAS-PCR Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	55
3.1.2.1.3. ANOVA Testi	59
3.1.2.1.4. OAS-PCR Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi	59
3.1.2.1.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası	59
3.1.2.1.4.2. OAS-PCR Yöntemi için Tayinin Standart Hatası.....	61
3.1.2.1.5. OAS-PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması.....	62
3.1.2.2. Orijinal Absorpsiyon Spektrumu- Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi	64
3.1.2.2.1. Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu (Original Absorption Spectra-Partial Least-Square Calibration)	64
3.1.2.2.2. OAS-PLS Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	64
3.1.2.2.3. ANOVA Testi	67
3.1.2.2.4. OAS-PLS Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi	68
3.1.2.2.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası	68
3.1.2.2.4.2. OAS-PLS Yöntemi için Tayinin Standart Hatası	70
3.1.2.2.5. OAS-PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	71
3.1.3.1. Türev Spektrum-Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi	73

	Sayfa No
3.1.3.1.1. Türev Spektrumu-Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu	73
(Derivative Spectra-Principial Component Regression Calibration)	
3.1.3.1.2. TS-PCR Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	73
3.1.3.1.3. ANOVA Testi	76
3.1.3.1.4. TS-PCR Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi	77
3.1.3.1.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası	77
3.1.3.1.4.2. TS-PCR Kalibrasyonu İçin Tayinin Standart Hatası	79
3.1.3.1.5. TS-PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	80
3.1.3.2. Türev Spektrumu-Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi	82
3.1.3.2.1. Türev Spektrumu-Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu	82
(Derivative Spectra-Partial Least-Square Calibration)	
3.1.3.2.2. TS-PLS Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	82
3.1.3.2.3. ANOVA Testi	85
3.1.3.2.4. TS-PLS Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi	86
3.1.3.2.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası	86
3.1.3.2.4.2. TS-PLS Yöntemi için Tayinin Standart Hatası	88
3.1.3.2.5. OAS-PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	89
3.2. Sinyal İşleme Yöntemleri	91
3.2.1. Haar Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi	91
(Haar Continuous Wavelet Transform Method)	
3.2.1.1. Standart Çözeltiler	91
3.2.1.2. Doğrusal Regresyon Analizi	91
3.2.1.3. HAAR-SDD Yönteminin Validasyonu	94
3.2.1.4. HAAR-SDD Yöntemi için ANOVA Testi	97
3.2.1.5. HAAR-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	98
3.2.2. Biortogonal Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi	100
(Biortogonal Continuous Wavelet Transform Method)	
3.2.2.1. Standart Çözeltiler	100
3.2.2.2. Doğrusal Regresyon Analizi	100

	Sayfa No
3.2.2.3. BIOR1.5-SDD Yönteminin Validasyonu	103
3.2.2.4. BIOR1.5-SDD Yöntemi için ANOVA Testi	107
3.2.2.5. BIOR1.5-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	108
3.3. Karşılaştırma Yöntemleri	110
3.3.1. Türev Spektrofotometri (Karşılaştırma Yöntemi)	110
3.3.1.1. Standart Çözeltiler	110
3.3.1.2. Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması	110
3.3.1.3. Türev Yönteminin Validasyonu	113
3.3.1.4. Türev Yöntemi için ANOVA Testi	116
3.3.1.5. Türev Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	117
3.3.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	119
3.3.2.1. Standart Çözeltiler	119
3.3.2.2. YBSK Yönteminde Kromatografik Şartlar	120
3.3.2.3. Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması	120
3.3.2.4. YBSK Yönteminin Validasyonu	122
3.3.2.5. YBSK Yöntemi için ANOVA Testi	125
3.3.2.6. YBSK Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	126
3.3.3. İstatistiksel Analiz	128
 4. TARTIŞMA	 130
 5. SONUÇ VE ÖNERİLER	 134
 ÖZET	 135
SUMMARY	137
KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ	145

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında karışımlardaki PER ve IND in aynı anda miktar tayinleri, hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleriyle başarıyla gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu kemometrik yöntemlerle elde edilen analiz sonuçları, klasik türev ve YBSK yöntemleriyle karşılaştırıldı. Geliştirilen yöntemlerle, PER ve IND bileşiklerinin kalite kontrol ve rutin analizlerine uygulanabileceğini, yöntemlerin analitik validasyonu ve analiz sonuçlarıyla ortaya konmuştur. Bu bakımdan tez amacına ulaşmıştır ve orijinaldir.

Yüksek lisans tezindeki çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman Hocam Doç. Dr. Sayın Erdal DİNÇ'E teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans programı ders döneminde teorik bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen, başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Feyyaz ONUR'A ve diğer anabilim dalımız hocalarına sonsuz teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Araş. Gör. Özgür ÜSTÜNDAĞ'A çalışmalarım sırasındaki desteklerinden ve yakın ilgisinden dolayı teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm araştırma görevlilerine ve y.lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür eder her şeyin gönüllerince olmasını dilerim.

Hayatım boyunca ve tezim sırasında desteklerini üzerimden eksik etmeyen aileme teşekkür ederim.

KISALTMALAR

PER	Perindopril
IND	İndapamid
OAS-PCR	Original Absorption Spectra-Principal Component Regression (Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Temel bileşen regresyon yöntemi)
OAS-PLS	Original Absorption Spectra-Partial Least-Squares (Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Kısmi en küçük kareler yöntemi)
TS-PCR	Derivative Spectra-Principal Component Regression (Türev Spektrumu-Temel bileşen regresyon yöntemi)
TS-PLS	Derivative Spectra- Partial Least-Squares (Türev Spektrumu-Kısmi en küçük kareler yöntemi)
HAAR-SDD	(Haar sürekli dalgacık dönüşümü yöntemi)
BIOR1.5-SDD	(Biortogonal1.5 sürekli dalgacık dönüşümü yöntemi)
CLS	Classical Least-Squars (Klasik en küçük kareler yöntemi)
ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
SEC	Standard Error of Calibration (Kalibrasyonun standart hatası)
SEP	Standard Error of Prediction (Tayinin standart hatası)
BSS	% Bağlı standart sapma
SS	Standart sapma
SH	Standart hata
GA	Güven aralığı
BH	% Bağlı hata
GK	% Geri kazanım
PRESS	Predicted Residual Error Some of Squares (Tahmin edilen hataların karelerinin toplamı)
LOD	(Limit of Dedection) Yakalama sınırı
LOQ	(Limit of Quantification) Tayin sınırı
r	Korelasyon katsayısı
YBSK (HPLC)	Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

	Sayfa No.
Şekil 1.1. Perindopril'in açık formülü	5
Şekil 1.2. Perindopril'in (65 µg/mL) metanol – 0.1 M NaOH (50:50, v/v) içerisindeki absorpsiyon spektrumu	6
Şekil 1.3. İndapamid'in açık formülü	9
Şekil 1.4. İndapamid'in (11 µg/mL) mehanol - 0.1 M NaOH (50:50, v/v) içerisindeki absorpsiyon spektrumu	10
Şekil 2.1. Enerji seviyeleri arasındaki fark	25
Şekil 2.2. Moleküldeki enerji seviyeleri	26
Şekil 2.3. Sürekli spektrum (moleküldeki elektronik geçişler ve UV-görünür spektrum)	27
Şekil 2.4. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti	27
Şekil 2.5. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları	30
Şekil 2.6. Bir çift ışık yollu (double beam) spektrofotometrenin optik sistemi ve bileşenleri	32
Şekil 2.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler	35
Şekil 2.8. PLS2 kalibrasyonu	40
Şekil 3.1. Kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği	49
Şekil 3.2. PER (45 µg/mL) (—) ve IND (7 µg/mL) (----) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın (.....) absorpsiyon spektrumları (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v) çözeltisi içerisinde)	51
Şekil 3.3. PER ve IND için Çizelge 3.1. ve Şekil 3.1. de verilen kalibrasyon setinin absorpsiyon spektrumları (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v) çözeltisi içerisinde)	52
Şekil 3.4. PER ve IND için 215-260 nm dalga boyu arasındaki Türev Spektrumu (C). (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v) çözeltisi içerisinde)	54
Şekil 3.5. PER için OAS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar	60
Şekil 3.6. IND için OAS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları	60
Şekil 3.7. PER için OAS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar	61
Şekil 3.8. IND için OAS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen	

	Sayfa No.
konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar	62
Şekil 3.9. PER için OAS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar	69
Şekil 3.10. IND için OAS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	69
Şekil 3.11. PER için OAS-PLS tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	70
Şekil 3.12. IND için OAS-PLS tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	71
Şekil 3.13. PER için TS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	78
Şekil 3.14. IND için TS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	78
Şekil 3.15. PER için TS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	79
Şekil 3.16. IND için TS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	80
Şekil 3.17. PER için TS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	87
Şekil 3.18. IND için TS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	87
Şekil 3.19. PER için TS-PLS tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	88
Şekil 3.20. IND için TS-PLS tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	89
Şekil 3.21. PER (—) (25.0-105.0 µg/mL) ve IND(- - -) (3.0-19.0 µg/mL) A) Absorpsiyon Spektrumları ve B) HAAR-SDD Spektrumları (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v)	92
Şekil 3.22. PER (—) (25.0-105.0 µg/mL) ve IND(- - -) (3.0-19.0 µg/mL) A) Absorpsiyon Spektrumları ve B) BIOR1.5-SDD Spektrumları	

	Sayfa No.
(Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v)	101
Şekil 3.23. PER için 25.0-105.0 µg/mL (—) ve IND için 3.0-19.0 µg/mL (- - -) konsantrasyon aralığında; A) absorpsiyon spektrumları, B) Birinci türev spektrumları ($\Delta\lambda=16$ nm aralıklarla ve skala faktörü = 10)	112
Şekil 3.24. a)85 µg/mL PER, b)15 µg/mL IND ve c)25 µg/mL IS kromatogramları	121

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. PER ve IND analizi için konsantrasyon seti	48
Çizelge 3.2. OAS-PCR yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	56
Çizelge 3.3. OAS-PCR yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	57
Çizelge 3.4. OAS-PCR yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	58
Çizelge 3.5. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	59
Çizelge 3.6. OAS-PCR yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	63
Çizelge 3.7. OAS-PLS yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	65
Çizelge 3.8. OAS-PLS yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	66
Çizelge 3.9. OAS-PLS yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	67
Çizelge 3.10. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	68
Çizelge 3.11. OAS-PLS yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla	

	Sayfa No.
elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	72
Çizelge 3.12. TS-PCR yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	74
Çizelge 3.13. TS-PCR yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	75
Çizelge 3.14. TS-PCR yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	76
Çizelge 3.15. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	77
Çizelge 3.16. TS-PCR yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	81
Çizelge 3.17. TS-PLS yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	83
Çizelge 3.18. TS-PLS yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	84
Çizelge 3.19. TS-PLS yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	85
Çizelge 3.20. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	86
Çizelge 3.21. TS-PLS yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	90
Çizelge 3.22. HAAR-SDD yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	94
Çizelge 3.23. HAAR-SDD yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	95
Çizelge 3.24. HAAR-SDD yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	96
Çizelge 3.25. HAAR-SDD yöntemleriyle standart ekleme tekniği	

	Sayfa No.
kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	97
Çizelge 3.26. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	98
Çizelge 3.27. HAAR-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	99
Çizelge 3.28. BIOR1.5-SDD yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	103
Çizelge 3.29. BIOR1.5-SDD yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	104
Çizelge 3.30. BIOR1.5-SDD yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	105
Çizelge 3.31. BIOR1.5-SDD yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	106
Çizelge 3.32. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	107
Çizelge 3.33. BIOR1.5-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	109
Çizelge 3.34. TD yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	113
Çizelge 3.35. TD yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	114
Çizelge 3.36. TD yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	115
Çizelge 3.37. TD yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	116
Çizelge 3.38. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	117
Çizelge 3.39. TD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki	

	Sayfa No.
miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	118
Çizelge 3. 40. HPLC yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	122
Çizelge 3.41. HPLC yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	123
Çizelge 3.42. HPLC yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	124
Çizelge 3.43. HPLC yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları	125
Çizelge 3.44. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	126
Çizelge 3.45. HPLC yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar :4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)	127
Çizelge 3.46. PER için t-testi ve F-testi.....	128
Çizelge 3.47. IND için t-testi ve F-testi.....	129

1. GİRİŞ

Analitik kimya gıda, klinik, çevre, ziraat, adli tıp, ilaç endüstrisinde ve kimyanın diğer branşlarında analiz için yöntem ve tekniklerin geliştirilmesini kapsayan bir disiplindir. Özellikle insan sağlığı için ilaç endüstrisinde formülasyon öncesi ve formülasyon sonrası ticari ürünlerdeki bileşenlerin rutin analizi ve kalite kontrolü, yasa ve yönergelerle zorunlu olduğu için analitik kimyanın teknik ve yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Daha genel ifade etmek gerekirse doğal ve bütün sanayi ürünlerinin analiz ve kontrolünde analitik kimya disiplin olarak önemli bir yere sahiptir.

Yukarıda da açıklandığı gibi analitik kimyanın yöntem ve teknikleri analiz işlemlerinde vazgeçilmez hayati öneme sahiptir. Analiz işlemlerinde spektrofotometri, sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulamasında analiz işlemlerinin temel problemleri, analiz yönteminin kolay uygulanabilirliği, analiz maliyeti, analiz hızı, sonuçların kesinliği ve doğruluğudur. Analiz işlemlerindeki güçlükleri aşabilmek için sıvı kromatografi-diode array dedektör sistemi (liquid chromatography-diode array dedector system→LC-DAD), sıvı kromatografisi-kütle spektrometri (liquid chromatography-mass spectrometry→ LC-MS), kapiler elektroforez-kütle spektrometri (capillary electrophoresis-mass spectrometry→ CE-MS) ve gaz kromatografi-kütle spektrometri (gas chromatography-mass spectrometry→ GC-MS) gibi yüksek teknoloji ürünü, pahalı ve kompleks bileşenlere sahip analitik cihazlar ya da analitik yöntemler kullanılmaktadır. Bu karmaşık analitik yöntemler, analiz işlemlerinde türevlendirme ve ekstraksiyon gibi ön ayırma işlemlerinin kullanımını gerektirmektedir. İlaç sanayinde, rutin kalite kontrol laboratuvarlarında ve araştırma laboratuvarlarında birden fazla aktif bileşiği içeren karışımların analizinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) veya yüksek teknolojiye sahip ayırma tekniklerine dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ekonomik olarak pahalı ve karmaşık bileşenlerden oluşmaktadır ve analiz esnasında deneysel koşulların optimizasyonu usandırıcı ve zaman alıcıdır. Deneylerin

uzamasıyla kullanılan kimyasalların sarfiyatı da yüksek olmaktadır. Bazı durumlarda da istenen kalitede sonuçlar alınamadığı da olmaktadır. Açıkça ifade etmek gerekirse, iki veya daha fazla aktif bileşiği ve numune matriksini içeren kompleks problemleri çözmek için ekonomik, hızlı, kolay uygulanabilir ve doğru sonuçlar verebilen yeni analitik teknik ve yöntemlere ihtiyaç olduğu açıktır. Ayrıca analiz işlemlerinde klasik ve yüksek teknoloji ürünü kombine analitik yöntemlerin dezavantajlarını azaltmak ya da ortadan kaldırmak için ve daha doğru ve daha kesin analitik sonuçlara ulaşmak için, günümüzde yeni sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları klasik analitik yöntemler ile kombine olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda numunelerdeki iki veya daha fazla bileşiğin kantitatif analizi için çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri kemometrik yöntemler olarak kromatografik ve diğer analitik cihazlardan elde edilen verilere uygulanmaktadır.

Kemometrik uygulamalarda sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyonlar, bütün analitik cihazlardan elde edilen verilerin analizine uygulanabilmesine rağmen, daha çok spektrofotometrik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bunun nedeni spektrofotometrik cihazlardan kolay, hızlı ve tekraredilebilir verilerin elde edilebilmesidir (Dinç E ve ark., 2001a; Dinç ve ark., 2001b; Dinç E ve Baleanu D, 2002; Dinç E ve ark., 2002a; Dinç E 2002; Dinç E ve Üstündağ Ö, 2002; Dinç E ve ark., 2002b; Dinç E ve ark., 2002c; Dinç ve ark., 2002d; Dinç E ve Kanbur M 2002; Dinç E ve ark., 2003a; Dinç E ve ark., 2003b; Üstündağ Ö ve Dinç E 2003a; Dinç E ve Üstündağ Ö 2003b; Dinç E ve Özdemir Ö 2004a; Dinç E ve ark., 2004a; Dinç E ve Özdemir D 2005a; Dinç E ve ark 2004b; Özdemir D ve Dinç E 2004b; Dinç E ve Üstündağ Ö 2005; Dinç E ve ark., 2005a; Dinç E ve ark., 2005b; Dinç E ve ark., 2005c; Özdemir D ve Dinç E 2005b; Dinç ve ark., 2006a; Dinç E ve ark., 2006b; Dinç E ve ark., 2006c).

Son yıllarda dalgacık dönüşüm (wavelet transform→WT) yöntemlerinin gelişimi ve analitik uygulamaları, analiz işlemlerinde spektrofotometrik tekniklerin potansiyel gücünü anlamlı bir şekilde artırmıştır (Dubechies I., 1992; Mallat S., 1998; Leung A.K.M., 1998; Walczak B., 2000; C. X. Ma, X. B. Shao, 2004). Spektral analitik çalışmalarda sürekli dalgacık dönüşüm (continuous wavelet transform→CWT) yöntemleri verilerin azaltılması, sinyalde gürültünün eliminasyonu, sıfır çizgisinin düzeltilmesi ve spektral girişim yapan bileşenlerin kantitatif analizi için esnek ve çok yönlü güçlü sinyal işleme teknikleridir. (E. Dinç, D. Baleanu, 2007; E. Dinç, D. Baleanu, 2006; E. Dinç, D. Baleanu, 2004a; E. Dinç, D. Baleanu, 2004b; E. Dinç, M. Kanbur, D. Baleanu, 2005; E. Dinç, D. Baleanu, Ö. Üstündağ, 2003; E. Dinç, D. Baleanu, A. Taş, 2006).

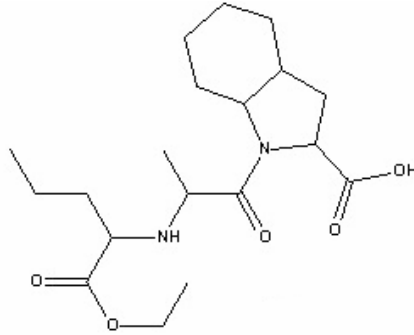
Bu çalışmanın genel amacı olarak, kombine farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin kantitatif analizi için kompleks bileşenlere sahip pahalı cihazlar gerektiren ve analiz maliyeti yüksek olan ayırma yöntemlerine alternatif olarak sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, perindopril ve indapamid bileşiklerini birlikte içeren farmasötik kombinasyonda bu etkin maddelerin hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın ve aynı anda miktar tayinlerinin, sinyal işleme (*sürekli dalgacık dönüşüm yöntemleri*) ve çok değişkenli kalibrasyon (*temel bileşen regresyon (principal component regression→PCR) ve kısmi en küçük kareler (partial least-squares→PLS)*) yöntemleri ile gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Tez kapsamında analiz için geliştirilen çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla türev spektrofotometrisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri geliştirildi. Karşılaştırma için t-test ve F-test istatistiği kullanıldı. Ticari tabletlerdeki PER ve IND'in analizi için geliştirilen bütün yöntemlerin uygulamasından başarılı sonuçlar elde edildi.

Çalışmada geliştirilen orijinal absorpsiyon spektrumu-temel bileşen regresyon (OAS-PCR), orijinal absorpsiyon spektrumu-kısmi en küçük kareler (OAS-PLS) türev spektrofotometri- temel bileşen regresyon (TS-PCR) ve türev spektrofotometri-kısmi en küçük kareler (TS-PLS) yöntemleri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri olarak, Haar sürekli dalgacık dönüşüm (HAAR-SDD) ve Biortogonal1.5 sürekli dalgacık dönüşüm (BIOR1.5-SDD) yöntemleri ise sinyal işleme yöntemleri olarak PER ve IND’i beraber içeren farmasötik preparatın analizine başarıyla uygulandı.

1.1. Perindopril

1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 1.1. Perindoprilin açık formülü

Molekül Formülü: $C_{19}H_{32}N_2O_5$

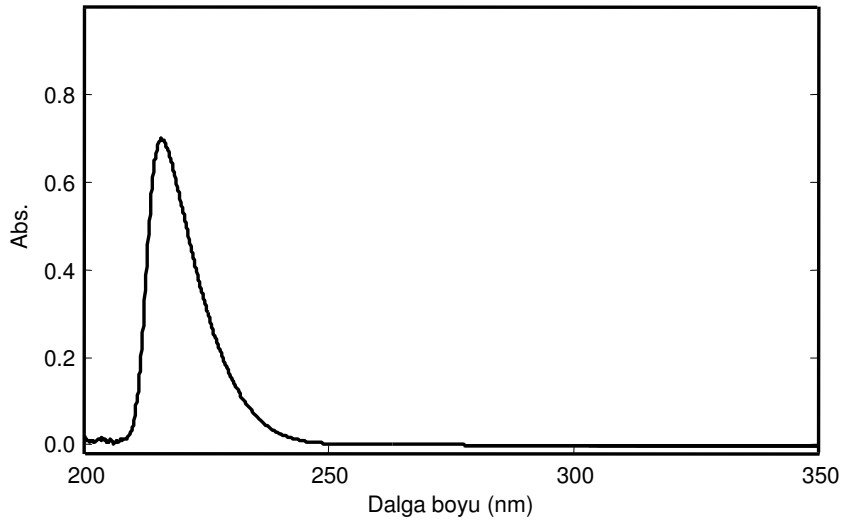
Mol ağırlığı : 368.47

Açık Formülü: *(2S,3aS,7aS)-1-{N-((S)-1-Etoksikarbonilbutil)-L-alanil}perhidroindol-2-karboksilik asit tert butilamin*

Elementel Analizi: C %61.93 , H %8.75 , N %7.60 , O %21.71

Erime Noktası: 156-157 °C

Fiziksel Özellikleri: Perindopril erbumin beyaz, kristalize bir tozdur. Molekül ağırlığı serbest asit formda 368.47 ve tuz formda 441.61'dir. Su (%60 a/a), alkol ve kloroformda serbestçe çözünür. Perindopril, perindopril erbumin'in serbest asit formudur; *in vivo* ortamda ester grubunun hidrolize olmasıyla biyolojik aktif metaboliti perindoprilat'a dönüştürülür.



Şekil 1.2. Perindopril'in (65 µg/mL) metanol – 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içerisindeki absorpsiyon spektrumu.

1.1.2. Farmakolojik özellikleri

Perindopril hipertansiyon tedavisinde oral yoldan tek başına veya kombine olarak kullanılan bir anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. Esasen perindoprilata hidroliz olan bir ön ilaçtır. Perindopril günde bir veya iki doz halinde kullanıma uygun orta-etki süreli bir ACE inhibitörüdür. ACE inhibitörleri genelde siyahi olmayanlarla karşılaştırıldığında siyahi hastalarda (düşük renin popülasyonlu) kan basıncını daha az düşürürler. Kaptoprilin aksine, perindopril advers etki profili bakımından önemli olan bir sülfhidril grubu içermez. Perindopril, FDA tarafından onaylanmamış olmasına rağmen kalp yetmezliğinde de kullanılır. Geniş plasebo kontrollü randomize bir araştırmada (EUROPA, n =12.218) stabil koroner arter hastalığı olan hastalarda kardiyak olayları azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca serebrovasküler hastalık öyküsü olan hastalarda tekrarlayan inmeden korunmada perindopril-indapamid kombinasyonunun (*perindopril 4mg/gün ve indapamid 2.5mg/gün*) yararlı olduğu gösterilmiştir. Perindopril FDA tarafından 30 Aralık 1993'te hipertansiyon tedavisi için onaylanmış, fakat 1999 yılının ortasına kadar bu ülkede pazarlanmamıştır. Perindopril (Coversyl® 2 mg ve 4 mg) Sağlık Bakanlığı tarafından ilk olarak Ekim 1991'de onaylanmıştır. 8 mg tablet formu ise Aralık

2003'te onay almıştır. Esansiyel hipetansiyon tedavisi için onaylanan perindopril-indapamid kombinasyonu (Coversyl® Plus 4 mg/1.25 mg) Temmuz 1999'da onaylanmıştır.

ACE inhibitörü ilaçlar etkilerini lokal vasküler tonüsü azaltarak gösterebilirler. Bu etkileri A-II'nin neden olduğu sempatik ve/veya vazokonstriktör etkinliği zayıflatmalarından kaynaklanır. ACE inhibitörleri presinaptik noradrenalin salıverilmesi ve postsinaptik adrenerjik reseptör aktivitesine de inhibe edebilirler. Böylece, vazopresör aktiviteye karşı duyarlılığı azaltabilirler, fakat bu etkileri klinikteki alışılmış dozlarda kullanıldıklarında görülmeyebilir. Plazma A-II düzeylerinde yaptıkları azalma aldosteron hormon salgılanmasında da azalmaya neden olur. Aldosteron vücutta sodyum ve ona bağlı su reabsorbsiyonunu artıran bir hormondur ve kan basıncının belirli sınırlar içinde sabit tutulmasını sağlayan mekanizmalar içinde önemli bir yeri vardır. ACE inhibitörleri aldosteron salgılanmasında yaptıkları bu azalma ile vücuttaki sodyum ve su tutulumunu da azaltırlar. Bir antihipertansif ilaç grubu olarak ACE inhibitörleri sol ventrikul hipertrofisini (LVH) azaltır, insülin rezistansının veya hiperlipideminin kötüleştirmez ve genelde seksüel difonksiyon yapmazlar.

Perindopril arterlerde dilatasyon yaparak total periferik damar rezistansını (TPDR) düşürür. Hipertansif hastalarda kan basıncındaki azalma kalp atım hızı, atım hacmi veya kalp debisinde önemli herhangi bir değişikliğe neden olmaz yada çok hafif bir değişme görülür. Perindopril verilmesini takiben gerek ayakta gerekse yatar pozisyonunda ölçülen kan basıncını düşürür. Nadiren semptomatik hipertansiyona neden olabilir ve bu durum daha çok hipovolemik veya hiponatremik hastalarda görülür.

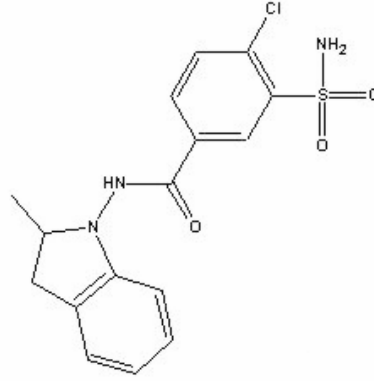
Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinin kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılma gerekçeleri etki mekanizmalarının zaman geçtikçe daha iyi anlaşılmasına bağlı olarak değişmiştir. Başlangıçta ACE inhibitörlerinin tedavi hedefi hipertansiyon ve kronik kalp yetersizliği (KKY) olmuştur. ACE inhibitörlerinin KKY tedavisinde ilk kullanılma nedeni kalbin ön ve

ard yükünü azaltarak sol ventrikülün sistolik fonksiyonunu düzeltmektir. Ancak yapılan çalışmalarda hemodinamik ölçümler ile egzersiz toleransı, ejeksiyon fraksiyonu, kalp büyüklüğü ve klinik sınıfta değişme arasında zayıf bir korelasyon olması ACE inhibitörlerinin sistemik vasküler direnci düşürmekten öte başka mekanizmalarla klinik yarar sağladığını düşündürmüştür. Ayrıca hayvanlarda oluşturulan deneysel miyokard infarktüslerinde (MI) enfarktüsün erken döneminde ACE inhibitörü verildiğinde enfarkt sahasının sınırlandığı ve ilerleyici sol ventrikül dilatasyonunun geciktiği gözlenmiştir. Bu gözlemler üzerine ACE inhibitörlerinin KKY tedavisinde kullanılma gerekçesi değişmiş ve 1980'li yıllarda sol ventrikülün yeniden şekillenmesini hafifletmek olmuştur.

Kalp yetersizliğinde ACE inhibitörlerinin uzun süreli kullanımda mortaliteye etkisini araştıran çalışmalarda ACE inhibitörü alan kişilerde beklenmedik bir şekilde infarktüs ve herhangi bir kardiyovasküler olay nedeniyle hastaneye yatırılma sıklığının ve koroner anjiyoplasti veya baypas tedavisine duyulan ihtiyacının azaldığı saptanmıştır. Bunun üzerine ACE inhibitörlerinin yararlı etkilerinin damar koruyucu etki ile açıklanabileceğine dair bir hipotez geliştirilmiş ve bu hipotez çok merkezli randomize çift-kör çalışmalarla başarılı bir şekilde test edilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklarda halen ACE inhibitörlerinin kullanılma nedeni vasküler koruyucu (antiaterojenik, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antitrombotik) etki nedeniyle.

1.2. İndapamid

1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler



Şekil 1.3. İndapamidin açık formülü

Molekül Formülü: $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$

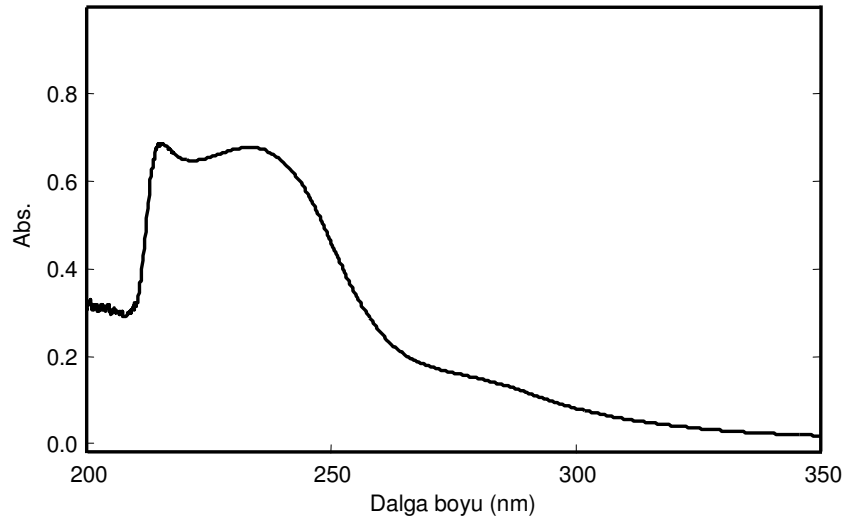
Molekül ağırlığı: 365.84

Açık formülü: 4-Kloro-N-(2-metilindolin-1-il)-3-sülfamoilbenzamid

Elementel Analizi: C %52.53, H %4.41, Cl %9.69, N %11.49, O %13.12, S %8.77

Erime Noktası: 166-167 °C

Fiziksel Özellikleri: İndapamid beyaz veya beyaza yakın renkte, bir tozdur. Pratik olarak suda çözünmez; alkol, metil alkol, asetonitril, glasiyel asetik asit ve etil asetatta çözünür; eter ve kloroformda çok az çözünür.



Şekil 1.4. İndapamid'in (11 µg/mL) metanol - 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içerisindeki absorpsiyon spektrumu.

1.2.2. Farmakolojik özellikleri

Farmakodinamik Özellikleri

İndapamid, antihipertansif ve diüretik etki gösteren indolin sınıfından bir maddedir. İndapamid'in etki biçimi ve kimyasal yapısı tiazid grubu diüretiklere benzemekle birlikte bazı üstünlükler gösterir. İndapamid günde bir kez ve 2,5-5 mg dozlarında, sürekli etki sağlar. Dozun arttırılması etkinliği artırmaz. Düşük dozlara ve günde bir kez kullanılması, hipertansiyon tedavisinde üstünlük sağlar. İndapamid hipertansiyonlu hastalarda, günlük 2,5-5 mg dozlarında, kalp üzerine inotropik veya kronotropik bir etki göstermez. Kalp atım sayısı ve debisinde bir değişikliğe yol açmadan periferik damar direncini azaltır. İndapamid uzun süreli tedavide, serum kolesterol düzeyinde bir değişikliğe neden olmaz.

Farmakokinetik Özellikleri

İndapamid sindirim sisteminden hızlı ve tam olarak emilir. Etkisi, ağız yoluyla alındıktan çok kısa bir süre sonra, 1-2 saat içinde görülmeye başlar ve 36 saat kadar sürer. İndapamid büyük ölçüde karaciğerde metabolize edilir. Alınan dozun büyük bir kısmı idrarla, kalanı dışkı ile vücuttan dışarı atılır. Plazma yarılanma ömrü 14 saat kadardır.

Perindopril-İndapamid'in kombine kullanımında; kortikal dilüsyon segmenti üzerinde etkili bir anjiotensin konverting enzim inhibitörü olan, perindopril tert-bütülin tuzu ile bir klorosülfamid diüretik olan indapamid'in sabit kombinasyonudur. Farmakolojik özellikleri her iki bileşenin ayrı ayrı özelliklerinin yanı sıra iki ürün birlikte kullanıldığında ortaya çıkan aditif, sinerjik etki ile oluşmaktadır. Bu kombine kullanımda, her iki bileşenin antihipertansif etkilerinin aditif sinerjisi ile hipertansiyonda, vasküler endotelyum, arteriyokapiler, mikrosirkülasyon ve hedef organlarda aşağıdaki etkileri oluşturmaktadır.

- Vazorelaksasyonda artış ve endotel bağımlı vazokonstriksiyonda azalma,
- Arteriyolo kapiler mikrosirkülasyonda (arteriyel hipertansiyonda sıklıkla rastlanan mikrosirküler lezyonda azalma), olumlu etkiler
- Böbrek lezyonlarında (glomerülosikloz ve proteinüri) ve miyokard olgularında (sol ventrikül hipertrofisi, kapiler dansitede azalma) gerileme sağlar.

Perindopril ve indapamid'in birlikte uygulanması, ayrı ayrı uygulanmaları durumundaki farmakokinetik özellikleri değiştirmez.

1.3. Perindopril ve İndapamid İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri

1.3.1. Perindopril Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

1.3.1.1. Spektrofotometri

Rahman ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada farmasötik preparatlarda PER'in miktar tayini için kinetik spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem, dimetilsülfoksit içinde 1-kloro-2-4-dinitrobenzen ile ilacın etkileşmesine dayanır. Reaksiyon, spektrofotometrik olarak 420 nm'deki absorbansın değişim hızının ölçümü ile izlenmiştir. Optimize edilen deneysel koşullar altında kalibrasyon grafiği için 20-140 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ilişki olduğu verilmektedir. Yöntem farmasötik ticari preparatlardaki PER'in miktar tayinine başarıyla uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem istatistiksel olarak literatür yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

Erk (2001) çalışmasında iki spektrofotometrik yöntem geliştirerek farmasötik preparatlardaki perindopril ve indapamidin ikili karışımına uygulamıştır. Bu yöntemi karşılaştırmak için de yüksek basınçlı sıvı kromatografisini (YBSK) kullanmıştır. Kromatografik ayırma işlemi RP-YMC pack ODS A-132 C18 (5µm, 15 cmx6.0 mm i.d.) kolonu, pH=2.4 fosfat tamponu ve asetonitril (70:30, h/h) hareketli fazı ve 1.0 mL/dakika akış hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tutulma zamanları sırasıyla PER için 3.20 ve IND için ise 5.80 dakika olarak bulunmuştur. Spektrofotometrik analizde ilk önce birinci türev spektrofotometri yöntemi, ikili karışımlardaki perindopril ve indapamidin aynı anda miktar tayinlerine hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın uygulamıştır. Doğrusal kalibrasyon grafikleri perindopril ve indapamid için sırasıyla 225.7 ve 255.4 nm dalga boylarında ölçülen türev absorbans değerleri kullanılarak elde edilmiştir. İkinci spektrofotometrik yöntem olarak spektrum oranları türev yöntemi kullanılmıştır. Yöntemler birbiriyle karşılaştırılmıştır ve başarıyla ticari preparat analizine uygulanmıştır.

Abdellatef ve ark. (1999), ramipril ve perindopril miktar tayinleri için atomik absorpsiyon ve moleküler spektrofotometri şeklinde iki yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemlerin uygulamasında her iki bileşiğin Cu(II) ile oluşturdukları komplekslerin kloroform fazına ekstraksiyonu ile 535 nm deki absorbans ölçümleri kullanılmıştır. Molar absorptivite değerleri ramipril ve perindopril için sırasıyla 6.55 ve $4.00 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak ve Sandell'in duyarlılıkları ramipril ve perindopril için sırasıyla 5.80×10^{-2} ve $1.04 \times 10^{-1} \mu\text{g cm}^{-2}$ dir. Çoklu kompleks çözeltisi, ramipril ve perindopril için sırasıyla 10-60 ve 20-100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında Beer'in kanununa uygun olduğu belirtilmektedir. Önerilen yöntem farmasötik tabletlerdeki iki etken maddenin miktar tayinine uygulanmıştır. Atomik Absorpsiyon spektrofotometrisinde miktar tayinleri, ilaçların bakır komplekslerinde bakır analizi üzerinden yapılmıştır. Moleküler spektrofotometri ve atomik absorpsiyon spektrometri tabletlerdeki ramipril ve perindoprilin kantitatif analizine başarıyla uygulandığı belirtilmektedir.

Abdellatef 1998, perindoprilin kantitatif analizi için hızlı, kesin ve duyarlı spektrofotometrik yöntemler geliştirmiştir. Yöntemler, n elektron verici olarak 2,3-dikloro-5,6-disiyano-p-benzokinon(DDK)-7,7,8,8-tetrasiyanoekinodimetan(TCNK), tetrasiyanoetilen (TCNE), kloranil (CL) ve pi alıcısı olarak da oldukça renkli kompleks türleri veren p-kloranilik asit (p-CA) ile birlikte bu ilacın reaksiyonuna dayanır. Bu renkli ürünleri spektrofotometrik olarak DDK, TCNK, TCNE, CL ve p-CA için sırasıyla 558, 843, 419, 550 ve 520 nm dalga boylarında absorbans ölçümleriyle analizlerin gerçekleştirildiğini belirtmiştir. Çalışmada, yöntemlerin 20-200 $\mu\text{g/mL}$ aralığında Beer'in kanununa uyduğu ortaya konmuştur. Önerilen yöntemleri perindopril içeren ticari tabletlerin analizine uygulamıştır.

1.3.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Gumieniczek ve ark. (1998), tabletlerdeki perindoprilin analizi için 210 nm dalga boyunda, internal standart olarak kinapril kullanarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemini kullanmışlardır. 0.1 ve 0.5 mg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ölçüm sonuçlarını elde etmişlerdir. Bu çalışmada yakalama sınırı

50 µg/mL'dir. Perindopril tabletlerden metanol ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmada geri kazanım yüzdesi % 95-% 102.75 aralığında bulunmuştur.

1.3.1.3 Kapiller Elektforez

Hillaert (2002) bir çalışmasında, istatistiksel bir deneysel tasarımı, anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri olan enalapril, lisinopril, quinapril, fosinopril, perindopril, ramipril, benazepril ve cilazapril için bir kapiler elektroforetik ayırma yöntemini optimize etmek için kullanılmıştır. Daha önce hiçbir kapiler elektroforez yöntemiyle bu sekiz bileşiğin tamamen ayrımının gerçekleştirilemediği çalışmada belirtilmektedir. Çalışmada ayırma işleminde iyon çifti ajanının molaritesi ve pH'ın etkisi incelenmiştir. Gelişmiş ayırma işlemleri, analit ve katkı maddesi arasındaki iyon çifti etkileşimlerinin uygun etkisini önererek elde edilmiştir. Bununla birlikte, bu işlem sözü edilen anjiyotensin konverting ezim inhibitörü olan bileşiklerinin tümünün tek bir basamakta ayrılmasının mümkün olmadığını ve ikili bir sistemin kombinasyonunun, yapısal bakımdan ilişkili olan bu maddelerin seçici teşhisi için hala gerekli olduğunu bir kez daha göstermiştir.

1.3.1.4. Elektrokimyasal Yöntem

Stefan ve ark. (2002), S- ve R-perindoprilin aynı anda analizi için iki tür akış sistemi seçmiştir. Bunlar akış enjeksiyon analizi ve ardışık enjeksiyon analizidir. Ardışık enjeksiyon analizi en yüksek doğruluk ve kesinlik değerleri ile numune ve tamponun daha düşük tüketimi nedeniyle daha uygun bir analiz yöntemi olarak kabul edilmiştir. Bu akış sistemlerinde dedektör olarak amperometrik biyosensörler kullanılmaktadır. Bu amperometrik biyosensörleri L- ve D-amino oksidaz olarak seçmiştir. Doğrusal konsantrasyon aralığı 120 pmol/L-40 nmol/L (3 x S.D.) dir. Saatte 30 örnekten daha fazla sıklıkla S- ve R-perindoprilin aynı anda kantitatif analizini gerçekleştirmek için, sentez işlemi kontrolünde biyosensör/akış sistemi kullanılmıştır.

Stefan ve ark. (1999), bir çalışmalarında S-perindoprilin enantiopurity testini amperometrik bir biyosensörlü akış enjeksiyonuna dayanan otomatik bir sistemle gerçekleştirmişlerdir. Bu sistem S-perindoprilin on-line izlenmesinde saatte yaklaşık 65 numuneden örnek alabilecek hızdadır. Bu işlemde doğrusal çalışma aralığı 80-200 pmol/L olarak bulunmuştur.

1.3.1.5. Gaz Kromatografisi Yöntemi

Lin ve ark. (1996), antihipertansif bir ajan olarak perindoprilin kantitatif analizi için bir kapiller-gaz kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem bazik bir katalizör olarak kullanılan potasyum-karbonat ile aseton içerisinde pentaflorobenzil bromid ile perindoprilin türevlendirilmesine dayanmaktadır. Normal şartlarda, yüksek polarite ve uçucu olmayan perindopril türevlendirilmiş haliyle uygun kromatografik özelliklere sahip hale getirilmiştir. Perindoprilin türevlendirilmiş biçimi, S-54 kapiler kolonla ayrılarak alev-iyonizasyon dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada perindoprilin türevlendirilmesine etki eden çeşitli parametreler araştırılmıştır. Perindoprilin tayini için yöntemin doğrusal çalışma aralığı 20-300 nmol olarak bulunmuştur. Yöntem tabletlerdeki perindoprilin analizine başarıyla uygulanmıştır.

1.3.2. İndapamid Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

1.3.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Agrawal ve ark. (1995) yaptıkları bir çalışmada indapamidin farmasötik ticari preparatlardan miktar tayini için amonyum molibdatı kullanarak spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. İndapamid, asidik ortamda 710 nm'de maksimum absorbansa sahip molibdat ile mavi renkli bir kompleks oluşturuyor. Bu kompleksin molar absorptivitesi 6.1×10^3 olarak bulunuyor. Yöntemden 2.5-30 µg/mL konsantrasyon aralığında indapamid için doğrusal cevaplar elde ediliyor. Bu yöntem indapamidin miktar tayini için ticari preparatlara başarıyla uygulanmıştır.

Süslü ve ark. (2002) farmasötik preparatlardaki indapamidin miktar tayini için basit, hızlı ve güvenilir bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Standart ve numune çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. İlacın kantitatif miktar tayini, 252.8 nm'de ölçülen birinci türev absorbans değerleri ve 260.4 nm'de ölçülen ikinci türev absorbans değerleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada indapamid için birinci türev yönteminde 1.0-30.0 µg/mL ve ikinci türev yönteminde ise 1.0-35.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığı olarak saptanmıştır. Geliştirilen bu yöntemler, hiçbir ön ayırma işlemi gerektirmeksizin farmasötik preparatlara başarıyla uygulanmıştır. Türev yöntemlerinden elde edilen sonuçlar, istatistiksel olarak literatür yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

Youssef (2003) spektrofotometrik, spektroflorimetrik ve dansiyometrik yöntemler geliştirerek indapamidin miktar tayinini gerçekleştirmiştir. Spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntemlerin esası asidik ortamda Ce (IV) amonyum sülfat varlığında indapamid ile 3-metil-2-benzotlazolin hidrazon hidroklorürün oksidatif çiftleşme reaksiyonuna dayanır. Spektrofotometrik miktar tayini için reaksiyon ürününün absorbansı 601 nm'de ölçülür. Aynı reaksiyon kullanılarak spektroflorimetrik miktar tayini için 300 nm dalga boyundaki uyarıcı ışık kullanılarak 350 nm'deki yayılan ışığın ölçümü kullanılır. Spektrofotometrik ve spektroflorimetrik çalışmalarda 1.2-9.6 µg/mL doğrusal çalışma aralığı olarak

saptanmıştır. Sırasıyla yöntemler için ortalama geri kazanım değerleri ile standart sapmaları % 99.92 ile % 0.83 ve % 99.97 ile % 1.11 olarak verilmektedir. Üçüncü yöntem olarak dansiyometrik kararlılık ölçme yöntemi indapamidin analizi için geliştirilmiştir. Bu yöntemde çözücü sistemi olarak toluen-etil asetat-asetik asit (69:30:1, v/v) kullanılarak bozunma ürünü ve ilacın varlığında 242 nm'deki ölçümler kullanılmıştır. Bu yöntemde ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri, % 99.73 ve % 0.71 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler ticari tabletlere başarıyla uygulanmıştır ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Rodriguez ve ark. (2005), bu çalışmalarında ticari farmasötik preparatlardaki indapamidin kantitatif analizi için enjeksiyon spektrofotometrik yöntemlerini en uygun şekilde kullanmak için çok değişkenli deneysel tasarımı kullanmışlardır. Bu yöntemler asidik ortamda Fe(III) içeren ilaçların oksidasyonuna dayanmaktadır. Plackett-Burman tasarımları bir tarayıcı yöntem olarak çok az sayıdaki deneylerle birlikte en etkili faktörlerin değerlendirilmesine uygulanmıştır. Ardından bu yöntemlerin validasyonu gerçekleştirilmiş ve saf haldeki ve farmasötik preparatlardaki indapamidin kantitatif analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Sonuçlar iyi kesinlik ve doğruluk değerleri vermiştir. Bu yüzden önerilen bu iki prosedür basit, ucuz ve farmasötik preparatlardaki indapamidin rutin analizi için uygundur.

1.3.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Hang ve ark. (2006) indapamidi insan kanında dietil eter ile ekstre ederek yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin etmişlerdir. Bu yöntemde İntersil ODS-3 kolonu ile 2 g KH_2PO_4 , 3mL H_3PO_4 ve 3.5 mL trietilen amin 1000 mL suda hazırlanan tampon çözelti, asetonitril ve metanol (55:40:5, h/h/h) den oluşan izokratik hareketli faz 12.8 dakika ve % 100 izokratik hareketli fazdan metanol ile % 20 izokratik hareketli faza değişen gradient kullanılarak indapamidin kromatografik ayrımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmada indapamid ve glipizid (iç standart) sırasıyla 10.5 ve 12.8 dakika civarında kolondan elue olmuşlardır. Yöntemin validasyonu için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Gün içi ve günler arası % bağıl hata

değerleri sırasıyla % 1.2- % 9.7 (n=5) ve % 3.3-% 9.7 (n=5) olarak bulunmuştur. Yöntem jenerik indapamid kapsüllere (2.5 mg/kapsül) ve referans indapamid tabletlerin (2.5 mg/tablet) karşılaştırmak amacıyla farmakokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmalarına başarıyla uygulanmıştır. Çalışmalarda 20 gönüllü çinli erkek kullanılmıştır. Test ürünü için 25 mg lık tek doz kullanımından sonra gönüllü çinli hastalardaki indapamid için temel farmakokinetik parametreler olarak sırasıyla C-max, AUC(0-48), AUC(0-sonsuz), T-max ve t(1/2) değerleri 331.0 ng/mL (ortalama) $\pm$ 39.2 ng/mL (standart sapma), 6193.7 ng/mL $\pm$ 873.5 ng saat/mL, 7311.8 ng/mL $\pm$ 1232.3 ng saat/mL, 3.2 ng/mL $\pm$ 0.9 saat ve 17.3 ng/mL $\pm$ 2.8 saat. Çalışmada iki formülasyon arasında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmektedir.

Chen ve ark. (2006) insan plazmasında indapamidin teşhisi ve miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrik (YBSK-ESI-KS) yöntemi kullanmışlardır. Basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi gradient elüsyon ve teşhisi C-18 kolonu üzerinde ekstrelerin enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem 6 farklı plazma numunesi kullanılarak test edilmiştir. Doğrusallık, 0.9998 korelasyon katsayısıyla 0.5-100.0 ng/mL konsantrasyon aralığı olarak verilmektedir. Yöntemin validasyonu için gün içi ve günler arası geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanım sonuçları % 85-% 115 arasında bulunmuştur. Çalışmada yöntemin en düşük kantitatif sınır 0.2 ng/mL olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem klinik öncesi ve klinik çalışmalar için indapamidin tanınmasına ve kantitatif analizine başarıyla uygulanabileceği belirtilmektedir.

Ding ve ark. (2006) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrik (YBSK-ESI-KS) tekniğini kullanarak insan plazmasında iç standart (IS) olarak glibenkamid varlığında indapamidin kantitatif analizini gerçekleştirmişlerdir. Analiz işleminde 1.0 M HCl çözeltisi ile numune asidik kılındıktan sonra plazma numuneleri etil asetat ile ekstre ediliyor ve 10 mM amonyum asetat ve metanol (22:78, v/v) karışımını içeren mobil faz ile C-18 kolonu üzerinde ayırma işlemi yapılıyor. İndapamid geliştirilen bu yöntemle tayin edilmiştir. YBSK-ESI-KS analizi, indapamid için 364.3 m/z'de ve IS için 492.4 m/z'de hedef

iyonlar kullanılarak seçilmiş iyon monitoring modunda başarılmıştır. Kalibrasyon grafikleri indapamid için 0.1-100.0 ng/mL aralıkta çizdirilmiştir. Yöntemin validasyonu için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Yöntem gönüllü çinli erkeklerdeki indapamidin farmakokinetik çalışmasına başarıyla uygulanmıştır.

Tang ve ark. (2005), elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrik ölçüm ile birlikte sıvı kromatoğrafisini kullanarak hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirmiş ve insan kanındaki indapamidin miktar tayini için valide etmişlerdir. Kan örnekleri heksan-diklorometan (1:1, v/v) ile ekstrakte edilmiş ve ayırma hareketli fazı asetonitril-su (60:40, v/v) karışımı içeren bir Symmetry C-18 kolonuyla (150 x 3.9 mm i.d., 5 µm) gerçekleştirilmiştir. İndapamid ve iç standart (propilparaben), negatif elektrosprey iyonizasyon ve seçilmiş iyon kaydedici tarafından indapamid için kütle/yük = 364 'de ve propilparaben için de kütle/yük = 179'de ölçülmüştür. Bu yöntem 2.0 µg/L – 120 µg/L doğrusal bir kalibrasyon aralığına sahip olması nedeniyle daha düşük bir tayin sınırına (LLOQ) sahiptir.

Gao ve ark. (2005), insan tam kanındaki indapamidin tayini için hızlı ve duyarlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem metil tertiaributil eter ve insan tam kanı karışımının sıvı-sıvı ekstraksiyonuna dayanmaktadır ve ters fazlı HPLC ve UV dedeksiyon kullanılmıştır. Çalışmada, ayırma işlemi bir YMC (R) ODS-A ters kolunu (5 µm particle size, 4.6 x 150 mm i.d.) kullanılmıştır. Mobil faz olarak sulu çözeltide asetonitril-2-propanol -0.1 trietilamin (%85 fosforik asit tamponu pH 3.75 e ayarlandı.) (35:5:60, v/v/v). İndapamid için doğrusal konsantrasyon aralığı 5.0-500.0 µg/mL ve en düşük tayin sınırı 5.0 µg/mL olarak gözlenmiştir. Gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri ise sırasıyla %2.36 - %4.53 ve %1.68-%8.01 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak geliştirilen bu yöntemin duyarlılığı ve doğruluğu nedeniyle tam kan konsantrasyonlarının analizi için etkili olduğu ispatlanmıştır. Ayrıca yöntem farmakokinetik parametrelerin değerlendirilmesi için kullanılabilir.

Suo ve ark. (2005), bir YBSK ile UV dedektörü birlikte kullanarak sıvı-sıvı ekstraksiyonuna dayanan bir yöntem geliştirmişler ve fare tam kanındaki lauril-indapamidin kantitatif analizini ve validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kan örneği %10 trifloroasetik asit (aq.) ilavesinden sonra dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Kromatografik ayırma için bir Chromasil ODS kolonunu ve mobil faz olarak da metanol-asetonitril-tetrahidrofuran-0.2% trifloroasetik asit (170:20:15:38, h/h/h/h) karışımını kullanmışlardır. UV dedektörde max. dalga boyu 240 nm olarak ölçülmüştür. Lauroil-indapamid ekstraksiyonu geri kazanım değerleri %76.5 ile %82.6 aralığındadır ve kalibrasyon eğrisi 0.048-200 µg/ml ($r = 0.9976$) aralığında iyi bir doğrusallığı sahiptir. Yöntem yüzde bağıl standart sapma değerinin %7.4'ün altında olması ve uygun gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerine sahip olması nedeniyle farmasötik çalışmalarda kullanılması uygun bulunmuştur.

Albu ve ark. (2005), çalışmalarında t-butil metil eter içerisinde tek basamaklı sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemini kullanarak indapamidi ve internal standardı (5-kloro-2-metoksi-N-[2-(4-sülfamilfenil)etil]benzamid) plazmadan izole etmişlerdir. Kromatografik ayırma mobil faz olarak metanol/sulu %0.1 formik asit karışımını içeren bir ters fazlı C 18 monolitik kolonundan oluşmaktadır ve akış hızı 0.8 ml/dk'dir. Hedef bileşikler bir iyon tutucu analizöre (atmosferik basınç elektrosprey arayüzeyine) transfer edilmiştir. Kütle analizörü dedeksiyon seçiciliğini yükseltmek için seçilmiş bir reaksiyon gözlemlene yolu kullanmışlardır. İndapamid için tüm yöntem tayin sınırı 1 µg/ml olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak yöntem indapamidin farmasötik formülasyonlarına başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Zendelovska ve ark. (2003), biyolojik sıvılardaki indapamidin kantitatif analizi için bir UV dedeksiyonla birlikte basit ve hızlı bir YBSK yöntemini geliştirmişlerdir. İndapamid and internal standart serum ve tam kan örneklerinden izole edilmiştir. Kromatografik ayırma, sudaki çözeltisi %0.1 (h/h) trietilamin (pH=3.5) ve asetonitril (63:37, h/h) olan mobil fazı içeren bir ters-fazlı C 18 kolonu ile gerçekleştirilmiştir. UV deteksiyonu ile 240 nm'de ölçüm yapılmıştır. Kalibrasyon eğrileri serum için 10.0-100.0 µg/mL ve tam kan için 50.0-500.0 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır ve tayin sınırları sırasıyla 10.0 µg/mL ve 50.0 µg/mL'dir.

Miller ve ark. (1993), insan tam kanındaki indapamidin analizi için duyarlı, kesin ve yeniden üretilebilir bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. pH=6.6 da dietil eter kullanarak tek basamaklı sıvı-sıvı ekstraksiyonundan sonra indapamidi kolondan elue etmişlerdir. Bu yöntemde Nucleosil C18 kolonunu ve mobil faz olarak da 80 mM amonyum asetat, pH=3.5-asetonitril-2-propanol (65:30:5, h/h/h) kullanmışlardır. Pik yüksekliği tam kan konsantrasyonuna karşı UV dedektörü kullanılarak ölçülen 10.0-500.0 ng/mL aralığında doğrusaldır. İndapamid için geri kazanım değeri %87.4 olarak bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri ise %9.6 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu yöntem indapamidin 2.5 mg'lık tek oral dozunu alan sağlıklı insanlardan alınan tam kan örneklerinin analizine uygulanmıştır.

1.3.2.3. Elektrokimyasal Yöntem

Radi (2003), bu çalışmasında döner damlayan civa elektrotta doğrusal taramalı adsorptif katodik sıyrma voltametri ile geniş bir pH aralığında bakır iyonları varlığında indapamidin voltametrik davranışını incelemiştir. Cu (II)-indapamid kompleksinin adsorptif biriktirilmesi ve bu bakır kompleksinin indirgenmesine dayanan bir yöntem IND in miktar tayini için geliştirilmiştir. pH'ın en uygun olduğu şartlar, Cu(II) konsantrasyonu, birikme potansiyeli ve birikme zamanı parametreleri kullanılarak araştırılmıştır. Optimal koşullar altında lineer bir kalibrasyon grafiği 20-200 nmol/L aralığında ve yakalama sınırı 5 mmol/L olarak gözlenmiştir. Bağlı standart sapma değeri 50 nmol/L'de %2.2 (n=10) olarak gözlenmiştir. Cu(II)-indapamid kompleksinin pik yüksekliğinde, genel ilaç katkı maddeleri ve metal iyonlarının etkisi incelenmiştir. Yöntem tablet dozaj formdaki ilaçların analizine uygulanmıştır.

Radi (2001), bir çalışmasında diüretik indapamidi karbon paste elektrotlar kullanarak, dönüşümlü ve diferansiyel puls voltametri tekniğiyle karakterize etmiştir. İndapamidin miktar tayini, modifiye karbon paste elektrot ile adsorptif-sıyrma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu analiz işleminde pH, iyon şiddeti, indapamidin konsantrasyonu, girişim gibi çözelti değişkenleri ile tarama hızı, puls

genliği, deriştirme zamanı ve biriktirme potansiyeli gibi enstrümantal değişkenler ile pik akımının değişimi analitik amaçlar için yükseltgenme sinyalinin optimizasyonu için bir çalışma yapılmıştır. Anodik diferansiyel puls voltametrisi ile kalibrasyon grafiğinin 5×10^{-8} - 1×10^{-7} M çalışma aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. Serum numunelerine ilave edilen indapamidin seçici olarak tayini gerçekteştirilmiştir.

1.3.2.4. Spektroflorometrik Yöntem

Nie ve ark. (2005), çalışmalarında çözünebilir Mn(IV) ve indapamid arasında bir kemilüminesans reaksiyonu geliştirmişlerdir. Ölçüm sistemi olarak çözünebilir Mn (IV)-formaldehit-indapamid kemilüminesans sistemi ve tanımlı madde olarak indapamid MIP kullanılarak, kemilüminesans yöntemiyle indapamidin miktar tayini için seçici bir molekül oluşturulmuştur. Bu yöntemin doğrusal cevap aralığı 2.0×10^{-8} - 5.0×10^{-6} g/mL aralığındadır. (Lineer düzeltme faktörü 0.995 olarak saptanmıştır). Yakalama sınırı ise 8×10^{-9} g/mL'dir. İndapamid çözeltisinin 5.0×10^{-7} g/mL'sinde bağıl standart sapma değerı % 3.5 (n = 9) olarak bulunmuştur.

Wang ve ark. (2004), bu çalışmalarında indapamidin analizi için akış-enjeksiyon tekniği ile birleştirilmiş duyarlı bir kemilüminesans (CL) yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem kemilüminesans emisyon sisteminde çalışılmış olan ilaçların inhibisyon etkisine dayanmaktadır. Uygun şartlar altında, azalmış CL yoğunluğu indapamidin 1×10^{-8} ile 1.0×10^{-6} g/mL aralığındaki konsantrasyonuyla orantılıdır. Yakalama sınırı 3.4×10^{-9} g/mL'dir. İndapamid için 11 paralel ölçüm sonucunda bağıl standart sapma değerı 1.0×10^{-7} g/mL olarak hesaplanmıştır. Önerilen yöntem farmasötik formülasyonlardaki indapamidin kantitatif analizine uygulanmıştır. Sonuçlar diğer yöntemlerle karşılaştırılmıştır.

1.3.2.5. Kolorimetri

Saleh ve ark. (2001), saf haldeki ve dozaj formdaki indapamidin analizi için iki basit ve duyarlı yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemler asidik ortamda Fe(II) içeren indapamidin oksidasyonuna dayanmaktadır. Serbest Fe(II) 1,10-phenanthroline ile reaksiyona girer ve ferroin kompleksi kolorimetrik olarak 509 nm’de kör çözeltiye karşı ölçülmüştür. (Yöntem A). Yöntem B ise ilaç tarafından Fe(III)’ün indirgenmesine dayanmaktadır. Fe(II), 2,2'-bipiridil ile birlikte renkli bir komplekse dönüşür. (lambda (max) 522 nm). Deneysel optimizasyon koşulları belirtilmiştir. A ve B yöntemleri için sırasıyla 1.0-12.0 µg/mL ve 4.0-18.0 µg/mL konsantrasyon aralığında Lambert Beer kuralına uyulmuştur. Yöntem A için görünür molar absorptivite ve Sandell duyarlılığı 3×10^4 L/mol $\times$ cm ve 0.0188 µg/cm² iken, yöntem B için 2.3×10^4 L/mol $\times$ cm ve 0.0159 µg/cm²’dir. Ölçüm ve tayin sınırları hesaplanmıştır. Geliştirilen bu yöntemler, ilaç katkı maddelerinin hiçbir girişimi olmadan saf haldeki ve tablet formundaki indapamidin analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Spektrofotometri

Spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopi şeklinde sınıflandırılan geniş bir analitik yöntemler grubudur. Spektroskopi, çeşitli tipte ışınların madde ile etkileşmesini inceleyen bilim dalı için kullanılan bir terimdir. Spektroskopi, önceleri sadece elektromanyetik radyasyon (EMR) ile madde arasındaki etkileşmeleri incelerken, günümüzde madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşmeleri de içerecek şekilde genişletilmiştir. Spektroskopik yöntemler, EMR (ışığın) kullanıldığı spektrofotometrik yöntemler ve diğer enerji türlerinin kullanıldığı spektrofotometrik yöntemler şeklinde iki genel sınıfa ayrılır. Spektrofotometri elektromanyetik radyasyon tarafından taşınan enerjinin madde tarafından absorpsiyonuna dayanır.

Elektromanyetik radyasyon, uzayda sabit hızda doğrusal olarak yayılan ve yayılma eksenini boyunca sinüs salınımları şeklinde birbirine dik elektrik ve manyetik alanlardan ibarettir. Elektromanyetik radyasyonun (ışığın) davranışı dalga ve tanecik özellikleriyle açıklanan bir enerji şeklidir.

1) Dalga karakteri: Uzayda sinüzoidal (dalga hareketleriyle) yayılan elektrik ve manyetik vektörlere sahiptir. Spektrofotometride elektrik vektörü kullanılır. Elektromanyetik radyasyon, hız ($c=3.0 \times 10^{10}$ cm/sn), genlik, frekans (ν) ve dalga boyu (λ) gibi çeşitli parametrelerle karakterize edilir.

2) Tanecik karakteri: Bir elektromanyetik radyasyon demeti çok sayıda tanecikten oluşur ve enerjisi aşağıdaki matematiksel ifadeyle verilir:

$$E = h.\nu \quad (1) \quad \text{veya} \quad E = h.c/\lambda \quad (2)$$

formülleriyle ifade edilir (h =plank sabiti= 6.62×10^{-27} erg.sn ve $c=3 \times 10^{10}$ cm/sn).

Bu eşitliklere göre ışığın dalga boyu büyüdükçe enerjisinin azalmasına karşılık dalga boyu küçüldükçe enerjisi artar.

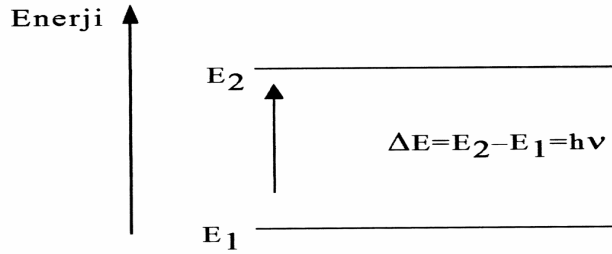
Işık; atom ve moleküller tarafından absorbe edilebilir. UV ve görünür alandaki ışığın absorpsiyonu molekülü oluşturan atomların bağ elektronları ile ilgilidir.

Absorbe edilen enerji kuantlidir ve elektronların düşük enerjili orbitallerden (temel hal) daha yüksek enerjili orbitallere (uyarılmış hal) geçmesine neden olur. Ama her enerji absorbe edilemez; ancak iki enerji seviyesi arasındaki farka eşit bir enerji absorbe edilebilir (Şekil 2.1.).

UV ve görünür alandaki ışığın absorpsiyonu aynı zamanda bir molekülün vibrasyonel ve rotasyonel enerji seviyelerinde de değişikliğe neden olur; çünkü bir molekülün toplam enerjisi:

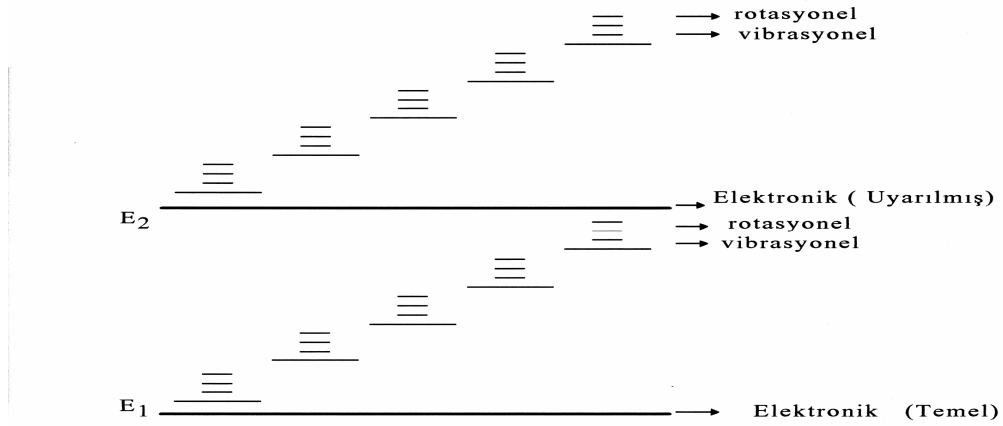
$$E_{\text{toplam}} = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}} + E_{\text{ötelenme}}$$

dur ve her bir elektronik enerji seviyesi çok sayıda vibrasyonel ve rotasyonel enerji seviyesinden meydana gelmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Enerji seviyeleri arasındaki fark

Elektronik enerji diğer enerjilerden büyüktür. Bu nedenle elektronik uyarılma sırasında vibrasyonel ve rotasyonel enerji seviyelerinde de değişme olur. Vibrasyonel ve rotasyonel enerjiler moleküldeki atomların titreşmesi ve molekülün dönmesi ile ilgilidir. Translasyon enerjisi molekülün bütünüünün ötelenme hareketi ile ilgilidir ve en düşük enerjili harekettir.



Şekil 2.2. Moleküldeki enerji seviyeleri.

İki temel tip moleküler enerji çeşidi vardır:

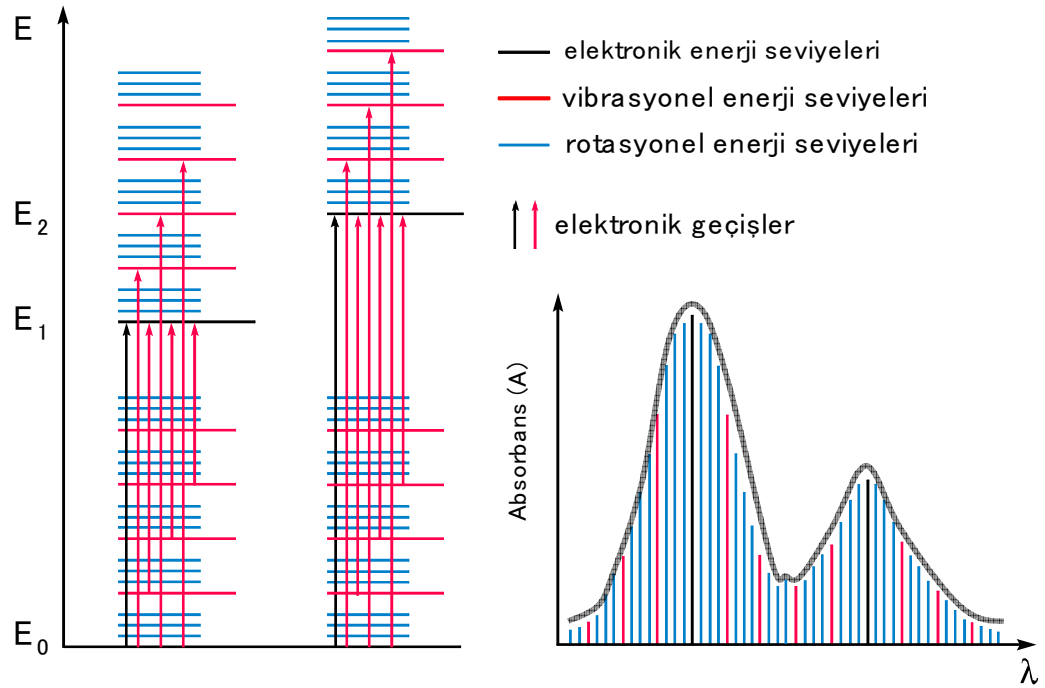
i-Elektronik uyarılma: 35–150 Kcal/mol, yani kimyasal bağlar seviyesinde bir enerji (200–800 nm'deki ışık) ile gerçekleşebilir. Bu olay sonucunda elektronlar daha yüksek enerjili orbitallere (antibağ orbitalleri) çıkarlar. Bu geçişler sırasında UV ve görünür alan spektrumu meydana gelir.

ii-Nükleer vibrasyon: 1-15 Kcal/mol derecesinde bir enerji (2-25 mikrondaki ışık) ile gerçekleşebilir ve bu olay sonucunda infrared (IR) spektrumu meydana gelir.

Hangi spektrum bölgesinde olursa olsun belli bir dalga boyundaki ışığın absorpsiyonu enerjii absorbe etme kapasitesine sahip bir yapının varlığının göstergesidir. Bu en kolay, dalga boyunun düzenli olarak değiştirilerek bir maddenin üzerine düşürülmesinden sonra, ışığın geçmeden önce ve geçtikten sonraki şiddetinin ölçülmesi ile belirlenir. Absorpsiyonun olduğu veya ışığın geçtiği dalga boyları kaydedilir. Absorpsiyon miktarının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak kaydedilmesi sonucunda “absorpsiyon spektrumu” elde edilir.

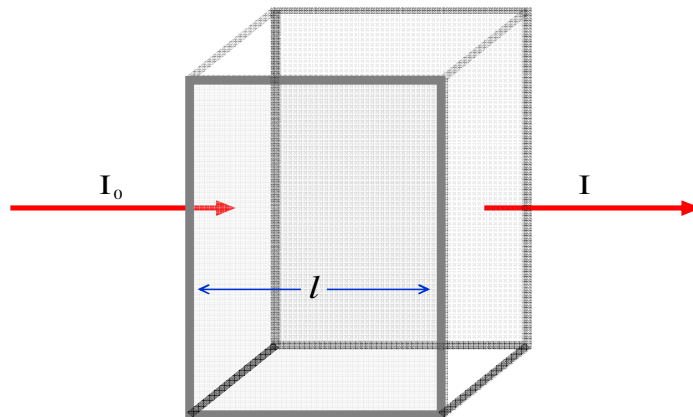
Atomların elektronik uyarılmaları sonucunda her bir yüksek enerjili atomik orbitale geçişe karşılık fotoğraf plağında bir çizgi gözlenir. Bir atomda da birden çok fazla sayıda atomik orbital olduğu için bu tür uyarılma için çok sayıda çizgiden meydana gelen “çizgi spektrumu” görülür (atomik absorpsiyon spektrofotometresi).

Moleküllerde ise birden fazla sayıda atom içermeleri nedeni ile absorpsiyon sonucunda atomlar için gözlenen çizgilerin bir araya gelmesi söz konusudur ve bunun sonucunda “sürekli spektrum” meydana gelir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Sürekli spektrum (moleküldeki elektronik geçişler ve UV-görünür spektrum)

Işık absorpsiyonu spektrofotometrelerde ölçülür. Bu ölçüm atom, iyon veya molekül üzerine gönderilen ışığın şiddeti (I_0) ile geçen ışığın şiddeti (I) arasındaki farkın ölçümü şeklindedir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti (l = ışığın numune içinde aldığı yol)

Işığın absorpsiyonunun üzerine düştüğü atom, iyon veya molekülün konsantrasyonu ile orantılı olarak ilk kez Lambert ve Beer tarafından ortaya konulmuştur.

Beer'e göre aynı derinlikte bir çözeltiden geçen ve çözelti tarafından absorbe edilen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti çözeltinin konsantrasyonu ile logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır. Beer yaklaşımının matematiksel ifadesi,

$$I = I_0 \cdot 10^{-aC} \quad (3) \quad \text{şeklinde verilir.}$$

I_0 gelen ışının şiddeti, I çözeltiyi terkeden ışının şiddeti, a çözeltinin türüne ve monokromatik ışının dalga boyuna bağlı bir sabit, C ise çözeltinin konsantrasyonudur.

Lambert'e göre, bir çözeltiden geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti, çözelti içinde aldığı yolla logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır. Bu gerçek logaritmik olarak;

$$I = I_0 \cdot 10^{-al} \quad (4) \quad \text{şeklinde gösterilir.}$$

(l = çözeltinin derinliği)

Yukarıda açıklanan iki kanun birleştirilerek,

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot l \cdot C} \quad (5)$$

denklemini elde edilir.

Burada: I = Numuneyi terk eden ışığın şiddeti,

I_0 = Numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti,

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı,

C = Absorpsiyon yapanın konsantrasyonu,

l = Işığın numune içerisinde aldığı yol (cm)'dur.

Eşitliğin eksi logaritması alınır,

$$\log I_0 / I = E.l.C \quad (6) \quad \text{olur.}$$

Log I_0 / I ye absorbans denir ve A ile gösterilir. E ise absorbtivite katsayısı olup, bu katsayı seçilen dalga boyuna göre değişir.

$$A = \log I_0 / I = E.l.C \quad (7)$$

Bu eşitlik kısaca,

$$A = E.l.C \quad (8)$$

şeklinde verilir ve bu eşitlikten konsantrasyon (C) hesaplanabilir.

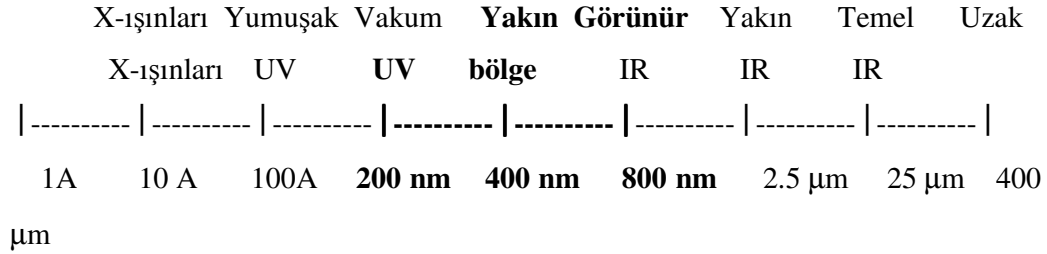
Bu bağıntıda A değeri C'ye karşı grafiğe geçirilirse eğimi $E.l$ olan bir doğru elde edilir, ancak her zaman muntazam bir doğru elde edilemez. Böyle sapmaların (hataların) çeşitli nedenleri olabilir. Bunlar başlıca:

- i) *Cihazdan kaynaklanan sapmalar*: Cihazdaki hatalar şunlar olabilir: Cihaza gelen potansiyelin düzgün olmaması, ışın kaynağının iyi çalışmaması, dedektör sisteminin iyi çalışmaması, kaçak ışınların olması, monokromatörün (dalga boyu seçicisi) hatalı olması, slit ayarının iyi ayarlanmaması vb.
- ii) *Kimyasal maddelerden kaynaklanan sapmalar*: Ölçüm yapılan çözeltide meydana gelen iyonlara ayrışma, birleşme, kompleks oluşumu, fosforesans ve fluoresans olayları, çözeltinin pH'sı ve ortam ısısı gibi olaylar nedeniyle sapmalar gözlenir.
- iii) *Analizci hatasından ileri gelen sapmalar*: Analizcinin dikkatsizliği ve bilgisizliğinden ileri gelen uygun olmayan çözücülerle çalışmak, yüksek absorblama konsantrasyonlarında çalışmak, çözelti içinde kabarcıklar ve asılı parçacıkların bulunması, çözeltinin ölçüldüğü kabın kirli ve çizik olması gibi sebeplerden ötürü sapmalar olabilir (Dinç, 1996; Üstündağ, 2003; Kayapınar, 2007; Kaya 2007).

2.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi

Görünür ışık toplam elektromanyetik radyasyonun çok düşük bir bölümüdür (400–800 nm) ve insan gözü tarafından renk olarak görülür. 400 nm olan alt ucunda mor renk vardır ve gökkuşağı renklerini takip ederek 800 nm olan üst sınıra geldiğinde

kırmızı renk görülür. Görünür ışığın altındaki bölgeye (100–400 nm) “UV” bölgesi, üstündeki bölgeye ise (800 nm–25 μ) “İnfrared” bölgesi adı verilir (Şekil 2.5.).



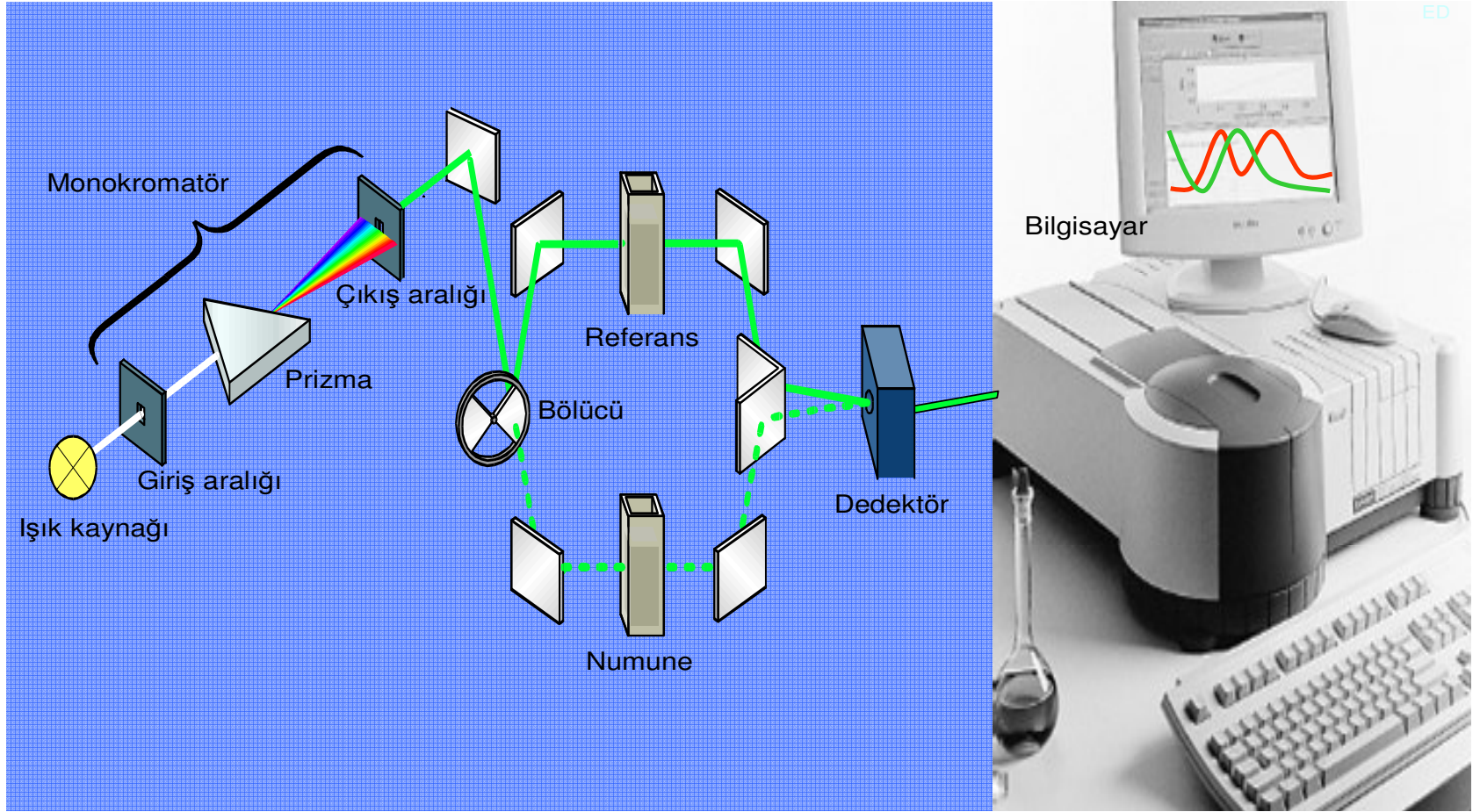
Şekil 2.5. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları.

Moleküllerin elektromanyetik dalgalarla, özellikle ultraviyole, görünür alan ve enfraruj ışınları ile uyarılması sonucu meydana gelen absorpsiyondan, molekül hakkında kalitatif ve kantitatif bilgi edinmek mümkündür (Absorpsiyon spektroskopisi). UV ve görünür alandaki ışık kullanıldığında bileşiklerdeki atomların dış elektronları, cinslerine ve konumlarına göre bu ışığın belli dalga boylarını absorbe ederler ki bu özellik dış elektronların uyarılmasına dayandığından bu yöntem, görünür ve ultraviyole alan spektroskopisi veya *elektron spektroskopisi* adını alır. Bu yöntemden maddelerin yapı aydınlatmalarında ve kantitatif tayinlerinde yararlanılır. UV ve görünür alan soğurma teknikleri, maddelerin yaklaşık 190-900 nm dalga boyları aralığında ışık soğurması ölçümlerine dayanan analitik yöntemleri kapsar.

UV–Görünür alan absorpsiyon spektroskopisi, kantitatif amaçlarla en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hem organik hem de inorganik maddelerin tayininde kullanılabilmesi, son zamanlardaki gelişmelerle 10^{-6} – 10^{-7} M civarına kadar duyarlı olması bu yöntemi çekici hale getirmektedir. Yine bu yöntemle iyi bir kesinlik ve doğruluk sağlamak mümkündür. Zira yöntemin bağıl doğruluktan sapmasının % 1–3 arasında olduğu, bazı tedbirler alınarak bu belirsizliğin çok daha aşağı düşürülebildiği belirtilmiştir. Bunlardan başka yöntemin kolay veri elde etmede fark edilir bir üstünlüğünün olduğunu belirtmek gerekir.

Bir spektrofotometre şu kısımlardan meydana gelmiştir (Şekil 2.6.):

- 1- Işık kaynağı
- 2- Monokromatör
 - a) Işık giriş aralığı
 - b) Prizma
 - c) Işık çıkış aralığı
- 3- Yansıtıcı ayna ve bölücü
- 4- Aynalar
- 5- Numune ve referans kapları
- 6- Dedektör
- 7- Sisteme bağlı bilgisayar ve spektrofotometrik program



Şekil 2.6. Bir çift ışık yollu (double beam) spektrofotometrenin optik sistemi ve bileşenleri.

2.2. Kemometri

Günümüzde bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik alanlarındaki gelişmeler, kimya alanında, özellikle de analitik kimya’da kompleks sistemlerin çözümü için kemometri adı verilen yeni bir disiplinin doğuşuna neden olmuştur. Bu gelişmeler, analitik kimya ve komşu branşlardaki araştırmacılara, analitik problemlerin çözümünde yeni olanaklar sağlayan çok boyutlu ve çok değişkenli parametrelerin kullanıldığı kemometrik yöntemlerle yeni çalışma alanları doğurmuştur. Kemometri, istatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanarak kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya disiplindir. Kemometri, kimyasal analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ekstraksiyonunu veya saklı bilgilerin açığa çıkarılmasına olanak tanıyan güçlü bir araçtır. Kemometrinin temel uygulama alanlarından biri de analitik kimyadır.

Kemometri kelime olarak, 1970’li yıllarda istatistik ve matematiksel yöntemler ile birlikte bilgisayar ve yazılımların kullanıldığı kimyadaki uygulamaları için sözü edilmeye başlanmıştır. Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürüldü ve 1974 yılında uluslararası kemometri derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapıldı. İzleyen yıllarda, dünyada, ulusal ve uluslararası kemometri konferanslarının da organize edildiği gözlenmektedir.

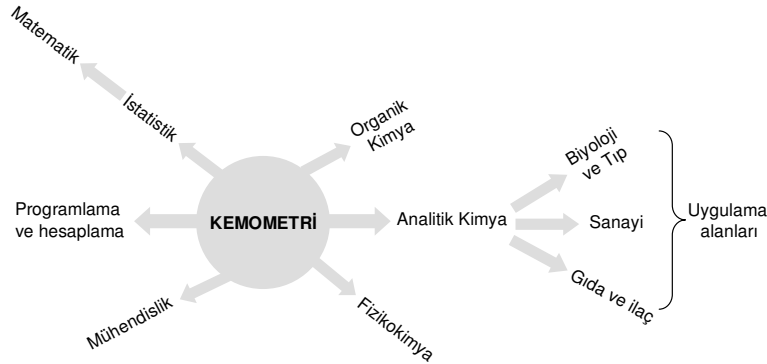
Bugün analitik kimyada kemometri disiplininin tanımı, konuları ve çözüm getirdiği problemler için artan yoğunlukta ve çok sayıda kitabının yayınlandığı görülmektedir. Bu disiplinin ortaya atıldığı günden itibaren kemometrik yöntemler ve uygulamaları ile ilgili derleme makaleler ve öğretici ders notları yayınlanmıştır. (Beebe ve ark., 1998; Brereton ve ark., 1992; Brereton, 1992; Brereton, 2003; Caulcutt ve ark., 1983; Cornell, 1990; Gans, 1992; Jansson, 1984; Joliffe, 1987; Kowalski, 1984; Kramer, 1998; Malinowski, 1991; Martens ve ark., 1989; Martens ve ark., 2000; Massart ve ark., 1990; Massart ve ark., 1997; Meloun ve ark., 1992; Miller ve ark., 1993; Otto, 1998; Vandeginste ve ark., 1998; Dinç, 2007)

Bu kemometrik yöntemlere rağbet edilmesi, kimya ve de analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunmasına bağlanabilir. Yapılan bilimsel çalışmaların sonucu yayınlanan makaleler göstermiştir ki son 15 yıl içinde analitik problemlerin çözümü için gelişmiş analitik cihazlardan elde edilen çok değişkenli ve çok boyutlu ölçüm verilerinin işlenmesi için kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılarıdır.

Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik (descriptive and inference statistics), sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design) , modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (Artificial intelligence methods), resim işleme (image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

Analitik verilerin işlenmesinde, istatistik ve uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır. Sinyallerin işlenmesi, düzleştirme (smoothing), filtreleme (filtering), türev ve integrasyon için kullanılan algoritmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Fourier ve dalgacık dönüşümü gibi yöntemler sinyal işlemek için kullanılan yöntemlerdir. Yüksek verimli deneysel çalışmalar, deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanır. Deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirmeler matematiksel modeller veya tasarımlar vasıtasıyla başarılabılır. Deneysel tasarım ve optimizasyon konusunda çok sayıda teknik bilgi notu ve kitap istatistikçiler tarafından yazılmıştır. Bu konuda ilk analitik uygulamalı kitaplardan biri Cornell tarafından yazılmıştır (Cornell, 1990). Doğrusal olmayan kompleks sistemlerde kalitatif ve kantitatif analizlerde yapay zeka yöntemleri olarak yapay sinir ağları yöntemleri, kemometrik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılar olmakla birlikte, laboratuvar ve analiz çalışması yapan komşu branşlarda da kullanıldığı yayınlanan eğitici notlardan ve yayınlanan bilimsel makalelerden gözlenmektedir. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri şekil 2.7. de sunulmaktadır (Vandeginste ve ark., 1998;)



Şekil 2.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler

Şekil 2.7. de görüldüğü gibi kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektirdiği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap makinalarıyla gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB ve diğer paket programlar kullanılmaktadır.

Kemometri, analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimciler, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasötik kimyacılar, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda deneysel tasarım ve ilaç tasarımında yapı etki ilişkisi çalışmalarında kemometrinin araçlarını kullanmaktadırlar.

Kemometrik miktar tayinlerinde, kompleks karışımların analizi için sıklıkla kullanılan klasik en küçük kareler (classical least-squares → CLS), ters en küçük kareler (inverse least-squares → ILS), temel bileşen regresyon (principal component regression → PCR), kısmi en küçük kareler (partial least-squares → PLS) ve yapay sinir ağları (artificial neural networks → ANN) gibi çok değişkenli kalibrasyon yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlere ait algoritmalar aşağıda sunulmaktadır.

2.2.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları

(Multivariate Calibration Algorithms)

2.2.1.1. Klasik en küçük kareler yöntemi ve matematiksel işlemler

(Classical Least Squares (K-matris) method)

Klasik en küçük kareler kalibrasyon yöntemi, spektrofotometrik veya diğer analitik cihazlardan elde edilen ölçüm verilerinden oluşan doğrusal denklem sistemlerine, Beer–Lambert yasasına uygulanmasıdır. Bu yöntem K-matris yöntemi olarak da belirtilmektedir. Burada CLS algoritmasıyla ilgili açıklamalar spektrofotometrik çalışmalar için yapılmaktadır. $A = K \times C$ (Lambert-Beer yasasına göre)'dir.

$$A_{p \times q} = K_{p \times j} \cdot C_{j \times q} \quad (9)$$

$$K = (A_{p \times j} C_{q \times j}) \times (C_{p \times j} C_{q \times j}^T)^{-1} \quad (10)$$

$$K^* = (K_{j \times p}^T K_{p \times j})^{-1} K_{j \times p}^T \quad (11)$$

$$C_{j \times p} = K^* \cdot A_{\text{sample}} \quad (12)$$

Burada A = absorbans, K = kalibrasyon katsayısı, K^* = CLS kalibrasyon katsayısı,

C = analiz edilen bileşiğin konsantrasyonu.

2.2.1.2. Ters en küçük kareler (P-matris) yöntemi (Inverse Least Squares method)

P-matris yöntemi olarakda ifade edilen ILS yöntemi, doğrusal denklemler sisteminin spektrofotometride Beer-Lambert yasasının ters ifadesine uygulanmasını içerir:

$$C = P \times A \quad (13)$$

$$C_{k \times q} = P_{k \times p} A_{p \times q} \quad (14)$$

$$P = (C_{k \times q} A^T (A_{p \times q} A_{q \times p}^T)^{-1})^{-1} \quad (15)$$

$$C_{\text{sample}} = P_{k \times p} \cdot A_{p \times q} \quad (16)$$

Yukarıdaki denklemler sisteminde A = ölçülen absorbans değeri, P = kalibrasyon katsayısıdır, C = bileşenin konsantrasyonudur. PCR ve PLS algoritmalarında CLS ve ILS işlemleri kullanıldığı için K- ve P-matris algoritmaları kısaca açıklanmıştır.

2.2.1.3. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi

(Principal component regression method)

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerden birisi olan temel bileşen regresyon yöntemi, konsantrasyon seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir.

Burada açıklanan PCR algoritması Martens ve Naes (1984) tarafından verilen şemaya göre açıklanmaktadır. PCR kalibrasyonu kurulmasındaki basamaklar aşağıdaki biçimdedir:

Analiz edilecek maddenin konsantrasyon ve absorbands verilerinin varyans-kovaryansı bulunur. Varyans-kovaryans saçılma matriksinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A \quad (17)$$

Burada C analiz edilecek maddenin konsantrasyonudur, a sabit sayı, b ise temel bileşenlerin ve C-loading matriksinin (q) çarpımından elde edilir:

$$b = P \cdot q \quad (18)$$

Burada P öz vektörlerin matriksidir. Öz vektörler kolon matriksi en uygun öz değere (faktöre) ya da öz değerlere (faktörlere) karşılık gelmektedir. Burada q vektörü C-loadings olarak adlandırılır ve T (sayı matriksi) üzerinden C'nin regresyonu ile tayin edilir:

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_o \quad (19)$$

Burada D diagonal matriks olup herbir öz değer tersine eşittir. t_1 sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir :

$$t_1 = A_o \cdot P_1 \quad (20)$$

Ortalanmış absorbands ve konsantrasyon, A_o ve C_o ile gösterilebilir. Burada a sabiti genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir :

$$a = C_o - A_o^T \cdot b \quad (21)$$

Herbir aşamada elde edilen değerler 16 no'lu denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

a) Yöntemin avantajları; i) dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir, ii) çok bileşen analiz için kullanılabilir, iii) PCR data işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına olanak tanır. iv) analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir, v) bazen orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, vi) kalibrasyon için ölçülen absorbansların dekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdan ve ölçüm aletlerinden gelen gürültünün eliminasyonuna olanak tanır.

b) Yöntemin dezavantajları; i) hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır, ii) yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için), iii) kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere karşılık gelmeyebilir, iv) genellikle çok sayıda kalibrasyon numunesinin kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, v) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

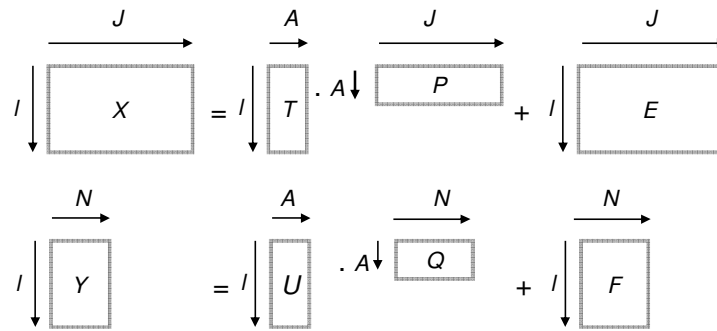
2.2.1.4. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi

(Partial Least Squares Regression Method)

Kemometrik kalibrasyonlardan en yagın ve popüler olanı PLS yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonalized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-orthogonalized PLS algorithm) gibi şekilleri vardır. Ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS algoritması arasındaki temel fark X den faktörlerin çıkarılmasındadır. PLS

kalibrasyonunun PLS1 ve PLS2 şeklinde iki tipi söz konusudur. PLS1 de bir bileşik model içerisinde iken; PLS2 de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir.

PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X- ve Y-blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezleştirilmiş X-değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y-değişkeninin parçalanması aşağıdaki biçimde verilir.



Şekil 2.8. PLS2 kalibrasyonu

$$X = T P^T + E$$

$$Y = U Q^T + F \quad (22)$$

$$Y = X B + F$$

$$B = W (P^T W)^{-1} Q^T$$

Burada X= bağımlı değişken (örneğin absorbans verileri), Y = bağımsız değişken (örneğin konsantrasyon), T = X için sayı matrisi, U= Y için sayı matrisi, P = X için yük matrisi Q= Y için yük matrisi, E = X-kalıntı matrisi, F=Y-kalıntı matrisi, W= max(kovaryans(E, F))

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorbans değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanır .

a) Yöntemin avantajları; i) PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır, ii) tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir, iii) kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik konsantrasyonlarını yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır, iv) yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir, v) bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, vi) bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS'nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR'den daha iyi sonuçlar verir.

b) Yöntemin dezavantajları; i) PLS hesaplamaları klasik metodlardan daha yavaştır, ii) PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur, iii) genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir, iv) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

2.2.2. Kalibrasyon (Konsantrasyon) Setinin Tasarımı

Kemometrik (PCR, PLS) kalibrasyonlar için kalibrasyon seti ya rastgele (randomly) yada analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin konsantrasyonlarını içerecek şekilde kalibrasyon (konsantrasyon) setinin tasarımı yapılır. Simetrik kalibrasyon setinin planlamasında analiz edilecek maddelerin konsantrasyonları, kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturmalıdır. Kemometrik çalışmalarda rastgele kalibrasyon setinin hazırlanmasından ziyade, analiz edilecek maddelerin konsantrasyonlarına göre simetrik bir kalibrasyon setinin hazırlanması, elde edilecek sonuçların doğruluğu ve hataların minimize edilmesi açısından tercih edilecek bir durumdur.

Çalışmalarda konsantrasyon (derişim) seti hazırlamasında, çeşitli tasarım şekilleri verilmekle birlikte rastgele hazırlanan konsantrasyon setleride kullanılmaktadır.

2.2.3. Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-validation Procedure)

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (standard error of calibration → SEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (standard error of prediction → SEP) gibi parametreler kullanılmaktadır. SEC ve SEP değerlerinin minumum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır. Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen konsantrasyon değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı (r), doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır.

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemi (cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için tahmin edilen (tayin) hataların karalarının toplamı (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) hesaplanır. Optimal faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler minumun PRESS değeri ve F-istatistiktir. (Dinç E. 2007).

2.2.4) Sürekli dalgacık dönüşümü (SDD) (wavelet transform) :

Dalgacıklar (wavelets), skala (genişleme) parametresi ($D(x) \rightarrow D(2x)$) ve kayma parametresi ($D(x) \rightarrow D(x+1)$) kullanılarak temel bir fonksiyondan üretilen matematiksel fonksiyonlardır.

$$SDD_{a,b}(x) = \frac{1}{\sqrt{|a|}} \Psi\left(\frac{x-b}{a}\right), \quad a, b \in \mathbf{R}, \quad a \neq 0 \quad (1)$$

Dalgacık temelli fonksiyonlar içinde bir sinyalin projeksiyonu, dalgacık dönüşümü (wavelet transform) olarak adlandırılır. Sürekli dönüşümde ise skala (a) ve kaymaya (b) karşılık gelen dalgacık, ana dalgacık (mother wavelet) olarak adlandırılır ve elde edilen dalgacık fonksiyonu ile sinyal fonksiyonunun iç çarpımları, *sürekli dalgacık dönüşüm* (continuous wavelet transform) yöntemidir.

Bir $f(x)$ fonksiyonunun *sürekli dalgacık dönüşümü (SDD)* aşağıdaki eşitlik ile verilebilir:

$$\text{SDD} \{f(x); a, b\} = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \psi_{ab}^*(x) dx \quad (2)$$

Vektörlerin dönüşümünde, vektörlerin 2^n sayıda ölçüm verisini içermesi şart olup, analitik uygulamalarda bu gözletilmeyebilir. (Dubechies I., 1992; Mallat S., 1998; Leung A.K.M., 1998; Walczak B., 2000; C. X. Ma, X. B. Shao, 2004).

2.2.5. Dalgacıklar Ailesi :

Wavelets (dalgacıklar) dönüşüm yöntemleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Dalgacıklar ailesi	Dalgacık şekilleri ve kodları
Haar	'haar'
Mexican Hat Function	'mexh'
Daubechies	'db1 ve 'db2'..., 'db10
Coiflets	'coif1', ... , 'coif5'
Symlets	'sym2', ... , 'sym8'
Discrete Meyer	'dmey'
Biorthogonal	'bior1.1', 'bior1.3', 'bior1.5', 'bior2.2.', 'bior2.4', 'bior2.6', 'bior2.8', 'bior3.1', 'bior3.3', 'bior3.5', 'bior3.7', 'bior3.9', 'bior4.4', 'bior5.5', 'bior6.8'
Reverse Biorthogonal	'rbio1.1', 'rbio1.3', 'rbio1.5', 'rbio2.2', 'rbio2.4', 'rbio2.6', 'rbio2.8', 'rbio3.1', 'rbio3.3', 'rbio3.5', 'rbio3.7', 'rbio3.9', 'rbio4.4', 'rbio5.5', 'rbio6.8'
Gauss	'gaus1', ... , 'gaus8'
Meyer	'meyr'
Morlet	'morl'

2.2.6. Sürekli dalgacık dönüşümü-sıfır kesim yöntemi:

Tez kapsamındaki ilaç karışımlarının analizinde, girişim yapan orijinal absorpsiyon spektrumlarına sürekli dalgacık tekniği uygulandıktan sonra klasik sıfır tekniği yardımıyla hesaplanan doğru denklemleriyle karışımlardaki ilaç maddelerinin analizi gerçekleştirilecektir. Bu yöntem, sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) ve klasik sıfır kesim işlemlerinin kombine kullanımına dayanmaktadır. (Dubechies I., 1992; Mallat S., 1998; Leung A.K.M., 1998; Walczak B., 2000; C. X. Ma, X. B. Shao, 2004).

Spektrofotometrik bir çalışmada, M ve N bileşiklerini içeren ikili bir karışım dikkate alındığında ve bu karışımın λ_i dalga boyunda absorbansı ölçülürse, aşağıdaki eşitlik yazılabilir:

$$A_{kar., \lambda_i} = \alpha_{M, \lambda_i} C_M + \beta_{N, \lambda_i} C_N \quad (1)$$

Bu eşitlikte, $A_{kar., \lambda_i}$, λ dalga boyunda karışımın dalga boyudur. α_{M, λ_i} ve β_{N, λ_i} katsayıları M ve N bileşiklerinin absorbans katsayılarıdır. C_M ve C_N bileşiklerin derişimleridir.

Eğer SDD sinyal işleme yöntemi, 1 nolu denkleme uygulanırsa, aşağıdaki denklem yazılabilir :

$$SDD [A_{kar., \lambda_i}] = SDD [\alpha_{M, \lambda_i}] C_M + SDD [\beta_{N, \lambda_i}] C_N \quad (2)$$

Yukarıdaki 2 nolu eşitlik SDD-katsayısı cinsinden ifade edilebilir:

$$C_{a,b} (A_{kar., \lambda_i}) = SDD [\alpha_{M, \lambda_i}] C_M + SDD [\beta_{N, \lambda_i}] C_N \quad (3)$$

Karışımındaki saf bileşiklerin orjinal spektrumlarının maksimum ve minimum absorbans verdiği noktalarda SDD-spektrumları da sıfır noktalarından geçecektir. Bu matematiksel gereklilik göz önüne alındığında eğer $SDD [\beta_{N, \lambda_i}] C_N = 0$ ise aşağıdaki sonuç yazılabilir:

$$C_{a,b} (A_{kar., \lambda_i}) = SDD [\alpha_{M, \lambda_i}] C_M \quad (4)$$

4 nolu eşitliğe göre karışımındaki M bileşiğinin konsantrasyonu, $C_{a,b} (A_{kar., \lambda_i})$ değeri ile orantılıdır. Bu matematiksel ilişki sürekli dalgacık dönüşüm-sıfır kesim yönteminin temelini oluşturmaktadır.

Karışımındaki M bileşiğinin miktar tayini için artan derişimlerde M bileşiğinin standart serisi hazırlanır ve karşılık gelen $C_{a,b} (A_{M, \lambda_i})$ değerleri ölçülerek kalibrasyonu grafiği elde edilir.

Aynı işlem karışım numuneleri için uygulanarak ölçülen $C_{a,b} (A_{kar., \lambda_i})$ değerleri, yukarıda M bileşiği için hesaplanan kalibrasyon dekleminde yerine konarak karışımındaki M bileşiğinin konsantrasyonu hesaplanır. Bu işlem karışımındaki N bileşiği için de tekrar edilir. (E. Dinç, D. Baleanu, 2007; E. Dinç, D. Baleanu, 2006; E. Dinç, D. Baleanu, 2004a; E. Dinç, D.

Baleanu, 2004b; E. Dinç, M. Kanbur, D. Baleanu, 2005; E. Dinç, D. Baleanu, Ö. Üstündağ, 2003; E. Dinç, D. Baleanu, A. Taş, 2006)

2.3. Gereçler

2.3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Agilent 1100 Series HPLC Sistem (Agilent Technologies, Inc., California and USA).

HPLC sistemi bir DAD (Diode Array Dedector) sistemi ile birlikte.

Waters Symmetry® C-18 HPLC Kolonu.

HP Chem Station (Rev. A0.001 [403] Software programı.

Agilent Vial

Spektrofotometre (UV/ VIS): Shimadzu UV- 1601

Kuvartz küvet

Hassas terazi: Shimadzu Libror AEG-220

Manyetik karıştırıcı: Ikamak RH Jonke & Kunkel IKA (Labortechnik)

Magnet

Pipet (1-10 mL)

Sartorius Minisart tek kullanımlık membran filtre (Gözenek çapı = 0,45 µm)

Balon joje (25-250 mL)

Beher

2.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol (Merck)

0.1 M NaOH Çözeltisi

0.1 M pH=2.12 H₃PO₄-NaH₂PO₄ Tampon Çözeltisi

H₃PO₄ (Merck), NaOH

Acetonitril (Merck)

Perindopril

İndapamid

2.3.3. Analiz edilen bileşiklerin ticari preaparatları**COVERSYL PLUS® (Tablet) Servier:**

Perindopril:..... 4.0 mg
İndapamid:.....1.25 mg

PRETERAX (Tablet) Servier:

Perindopril:..... 2.0 mg
İndapamid:.....0.625 mg

3. BULGULAR

Bir kombine farmasötik preparattaki PER ve IND bileşiklerinin kantitatif analizine çok değişkenli kalibrasyona ve sinyal işlemeye dayalı kemometrik yöntemler uygulandı. PER ve IND kombinasyonunun çok değişkenli kalibrasyon yöntemleriyle analizi için iki farklı çok değişkenli kalibrasyon yöntemi orijinal absorpsiyon spektrumlarına ve 1. dereceden türev spektrumlarına uygulanarak 4 farklı numerik kalibrasyon yöntemi geliştirildi. Bu yöntemler, orijinal absorpsiyon spektrumu-temel bileşen regresyon (OAS-PCR), orijinal absorpsiyon spektrumu-kısmi en küçük kareler (OAS-PLS), türev spektrumu-temel bileşen regresyon (TS-PCR) ve türev spektrumu-kısmi en küçük kareler (TS-PLS) yöntemleri olarak adlandırıldı. PER ve IND karışımının sinyal işleme yöntemleriyle analizinde Haar ve Biortogonal1.5 sürekli dalgacık dönüşüm (HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD) yöntemleri geliştirildi. Yöntemlerin geliştirilmesi aşamasında optimal koşullar en yüksek geri kazanım sonuçlarına göre saptandı. Geliştirilen yöntemler PER ve IND içeren yapay karışımların ve ticari preparatın kantitatif analizine uygulandı.

Tez kapsamında PER ve IND bileşiklerinin aynı anda kantitatif analizi için hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın geliştirilen çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla türev spektrofotometri (TS) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) geliştirilerek karşılaştırma yöntemleri olarak karışımlardaki IND ve PER'in analizine uygulandı.

3.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Çok Değişkenli kalibrasyon yöntemleri olarak OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR ve TS-PLS uygulaması için spektral koşulların optimizasyonu ve optimal kalibrasyon setinin hazırlanması için ön çalışmalar yapıldı. Saptanan spektral koşullarda kalibrasyon setinin ve numunelerin 200-350 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Kemometrik kalibrasyonlar, bilgisayarın hafızasına kaydedilen spektrumlar çağrılarak 215-260 nm dalga boyu bölgesindeki bütün absorbans

değerlerinin vektörel ölçümleri kullanılarak elde edildi. PCR ve PLS algoritmalarıyla hesaplanan OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR ve TS-PLS kalibrasyonları yapay ve farmasötik numunelerin analizine uygulandı.

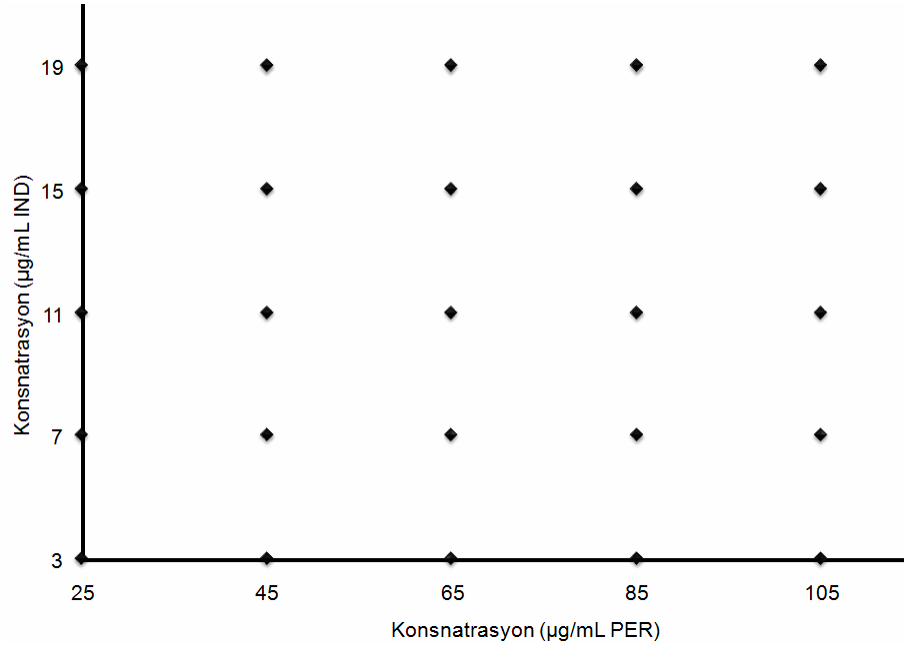
3.1.1. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Kemometrik kalibrasyonlar için metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v) çözeltisi içerisinde PER için 25.0-105.0 µg/mL ve IND için 3.0-19.0 µg/mL konsantrasyon aralığında her iki bileşiği içeren 25 değişik kompozisyonda simetrik bir kalibrasyon seti hazırlandı. Konsantrasyon seti Çizelge 3.1. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. PER ve IND analizi için konsantrasyon seti

Konsantrasyon seti					
No.	Konsantrasyon (µg/mL)		No.	Konsantrasyon (µg/mL)	
	PER	IND		PER	IND
1	25	3	14	25	7
2	65	3	15	25	15
3	105	3	16	45	3
4	45	7	17	45	11
5	85	7	18	45	19
6	25	11	19	65	7
7	65	11	20	65	15
8	105	11	21	85	3
9	45	15	22	85	11
10	85	15	23	85	19
11	25	19	24	105	7
12	65	19	25	105	15
13	105	19			

Kalibrasyonlar için rastgele kalibrasyon seti yerine simetrik kalibrasyon seti tercih edilmiştir. Bunun sebebi analiz esnasında meydana gelebilecek kalibrasyon hatalarını minimize etmektir. Çizelge 3.1. deki simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki projeksiyon grafiği Şekil 3.1 de görülmektedir.

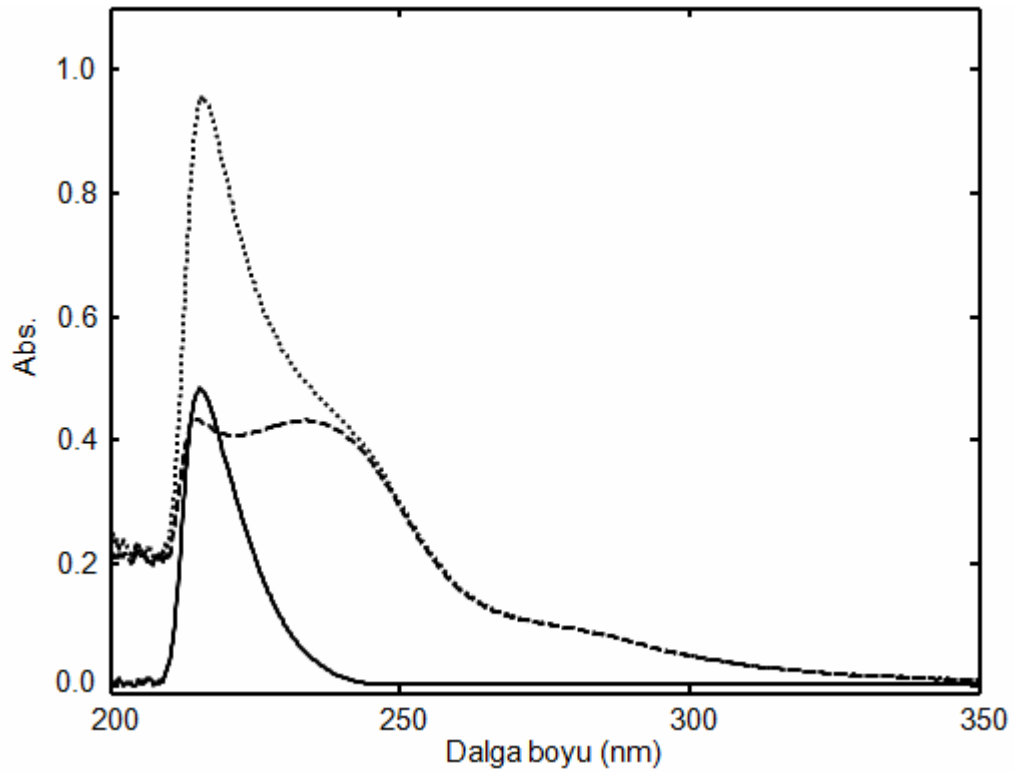


Şekil 3.1. Kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği

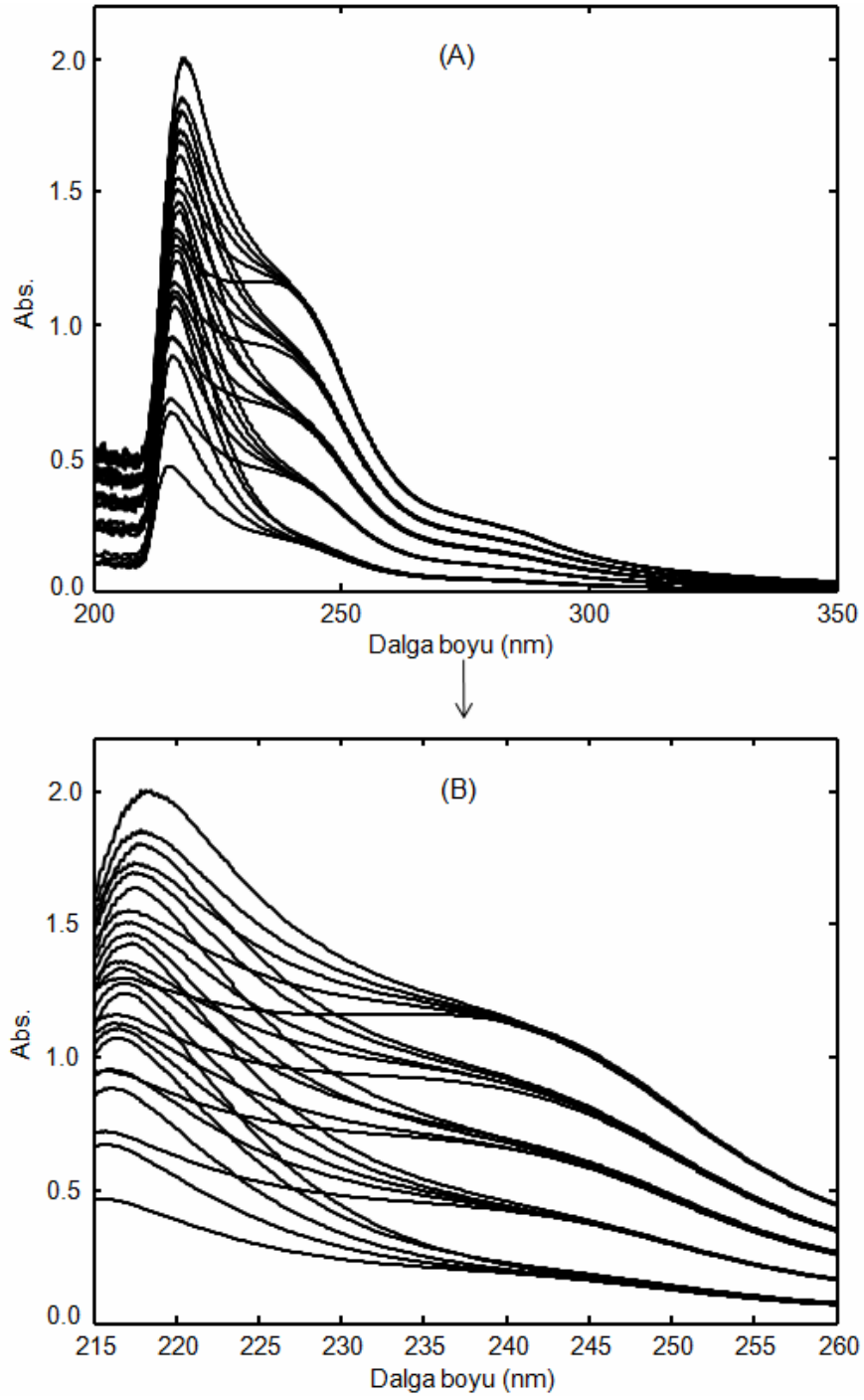
3.1.2. Çok Değişkenli Kalibrasyonların Absorpsiyon Spektrumlarına Uygulamasında Spektral Koşulların Optimizasyonu

OAS-PCR ve OAS-PLS yöntemlerinin uygulanmasında, spektrofotometrik çalışmalarda PER ve IND için metanol ve 0.1 M NaOH'in (50:50, v/v) uygun çözücü olduğu saptandı. Bu çözücü içerisinde PER ve IND bileşikleri ile karışımının 200-350 nm dalga boyu aralığında spektrumları alındı (Şekil 3.2.). Şekil 3.2. den de görüldüğü gibi her iki bileşik aynı dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır. Bu nedenle klasik spektroskopik yaklaşımlarla her iki bileşiğin aynı anda miktar tayinleri mümkün değildir. Bu nedenle çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri tabletlerdeki PER ve IND'in analizine uygulandı.

Geliştirilen kalibrasyon modelleri için Çizelge 3.1. deki kalibrasyon seti hazırlandı ve bu kalibrasyon setinin 200-350 nm dalga boyu aralığındaki spektrumları çizdirildi (Şekil 3.3A). Aynı spektral işlemler yapay ve gerçek numuneler içinde uygulandı. Kemometrik PCR ve PLS kalibrasyonlarının hesaplanmasında hazırlanan konsantrasyon seti için 200-350 nm dalga boyu bölgesinde absorbans değerleri ölçüldü. Kalibrasyon için 215-260 nm dalga boyu aralığındaki absorbans ölçümlerinden oluşan oluşan 451x25 absorbans verilerinin matrisi kullanıldı (Şekil 3.3B). Spektral ölçümlerde tablet yardımcı maddelerinin etkisinin olmadığı ve spektral duyarlılığın yüksek olacağı düşünülen 215-260 nm dalga boyu aralığındaki ölçülen absorbans verileri absorbans seti olarak seçildi. Çalışmalarımızda 200-350 nm aralığı kullanıldığı durumlarda başarılı analiz sonuçları alınamamıştır.



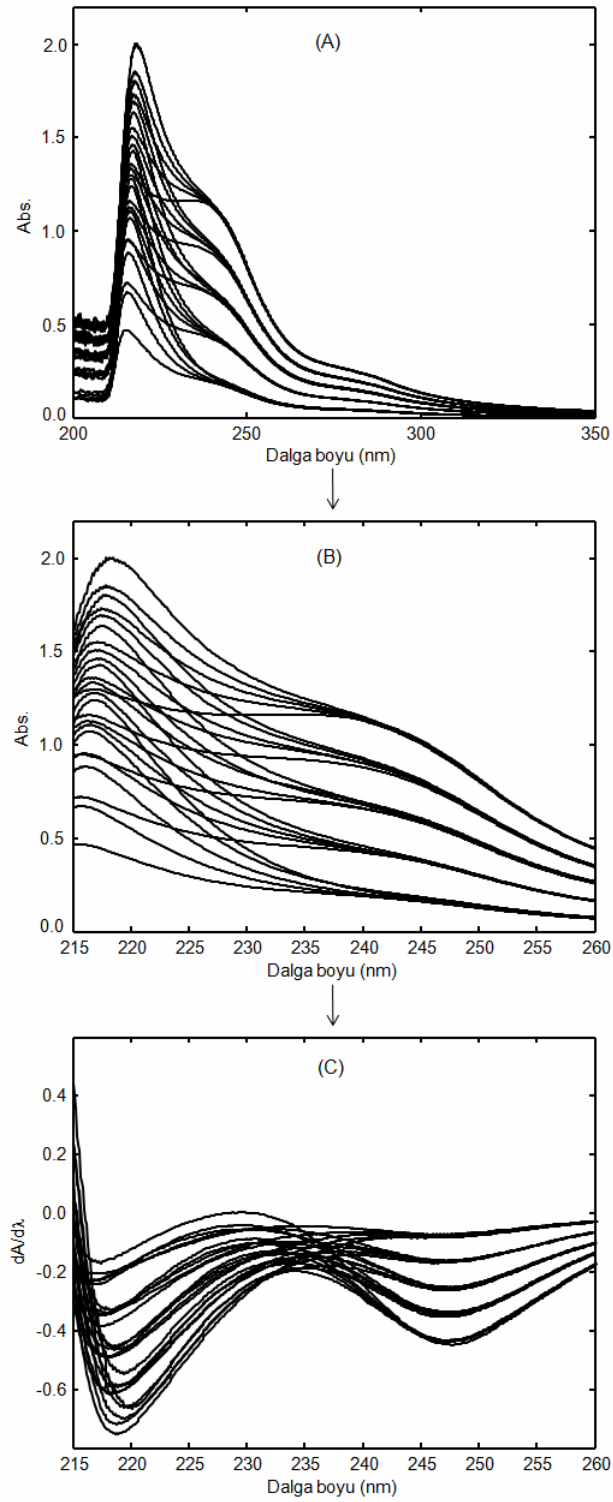
Şekil 3.2. PER (45 µg/mL) (—) ve IND (7 µg/mL) (-----) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın (.....) absorpsiyon spektrumları (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde).



Şekil 3.3. PER ve IND için Çizelge 3.1. ve Şekil 3.1. de verilen kalibrasyon setinin absorpsiyon spektrumları (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde).

3.1.3. Çok Değişkenli Kalibrasyonların Türev Spektrumlarına Uygulamasında Spektral Koşulların Optimizasyonu

TS-PCR ve TS-PLS yöntemlerinin karışım analizine uygulanmasında, OAS-PCR ve OAS-PLS yöntemlerinde kullanılan Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1 deki konsantrasyon seti için 200-350 nm dalga boyu aralığındaki absorpsiyon spektrumları TS-PCR ve TS-PLS kalibrasyonları için kullanıldı (Şekil 3.4A). Konsantrasyon seti için Şekil 3.4A daki spektrumların $\Delta\lambda=6$ nm aralıklarla skala faktörü=10 olarak türevleri hesaplandı (Şekil 3.4B). TS-PCR ve TS-PLS kalibrasyonlarını hesaplamak için 215-260 nm dalga boyundaki türev absobans verilerinin 451x25 matrisi ve Çizelge 3.1 deki konsantrasyon setine bölüm 2.2.1.3 ve 2.2.1.4 de açıklanan PCR ve PLS algoritmaları uygulandı (Şekil 3.4C).



Şekil 3.4. PER ve IND için 215-260 nm dalga boyu arasındaki Türev Spektrumu (C).
 (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde).

3.1.2.1. Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi

Bu OAS-PCR yöntemi konsantrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması bölüm 2.2.1.3. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.1.2.1.1. Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu (Original Absorption Spectra-Principal Component Regression Calibration)

Kemometrik OAS-PCR kalibrasyon için Çizelge 3.1 de hazırlanan konsantrasyon setinin 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla 451 noktada absorbans değerleri okundu (Şekil 3.3B). Bölüm 2.2.1.3. de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Konsantrasyon seti için ölçülen 451x25 veriler matrisinin parçalanma işlemine tabi tutulmasından sonra elde edilen temel bileşenlerin, konsantrasyon seti ile arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı OAS-PCR kalibrasyonu kuruldu. PER ve IND içeren numunelerin 215-260 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak OAS-PCR kalibrasyonunda yerine konularak PER ve IND'in konsantrasyonları hesaplandı.

3.1.2.1.2. OAS-PCR Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Kemometrik OAS-PCR yönteminin validasyon işlemi için metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v) çözeltisi içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışımını içeren çözeltilerden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan OAS-PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. OAS-PCR ile geri kazanım değerleri PER için % 103.9, IND için % 100.5 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri PER için % 2.78 ve IND için %1.24 olarak hesaplandı. OAS-PCR

kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2 de sunuldu.

Çizelge 3.2. OAS-PCR yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	26.91	12.71	107.6	101.7
45.0	12.5	46.44	12.47	103.2	99.8
65.0	12.5	67.24	12.65	103.4	101.2
85.0	12.5	87.12	12.41	102.5	99.3
105.0	12.5	106.62	12.46	101.5	99.7
40.0	3.0	39.72	3.09	99.3	103.1
40.0	7.0	40.82	6.95	102.0	99.3
40.0	11.0	42.21	10.99	105.5	99.9
40.0	15.0	42.19	14.99	105.5	99.9
40.0	19.0	43.49	19.16	108.7	100.9
		$\bar{X}$		103.9	100.5
		SS		2.89	1.25
		BSS		2.78	1.24

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma

Diğer bir validasyon işlemi olarak OAS-PCR yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.3. OAS-PCR yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.56	1.05	3.42	1.88	101.9	8.39	0.11	1.33	4.89	104.9
60	12	62.38	1.31	2.10	3.97	104.0	12.78	0.32	2.49	6.48	106.5
90	16	94.71	1.85	1.96	5.24	105.2	17.32	0.09	0.52	8.24	108.2
		$\bar{X}$ 103.7					$\bar{X}$ 106.5				
		SS 1.69					SS 1.67				
		BSS 1.63					BSS 1.57				
Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.56	1.10	3.59	1.87	101.9	8.27	0.17	2.11	3.42	103.4
60	12	61.79	1.21	1.96	2.98	103.0	12.87	0.20	1.58	7.27	107.3
90	16	94.92	1.43	1.51	5.47	105.5	17.15	0.14	0.84	7.22	107.2
		$\bar{X}$ 103.4					$\bar{X}$ 106.0				
		SS 1.84					SS 2.21				
		BSS 1.78					BSS 2.08				

BH= Bağlı hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağlı Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

Geliştirilen OAS-PCR kalibrasyon yöntemini gerçek ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce tablet yardımcı maddelerinin PER ve IND içeren farmasötik preparatların analizine etkisi olup olmadığı hesaplanan kalibrasyon için test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmelerin yapılmasıyla preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND'e karşılık gelen numune ve bu içeriğin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PER ve IND miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri kazanım ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. OAS-PCR yönteminin **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PER için % 103.8 ve % 0.71 ve IND için % 102.3 ve % 0.43 olarak bulundu.

Çizelge 3.4. OAS-PCR yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

		Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dır.									
İlave edilen		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
25	4	25.74	0.25	0.98	2.97	103.0	3.98	0.10	2.60	0.54	101.8
40	8	41.69	0.84	2.02	4.22	104.2	8.21	0.13	1.59	2.61	102.6
70	11	72.98	1.22	1.67	4.26	104.3	11.28	0.18	1.60	2.51	102.5
		$\bar{X}$ 103.8					$\bar{X}$ 102.3				
		SS 0.74					SS 0.44				
		BSS 0.71					BSS 0.43				

$$BH = \text{Bağıl hata} = \frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =ortalama

3.1.2.1.3. ANOVA Testi

Kemometrik OAS-PCR yöntemiyle gün içi günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) ve her derişim ve altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.01 ve p-değeri 1.00, IND için hesaplanan F-test değeri 0.01 ve p-değeri 1.00 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri > p=0.05 olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.5 de sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

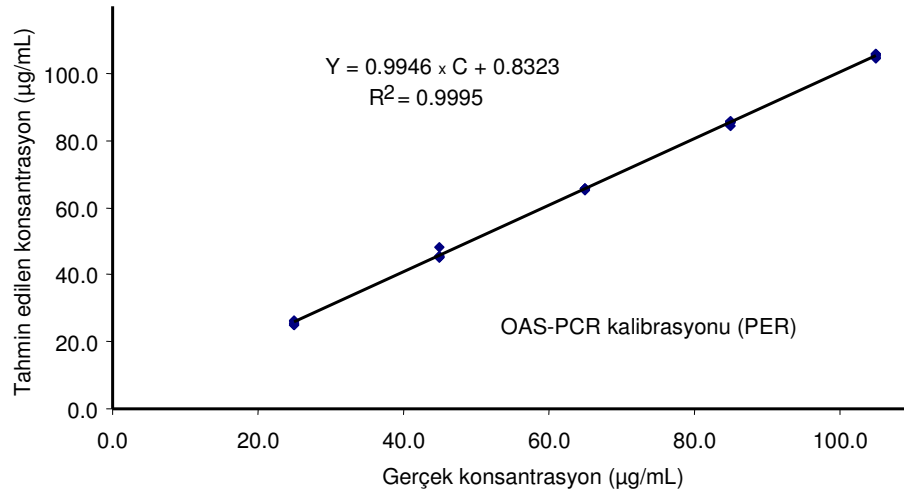
Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	23.72	5	4.74	0.01	1.00	2.62
	Grup içi	17452.82	24	727.20			
	Toplam	17476.54	29				
IND	Gruplar arası	1.85	5	0.37	0.02	0.99	2.62
	Grup içi	362.77	24	15.11			
	Toplam	364.61	29				

3.1.2.1.4. OAS-PCR Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

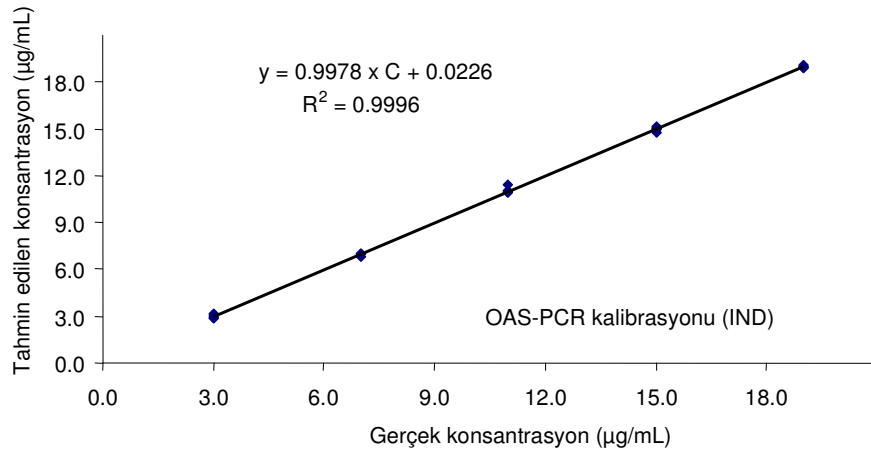
3.1.2.1.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası

Karışımlardaki PER ve IND maddelerinin miktar tayini için OAS-PCR kalibrasyonun hesaplanmasında çapraz validasyon işleminde üç faktör kullanımında tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Sum of Squares→ PRESS)

minimal değerleri elde edilmiştir. PER ve IND için kurulan üç faktörlü OAS-PCR kalibrasyonunda PRESS değeri PER ve IND için sırasıyla 17.09 ve 0.34 olarak hesaplandı. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve PER ve IND için sırasıyla 0.8269 ve 0.1171 olarak bulundu. Gerçek ve tahmin edilen konsantrasyon için lineer regresyon analiz sonuçları PER için şekil 3.5. de ve IND için şekil 3.6. da sunulmaktadır.



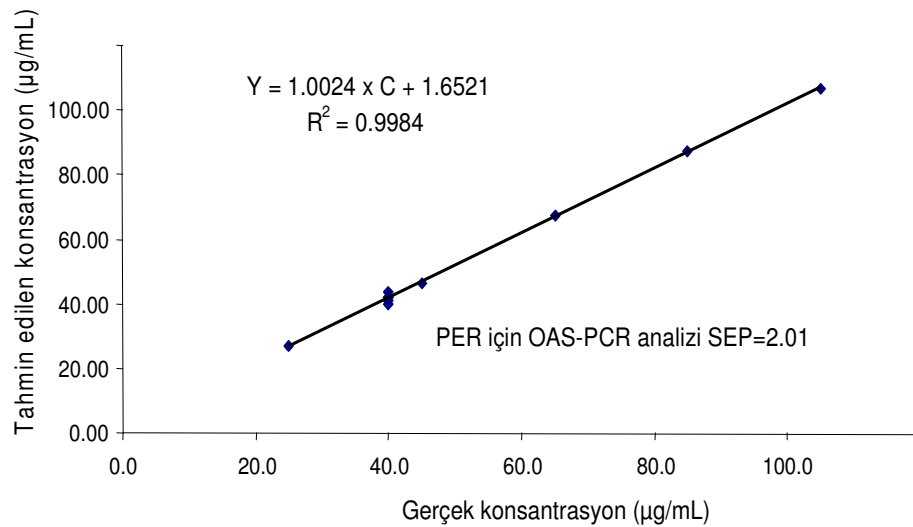
Şekil 3.5. PER için OAS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C=konsantrasyon), (R²=Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



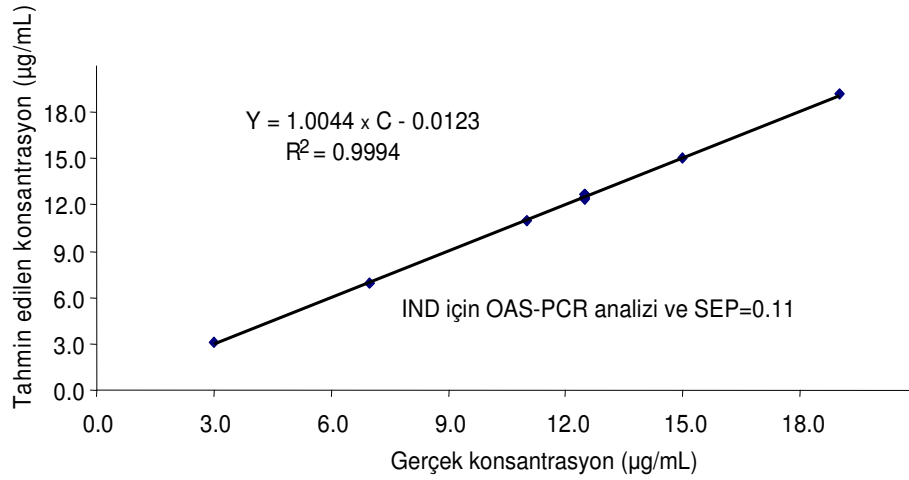
Şekil 3.6. IND için OAS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C=konsantrasyon), (R²=Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.2.1.4.2. Tayinin Standart Hatası

Analiz işleminde validasyon seti olarak hazırlanan perindopril ve indapamid içeren yapay karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden OAS-PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların doğrusal regresyon analizi ile korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar ve SEP değerleri sırasıyla PER ve IND için şekil 3.7. ve şekil 3.8. de verildi.



Şekil 3.7. PER için OAS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R^2 =Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



Şekil 3.8. IND için OAS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R^2 =Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.2.1.5. OAS-PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada kemometrik OAS-PCR yönteminin ticari preparata uygulanmasında 20 tablet, sırasıyla tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL’lik balonjojede metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözücü sistemi içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu numune çözeltilerinin 200-350 nm dalga boyu bölgesinde spektrumları alındı ve 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbans değerlerine bölüm 2.2.1.3. de açıklanan PCR algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki PER ve IND miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet’e uygulandı. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.6. da sunuldu.

Çizelge 3.6. OAS-PCR yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	4.00	1.25
2	4.18	1.31
3	4.13	1.32
4	4.20	1.32
5	4.10	1.31
6	4.10	1.31
7	4.18	1.32
8	4.13	1.30
9	4.20	1.31
10	4.10	1.31
$\bar{X}$	4.13	1.31
SS	0.06	0.02
BSS	1.47	1.52
SH	0.02	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.04 = (4.07-4.19)$	$\bar{X} \pm 0.01 = (1.29- 1.33)$

$\bar{X}$ = Ortalama, SS = Standart Sapma, BSS = Bağlı Standart Sapma
SH = Standart hata, GA = Güven aralığı

3.1.2.2. Orijinal Absorpsiyon Spekt.-Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi

Kemometrik OAS-PLS yöntemi, konsantrasyon seti ve ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen bileşenlerin korelasyonuna dayalı bir yöntemdir. PLS algoritmasının ayrıntılı kuramsal temeli bölüm 2.2.1.4. de verilmiştir.

3.1.2.2.1. Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu (Original Absorption Spectra-Partial Least-Square Calibration)

Kemometrik OAS-PLS kalibrasyonu için hazırlanan konsantrasyon setinin 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda=0.1$ nm aralıklarla ve 451 noktada absorbans değerleri okundu (Şekil 3.3B). Bölüm 2.2.1.4. de açıklanan PLS algoritmasına göre 2x25 boyutlu kalibrasyon seti için ölçülen 451x25 absorbans veriler matrisinin varyans-kovaryans matriksinin parçalanma işlemine tabi tutulmasından sonra konsantrasyon seti ile absorbans matrisinin sayı matrisleri arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı OAS-PLS kalibrasyonu kuruldu. PER ve IND içeren numunelerin 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda=0.1$ nm aralıklarla absorbans değerleri okunarak OAS-PLS kalibrasyonunda yerine konularak PER ve IND maddelerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.1.2.2.2. OAS-PLS Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Çalışmada OAS-PLS yönteminin validasyon işlemi için metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışımını içeren çözeltilerinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan OAS-PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri PER için % 103.6, IND için % 100.5 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri PER için % 2.53 ve IND için 1.25 olarak hesaplandı. OAS-PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7. de gösterildi.

Çizelge 3.7. OAS-PLS yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	26.75	12.72	107.0	101.7
45.0	12.5	46.24	12.47	102.8	99.8
65.0	12.5	66.96	12.65	103.0	101.2
85.0	12.5	86.99	12.41	102.3	99.3
105.0	12.5	106.46	12.46	101.4	99.7
40.0	3.0	39.83	3.10	99.6	103.2
40.0	7.0	40.72	6.95	101.8	99.3
40.0	11.0	41.99	10.99	105.0	99.9
40.0	15.0	41.95	14.99	104.9	99.9
40.0	19.0	43.22	19.17	108.1	100.9
		$\bar{X}$		103.6	100.5
		SS		2.62	1.25
		BSS		2.53	1.25

$\bar{X}$ = Ortalama, SS = Standart Sapma, BSS = Bağıl Standart Sapma

Diğer bir validasyon işlemi olarak OAS-PLS yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 $\mu\text{g/mL}$) her derişim için 6 farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.8. OAS-PLS yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.78	1.01	3.30	2.59	102.6	8.49	0.02	0.21	6.13	106.1
60	12	62.66	1.30	2.07	4.43	104.4	13.03	0.02	0.19	8.56	108.6
90	16	95.02	1.85	1.94	5.58	105.6	17.19	0.14	0.82	7.46	107.5
		$\bar{X}$ 104.2					$\bar{X}$ 107.4				
		SS 1.51					SS 1.21				
		BSS 1.45					BSS 1.13				
Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	31.72	0.62	1.96	5.72	105.7	8.50	0.10	1.19	6.20	106.2
60	12	62.12	0.73	1.17	3.53	103.5	12.99	0.10	0.77	8.24	108.2
90	16	95.41	1.53	1.61	6.01	106.0	17.15	0.14	0.83	7.22	107.2
		$\bar{X}$ 105.1					$\bar{X}$ 107.2				
		SS 1.36					SS 1.02				
		BSS 1.29					BSS 0.95				

BH= Bağıl hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ = Ortalama

Geliştirilen OAS-PLS kalibrasyon yöntemini gerçek ticari farmasötik preparata uygulamadan önce, PER ve IND içeren farmasötik preparatın tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerine etkisi olup olmadığı hesaplanan kalibrasyon seti test edildi. Bunun için standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmelerin yapılmasıyla preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®**

Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda 25 µg/mL PER ve 8 µg/mL IND preparattan gelen PER ve IND miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri kazanım ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Analiz işleminde OAS-PLS yönteminin **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağlı standart sapma değerleri PER için % 104.9 ve % 0.79 ve IND için % 102.1 ve % 5.52 olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.9. OAS-PLS yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

		Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dır.									
İlave edilen		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
25	4	26.01	0.30	1.14	4.02	104.0	4.03	0.30	7.40	0.71	100.7
40	8	42.27	0.49	1.15	5.67	105.7	8.44	0.29	3.43	5.56	105.6
70	11	73.41	1.60	2.18	4.86	104.9	11.57	0.02	0.21	5.20	105.2
		$\bar{X}$ 104.9					$\bar{X}$ 102.1				
		SS 0.82					SS 5.63				
		BSS 0.79					BSS 5.52				

BH= Bağlı hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{İlave edilen miktar}} \times 100$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağlı Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

3.1.2.2.3. ANOVA Testi

Kemometrik OAS-PLS yöntemiyle gün içi ve günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.02 ve p-değeri 1.00, IND için hesaplanan F-test değeri 0.09 ve p-değeri 0.99 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.10

da sunulmuştur. ANOVA testinde $F\text{-hesaplanan} < F\text{-tablo}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

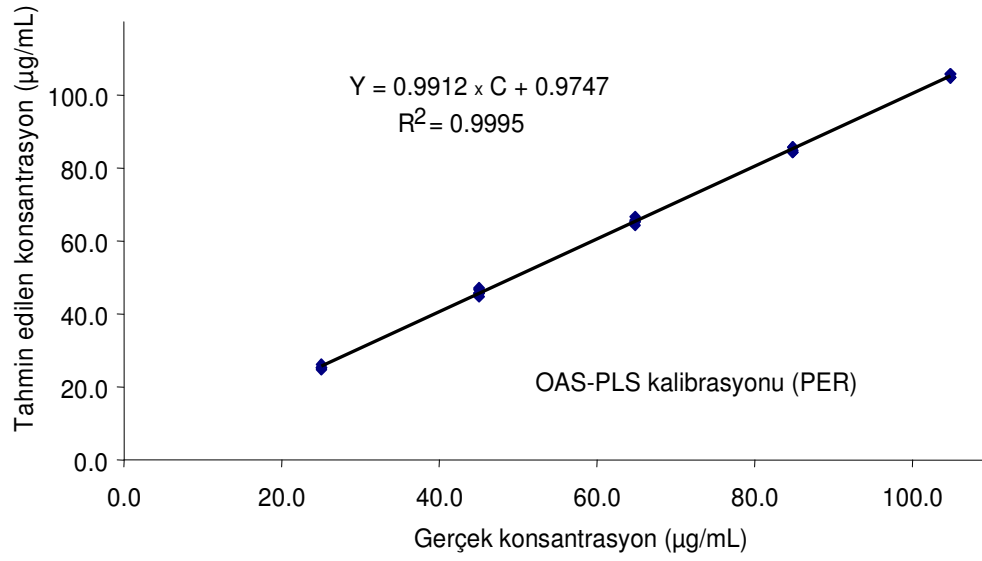
Çizelge 3.10. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	58.31	5	11.66	0.02	1.00	2.62
	Grup içi	16604.02	24	691.83			
	Toplam	16662.33	29				
IND	Gruplar arası	5.53	5	1.11	0.09	0.99	2.62
	Grup içi	304.60	24	12.69			
	Toplam	310.13	29				

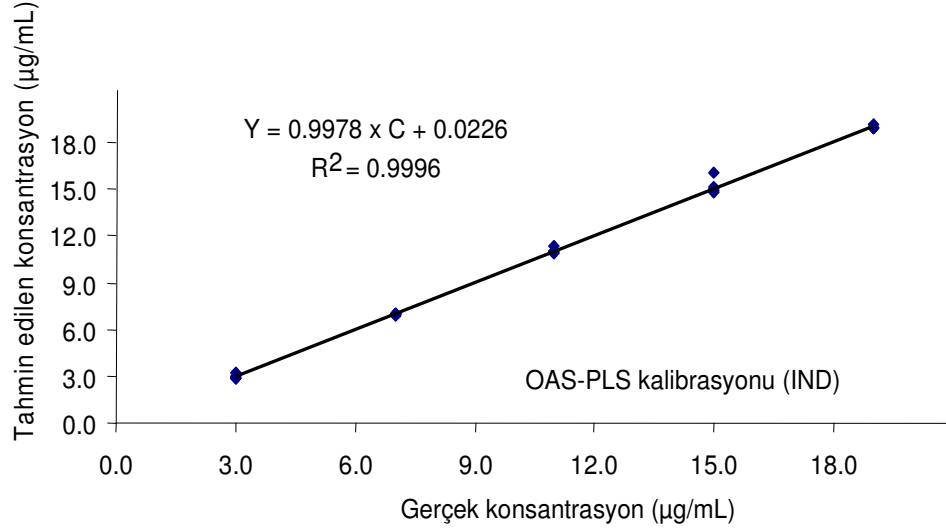
3.1.2.2.4. OAS-PLS Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

3.1.2.2.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası

Karışımlardan PER ve IND maddelerinin miktar tayini için OAS-PLS kalibrasyonun hesaplanmasında çapraz validasyon işleminde üç faktör kullanımında tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Sum of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. PER ve IND için kurulan üç faktörlü PCR kalibrasyonunda PRESS değeri PER ve IND için sırasıyla 15.87 ve 1.4692 olarak hesaplandı. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı. PER ve IND için SEC değerleri sırasıyla 0.7969 ve 0.2424 olarak bulundu. Gerçek ve tahmin edilen konsantrasyon için doğrusal regresyon analiz sonuçları PER için Şekil 3.9 da ve IND için şekil 3.10 da sunulmaktadır.



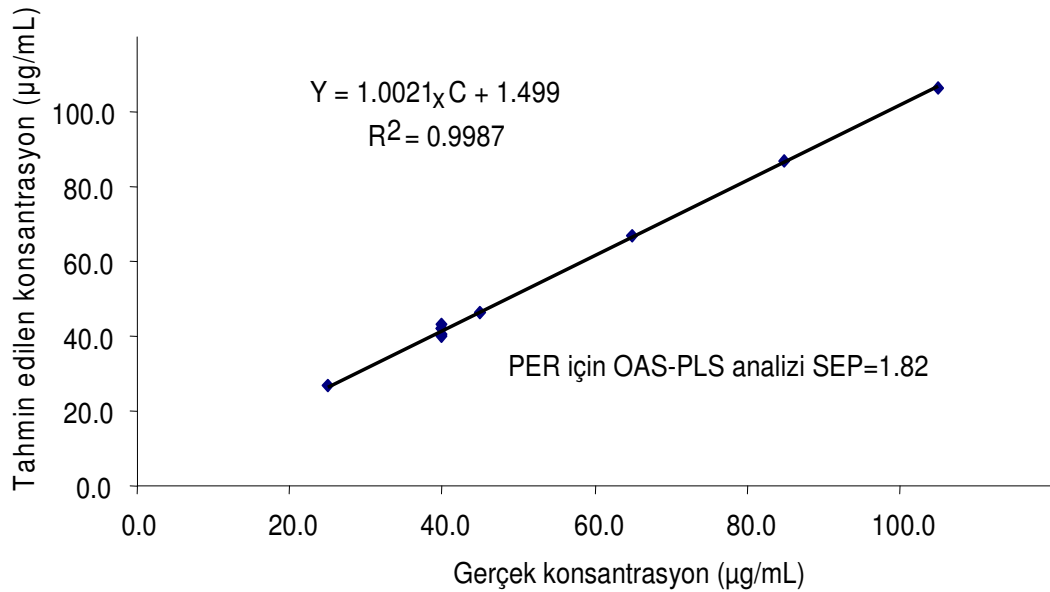
Şekil 3.9. PER için OAS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C=Konsantrasyon), (R²=Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



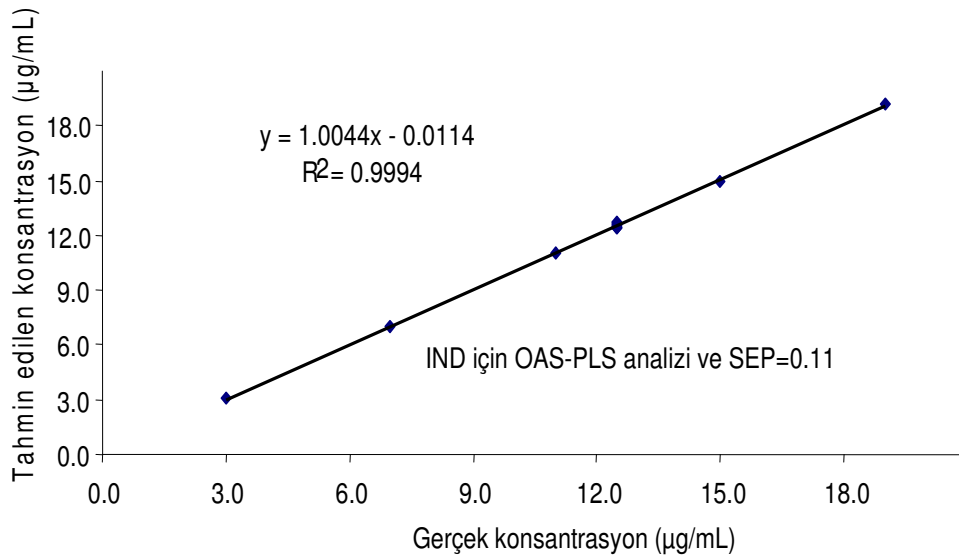
Şekil 3.10. IND için OAS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C=Konsantrasyon), (R²=Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.2.2.4.2. Tayinin Standart Hatası

Tayinin standart hatasını hesaplamak için validasyon seti olarak hazırlanan PER ve IND bileşiklerini içeren yapay karışımlarda bu iki bileşiğin konulan ve bulunan verilerinden OAS-PLS kalibrasyonu kullanıldığında tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), validasyon setinin gerçek konsantrasyonuna karşılık tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon analizi ile korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar ve SEP değerleri sırasıyla PER ve IND için şekil 3.11. ve şekil 3.12. de verildi.



Şekil 3.11. PER için OAS-PLS tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C=Konsantrasyon), (R²=Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



Şekil 3.12. IND için OAS-PLS tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C=Konsantrasyon), (R^2 =Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.2.2.5. OAS-PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Kemometrik OAS-PLS yönteminin farmasötik preparata uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede, metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içerisinde çözüldü. Balonjojedeki çözelti mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu çözeltilerin 200-350 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla spektrumları çizdirildi ve 215-260 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbans değerleri bölüm 2.2.1.4. de açıklanan PLS algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki PER ve IND hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.11 de sunuldu.

Çizelge 3.11. OAS-PLS yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	4.05	1.25
2	4.24	1.31
3	4.11	1.33
4	4.27	1.32
5	4.17	1.31
6	4.16	1.31
7	4.24	1.31
8	4.19	1.31
9	4.27	1.32
10	4.17	1.31
$\bar{X}$	4.19	1.31
SS	0.07	0.02
BSS	1.72	1.58
SH	0.02	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.04 = (4.12- 4.26)$	$\bar{X} \pm 0.01= (1.29-1.33)$

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma
SH = Standart hata, GA = Güven Aralığı

3.1.3.1. Türev Spektrumu-Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi

TS-PCR yöntemi konsantrasyon seti için ölçülen birinci türev absorbens matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması bölüm 2.2.1.3. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.1.3.1.1. Türev Spektrumu-Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu (Derivative Spectra-Principal Component Regression Calibration)

Kemometrik TS-PCR kalibrasyon için hazırlanan konsantrasyon setinin $\Delta\lambda=6$ nm aralıklarla ve skala faktörü=10 olarak hesaplanan türev spektrumlarında, 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda=0.1$ nm aralıklarla 451 noktada absorbens değerleri okundu (Şekil 3.4C). Bölüm 2.2.1.3. de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbens ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri oluşturuldu ve bunun üzerinden kalibrasyonun diğer basamakları gerçekleştirildi. Konsantrasyon seti ve bu sete karşılık ölçülen absorbensların 451x25 veriler matrisinin parçalanma işlemine tabi tutulmasından sonra, elde edilen temel bileşenlerin, konsantrasyon seti ile arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı TS-PCR kalibrasyonu kuruldu. PER ve IND içeren numunelerin 215-260 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda=0.1$ nm aralıklarla ölçülen absorbens değerleri okunarak TS-PCR kalibrasyonunda yerine konularak PER ve IND'in konsantrasyonları hesaplandı.

3.1.3.1.2. TS-PCR Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Kemometrik TS-PCR yönteminin analitik validasyon işleminde metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışımını içeren çözeltilerden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan TS-PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri PER için % 100.5, IND için % 100.9 olarak bulundu. Bağlı standart

sapma değerleri PER için % 2.53 ve IND için %1.66 olarak hesaplandı. TS-PCR kalibrasyon yönteminin PER-IND yapay karışımına uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 3.12 de gösterildi.

Çizelge 3.12. TS-PCR yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	24.93	12.76	99.7	102.1
45.0	12.5	45.37	12.55	100.8	100.4
65.0	12.5	66.36	12.74	102.1	101.9
85.0	12.5	86.57	12.40	101.8	99.2
105.0	12.5	105.59	12.48	100.6	99.9
40.0	3.0	39.22	3.12	98.1	103.9
40.0	7.0	39.16	6.90	97.9	98.6
40.0	11.0	39.16	10.97	97.9	99.8
40.0	15.0	39.90	15.05	99.7	100.3
40.0	19.0	42.49	19.49	106.2	102.6
		$\bar{X}$		100.5	100.9
		SS		2.54	1.68
		BSS		2.53	1.66

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma

Diğer bir validasyon işlemi olarak TS-PCR yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL

ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı karışım çözeltisi kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk test sonuçları Çizelge 3.13 de sunulmaktadır.

Çizelge 3.13. TS-PCR yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)										
Konulan (µg/mL)		PER					IND			
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)
30	8	30.34	0.73	2.42	1.14	101.1	8.25	0.20	2.41	3.16
60	12	61.47	1.58	2.57	2.44	102.4	12.44	0.06	0.45	3.66
90	16	92.93	0.65	0.70	3.25	103.3	16.30	0.15	0.92	1.90
					$\bar{X}$	102.3				$\bar{X}$
					SS	1.07				SS
					BSS	1.04				BSS
Günler arası (n=6)										
Konulan (µg/mL)		PER					IND			
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)
30	8	29.97	0.76	2.53	-0.11	99.9	8.29	0.18	2.17	3.68
60	12	61.12	1.17	1.91	1.87	101.9	12.61	0.24	1.90	5.06
90	16	93.38	1.29	1.38	3.76	103.8	16.55	0.33	2.02	3.42
					$\bar{X}$	101.8				$\bar{X}$
					SS	1.93				SS
					BSS	1.90				BSS

BH= Bağıl hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

Geliştirilen TS-PCR kalibrasyon yöntemini gerçek ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce PER ve IND içeren farmasötik preparatların tablet yardımcı maddelerinin analizi üzerine etkisi olup olmadığı hesaplanan kalibrasyon seti için test edildi. Bunun içinde standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparattaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılmasıyla preparatın üzerindeki etiket miktarlarına

göre sırasıyla yaklaşık 25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PER ve IND miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri kazanım ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. TS-PCR yöntemin uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri TS-PCR kalibrasyon yöntemi kullanıldığında PER için % 101.6 ve % 2.11 ve IND için % 102.0 ve % 1.53 olarak bulundu. Sonuçlar Çizelge 3.14 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. TS-PCR yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

		Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dir.									
İlave edilen		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
25	4	25.55	0.21	0.81	2.21	102.2	4.05	0.04	1.25	1.18	101.2
40	8	41.31	0.82	1.98	3.28	103.3	8.19	0.09	1.10	2.36	102.4
70	11	69.41	1.32	1.90	-0.84	99.2	11.37	0.10	0.86	3.40	103.4
		$\bar{X}$ 101.6					$\bar{X}$ 102.0				
		SS 2.14					SS 1.56				
		BSS 2.11					BSS 1.53				

BH= Bağıl hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

3.1.3.1.3. ANOVA Testi

Kemometrik TS-PCR yöntemiyle gün içi ve günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) ve her derişim ve altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62

olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.03 ve p-değeri 1.00, IND için hesaplanan F-test değeri 0.04 ve p-değeri 1.00 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.13. de sunulmuştur. ANOVA testinde F-hesaplanan< F-tablo ve p-değeri> p=0.05 olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.15 de sunulmuştur.

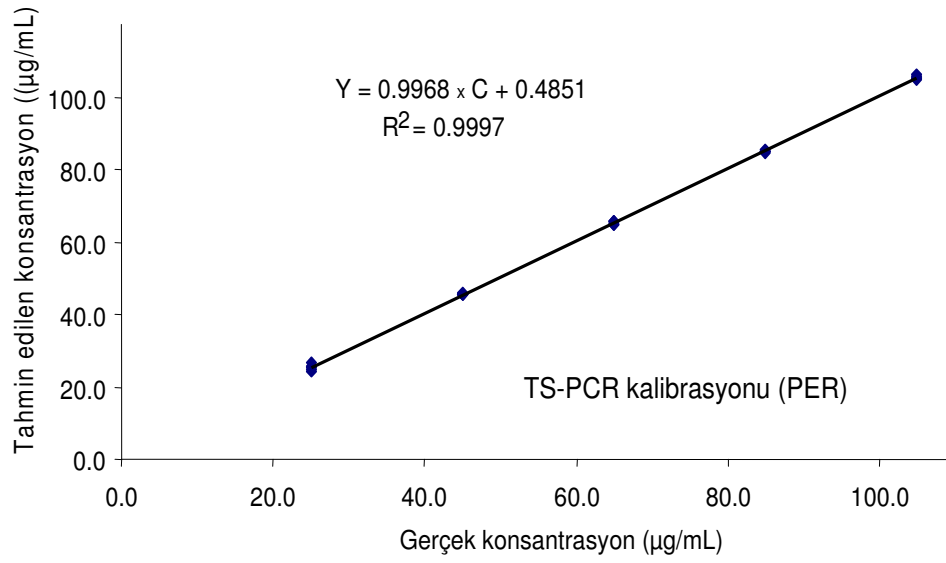
Çizelge 3.15. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	92.74	5	18.55	0.03	1.00	2.62
	Grup içi	17142.14	24	714.26			
	Toplam	17234.88	29				
IND	Gruplar arası	2.26	5	0.45	0.04	1.00	2.62
	Grup içi	301.85	24	12.58			
	Toplam	304.11	29				

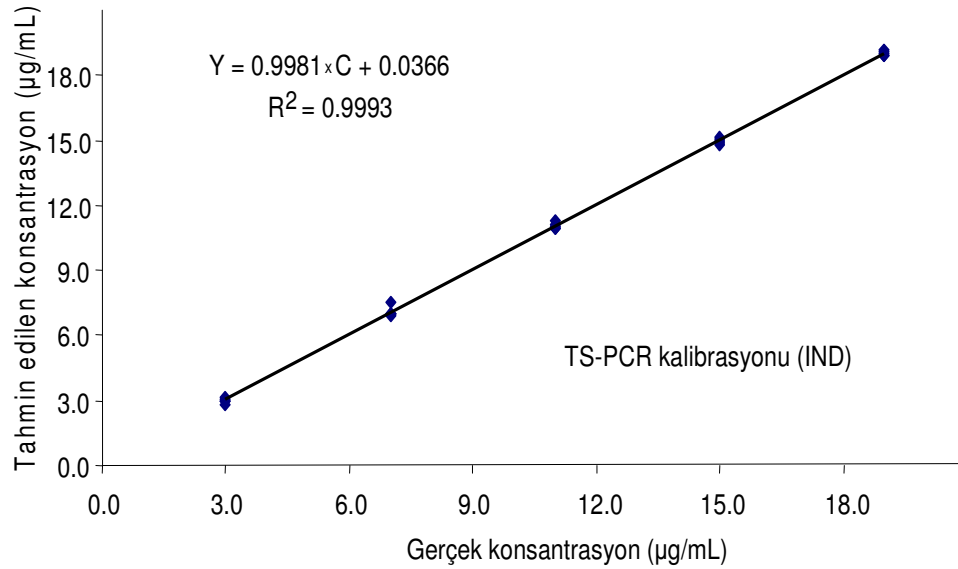
3.1.3.1.4. TS-PCR Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

3.1.3.1.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası

Karışımlardan PER ve IND etkin maddelerin miktar tayini için TS-PCR kalibrasyonun hesaplanmasında çapraz validasyon işleminde üç faktör kullanımında tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Sum of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. PER ve IND için kurulan üç faktörlü TS-PCR kalibrasyonunda PRESS değeri PER ve IND için sırasıyla 8.8027 ve 0.5760 olarak hesaplandı. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı. SEC değerleri, PER ve IND için sırasıyla 0.5934 ve 0.1518 olarak bulundu. Gerçek ve tahmin edilen konsantrasyon için doğrusal regresyon analiz sonuçları PER için şekil 3.13. de ve IND için şekil 3.14. de sunulmaktadır.



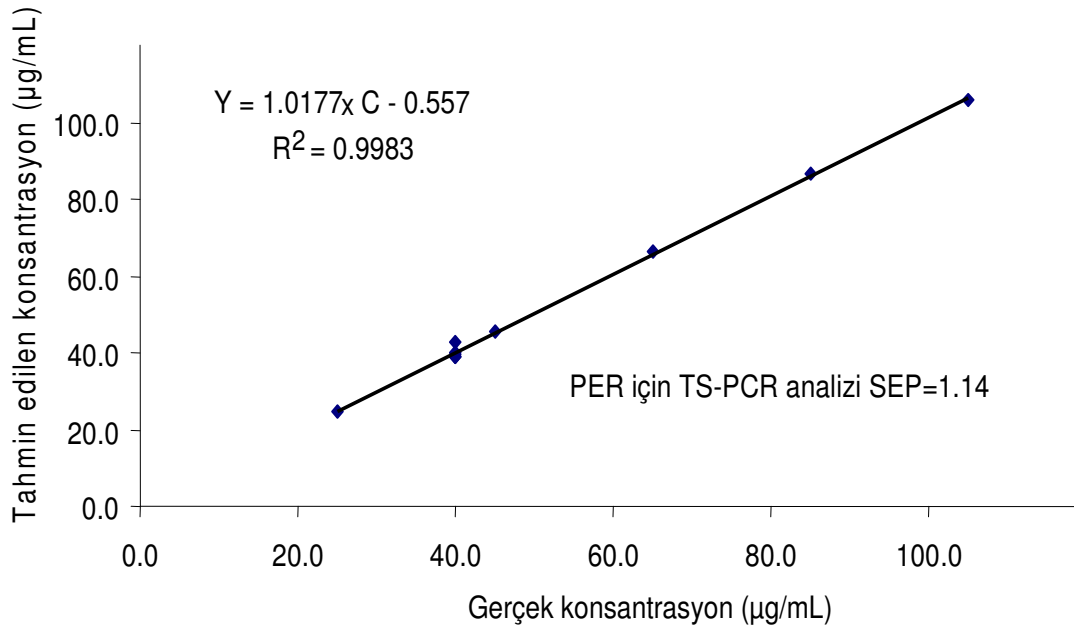
Şekil 3.13. PER için TS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C=Konsantrasyon), (R²=Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



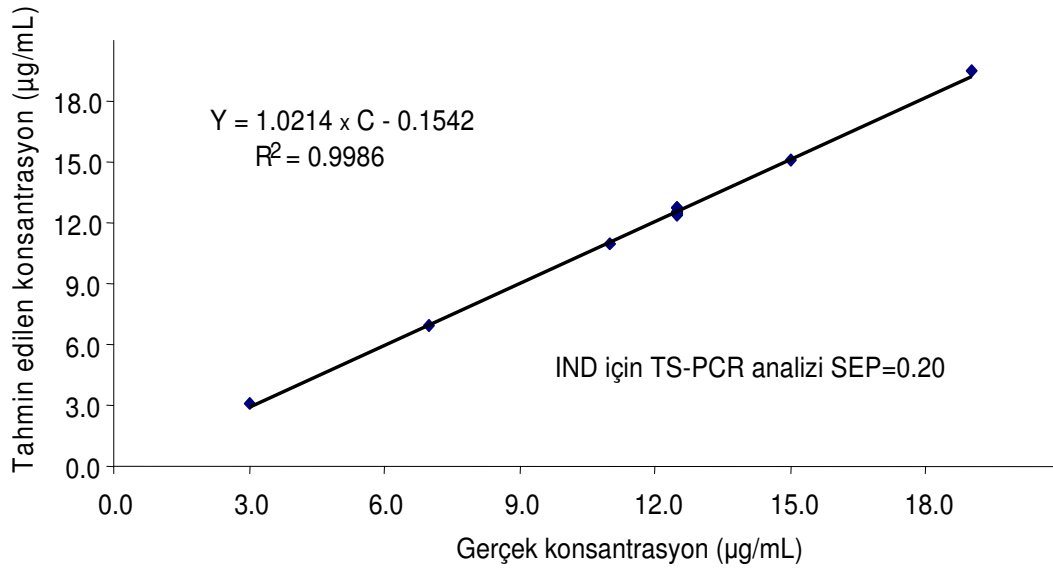
Şekil 3.14. IND için TS-PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R²=Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.3.1.4.2. TS-PCR Kalibrasyonu İçin Tayinin Standart Hatası

Analiz işleminde validasyon seti olarak hazırlanan perindopril ve indapamid içeren yapay karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden TS-PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), validasyon setinin gerçek konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların doğrusal regresyon analizi ile korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar ve SEP değerleri sırasıyla PER ve IND için şekil 3.15 ve şekil 3.16 da verildi.



Şekil 3.15. PER için TS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R²= Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



Şekil 3.16. IND için TS-PCR tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R^2 = Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.3.1.5. TS-PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada kemometrik TS-PCR yönteminin PER ve IND içeren ticari preparatlara uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu numune çözeltilerinin 200-350 nm dalga boyu bölgesinde spektrumları alındı ve 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbans değerlerine bölüm 2.2.1.3. de açıklanan PCR algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki PER ve IND hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.16. da sunuldu.

Çizelge 3.16. TS-PCR yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	4.09	1.31
2	4.08	1.31
3	4.02	1.28
4	4.08	1.30
5	4.11	1.26
6	3.98	1.28
7	4.26	1.32
8	4.29	1.28
9	4.16	1.27
10	4.08	1.30
$\bar{X}$	4.11	1.29
SS	0.10	0.02
BSS	2.35	1.51
SH	0.03	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.06 = (4.01- 4.21)$	$\bar{X} \pm 0.01= (1.27- 1.31)$

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma BSS=Bağıl Standart Sapma,

SH=Standart Hata, GA=Güven Aralığı

3.1.3.2. Türev Spektrumu-Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi

Kemometrik TS-PLS yöntemi, konsantrasyon seti ve ölçülen birinci türev absorbans değerlerinin matrisinin parçalanmasıyla elde edilen sayı matrislerinin kullanımına dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması bölüm 2.2.1.4. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.1.3.2.1. Türev Spektrumu-Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu (Derivative Spectra-Partial Least-Square Calibration)

Kemometrik TS-PLS kalibrasyonu, hazırlanan kalibrasyon setinin $\Delta\lambda=6$ nm aralıklarla ve skala faktörü=10 koşullarında 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda=0.1$ nm aralıklarla 451 noktada absorbans değerleri okundu (Şekil 3.4B). Bölüm 2.2.1.4.de açıklanan PLS algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri oluşturuldu. Konsantrasyon seti ve ölçülen absorbans değerlerinin 451x25 veriler matrisinin parçalanma işlemine tabi tutulmasından sonra, konsantrasyon ve absorbans hesaplanan sayı matrisleri arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı TS-PLS kalibrasyonu kuruldu. PER ve IND içeren numunelerin 215-260 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak TS-PLS kalibrasyonunda PER ve IND etken maddelerinin konsantrasyonları hesaplandı.

3.1.3.2.2. TS-PLS Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Kemometrik TS-PLS yönteminin validasyon işleminde 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözücü sistemi içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışımı içeren çözeltilerden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak yukarıdaki basamakta hesaplanan TS-PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. TS-PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.17 de gösterildi. Geri kazanım değerleri PER için % 102.5, IND için % 102.0

olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri PER için % 1.36 ve IND için 0.99 olarak bulundu.

Çizelge 3.17. TS-PLS yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	25.48	12.93	101.9	103.5
45.0	12.5	45.15	12.62	100.3	101.0
65.0	12.5	66.89	12.86	102.9	102.9
85.0	12.5	86.58	12.55	101.9	100.4
105.0	12.5	106.97	12.66	101.9	101.3
40.0	3.0	40.88	3.10	102.2	103.3
40.0	7.0	41.43	7.14	103.6	101.9
40.0	11.0	40.46	11.21	101.1	101.9
40.0	15.0	42.05	15.20	105.1	101.4
40.0	19.0	41.49	19.41	103.7	102.2
		$\bar{X}$		102.5	102.0
		SS		1.39	1.01
		BSS		1.36	0.99

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma

Çalışmada diğer bir validasyon işlemi olarak TS-PLS yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları yapıldı. Bu işlem için kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) her derişim için 6

farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.18 de sunulmaktadır.

Çizelge 3.18. TS-PLS yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	31.22	0.74	2.39	4.07	104.1	8.20	0.11	1.39	2.47	102.5
60	12	62.47	1.05	1.68	4.12	104.1	12.43	0.34	2.76	3.62	103.6
90	16	95.04	4.13	4.35	5.60	105.6	16.66	0.12	0.72	4.14	104.1
		$\bar{X}$ 104.6					$\bar{X}$ 103.4				
		SS 0.87					SS 0.85				
		BSS 0.83					BSS 0.82				
Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	31.07	0.40	1.30	3.55	103.6	8.20	0.26	3.14	2.54	102.5
60	12	62.57	0.00	0.00	4.28	104.3	12.52	0.11	0.88	4.31	104.3
90	16	93.13	1.14	1.23	3.48	103.5	16.14	0.24	1.48	0.90	100.9
		$\bar{X}$ 103.8					$\bar{X}$ 102.6				
		SS 0.44					SS 1.71				
		BSS 0.43					BSS 1.66				

BH= Bağıl hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

Önerilen TS-PLS kalibrasyon yöntemini ticari tablet preparatına uygulamadan önce, tablet yardımcı maddelerinin PER ve IND içeren farmasötik preparatların analizine etkisi olup olmadığı hesaplanan kalibrasyon için test edildi. Bunun için standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparattaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılmasıyla preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık

25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PER ve IND miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri kazanım ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Analiz işleminde TS-PLS yönteminin **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PER için % 101.3 ve % 1.83 ve IND için % 99.8 ve % 2.12 olarak bulundu. Sonuçlar Çizelge 3.19 da sunulmaktadır.

Çizelge 3.19. TS-PLS yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

		Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dır.									
İlave edilen		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
25	4	25.60	0.23	0.89	2.41	102.4	4.02	0.13	3.35	0.49	100.5
40	8	40.96	1.23	3.01	2.41	102.4	8.07	0.17	2.06	0.88	100.9
70	11	69.44	1.31	1.88	-0.80	99.2	11.13	0.07	0.67	1.18	101.2
		$\bar{X}$					$\bar{X}$				
		101.3					99.8				
		SS					SS				
		1.86					2.12				
		BSS					BSS				
		1.83					2.12				

BH= Bağıl hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

3.1.3.2.3. ANOVA Testi

Kemometrik TS-PLS yöntemiyle gün içi ve günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62

olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.02 ve p-değeri 1.00, IND için hesaplanan F-test değeri 0.09 ve p-değeri 0.99 olarak bulunmuştur. Sonuçlar çizelge 3.20 de sunulmuştur. Bu uygulanan ANOVA testinde % 95 güven aralığında F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri > p=0.05 olduğu için gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

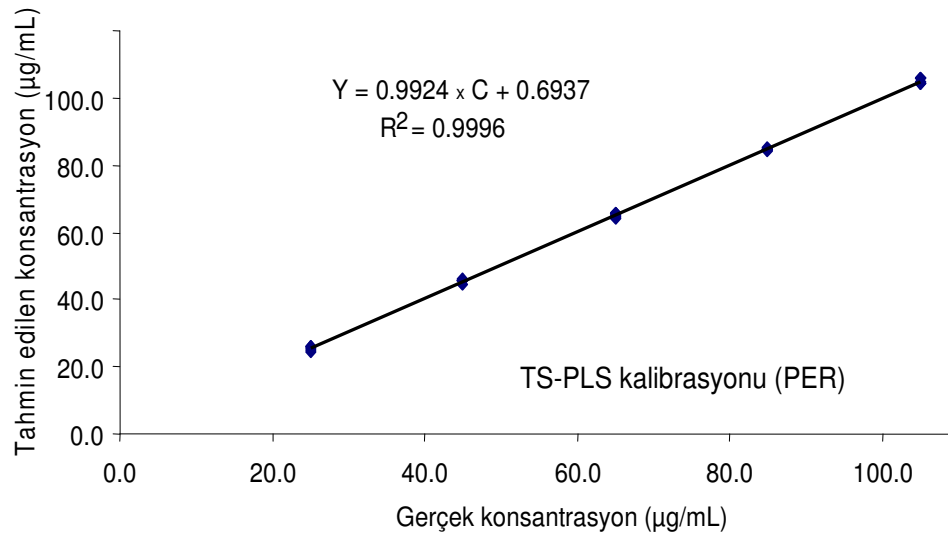
Çizelge 3.20. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	57.88	5	11.58	0.02	1.00	2.62
	Grup içi	17015.48	24	708.98			
	Toplam	17073.37	29				
IND	Gruplar arası	4.48	5	0.90	0.09	0.99	2.62
	Grup içi	246.22	24	10.26			
	Toplam	250.70	29				

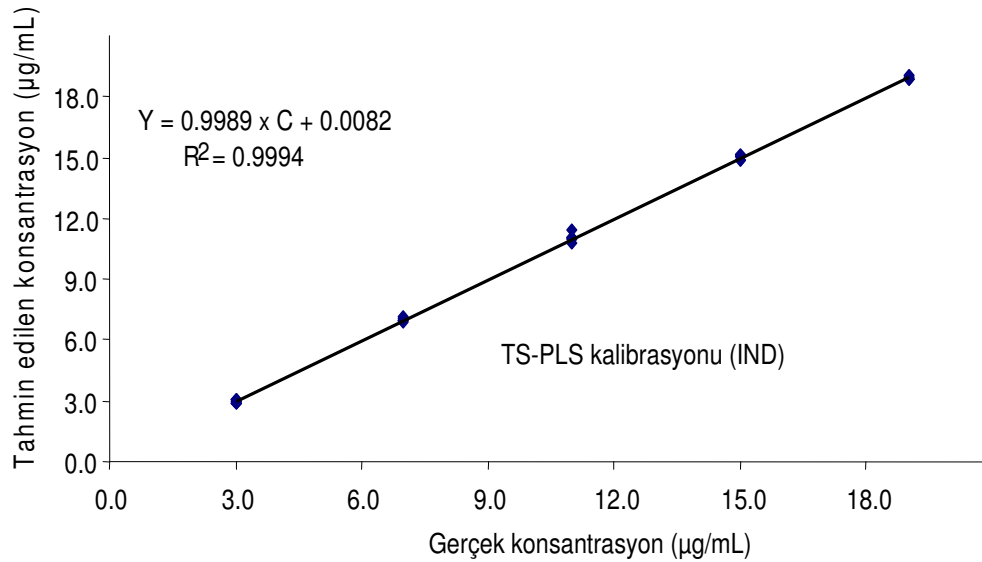
3.1.3.2.4. TS- PLS Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

3.1.3.2.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası

Yöntem geliştirme basamağında, karışımlardan PER ve IND etken maddelerin miktar tayininde TS-PLS kalibrasyonun hesaplanması için çapraz validasyon işleminde üç faktör kullanımında en yüksek geri kazanım sonuçları elde edebilmek için tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Sum of Squares→ PRESS) minimal değerler verdiği gözlemlendi. PER ve IND için kurulan üç faktörlü TS-PLS kalibrasyonunda PRESS değeri PER ve IND için sırasıyla 10.3572 ve 0.4682 olarak hesaplandı. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve PER ve IND için sırasıyla 0.6437 ve 0.1369 olarak bulundu. Gerçek ve tahmin edilen konsantrasyon için doğrusal regresyon analiz sonuçları PER için şekil 3.17. de ve IND için şekil 3.18. de sunulmaktadır.



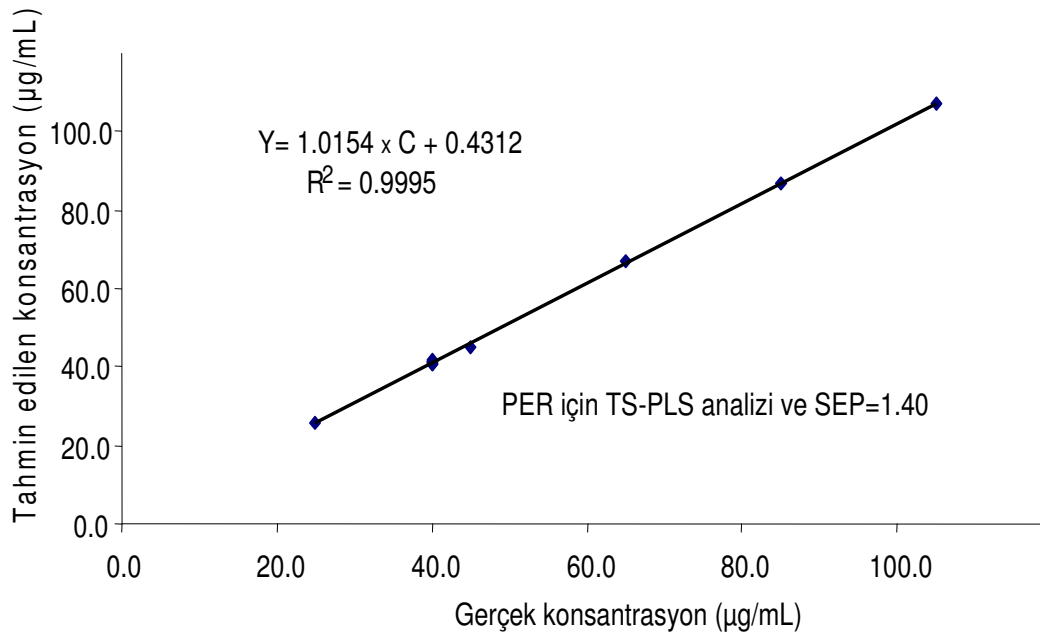
Şekil 3.17. PER için TS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların bağımsız regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R² = Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



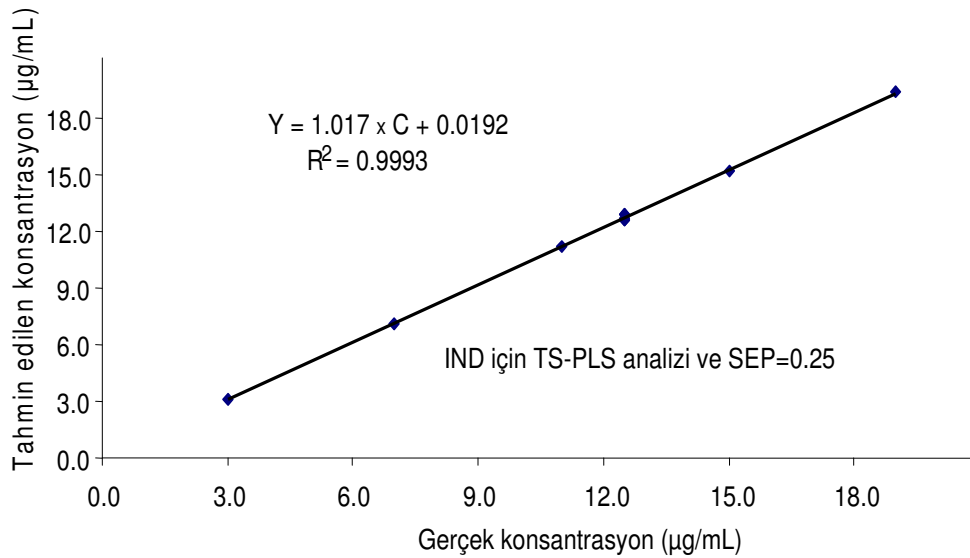
Şekil 3.18. IND için TS-PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R² = Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.3.2.4.2. Tayinin Standart Hatası

Analiz işleminde validasyon seti olarak hazırlanan perindopril ve indapamid içeren yapay karışımlarda, bu maddelerin konulan gerçek ve hesaplanan tahmin edilen verilerinden TS-PLS kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), validasyon setinin gerçek konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların doğrusal regresyon analizi ile korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar ve SEP değerleri sırasıyla PER ve IND için şekil 3.19 ve şekil 3.20 de verildi.



Şekil 3.19. PER için TS-PLS tayin basamağında gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R^2 = Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)



Şekil 3.20. IND için TS-PLS tayin basamağında güncel ve tahmin edilen konsantrasyonların doğrusal regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar (C= Konsantrasyon), (R^2 = Korelasyon tanımlayıcılık katsayısı)

3.1.3.2.5. TS-PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada kemometrik TS-PLS yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede, metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözücü sistemi içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 215-260 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbans değerleri bölüm 2.2.1.4 de açıklanan TS-PLS algoritmasıyla hesaplanan kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak tablet içeriğindeki PER ve IND hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet preparatına uygulandı. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.21 de sunuldu.

Çizelge 3.21. TS-PLS yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	3.90	1.25
2	3.93	1.26
3	4.12	1.29
4	4.07	1.30
5	4.05	1.27
6	4.08	1.26
7	4.05	1.28
8	4.02	1.30
9	3.99	1.30
10	4.07	1.28
$\bar{X}$	4.03	1.28
SS	0.07	0.02
BSS	1.74	1.32
SH	0.02	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.04 = (3.96- 4.10)$	$\bar{X} \pm 0.01 = (1.26-1.30)$

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma
SH=Standart Hata, GA=Güven Aralığı

3.2. Sinyal İşleme Yöntemleri

Farmasötik tablet formülasyonundaki PER ve IND'in hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın aynı anda kantitatif analizi için iki farklı sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) yöntemleri geliştirildi. Spektral analiz işleminde değişik dalgacık aileleri (wavelet families) test edildi ve en yüksek geri kazanım sonuçları sağlayan yöntemlerin, *Haar sürekli dalgacık dönüşüm* (HAAR-SDD) ve *Biortogonal1.5 sürekli dalgacık dönüşüm* (BIOR1.5-SDD) yöntemleri olduğu saptandı. Çalışmalarda analiz için bu HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD yöntemleri sinyal işleme yöntemi olarak kullanıldı.

3.2.1. Haar Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi

(Haar Continuous Wavelet Transform Method)

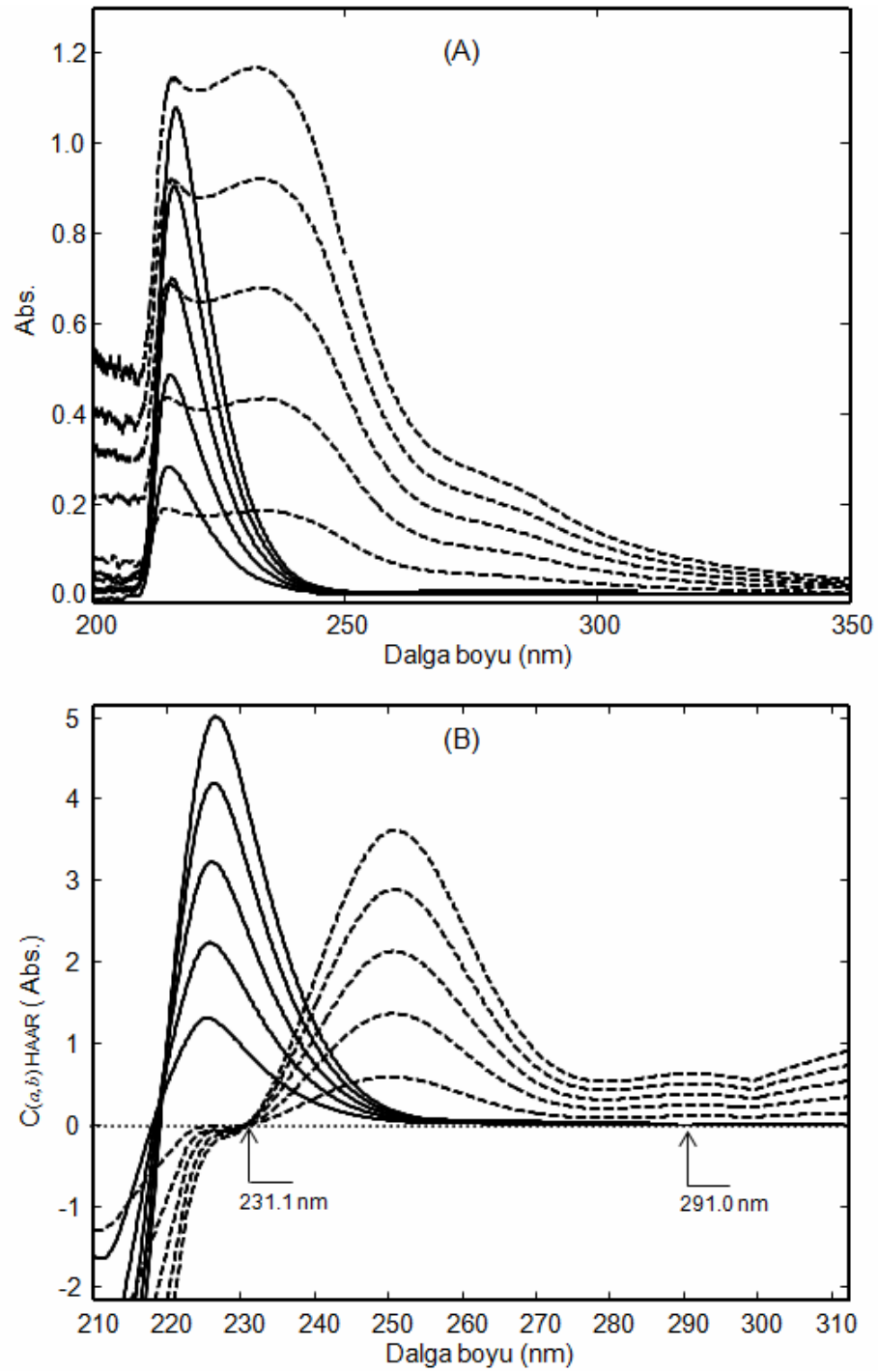
3.2.1.1. Standart Çözeltiler

- a) PER ve IND stok çözeltileri, metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) karışımından oluşan çözücü içerisinde 100 mL'lik hacimde 50 mg PER ve 25 mg IND bileşikler çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) PER için 25.0-105.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) IND için 3.0-19.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- d) Kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında PER ve IND bileşiklerini içeren yapay karışımları için 10 değişik konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon seti hazırlandı.

3.2.1.2. Doğrusal Regresyon Analizi

HAAR-SDD yöntemiyle PER ve IND bileşiklerini içeren karışımların analizinde uygulanmasında metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözücü sistemi kullanılarak PER için 25.0-105.0 µg/mL ve IND için 3.0-11.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Bu kalibrasyon çözeltilerinin 200-350 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve kodlanarak bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.21.A da bileşiklerin orjinal absorpsiyon spektrumları

sunulmaktadır. Bu spektrum alma işlemi PER ve IND bileşiklerini içeren bütün numunelere uygulandı.



Şekil 3.21. PER (—) (25.0-105.0 µg/mL) ve IND(- - -) (3.0-19.0 µg/mL)
A) Absorpsiyon Spektrumları ve B) HAAR-SDD Spektrumları
(Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h).

Sinyalleri işlemek için bileşiklerin ve numunelerin spektrumları herbir konsantrasyon değeri için bilgisayar hafızasında çağrılarak absorbans verilerinin vektörleri olarak *Microsoft Excel*'e transfer edildi ve 210.0-312.3 nm dalga boyu aralığında 1024 noktadan oluşan absorbans veriler dizisi seçildi ve dalgacık alanına taşındı.

Karışımındaki PER ve IND bileşiklerinin analizi için SDD aileleri arasında optimal sinyal işleme yöntemi olarak saptanan HAAR-SDD yöntemi 210.0-312.3 nm dalga boyu bölgesinde 2^{10} değerine karşılık gelen 1024 noktadaki kalibrasyon spektrumlarına uygulandı ve HAAR-SDD spektrumları, dalgacık dönüşüm katsayıları ($C_{a,b}$) dalga boyuna karşı grafiğe geçirilerek elde edildi (Şekil 3.21B).

HAAR-SDD yöntemiyle PER ve IND bileşiklerinin analizi için kalibrasyon grafikleri, kalibrasyon çözeltileri kullanılarak PER için 231.1 nm deki IND için 291 nm'deki HAAR-SDD genlikleri ölçülerek hesaplandı. Bu iki dalga boyundaki doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları, Çizelge 3.22.de görülmektedir.

Çizelge 3.22. HAAR-SDD yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon parametreleri	PER	IND
λ (nm)	231.1	291.0
m	3.78×10^{-2}	4.42×10^{-4}
n	-8.97×10^{-2}	3.28×10^{-2}
r	0.9998	0.9999
SH(m)	4.15×10^{-4}	2.78×10^{-4}
SH(n)	2.94×10^{-2}	3.44×10^{-3}
SH(r)	2.62×10^{-2}	3.52×10^{-3}
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	4.67	0.63
LOQ($\mu\text{g/mL}$)	15.57	2.10

m = Regresyon denkleminin eğimi,
n = Regresyon denkleminin kesim noktası,
r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı,
SH(m) = Eğimin standart hatası,
SE(n) = kesim noktasının standart hatası,
SH(r) = Korelasyon katsayısının standart hatası,
LOD = Yakalama sınırı,
LOQ = Tayin sınırı

Çizelge 3.22 deki lineer regresyon analizine göre hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak numunelerin içindeki PER ve IND miktarları hesaplandı.

3.2.1.3. HAAR-SDD Yönteminin Validasyonu

Çalışmada HAAR-SDD yöntemini validasyonu için metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak hesaplanan HAAR-SDD yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi. HAAR-SDD yönteminin

validasyon seti olarak hazırlanan yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.23 de sunulmaktadır. Geri kazanım değerleri, PER için % 101.0, IND için % 101.4 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri, PER için % 1.87 ve IND için 0.89 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.23. HAAR-SDD yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	25.60	12.62	102.4	101.0
45.0	12.5	45.16	12.77	100.3	102.2
65.0	12.5	65.38	12.88	100.6	103.1
85.0	12.5	84.5	12.67	99.4	101.4
105.0	12.5	103.3	12.63	98.4	101.0
40.0	3.0	41.00	3.06	102.5	102.1
40.0	7.0	41.37	7.00	103.4	100.0
40.0	11.0	41.56	11.06	103.9	100.5
40.0	15.0	40.09	15.14	100.2	101.0
40.0	19.0	39.69	19.32	99.2	101.7
		$\bar{X}$		101.0	101.4
		SS		1.89	0.9
		BSS		1.87	0.89

$\bar{X}$ =Ortalama, SS = Standart Sapma, BSS = Bağlı Standart Sapma

Ayrıca, HAAR-SDD yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları, kalibrasyon konsantrasyon aralığı içinde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için (8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) her derişim için 6 farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.24 de verilmektedir.

Çizelge 3.24. HAAR-SDD yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

		Gün içi (n=6)									
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.03	0.86	2.88	0.11	100.1	8.26	0.11	0.1	3.28	103.3
60	12	60.68	1.01	1.66	1.14	101.1	12.45	0.07	0.06	3.73	103.7
90	16	91.2	1.58	1.73	1.33	101.3	16.29	0.17	0.17	1.8	101.8
		$\bar{X}$ 100.9					$\bar{X}$ 102.9				
		SS 0.66					SS 1.01				
		BSS 0.65					BSS 0.98				
Günler arası (n=6)											
Konulan		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.36	0.86	2.88	1.20	101.2	8.28	0.11	0.1	3.50	103.5
60	12	61.16	1.01	1.66	0.26	101.9	12.49	0.07	0.06	4.08	104.0
90	16	92.04	1.58	1.73	2.27	102.3	16.53	0.17	0.17	3.31	103.3
		$\bar{X}$ 101.8					$\bar{X}$ 103.6				
		SS 0.54					SS 0.39				
		BSS 0.53					BSS 0.38				

BH= Bağlı hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = Bağlı Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

Analiz işleminde HAAR-SDD yöntemini gerçek ticari farmasötik preparatların analizine uygulamadan önce, PER ve IND içeren farmasötik preparattaki tablet yardımcı maddelerin analizi üzerine bir etkisi olup olmadığı yöntem için test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen

içeriğin 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmelerin yapılamıyla preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PER ve IND miktarları düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri kazanım ve diğer hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. HAAR-SDD yönteminin uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri, PER için % 101.7 ve % 0.65 ve IND için % 102.9 ve % 0.98 olarak bulundu.

Çizelge 3.25. HAAR-SDD yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dır.											
İlave edilen (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
25	4	24.86	2.02	8.13	-0.56	99.44	4.00	0.10	2.45	0.08	100.1
40	8	40.51	2.07	5.10	1.27	101.3	8.13	0.04	0.50	1.65	101.7
70	11	71.95	1.59	2.21	2.78	102.8	11.45	0.03	0.27	4.07	104.1
		$\bar{X}$ 101.7					$\bar{X}$ 102.9				
		SS 0.95					SS 1.01				
		BSS 0.65					BSS 0.98				

BH= Bağıl hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

3.2.1.4. HAAR-SDD Yöntemi için ANOVA Testi

HAAR-SDD sinyal işleme yönteminin doğruluk ve kesinliğinin validasyon işlemi için üç farklı konsantarsyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi

uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.01 ve p-değeri 0.99, IND için hesaplanan F-test değeri 0.04 ve p-değeri 0.99 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri > $p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı yapılan test sonuçlarından gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.26 da sunulmuştur.

Çizelge 3.26. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	30.82	5	6.16	0.01	0.99	2.62
	Grup içi	15702.62	24	654.28			
	Toplam	15733.44	29				
IND	Gruplar arası	1.82	5	0.36	0.04	0.99	2.62
	Grup içi	237.32	24	9.89			
	Toplam	239.14	29				

3.2.1.5. HAAR-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Çalışmada HAAR-SDD yönteminin ticari preparata uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL’lik balonjojede metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözücü sistemi içerisinde çözüldü. Balon joje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi=0,45\ \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 200-350 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda=0.1\ \text{nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlarından 210-312.3 nm dalga boyu aralığındaki absorpsiyon vektörlerin HAAR transformasyonundan sonra PER için 291.0 nm’de ölçülen SDD genlikleri, PER ve IND kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki PER ve IND hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet preparatına uygulandı. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.27 de sunuldu.

Çizelge 3.27. HAAR-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	3.84	1.30
2	4.05	1.26
3	3.98	1.23
4	3.91	1.21
5	3.97	1.21
6	3.97	1.25
7	4.11	1.26
8	4.06	1.23
9	4.10	1.21
10	4.09	1.21
$\bar{X}$	4.01	1.24
SS	0.09	0.03
BSS	2.21	2.44
SH	0.03	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.05 = (3.92- 4.10)$	$\bar{X} \pm 0.02 = (1.21-1.27)$

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma

SH=Standart Hata, GA=Güven Aralığı

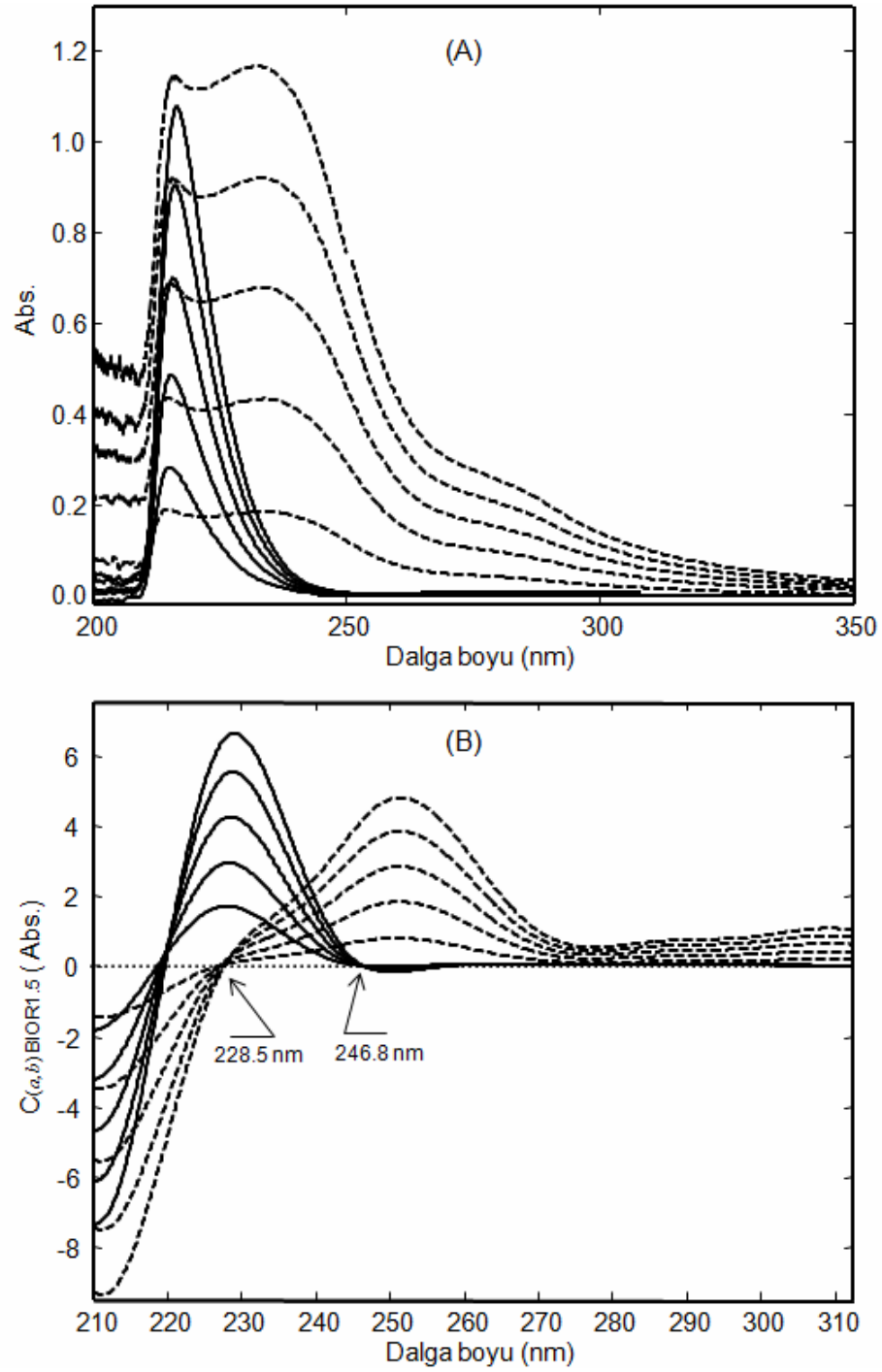
3.2.2. Biortogonal Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi (Biortogonal Continuous Wavelet Transform Method)

3.2.2.1. Standart Çözeltilerde

- a) PER ve IND stok çözeltileri, metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) karışımından oluşan çözücü içerisinde 100 mL'lik hacimde 50 mg PER ve 25 mg IND bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) PER için 25.0-105.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) IND için 3.0-19.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- d) Kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında PER ve IND bileşiklerini içeren 10 değişik konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon seti hazırlandı.

3.2.2.2. Doğrusal Regresyon Analizi

PER-IND karışımının kantitatif analizi için Biortogonal1.5 sürekli dalgacık dönüşümü (BIOR1.5-SDD) yönteminin kullanımında metanol ve 0.1 M NaOH (50:50:, h/h) çözücü sistemi kullanılarak PER için 25.0-105.0 µg/mL ve IND için 3.0-11.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak 200-350 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve kodlanarak bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.22.A da bileşiklerin orjinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Bu spektrum alma işlemi PER ve IND bileşiklerini içeren diğer bütün numunelere uygulandı.



Şekil 3.22. PER (—) (25.0-105.0 µg/mL) ve IND(- - -) (3.0-19.0 µg/mL) bileşiklerinin; A) Absorbans Spektrumları ve B) BIOR1.5-SDD Spektrumları (Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h)).

Sinyalleri işlemek için bileşiklerin ve numunelerin spektrumları, herbir konsantrasyon değeri için bilgisayar hafızasından çağrılarak absorbans verilerinin vektörleri olarak *Microsoft Excel*'e transfer edildi ve 210.0-312.3 nm dalga boyu aralığında 1024 noktadan oluşan absorbans veriler dizisi seçildi ve dalgacık alanına taşındı.

Karışımındaki PER ve IND bileşiklerinin analizi için SDD aileleri arasında optimal sinyal işleme yöntemi olarak saptanan BIOR1.5-SDD sinyal işleme yöntemi 210.0-312.3 nm dalga boyu bölgesinde 2^{10} değerine karşılık gelen 1024 noktada kalibrasyon spektrumlarına uygulandı. BIOR1.5-SDD spektrumları, dalgacık dönüşüm katsayılarının ($C_{a,b}$) dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edildi (Şekil 3.22.B).

BIOR1.5-SDD yöntemiyle PER ve IND bileşiklerinin analizi için lineer regresyon denklemleri, kalibrasyon çözeltileri kullanılarak PER için 228.5 nm deki IND için 246.8 nm'deki BIOR1.5-SDD genlikleri ölçülerek hesaplandı. Bu iki dalga boyundaki lineer regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları Çizelge 3.28. de görülmektedir.

Çizelge 3.28. BIOR1.5-SDD yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon parametreleri	PER	IND
λ (nm)	228.5	246.8
m	6.11×10^{-2}	2.21×10^{-1}
n	1.95×10^{-1}	5.52×10^{-2}
r	0.9997	0.9999
SH(m)	8.07×10^{-4}	2.02×10^{-3}
SH(n)	5.72×10^{-2}	2.49×10^{-2}
SH(r)	5.10×10^{-2}	2.55×10^{-2}
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	5.6126	0.6773
LOQ($\mu\text{g/mL}$)	18.7086	2.7576

m = Regresyon denkleminin eğimi,
n = Regresyon denkleminin kesim noktası,
r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı,
SH(m) = Eğimin standart hatası,
SE(n) = kesim noktasının standart hatası,
SH(r) = Korelasyon katsayısının standart hatası,
LOD = Yakalama sınırı,
LOQ = Tayin sınırı

Çizelge 3.28. deki doğrusal regresyon analizine göre hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak numunelerin içindeki PER ve IND miktarları hesaplandı.

3.2.2.3. BIOR1.5-SDD Yönteminin Validasyonu

Çalışmalarımızda BIOR1.5-SDD yönteminin validasyon işlemi için metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan BIOR1.5-SDD sinyal işleme yöntemiyle elde edilen sonuçların kesinlik ve doğruluğu test edildi. BIOR1.5-SDD yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde

edilen sonuçlar Çizelge 3.29 da gösterildi. Geri kazanım değerleri, PER için % 99.7, IND için % 98.7 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri, PER için % 2.86 ve IND için 1.27 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.29. BIOR1.5-SDD yönteminin PER-IND yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	25.23	12.56	100.9	100.5
45.0	12.5	44.58	12.31	99.1	98.5
65.0	12.5	63.76	12.52	98.1	100.1
85.0	12.5	82.85	12.27	97.5	98.1
105.0	12.5	101.91	12.40	97.1	99.2
40.0	3.0	41.04	2.91	102.6	97.0
40.0	7.0	41.84	6.76	104.6	96.6
40.0	11.0	41.20	10.84	103.0	98.6
40.0	15.0	38.54	14.81	96.4	98.8
40.0	19.0	39.29	18.95	98.2	99.7
		$\bar{X}$		99.7	98.7
		SS		2.85	1.26
		BSS		2.86	1.27

$\bar{X}$ =Ortalama, SS = Standart Sapma, BSS = Bağlı Standart Sapma

Diğer bir validasyon işlemi olarak BIOR1.5-SDD yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için (8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) her derişim için 6 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.30 da gösterilmiştir.

Çizelge 3.30. BIOR1.5-SDD yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

		Gün içi (n=6)									
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	29.33	0.18	0.61	-2.24	97.8	8.01	0.10	0.10	0.11	100.1
60	12	60.30	0.54	0.89	0.50	100.5	12.31	0.28	0.27	2.56	102.6
90	16	92.82	1.15	1.24	3.13	103.1	15.96	0.13	0.13	-0.26	99.7
		$\bar{X}$ 99.8					$\bar{X}$ 100.8				
		SS 2.20					SS 1.53				
		BSS 2.20					BSS 1.52				
Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	29.86	0.66	2.21	-0.43	99.5	8.23	0.25	0.24	2.87	102.9
60	12	61.95	0.61	0.98	3.25	103.2	12.22	0.22	0.21	1.84	101.8
90	16	91.11	1.33	1.46	1.23	101.2	16.26	0.50	0.49	1.63	102.6
		$\bar{X}$ 101.3					$\bar{X}$ 102.8				
		SS 1.86					SS 0.58				
		BSS 1.84					BSS 0.56				

BH= Bağlı hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{İlave edilen miktar}} \times 100$

GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = Bağlı Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

Tez kapsamında önerilen BIOR1.5-SDD sinyal işleme yöntemi gerçek ticari farmasötik preparata uygulamadan önce, PER ve IND bileşiklerinin BIOR1.5-SDD yöntemiyle tablet yardımcı maddelerinin etkisi girişim etkilerinin olup olmadığı test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PER ve IND miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. BIOR1.5-SDD yönteminin tablete uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PER için % 97.8 ve % 0.65 ve IND için % 99.3 ve % 0.65 olarak bulundu. Sonuçlar Çizelge 3.31 de sunulmuştur.

Çizelge 3.31. BIOR1.5-SDD yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

		Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dır.								
İlave edilen		PER					IND			
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	GK (%)
25	4	24.41	0.50	2.04	-2.36	97.64	4.01	0.10	2.40	100.13
40	8	38.70	1.26	3.26	-3.25	96.75	7.85	0.15	1.91	98.16
70	11	68.18	0.07	0.11	-2.60	97.40	10.95	0.13	1.16	99.54
		$\bar{X}$					$\bar{X}$			
		97.8					99.3			
		SS					SS			
		1.30					1.01			
		BSS					BSS			
		0.65					0.65			

$$BH = \text{Bağıl hata} = \frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$$

GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

3.2.2.4. BIOR1.5-SDD Yöntemi için ANOVA Testi

Sonuçları karşılaştırmak amacıyla, BIOR1.5-SDD sinyal işleme yöntemiyle gün içi ve günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 $\mu\text{g/mL}$) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.01 ve p-değeri 1.00, IND için hesaplanan F-test değeri 0.06 ve p-değeri 0.99 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p > 0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Test sonuçları Çizelge 3.32 de sunulmuştur.

Çizelge 3.32. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	44.44	5	8.89	0.01	1.00	2.62
	Grup içi	16387.41	24	682.80			
	Toplam	16431.86	29				
IND	Gruplar arası	3.06	5	0.61	0.06	0.99	2.62
	Grup içi	247.80	24	10.32			
	Toplam	250.86	29				

3.2.2.5. BIOR1.5-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada BIOR1.5-SDD sinyal işleme yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL’lik balon jodede metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözücü sistemi içerisinde çözüldü. Balon jodedeki çözelti mekanik bir karıştırıcı ile yaklaşık 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi=0,45\ \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 200-350 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda=0.1\ \text{nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlardan 210.0-312.3 nm dalga boyu aralığında ölçülen absorbans değerlerine BIOR1.5-SDD yöntemi uygulandı. BIOR1.5-SDD spektrumlarından PER için 228.5 nm deki ve IND için 246.8 nm’deki SDD genlikleri ölçülerek kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki PER ve IND miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet preparatına uygulandı. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları çizelge 3.33 de sunuldu.

Çizelge 3.33. BIOR1.5-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	4.13	1.24
2	4.08	1.21
3	4.06	1.23
4	4.06	1.22
5	4.28	1.27
6	4.13	1.24
7	4.06	1.20
8	4.08	1.20
9	4.11	1.19
10	4.01	1.20
$\bar{X}$	4.10	1.22
SS	0.07	0.03
BSS	1.78	2.08
SH	0.02	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.05 = (4.03- 4.17)$	$\bar{X} \pm 0.02 = (1.19- 1.25)$

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma
SH=Standart Hata, GA=Güven Aralığı

3.3. Karşılaştırma Yöntemleri

3.3.1. Türev Spektrofotometrisi (Karşılaştırma Yöntemi)

Türev spektrofotometrisi, karışım analizinde orijinal absorpsiyon eğrilerinin türevlerinin alınması ve bileşiklerden birisinin sıfır kesim noktasına karşılık diğer bileşiğin türev absorbans değerinin ölçümüyle hesaplanan kalibrasyon denklemlerinin elde edilmesiyle karışımların analizine dayanır. Spektrofotometrik çalışmalarda birden dörde kadar türev eğrileri kantitatif çalışmalarda kullanılmaktadır.

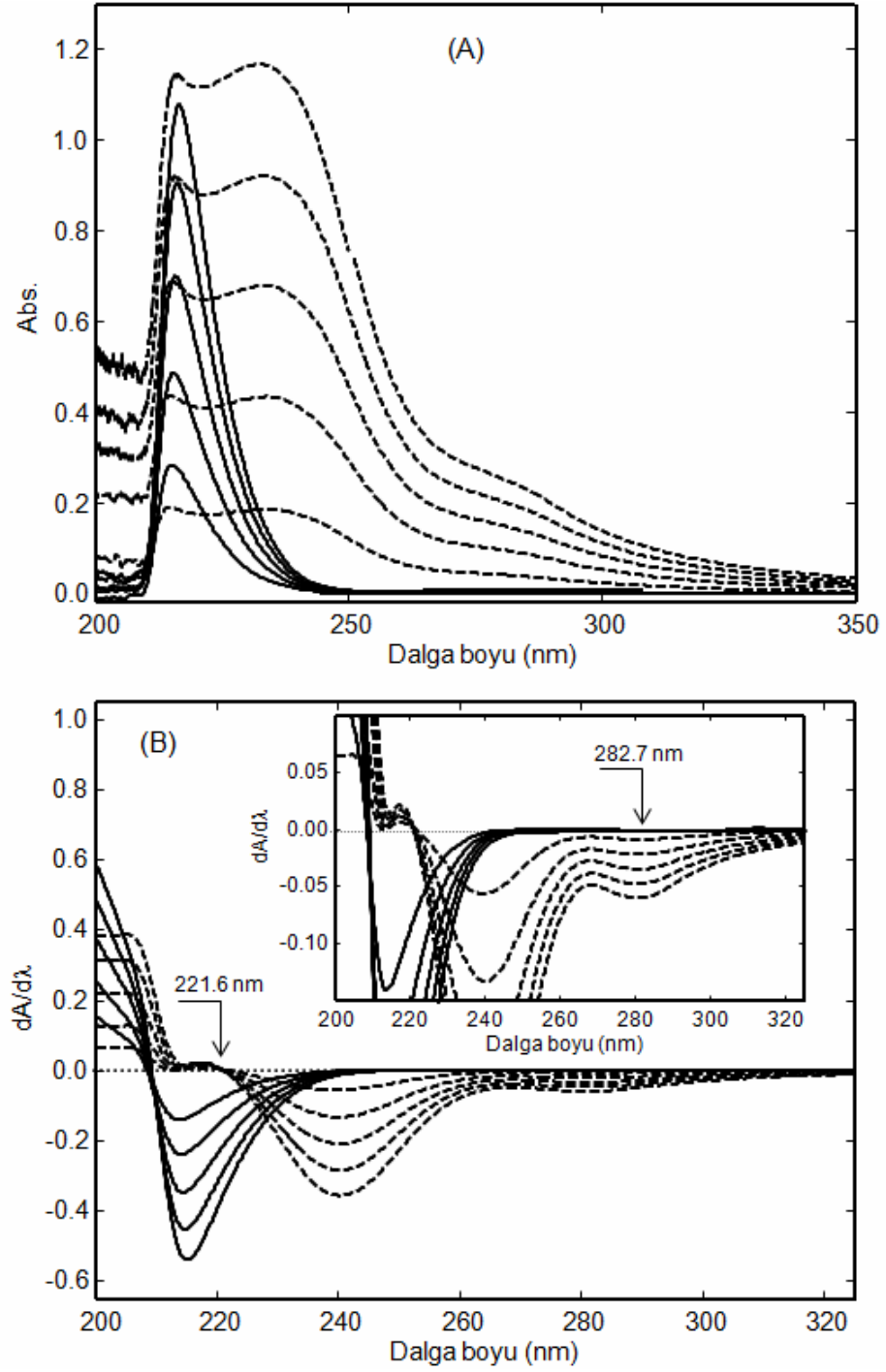
3.3.1.1. Standart Çözeltiler

- Metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içinde PER ve IND'in sırasıyla 50 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonlu stok çözeltileri hazırlandı.
- PER için 25.0-105.0 µg/mL ve IND için 3.0-19.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- PER için 25.0-105.0 µg/mL ve IND için 3.0-19.0 µg/mL çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 10 değişik konsantrasyonlarda yapay karışımlardan oluşan validasyon seti hazırlandı.

3.3.1.2. Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması

Türev yönteminin uygulamasında, PER için 25.0-105.0 µg/mL ve IND için 3.0-19.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin 200-320 nm dalga boyu aralığında spektrumları alındı ve bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.23.A da orijinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Analiz edilen PER ve IND bileşiklerinin absorpsiyon spektrumlarının birden dörde kadar değişik $\Delta\lambda$ aralıkları, değişik skala faktörleri ve değişik $\Delta\lambda$ aralıklarla düzeltme fonksiyonları kullanımıyla türev spektrumları hesaplandı. Aynı spektral işlemler yapay ve farmasötik preparatlar için de gerçekleştirildi.

Bu denemelerden sonra, her iki bileşiğin absorpsiyon spektrumlarının $\Delta\lambda=16$ nm aralıklarla ve skala faktörü=10 koşullarındaki birinci dereceden türevlerinin analiz için uygun olduğu elde edilen geri kazanım değerlerinin yüksekliğine bakılarak karar verildi. Bu birinci türev spektrumları, $\Delta\lambda=5$ nm aralıklarla 24 noktada düzleştirildi. Şekil.3.23.B, PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ doğrusal çalışma aralığında her iki bileşiğin birinci dereceden türev spektrumlarını göstermektedir. Kalibrasyon grafikleri, PER için 221.6 nm’de ve IND için 282.7 nm’de $dA/d\lambda$ değerlerinin ölçümüyle elde edildi. Doğrusal regresyon analizi için istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.34. de gösterilmiştir.



Şekil 3.23. PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ (—) ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ (- - -) konsantrasyon aralığında;
 A) absorpsiyon spektrumları,
 B) Birinci türev spektrumları ($\Delta\lambda=16$ nm aralıklarla ve skala faktörü = 10)

Çizelge 3.34. Türev yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon parametreleri	PER	IND
λ (nm)	221.6	282.7
m	-3.31×10^{-3}	-3.19×10^{-3}
n	9.27×10^{-3}	-7.75×10^{-5}
r	0.9998	0.9999
SH(m)	3.39×10^{-5}	2.70×10^{-5}
SH(n)	3.27×10^{-3}	3.74×10^{-4}
SH(r)	2.14×10^{-3}	3.42×10^{-4}
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	5.94	0.83
LOQ($\mu\text{g/mL}$)	19.80	2.76

m = Regresyon denkleminin eğimi,
n = Regresyon denkleminin kesim noktası,
r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı,
SH(m) = Eğimin standart hatası,
SE(n) = kesim noktasının standart hatası,
SH(r) = Korelasyon katsayısının standart hatası,
LOD = Yakalama sınırı,
LOQ = Tayin sınırı

3.3.1.3. Türev Yönteminin Validasyonu

Türev yönteminin validasyon işlemi için metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak kurulan türev yöntemi kalibrasyonunun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Türev yöntemi kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.35. de gösterildi. Geri kazanım değerleri PER

için % 103.9, IND için % 101.3 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri PER için % 2.15 ve IND için % 0.82 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.35. Türev yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	26.75	12.61	107.0	100.9
45.0	12.5	46.13	12.72	102.5	101.8
65.0	12.5	66.99	12.85	103.1	102.8
85.0	12.5	85.98	12.67	101.2	101.3
105.0	12.5	105.73	12.62	100.7	100.9
40.0	3.0	41.58	3.06	103.9	102.0
40.0	7.0	42.27	6.99	105.7	99.9
40.0	11.0	42.92	11.05	107.3	100.4
40.0	15.0	41.53	15.14	103.8	100.9
40.0	19.0	41.52	19.30	103.8	101.6
		$\bar{X}$		103.9	101.3
		SS		2.23	0.83
		BSS		2.15	0.82

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma

Diğer bir validasyon işlemi olarak türev yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 µg/mL ve IND için (8.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL) her derişim için 6 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.36 da gösterilmiştir.

Çizelge 3.36. Türev yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

		Gün iç (n=6)									
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.71	0.94	3.06	2.37	102.4	8.17	0.09	0.08	2.13	102.1
60	12	61.67	1.13	1.84	2.78	102.8	12.19	0.17	0.17	1.56	101.6
90	16	93.50	1.71	1.83	3.50	103.5	16.63	0.12	0.11	3.93	103.9
		$\bar{X}$ 102.9					$\bar{X}$ 102.5				
		SS 0.57					SS 1.24				
		BSS 0.56					BSS 1.21				
Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.71	0.65	2.14	2.37	102.4	8.14	0.15	0.14	1.71	101.7
60	12	61.67	0.45	0.73	2.78	102.8	12.38	0.08	0.08	3.13	103.1
90	16	93.50	0.79	0.87	3.89	103.9	16.38	0.32	0.31	2.38	102.4
		$\bar{X}$ 101.7					$\bar{X}$ 102.4				
		SS 0.61					SS 0.71				
		BSS 0.60					BSS 0.69				

BH= Bağlı hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = Bağlı Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

Karşılaştırma yöntemi olarak geliştirilen türev yöntemini ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce PER ve IND içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerinde bir etkisinin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PER ve IND miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri

kazanım ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Türev yönteminin uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri türev kalibrasyon yöntemi kullanıldığında PER için % 103.5 ve % 0.65 ve IND için % 100,4 ve % 0,65 olarak hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.37 de sunulmuştur.

Çizelge 3.37. Türev yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

		Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dır.									
İlave edilen ($\mu\text{g/mL}$)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
25	4	25.33	0.82	3.23	1.31	101.3	3.99	0.08	1.89	-0.25	99.75
40	8	41.84	0.19	0.46	4.60	104.6	8.12	0.02	0.30	1.46	101.5
70	11	73.17	2.59	3.53	4.53	104.5	10.95	0.22	2.05	-0.46	99.50
		$\bar{X}$ 103.5					$\bar{X}$ 100.4				
		SS 1.88					SS 0.99				
		BSS 0.65					BSS 0.65				

SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma, BH=Bağıl Hata, GK=Geri Kazanım, $\bar{X}$ =Ortalama

3.3.1.4. Türev Yöntemi için ANOVA Testi

Türev yönteminin doğruluk ve kesinliğinin validasyon işleminde üç farklı konsantrasyon seviyesinde (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 $\mu\text{g/mL}$), her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.13 ve p-değeri 0.98, IND için hesaplanan F-test değeri 0.06 ve p-değeri 1.00 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.38. de sunulmuştur.

Çizelge 3.38. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	433.13	5	86.63	0.13	0.98	2.62
	Grup içi	16174.57	24	673.94			
	Toplam	16607.69	29				
IND	Gruplar arası	3.94	5	0.79	0.06	1.00	2.62
	Grup içi	329.28	24	13.72			
	Toplam	333.22	29				

3.3.1.5. Türev Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Karşılaştırma türev yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen tablet miktarı 100 mL’lik balonjojede metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, h/h) çözeltisi içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 200-320 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları çizdirildi. Absorpsiyon spektrumlarının birinci türev spektrumunda 221.6 nm de PER ve 282.7 nm de IND bölüm 3.3.1.2 de hesaplanan kalibrasyon fonksiyonları kullanılarak PER ve IND miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet preparatına uygulanmıştır. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.39 da sunuldu.

Çizelge 3.39. Türev yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	4.05	1.24
2	4.21	1.22
3	3.99	1.20
4	4.19	1.20
5	4.01	1.25
6	4.15	1.24
7	4.14	1.22
8	4.01	1.30
9	4.08	1.20
10	3.96	1.25
$\bar{X}$	4.08	1.23
SS	0.09	0.03
BSS	2.13	2.59
SH	0.03	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.05 = (3.99- 4.17)$	$\bar{X} \pm 0.02 = (1.20- 1.26)$

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma
SH = Standart Hata, GA = Güven Aralığı

3.3.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatoğrafisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatoğrafisi, bir karışım içerisindeki bileşenlerin biri sabit (stasyoner) ve diğeri hareketli (mobil) olan iki faz arasındaki dağılım dengelerinin farklılığı esasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Yüksek basınçlı sıvı kromatoğrafisinde iç çeperi sabit fazı dolgu materyali bulunan kolon sisteminden değişik çözücü sistemleri, pompa yardımıyla yüksek bir basınçla kolon sisteminden geçirilir. Enjeksiyon sistemiyle hareketli faz içine enjekte edilen numunede bulunan maddeler kolon sisteminde sabit ve hareketli fazlarla etkileşimleri farklı olduğundan kolon içinde farklı hızlarda hareket ederler ve analiz edilen maddelerin tutulma zamanları farklı olduğu için kolonu terk etme sıralarına göre dedektör sisteminde yakalanarak kromatoğram olarak kaydedilir. Bu YBSK yöntemi yukarıda verilen esasa göre maddelerin ayırımına dayanan bir yöntemdir.

3.3.2.1. Standart Çözeltiler

- a) Acetonitril, 0.1 M H_3PO_4 - NaH_2PO_4 tampon sistemi ve saf suyun (45:45:10, h/h/h) 100 mL'lik çözeltisi içinde PER'in 50 $\mu g/mL$, IND'in 25 $\mu g/mL$ ve bu deneyde internal standart (IS) olarak kullandığımız Spironalakton'un ise 25 $\mu g/mL$ konsantrasyonlu stok çözeltileri hazırlandı.
- b) PER için 25.0-105.0 $\mu g/mL$ konsantrasyon aralığındaki 5 adet çözeltisinin her birine 25.0 $\mu g/mL$ IS eklenerek kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. IND için 3.0-19.0 $\mu g/mL$ konsantrasyon aralığındaki 5 adet çözeltisinin her biri üzerine aynı şekilde 25.0 $\mu g/mL$ IS eklenerek kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) PER için 25.0-105.0 $\mu g/mL$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu g/mL$ (yine her bir çözelti üzerine 25 $\mu g/mL$ IS eklenerek) çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 10 değişik konsantrasyonlarda validasyon seti hazırlandı.

3.3.2.2. YBSK Yönteminde Kromatografik Şartlar

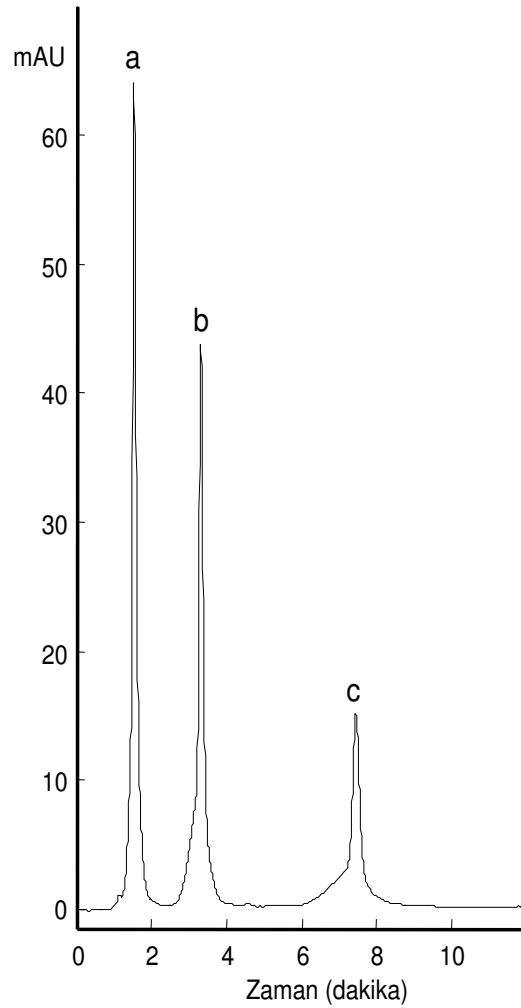
- a) **Hareketli Faz** : Analiz işleminde, PER, IND ve IS'ın kromatografik ayırımı için acetonitril, 0.1 M H_3PO_4 - NaH_2PO_4 tampon sistemi (pH=2.12) ve saf sudan (45:45:10, h/h/h) oluşan bir çözelti kullanıldı.
- b) **Kolon Cinsi** : Waters Symmetry® C-18 kolonu kullanıldı.
- c) **Kolon Sıcaklığı** : Kolon sisteminde maddelerin ayırımı oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirildi.
- d) **Basınç** : Kolondan çözelti akışı sırasında kolon basıncı ortalama 170 atm civarındadır.
- e) **Akış Hızı** : Deneyde akış hızı 2.0 mL/dak. olacak şekilde ayarlandı.
- f) **Enjeksiyon Hacmi** : Analiz süresinde her bir vial'den 25 µL alınacak şekilde enjeksiyon hacmi ayarlandı.
- g) **Dedeksiyon Dalga Boyu** : PER ve IND analizi için dalga boyu 220 nm olarak seçildi.

3.3.2.3. Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması

Karşılaştırma yöntemi olarak YBSK yönteminin uygulamasında, PER için 25.0-105.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan 5 adet kalibrasyon çözeltisinin her biri üzerine 25.0 µg/mL sabit konsantrasyonda IS (Spiroanalakton) eklenerek ve IND için 3.0-19.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin üzerine aynı şekilde 25.0 µg/mL sabit konsantrasyonda IS eklenerek 220 nm'de DAD dedektörü kullanılarak kromatogramlar elde edildi. Elde edilen bu kromatogramlarda PER, IND ve IS için kolonda tutulma süreleri sırasıyla ortalama 1.55, 3.39 ve 7.50 sn olarak gözlemlendi.(Şekil 3.24). Kromatografik analizde PER ve IND bileşiklerinin kromatogramlarından integrasyonla bulunan alanlar IS'ın kromatogram alanlarına oranı (PER/IS ve IND/IS oranları) konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek bir doğru denklemi elde edildi. PER/IS ve IND/IS

oranlarıyla konsantrasyon arasındaki doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.40 da sunulmuştur.

Karışımlardaki PER ve IND analizi için YBSK yönteminin geliştirilmesinde optimal kromatografik şartların bulunması için çeşitli hareketli faz sistemleri, akış hızı, dalga boyu seçimi, enjeksiyon hacmi gibi parametreler test edildi. IS (Spiranalakton) varlığında PER ve IND bileşiklerinin ayrımı ve tayini için bölüm 3.3.2.3 de verilen kromatografik koşulların uygun olduğu bulundu.



Şekil 3.24. a) 85 µg/mL PER, b) 15 µg/mL IND ve c) 25 µg/mL IS kromatogramları

Çizelge 3.40. YBSK yöntemiyle PER ve IND kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon parametreleri	PER	IND
λ (nm)	220	220
m	0.0369	0.2006
n	-0.0017	-0.0790
r	0.9995	0.9990
SH(m)	0.0007	0.0100
SH(n)	0.0358	0.0099
SH(r)	0.0435	0.1270
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	5.82	0.30
LOQ($\mu\text{g/mL}$)	19.41	0.98
m = Regresyon denkleminin eğimi, n = Regresyon denkleminin kesim noktası, r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı, SH(m) = Eğimin standart hatası, SE(n) = kesim noktasının standart hatası, SH(r) = Korelasyon katsayısının standart hatası, LOD = Yakalama sınırı, LOQ = Tayin sınırı		

3.3.2.4. YBSK Yönteminin Validasyonu

Karşılaştırma yöntemi olarak YBSK yönteminin validasyonu için acetonitril, 0.1 M H_3PO_4 - NaH_2PO_4 tampon sistemi ve saf su (45:45:10, h/h/h) çözeltisi içerisinde PER için 25.0-105.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için 3.0-19.0 $\mu\text{g/mL}$ doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon setinin hazırlanmasında herbir karışım çözeltisine 25.0 $\mu\text{g/mL}$ sabit konsantrasyonda IS (Spironalakton) stok çözeltisinden ilave edildi. Bu validasyon seti kullanılarak YBSK yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri PER için % 102.7, IND için % 100.2 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri PER

için % 2.16 ve IND için % 1.95 olarak hesaplandı. Geri kazanım çalışmasında YBSK yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.41 de gösterildi.

Çizelge 3.41. YBSK yönteminin PER-IND ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

İkili karışımlar ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)	
PER	IND	PER	IND	PER	IND
25.0	12.5	25.52	12.55	102.1	100.4
45.0	12.5	31.15	12.84	98.1	102.8
65.0	12.5	65.22	12.40	100.3	99.2
85.0	12.5	90.13	12.84	102.5	102.8
105.0	12.5	110.08	12.70	104.8	101.6
40.0	3.0	46.57	2.93	103.9	97.7
40.0	7.0	45.04	6.81	102.6	97.3
40.0	11.0	42.29	10.99	105.7	99.9
40.0	15.0	41.33	14.80	103.3	98.6
40.0	19.0	44.59	19.25	104.0	101.3
		$\bar{X}$		102.7	100.2
		SS		2.22	1.96
		BSS		2.16	1.95

$\bar{X}$ =Ortalama, SS = Standart Sapma, BSS = Bağlı Standart Sapma

Diğer bir validasyon işlemi olarak YBSK karşılaştırma yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 $\mu\text{g/mL}$ ve IND için (8.0, 12.0 ve 16.0 $\mu\text{g/mL}$) her derişim için 6 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.42 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.42. YBSK yöntemiyle PER ve IND analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

		Gün içi (n=6)									
Konulan (µg/mL)		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.98	0.75	2.42	3.26	103.3	7.90	0.11	1.39	-1.26	98.7
60	12	60.70	0.50	0.83	1.16	101.2	11.80	0.25	2.12	-1.64	98.4
90	16	91.18	1.75	1.91	1.32	101.3	15.90	0.40	2.54	-0.63	99.4
		$\bar{X}$ 101.9					$\bar{X}$ 98.8				
		SS 1.17					SS 0.51				
		BSS 1.14					BSS 0.52				
Günler arası (n=6)											
Konulan		PER					IND				
PER	IND	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
30	8	30.81	0.77	2.50	2.69	102.7	7.86	0.13	1.61	-1.81	98.2
60	12	60.37	1.30	2.15	0.61	100.6	12.05	0.13	1.07	0.43	100.4
90	16	91.77	1.64	1.79	1.97	102.0	16.16	0.15	0.93	1.02	101.0
		$\bar{X}$ 101.8					$\bar{X}$ 99.9				
		SS 1.05					SS 1.49				
		BSS 1.03					BSS 1.49				

BH= Bağıl hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

SS = Standart Sapma, BSS = Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

YBSK yöntemini ticari farmasötik preparat analizine uygulamadan önce PER ve IND içeren farmasötik preperatta, tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerine girişiminin olup olmadığını test etmek amacıyla standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparattaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL acetonitril, 0.1 M H₃PO₄-NaH₂PO₄ tampon sistemi ve saf su (45:45:10, h/h/h) içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 25.0 µg/mL PER ve 8.0 µg/mL IND'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 25.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL PER ve 4.0, 8.0 ve 11.0 µg/mL IND stok çözeltilerinden standart ilavesi yapıldı ve ardından her bir balonjoje içeriğine 25.0 µg/mL IS stok

çözeltilisinden ilavesi yapılarak 3 farklı konsantrasyon seviyesinde altı numune hazırlandı. Bu işlem **COVERSYL PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PER ve IND miktarları kalibrasyonlardan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki PER ve IND için geri kazanım ve diğer hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. YBSK yönteminin uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri YBSK yöntemi kullanıldığında PER için % 101.0 ve % 1.24 ve IND için % 99.7 ve % 1.24 olarak hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.43 de sunulmuştur.

Çizelge 3.43. YBSK yöntemiyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

İlave edilen		Üç farklı konsantrasyon seviyesi için $n=6$ dır.									
		PER					IND				
PER	IND	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	SS	BSS (%)	BH (%)	GK (%)
25	4	25.42	0.45	1.77	1.67	101.7	3.95	0.02	0.56	-1.25	98.7
40	8	40.68	0.64	1.56	1.71	101.7	7.87	0.16	2.05	-1.64	98.4
70	11	69.66	1.40	2.01	-0.48	99.5	10.99	0.06	0.57	-0.07	99.9
		$\bar{X}$ 101.0					$\bar{X}$ 99.7				
		SS 1.25					SS 1.23				
		BSS 1.24					BSS 1.24				

$$\text{BH} = \text{Bağıl hata} = \frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$$

SS = Standart Sapma, BSS = Bağıl Standart Sapma, $\bar{X}$ =Ortalama

3.3.2.5. YBSK Yöntemi İçin ANOVA Testi

YBSK karşılaştırma yönteminin doğruluk ve kesinliğinin değerlendirilmesi için üç farklı konsantrasyonda (PER için 30.0, 60.0 ve 90.0 $\mu\text{g/mL}$ ve her biri üzerine 25.0 $\mu\text{g/mL}$ IS ve IND için 8.0, 12.0 ve 16.0 $\mu\text{g/mL}$ ve her biri üzerine 25.0 $\mu\text{g/mL}$ IS) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1 = 5$ ve $n_2 = 24$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık PER için hesaplanan F-test değeri 0.04 ve p-

değeri 1.00, IND için hesaplanan F-test değeri 0.09 ve p-değeri 0.99 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.44 de sunulmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve p-değeri $> p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Çizelge 3.44. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
PER	Gruplar arası	151.71	5	30.34	0.04	1.00	2.62
	Grup içi	16885.67	24	703.57			
	Toplam	17037.37	29				
IND	Gruplar arası	7.90	5	1.58	0.09	0.99	2.62
	Grup içi	417.98	24	17.42			
	Toplam	425.88	29				

3.3.2.6. YBSK Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada YBSK yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen tablet miktarı 100 mL’lik balonjojede 0.1 M H_3PO_4 - NaH_2PO_4 -acetonitril-su (45:45:10, h/h/h) çözelti sistemi içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu m$) yardımı ile süzüldü. Hazırlanan tablet çözeltileri 2 mL’lik “vial” lere konularak kalibrasyon basamağındaki kromatografik şartlarda kromatogramları çizdirildi. Kromatogramlardan PER/IS ve IND/IS oranları hesaplanarak bölüm 3.3.2.3. de elde edilen kalibrasyon grafiklerinde yerine konarak tabletlerin içerisindeki PER ve IND miktarları hesaplandı.

Yukarıda açıklanan kromatografik tablet analiz işlemi **COVERSYL PLUS®** Tablet preparatına uygulanmıştır. **COVERSYL PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.45 de sunuldu.

Çizelge 3.45. YBSK yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 4.0 mg PER ve 1.25 mg IND /tablet)

No.	mg/tablet	
	PER	IND
1	3.91	1.28
2	4.15	1.26
3	3.98	1.25
4	4.09	1.26
5	4.19	1.25
6	4.05	1.24
7	4.14	1.25
8	4.10	1.26
9	4.17	1.27
10	4.18	1.21
$\bar{X}$	4.10	1.25
SS	0.09	0.02
BSS	2.29	1.48
SH	0.03	0.01
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.06 = (4.01 - 4.19)$	$\bar{X} \pm 0.01 = (1.23 - 1.27)$

$\bar{X}$ =Ortalama, SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma

SH = Standart Hata, GA = Güven Aralığı

3.3.3. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında geliştirilen PCR, PLS, HAAR ve BIOR1.5 yöntemlerinin ticari farmasötik preparata uygulamasından elde edilen sonuçlar, türev spektrofotometri (TS) ve YBSK yöntemlerinin sonuçlarıyla istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistiksel karşılaştırmada t-testi ve F-testi uygulandı. Yöntemlerin **COVERSYL PLUS®** ticari preparatına uygulamasında n=10 deneme için serbestlik derecesi = 9 için % 95 güven aralığında ($p = 0.05$) t-tablo değeri (t_{teorik}) ve F-tablo değeri (F_{teorik}) sırasıyla 2.26 ve 3.13 olmasına karşılık hesaplanan t-test ve F-test sonuçları Çizelge 3.46 ve Çizelge 3.47 de gösterildiği gibi bulunmuştur. Geliştirilen kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerinin tek tek türev ve kromatografik yöntemlerle karşılaştırılmasında t-hesaplanan < t_{teorik} ve F-hesaplanan < F_{teorik} olduğu için yukarıda ifade edilen güven aralığında yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.46. PER için t-testi ve F-testi

	PER							
	OAS-PCR	OAS-PLS	TS-PCR	TS-PLS	HAAR-SDD	BIOR-SDD	TS	YBSK
	4.00	4.05	4.09	3.90	3.84	4.13	4.05	3.91
	4.18	4.24	4.08	3.93	4.05	4.08	4.21	4.15
	4.13	4.11	4.02	4.12	3.98	4.06	3.99	3.98
	4.20	4.27	4.08	4.07	3.91	4.06	4.19	4.09
	4.10	4.17	4.11	4.05	3.97	4.28	4.01	4.19
	4.10	4.16	3.98	4.08	3.97	4.13	4.15	4.05
	4.18	4.24	4.26	4.05	4.11	4.06	4.14	4.14
	4.13	4.19	4.29	4.02	4.06	4.08	4.01	4.10
	4.20	4.27	4.16	3.99	4.1	4.11	4.08	4.17
	4.10	4.17	4.08	4.07	4.09	4.01	3.96	4.18
$\bar{X}$	4.13	4.19	4.12	4.03	4.01	4.10	4.08	4.10
$t_{\text{teorik}}=2.26$	0.177	0.002	0.598	0.080	0.003	0.913	0.679	-
	0.062	0.002	0.430	0.230	0.119	0.592	-	0.679
$F_{\text{teorik}}=3.13$	1.000	2.057	1.557	0.829	1.638	0.988	0.890	-
	2.057	1.557	0.829	1.638	0.988	1.473	-	0.890

Çizelge 3.47. IND için t-testi ve F-testi

IND								
	OAS-PCR	OAS-PLS	TS-PCR	TS-PLS	HAAR-SDD	BIOR1.5-SDD	TS	YBSK
	1.25	1.25	1.31	1.25	1.30	1.24	1.24	1.28
	1.31	1.31	1.31	1.26	1.26	1.21	1.22	1.26
	1.32	1.33	1.28	1.29	1.23	1.23	1.20	1.25
	1.32	1.32	1.30	1.30	1.21	1.22	1.20	1.26
	1.31	1.31	1.26	1.27	1.21	1.27	1.25	1.25
	1.31	1.31	1.28	1.26	1.25	1.24	1.24	1.24
	1.32	1.31	1.32	1.28	1.26	1.20	1.22	1.25
	1.30	1.31	1.28	1.30	1.23	1.20	1.30	1.26
	1.31	1.32	1.27	1.30	1.21	1.19	1.20	1.27
	1.31	1.31	1.30	1.28	1.21	1.20	1.25	1.21
$\bar{X}$	1.31	1.31	1.29	1.28	1.24	1.22	1.23	1.25
$t_{\text{teorik}}=2.26$	3.93×10^{-4}	3.25×10^{-4}	1.10×10^{-3}	3.57×10^{-3}	7.15×10^{-1}	3.50×10^{-1}	-	1.69×10^{-1}
	9.11×10^{-1}	8.41×10^{-1}	1.00×10^0	1.13×10^0	4.26×10^{-1}	6.25×10^{-1}	3.99×10^{-1}	-
$F_{\text{teorik}}=3.13$	2.28×10^0	2.11×10^0	2.51×10^0	2.83×10^0	1.07×10^0	1.56×10^0	-	2.50×10^0
	6.76×10^{-4}	4.84×10^{-4}	1.38×10^{-3}	8.36×10^{-3}	1.69×10^{-1}	1.20×10^{-2}	1.69×10^{-1}	-

4. TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tez çalışmasında bir antihipertansif kombine farmasötik preparattaki PER ve IND'in aynı anda miktar tayinleri için çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri geliştirildi. Bu çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri türev spektrofotometresi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleriyle karşılaştırıldı.

Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleriyle ikili karışımdaki PER ve IND bileşiklerinin kantitatif analizi için PCR ve PLS algoritmaları, orjinal ve türev absorbans ölçümlerine uygulanmasıyla OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR, TS-PLS kalibrasyonları hesaplandı.

Çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerinin uygulamasında optimal deneysel ve spektral koşullar belirlendi. Spektral çalışmalarda metanol ve 0.1 M NaOH (50:50, v/v) karışımı uygun çözücü sistem olarak saptandı. Analiz işleminde PER ve IND bileşiklerinin konsantrasyon seti ve numunelerin, 200-350 nm dalga boyu aralığında orijinal absorpsiyon spektrumları $\Delta\lambda=0.1$ nm aralıklar ile kaydedildi. OAS-PCR ve OAS-PLS kalibrasyonlarında y-blok olarak hazırlanan kalibrasyon setinin (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1) 215-260 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda=0.1$ nm aralıklar ile orijinal absorpsiyon spektrumlarından x-blok olarak kullanılan 451x25 absorbans ölçümlerinin matrisinin optimal spektral koşullar olduğu belirlendi (Şekil 3.3A ve Şekil 3.3B).

TS-PCR ve TS-PLS kalibrasyonları için konsantrasyon setinin (y-blok) 215-260 nm dalga boyunda $\Delta\lambda=6$ nm ve skala faktörü=10 koşullarında spektrumları hesaplandı (Şekil 3.4A, 3.4B ve 3.4C) ve türev absorbans ölçümlerinden oluşan 451x25 matrisin (x-blok) kalibrasyonu için uygun spektral ölçüm koşulları olduğu belirlendi. Orijinal ve türev spektrumları için oluşturulan şartlarda, PCR ve PLS algoritmalarının x-blok ve y-blok verilerine uygulanmasıyla OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR ve TS-PLS kalibrasyonları hesaplandı.

Sinyal işleme yöntemleriyle farmasötik preparattaki PER ve IND bileşiklerinin aynı anda kantitatif analizlerinde yüksek geri kazanım sonuçları sağlayabilen optimal spektral dönüşümleri saptayabilmek için değişik dalgacık aileleri (wavelet families) test edildi ve bunlardan HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD yöntemlerinin optimal olduğu belirlendi. 25.0-105.0 µg/mL doğrusal aralıkta PER ve 3.0-19.0 µg/mL doğrusal aralıkta IND bileşiklerinin standart kalibrasyon serilerinin 200-350 nm dalga boyu aralığındaki spektrumlarından (sırasıyla Şekil 3. 21A ve Şekil 3.22A) 200.0-302.3 nm spektral dalga boyu aralığında (Şekil 3.21B ve Şekil 3.22B) $2^{10}=1024$ absorbans verilerinin HAAR ve BIOR1.5 dönüşümüyle HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD spektrumları elde edildi. Aynı spektral dönüşümler iki bileşiği içeren numunelerin spektrumları için de uygulandı. HAAR-SDD yönteminde PER için 231.1 nm’de ve IND için 291.0 nm’de SDD-sinyalleri ölçülerek kalibrasyon grafikleri elde edildi. BIOR1.5-SDD yöntemi kullanıldığında PER için 228.5 nm’deki ve IND için 246.8 nm’deki SDD-sinyallerinin ölçümüyle iki bileşik için doğrusal regresyon analiziyle doğru denklemleri hesaplandı. (Çizelge 3.22 ve Çizelge 3.28).

Tez kapsamında geliştirilen çok değişkenli kalibrasyonlar (OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR ve TS-PLS) ve sinyal işleme yöntemleri (HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD) yöntemlerinin analitik validasyonu için çalışma aralığı içerisinde olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda PER ve IND içeren yapay karışımlardan oluşan validasyon seti için, yine üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı farklı tekrarlar hazırlanan yapay karışımların gün içi ve günler arası sonuçları için geri kazanım çalışması yapıldı (sırasıyla, Çizelge 3.3, 3.8, 3.13, 3.18, 3.24 ve 3.30). Ayrıca tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmak için tablet preparatının üzerine 3 farklı konsantrasyon seviyesinde 6 tekrarlı PER ve IND standart ilavesiyle geri kazanım çalışması gerçekleştirildi (Çizelge 3.4, 3.9, 3.14, 3.19, 3.25 ve 3.31).

Geliştirilen yöntemlerin validasyonu için yapılan geri kazanım sonuçları ve sonuçlara uygulanan istatistiksel testler (Çizelge 3.5, 3.10, 3.15, 3.20, 3.26, 3.32). Yöntemlerin PER ve IND analizi için yüksek geri kazanım değerleriyle tatmin edici doğruluk ve kesinliğe sahip olduklarını ve analiz üzerine tablet yardımcı maddelerinin

herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri, tabletlerdeki PER ve IND bileşiklerinin aynı anda miktar tayinlerine hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulandı ve son derece tatmin edici sonuçlar alındı.

Tez çalışmasında geliştirilen çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla literatürlerde verilen deneysel koşullarda farklı biçimde birinci türev spektrofotometresi (TS) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemleri geliştirildi ve karışımlardaki PER ve IND'in miktar tayinleri için kullanıldı.

Geliştirilen çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerinin validasyonu için uygulanan validasyon işlemleri, TS ve YBSK yöntemleri için de uygulandı. Sonuçlar (gün içi ve günler arası sonuçları için geri kazanım kesinlik ve doğruluk test sonuçları, sırasıyla Çizelge 3.36 ve 3.42), PER ve IND standart ilavesiyle geri kazanım sonuçları (Çizelge 3.37 ve 3.43), geri kazanım sonuçları ve sonuçlara uygulanan istatistiksel testler (Çizelge 3.38 ve 3.44) de sunuldu.

Tez kapsamında OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR, TS-PLS, HAAR-SDD, BIOR1.5-SDD, TS ve YBSK yöntemlerin yapay karışımlara uygulamasında elde edilen ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri sırasıyla PER için %103.9, %2.78 (OAS-PCR); %103.6, %2.53 (OAS-PLS); %100.5, %2.53 (TS-PCR); %102.5, %1.36 (TS-PLS); %101.0, %1.87 (HAAR-SDD); %99.7, %2.86 (BIOR1.5-SDD); %103.9, %2.15 (TD); %102.7, %2.16 (HPLC) ve IND için %100.5, %1.24 (OAS-PCR); %100.5, %1.25 (OAS-PLS); %100.9, %1.66 (TS-PCR); %102.0, %0.99 (TS-PLS); %101.4, %0.89 (HAAR-SDD); %98.7, %1.27 (BIOR1.5-SDD); %101.3, %0.82 (TD); %100.2, %1.95 (HPLC) olarak bulundu. Standart ilavesi yönteminde PER için % ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri %103.8, %0.71 (OAS-PCR); %104.9, %0.79 (OAS-PLS); %101.6, %2.11 (TS-PCR); %101.3, %1.83 (TS-PLS); %101.7, %0.65 (HAAR-SDD); %97.8, %0.65 (BIOR1.5-SDD); %103.5, %0.65 (TD); %101.0, 1.24 (HPLC) ve IND için % ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri %102.3, %0.43 (OAS-PCR); %102.1, %5.52

(OAS-PLS); % 102.0, %1.53 (TS-PCR); %99.8, %2.12 (TS-PLS); %102.9, %0.98 (HAAR-SDD); %99.3, %0.65 (BIOR1.5-SDD); %100.4, %0.65 (TS); %99.7, 1.24 olarak elde edildi. Yöntemler için gün içi ve günler arası ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri gün içinde PER için %103.7, %1.63 (OAS-PCR); %104.2, %1.45 (OAS-PLS); % 102.3, %1.04 (TS-PCR); %104.6, %0.83 (TS-PLS); %100.9, %0.65 (HAAR-SDD); %99.8, %2.20 (BIOR1.5-SDD); %102.9, %0.56 (TS); %101.9, %1.14 (HPLC); ve IND için %106.5, %1.57 (OAS-PCR); %107.4, %1.13 (OAS-PLS); %102.9, %0.88 (TS-PCR); %103.4, %0.82 (TS-PLS); %102.9, %0.98 (HAAR-SDD); %100.8, %1.52 (BIOR1.5-SDD); %102.5, %1.21 (TS); %98.8, %0.52 (HPLC); günler arasında PER için %103.4, %1.78 (OAS-PCR); %105.1, %1.29 (OAS-PLS); % 101.8, %1.90 (TS-PCR); %103.8, %0.43 (TS-PLS); %101.8, %0.53 (HAAR-SDD); %101.3, %1.84 (BIOR1.5-SDD); %101.7, %0.60 (TS); %101.8, %1.03 (HPLC); ve IND için %106.0, %2.08 (OAS-PCR); %107.2, %0.95 (OAS-PLS); %104.1, %0.85 (TS-PCR); %102.6, %1.66 (TS-PLS); %103.6, %0.38 (HAAR-SDD); %102.8, 0.56 (BIOR1.5-SDD); %102.4, %0.69 (TS); %99.9, %1.49 (HPLC) olarak hesaplandı.

Validasyon işleminden sonra yöntemler ticari tabletlerin analizine uygulandı ve tatmin edici sonuçlar elde edildi (Çizelge 3.39 ve 3.45). Geliştirilen OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR, TS-PLS, HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD yöntemleriyle ticari tabletlerdeki PER ve IND bileşiklerinin kantitatif analizinde karşılaştırma yöntemlerinin (YBSK ve TS) sonuçlarıyla karşılaştırılabilir sonuçlar elde edildi. Yöntemler ile ticari tabletlerin analizi için karşılaştırmak amacıyla t-test ve F-test istatistiği kullanıldı ve yöntemlerden elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. (Çizelge 3. 46 ve 3.47).

Bu tez çalışmasının sonuçları göstermiştir ki geliştirilen çok değişkenli ve sinyal işleme yöntemleri PER ve IND içeren ticari farmasötik preparatların rutin analizlerinde ve kalite kontrolünde kullanılabilirler.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Analiz işlemlerinde birden fazla aktif bileşiği içeren karışımların hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın ve aynı anda bileşiklerin miktar tayinleri özellikle ilaç analizlerinde son derece önemlidir. Bilindiği gibi pahalı ve karmaşık cihazlar gerektiren ayırma tekniklerinin kullanıldığı kromatografi ve kapiler elektroforez gibi yöntemler analiz işlemlerinde deneysel şartların optimizasyonundaki zorluklar ve uzun analiz süreleri nedeniyle bıkırtıcı olmaları ve bazı durumlarda başarılı sonuçlar vermemeleri nedeniyle analitik kimyacıların daha hızlı, daha kolay uygulanabilir ve daha ekonomik yöntemler arayışına itmektedir.

Bu tez kapsamında geliştirilen çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri daha kolay uygulanabilirlikleri, hızlı ve ekonomik olmalarıyla birlikte tekrar edilebilir, kesin, doğru ve güvenilir sonuçları vermeleri nedeniyle PER ve IND'in farmasötik preparatlardan analizi için bu tez çalışmasını orijinal kılmaktadır.

Tez kapsamında geliştirilen ve başarılı bir şekilde PER ve IND içeren tabletlerin analizine uygulanan çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme kemometrik kalibrasyon yöntemleriyle son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen bu kalibrasyon yöntemleri analiz işlemlerinde son derece hızlı, kolay uygulanabilir ve ekonomiktir. Kemometrik yöntemler, kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında yukarıda sayılan avantajları yanında herhangi bir ön ayırma işlemi kullanmaksızın kombine preparatların analizinde karşılaştırılabilir sonuçlar bulunması yönünden de avantajlıdır.

Tez kapsamında PER ve IND miktar tayinleri için geliştirilen bu kemometrik yöntemleri türev yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir ve tez konusu her iki bileşiğin kantitatif analizleri için başarıyla uygulanmıştır. Bu tez çalışmasında deneysel koşulları ve kemometrik parametreleri optimize edilen yöntemler daha sonraki bilimsel araştırmalarda ve sanayide PER ve IND analizi için kullanılabilmesi bakımından tez çalışmasını orijinal kılmaktadır.

ÖZET

Bir Farmasötik Preparattaki Perindopril ve İndapamid'in Sinyal İşleme ve Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleriyle Kantitatif Analizi

Bu tezde, sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri ticari preparatlardaki PER ve IND'in aynı anda miktar tayinine hiçbir ayırma gerektirmeksizin uygulandı.

Çok değişkenli kalibrasyonların tabletlerdeki PER ve IND'in aynı anda miktar tayinine uygulamasında, Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Temel Bileşen Regresyonu (OAS-PCR), Orijinal Absorpsiyon Spektrumu-Kısmi En Küçük Kareler (OAS-PLS), Türev Spektrumu-PCR (TS-PCR) ve Türev Spektrumu-PLS (TS-PLS) yöntemlerini oluşturmak için Temel Bileşen Regresyon (PCR) ve Kısmi En Küçük Kareler yöntemi orijinal absorpsiyon spektrumlarına ve onların birinci türev spektrumlarına uygulandı.

OAS-PCR, OAS-PLS, DS-PCR ve DS-PLS kalibrasyon yöntemlerinin validasyonu % geri kazanım çalışmaları ve standart ekleme tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Bir sonraki adımda, bu çok değişkenli kemometrik kalibrasyonlar PER ve IND içeren tabletlerin kantitatif analizine uygulandı.

Sinyal işleme yöntemlerinde, PER ve IND'in analizinde en yüksek geri kazanım sonuçlarını elde etmek için çeşitli dalgacık aileleri test edildi. Bu test sürecinde Haar ve Biortogonal1.5 sürekli dalgacık dönüşümlerinin (sırasıyla HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD) tabletlerdeki PER ve IND'in kantitatif analizi için uygun olduğu bulundu. HAAR-SDD yöntemlerini kullanarak, PER ve IND için kalibrasyon grafikleri PER için 231.1 nm ve IND için 291.0 nm'de SDD sinyallerini ölçerek elde edildi.

BIOR1.5-SDD yönteminde, PER için 221.6 nm ve IND için 282.7 nm ölçüm değerleri kullanılarak kalibrasyon grafikleri elde edildi. Bu yöntemlerin, çeşitli sentetik karışımların analiziyle ve standart ekleme tekniği kullanılarak validasyonu gerçekleştirildi.

Hem HAAR-SDD ve hem de BIOR1.5-SDD yöntemleri tabletlerdeki PER ve IND'in kantitatif analizine başarıyla uygulanmıştır.

OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR, TS-PLS, HAAR-SDD ve BIOR1.5-SDD yöntemlerinin karşılaştırılması için literatür yöntemlerinden farklı deneysel şartlara sahip olan birinci türev yöntemi (TS) ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi PER ve IND tabletlerinin kantitatif analizi için kullanıldı.

Gelişmiş OAS-PCR, OAS-PLS, TS-PCR, TS-PLS, HAAR-SDD and BIOR1.5-SDD yöntemlerinden elde edilen deneysel sonuçlar ile TS ve HPLC yöntemlerinden elde edilen sonuçlar t- testi ve F-testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Anahtar Kelimeler : Sinyal işleme yöntemleri, Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, Kantitatif analiz, Perindopril, İndapamid.

SUMMARY

Signal processing and multivariate calibration methods for the quantitative analysis of perindopril and indapamide in a pharmaceutical preparation

In this thesis, signal processing and multivariate calibration methods were applied to the simultaneous determination of PER and IND in the commercial tablet formulation without using any separation procedure.

In the application of the multivariate calibrations to the simultaneous determination of PER and IND in tablets, the algorithms of principle component regression (PCR) and partial least squares (PLS) were applied to the data set of the original absorption spectra and their first derivative spectra to construct the original absorption spectrum-PCR and the original absorption spectrum-PLS (OAS-PCR and OAS-PLS, respectively) and derivative spectrum-PCR and derivative spectrum-PLS (DS-PCR and DS-PLS, respectively).

The validation of the OAS-PCR, OAS-PLS, DS-PCR and DS-PLS calibration methods were performed by using recovery studies and standard addition technique. In the following step, these multivariate chemometric calibrations were subjected to the quantitative analysis of tablets containing PER and IND drugs.

In the signal processing methods, various wavelet families were tested to find the highest recovery results for the analysis of PER and IND. In this work, Haar and Biorthogonal1.5 continuous wavelet transforms (HAAR-CWT and BIOR1.5-CWT, respectively) were found to be suitable for the determination of the related compounds in samples. By using HAAR-CWT method, calibration graphs for PER and IND were obtained by measuring the CWT-amplitudes at 231.1 nm for PER and 291.0 nm for IND. Similarly, by Bior1.5-CWT method, the calibration graphs were obtained using the measurements at 221.6 nm for PER and 282.7 for IND. These methods were validated by analyzing various synthetic mixtures and by using standard addition technique. Both HAAR-CWT and

BIOR1.5-CWT methods were successfully applied to the quantitative analysis of PER and IND in tablets.

In order to compare methods of OAS-PCR, OAS-PLS, DS-PCR, DS-PLS, HAAR-CWT and BIOR1.5-CWT in this study, first derivative method and High performance liquid chromatography (DS and HPLC, respectively), which have different experimental conditions than literature methods, were developed and used for the quantitative resolution of the tablets of PER and IND. The validity of both DS and HPLC methods was performed by the validation parameters as well as the proposed multivariate and signal processing methods. These DS and HPLC methods give successful results for the determination of PER and IND in tablets.

The experimental results obtained from the developed OAS-PCR, OAS-PLS, DS-PCR, DS-PLS, HAAR-CWT and BIOR1.5-CWT methods were compared with those obtained by DS and HPLC methods by using t-test and F-test. Statistical results obtained by using t-test and F-test show no significant difference between the mentioned methods.

Key Words: Signal processing methods, Multivariate calibration methods, Quantitative analysis, Perindopril, Indapamide.

KAYNAKLAR

- ABDELLATEF HE. (1998). Utility of certain pi-acceptors for the spectrophotometric determination of perindopril, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17 (8): 1267-1271
- ABDELLATEF HE, AYAD MM, TAHA EA. (1999). Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of ramipril and perindopril through ternary complex formation with eosin and Cu(II), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18 (6): 1021-1027
- AGRAWAL YK, MAJUMDAR FD. (1995). Spectrophotometric determination of indapamide and its formulations using ammonium molybdate reagent, *Analytical letters* 28 (9): 1619-1627
- ALBU F, GEORGITA C, DAVID V, MEDVEDOVICI A. (2005). Liquid chromatography-electro spray tandem mass spectrometry method for determination of indapamide in serum for single/multiple dose bioequivalence studies of sustained release formulations. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 816 (1-2): 35-40
- BEEBE K. R, Pell R. J. and Seasholtz M. B. (1998). *Chemometrics: a Practical Guide*, Wiley, New York
- BRERETON R.G. (2003). Chemometrics data analysis for the laboratory and chemical plant. UK, University of Bristol, John Wiley & Sons Ltd.
- BRERETON R. G., Scott D. R., Massart D. L., Dessy R. E., Hopke P. K., Spiegelman C. H. and Wegscheider W. (Editors). (1992). *Chemometrics Tutorials II*, Elsevier, Amsterdam
- C. X. Ma, X. B. SHAO. (2004). *J. Chem. Inform. Compt. Sci.* 44(3) 907
- CAULCUTT R. VE BODDY R. (1983). Statistics for analytical chemists. London, Chapman and Hall
- CHEN WD, LIANG Y, ZHANG H, LI H, XIONG Y, WANG GJ, XIE L. (2006). Simple, sensitive and rapid LC-MS method for the quantitation of indapamide in human plasma - application to pharmacokinetic studies, : *Journal of chromatography b-analytical technologies in the biomedical and life sciences* 842 (1): 58-63 14
- CORNELL J.A. (1990). Experiments with mixtures: design, models and the analysis of mixture data. New York, Wiley, 2nd edn.
- DAUBECHIES, I. (1992). Ten Lectures on Wavelets. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia
- DING L ,YANG LH , LIU F, JU WZ , XIONG NN. (2006). A sensitive LC-ESI-MS method for the determination of indapamide in human plasma: Method and clinical applications, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 42 (2): 213-217
- DİNÇ E (2002). "Spectral analysis of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by three chemometric techniques", *Analytical Letters*, 35, 1021-1039
- DİNÇ E ve BALEANU D. (2002a). "Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 715-723
- DİNÇ E ve BALEANU D. (2002b). "Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques", *IL Farmaco*, 57, 33-37

- DİNÇ E ve KANBUR M. (2002). "Spectrophotometric multicomponent resolution of a veterinary, formulation containing oxfendazole and oxclozanide by multivariate calibration-prediction techniques", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis and Biomed. Anal.*, 28, 779-788
- DİNÇ E ve ÜSTÜNDAĞ Ö. (2002). "Chemometric resolution of a mixture containing hydrochlorothiazide and amiloride by absorption and derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 371-379
- DİNÇ E ve ÜSTÜNDAĞ Ö. (2003a). "Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spironolactone in tablets by chemometric analysis methods, *IL Farmaco*, 58, 1151-1161
- DİNÇ E ve ÜSTÜNDAĞ Ö. (2005). "Application of multivariate techniques to HPLC data for the quantitative analysis of binary mixture of hydrochlorothiazide and losartan in tablets", *Chromatographia* , 61(5-6) 237-244
- DİNÇ E, BALEANU B ve ONUR F. (2001a). "Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 949-957
- DİNÇ E, BALEANU D ve ONUR F. (2001b). Chemometric quantitative analysis of pyridoxine HCl and thiamine HCl in a vitamin combination by principal component analysis, classical least squares, and inverse least squares techniques. *Spectrosc. Letters*, 34, 279-288
- DİNÇ E, BALEANU D ve ONUR F. (2002a). Simultaneous spectrophotometric analysis of codeine phosphate, acetylsalicylic acid, and caffeine in tablets by inverse least-squares and principal component regression techniques, *Analytical. Letters*, 35, 545-558
- DİNÇ E, BALEANU D, ÜSTÜNDAĞ Ö ve TAŞ K. (2005a). Chemometric calibration based on the wavelet transform for the quantitative resolution of two-colorants mixtures. *Romanian Journal of Chemistry*, 50(4)283-290
- DİNÇ E, BAYDAN E, KANBUR M ve ONUR F. (2002b). Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods, *Talanta*, 58, 579-594
- DİNÇ E, DERMİŞ S, BALEANU B. (2006a). Simultaneous spectrophotometric determination of chlordiazepoxide and clidinium bromide in sugar coated tablets by partial least squares, principal component regression and artificial neural network, *Revista de Chimie*, 57 (3): 29-35
- DİNÇ E, ÖZDEMİR A, AKSOY H, ÜSTÜNDAĞ Ö, ve BALEANU D. (2006b). Chemometric Determination of Naproxen Sodium and Pseudoephedrine Hydrochloride in Tablets by HPLC, *Chem. Pharm. Bull.*, 54(4),415-421
- DİNÇ E, ÖZDEMİR A, BALEANU D VE ÜSTÜNDAĞ Ö. (2005b). A New Application of Chemometric Techniques to HPLC Data for the Simultaneous Analysis of Two Component Mixture, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(14)2179-2194
- DİNÇ E, ÖZDEMİR E, AKSOY H, BALEANU D. (2006c). Chemometric approach to simultaneous chromatographic determination of paracetamol and chlorzoxazone in tablets and spiked human plasma, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29: 1803–1822
- DİNÇ E, PALABIYIK I.M, ÜSTÜNDAĞ Ö, FİLİZ YURTSEVER F ve ONUR F. (2002c). Simultaneous spectrophotometric determination of chlorphenoxamine hydrochloride and caffeine in a pharmaceutical

- preparation using first derivative of the ratio spectra and chemometric methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 591-600
- DİNÇ E, SERİN C. TUGCU-DEMİRÖZ F. ve DOĞANAY T. (2003b). Dissolution and assaying of multicomponent tablets by chemometric methods using computer-aided spectrophotometer, *Int. J. Pharm.*, 250,339-350
- DİNÇ E, YÜCESOY C ve ONUR F. (2002d). Simultaneous spectrophotometric determination of mefenamic acid and paracetamol in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 1091-1100
- DİNÇ E, YÜCESOY C, PALABIYIK I.M, ÜSTÜNDAĞ Ö ve ONUR F. (2003a). Simultaneous spectrophotometric determination of cypoterone acetate and estradiol valerate in pharmaceutical preparations by ratio spectra derivative and chemometric methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 539-547
- DİNÇ E. (2007). Hacettepe Üniversitesi, *Eczacılık Fakültesi Dergisi*; 27(1): 61-92.
- DİNÇ E. ve BALEANU D. (2004a). Multicomponent quantitative resolution of binary mixtures using continuous wavelet transform, *Journal of AOAC International*, 87(2), 360-365
- DİNÇ E. ve BALEANU D. (2004b). Application of the wavelet method for the simultaneous quantitative determination of benazepril and hydrochlorothiazide in their mixtures”, *Journal of AOAC International* 87 (4): 834-841
- DİNÇ E. ve BALEANU D. (2004c). One-dimension continuous wavelet resolution for the simultaneous analysis of binary mixture of benazepril and hydrochlorothiazide in tablets using spectrophotometric absorbance data, *Romanian Journal of Chemistry*, 49 (11), 917-925
- DİNÇ E. ve BALEANU D. (2006). A new fractional wavelet approach for the simultaneous determination of ampicillin sodium and sulbactam sodium in a binary mixture”, *Spectrochimica Acta Part A*, 63 (3): 631-638
- DİNÇ E. ve ÖZDEMİR A. (2004). Multivariate spectral calibration techniques based on regression analysis for the quantitative multiresolution of a ternary mixture containing paracetamol, ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets”, *Die Pharmazie*, 59, 700-705
- DİNÇ E. ve ÖZDEMİR A. (2005). Mathematical algorithms applied to the multi-linear regression functions for the multicomponent determination of pharmaceutical dosage form containing three-component mixtures. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53(8): 899-906
- DİNÇ E. ve ÖZDEMİR D. (2004). Determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical preparations using UV-visible spectrophotometry and genetic algorithm based multivariate calibration methods, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52 (7): 810-817
- DİNÇ E., BALEANU D. ve HASSAN Y. ABOUL-ENEİN. (2004a). Wavelet analysis for the multicomponent determination in a binary mixture of caffeine and propyphenazone in tablets, *IL Farmaco*, 59, 335-342
- DİNÇ E., BALEANU D. ve KANBUR M. (2005c). A comparative application of wavelet approaches to the absorption and ratio spectra for the simultaneous determination of diminazene aceturate and phenazone in veterinary granules for injection, *Die Pharmazie*, 60(12) 892-896

- DİNÇ E., BALEANU D. ve ÜSTÜNDAĞ Ö. (2003). An approach to quantitative two-component analysis of a mixture containing hydrochlorothiazide and spironolactone in tablets by one-dimensional continuous daubechies and biorthogonal wavelet analysis of UV-spectra, *Spectroscopy Letters*, **36**, 341-355
- DİNÇ E., BALEANU D., ÜSTÜNDAĞ Ö. ve HASSAN Y. ABOUL-ENEİN. (2004b). Continuous wavelet transformation applied to the simultaneous quantitative analysis of two-component mixtures, *Die Pharmazie*, **59**, 618-623
- DİNÇ E., ÖZDEMİR A., BALEANU D., TAŞ K. (2006). Wavelet transform with chemometrics techniques for quantitative multiresolution analysis of a ternary mixture consisting of paracetamol, ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets, *Revista de Chimie* , **57** (5): 505-510
- ERK N. (2001). Comparison of spectrophotometric and an LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **26** (1): 43-52
- GANS P. (1992). Data fitting in the chemical sciences: by the method of least squares. Chichester, Wiley
- GAO XL, CHEN J, MEI N, TAO WX, JIANG WM, JIANG XG. (2005). HPLC determination and pharmacokinetic study of indapamide in human whole blood, *Chromatographia* **61** (11-12): 581-585
- GUMIENICZEK A, HOPKALA H. (1998). High-performance liquid chromatographic assay for perindopril in tablets, *Chemia Analityczna* **43** (6): 951-954
- HANG TJ, ZHAO W, LIU H, SONG M, XIE Y, ZHANG ZX, SHEN HP, ZHANG YD. (2006). A selective HPLC method for the determination of indapamide in human whole blood: Application to a bioequivalence study in Chinese volunteers, : *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **40** (1): 202-205
- HILLAERT S, VANDER HEYDEN Y, VAN DEN BOSSCHE W. (2002). Optimisation by experimental design of a capillary electrophoretic method for the separation of several inhibitors of angiotensin-converting enzyme using alkylsulphonates, *Journal of Chromatography* **a 978** (1-2): 231-242
- JANSSON P. A. (1984). (Editor), Deconvolution: with applications in spectroscopy. New York, Academic Pres
- JOLIFFE I.T. (1987). Principal Component Analysis. New York, Springer-Verlag
- KOWALSKI B. R. (1984). (Editor), *Chemometrics, Mathematics and Statistics in Chemistry*, Reidel, Dordrecht
- KOWALSKI B.R. (1984). (Editor). Chemometrics: mathematics and statistics in chemistry. Dordrecht, Reidel
- KRAMER R. (1998). *Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York
- LEGORBURU MJ, ALONSO RM, JIMENEZ RM, ORTIZ E. (1999). Quantitative determination of indapamide in pharmaceuticals and urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection, *Journal of Chromatographic Science* **37** (8): 283-287
- LEUNG A.K.M. (1998). A review on applications of wavelet transform techniques in chemical analysis: 1989-1997 *Chem.Intell. Lab. Sys.*
- LIN SJ, WU HL, CHEN SH, WEN YH. (1996). Derivatization gas chromatographic determination of perindopril, *Analytical Letters* **29** (10): 1751-1762

- MALINOWSKI E.R. (1991). Factor analysis in chemistry. New York, Wiley, 2nd edn.
- MALLAT S. (1998). A wavelet tour of signal processing . New York, Academic Pres
- MARTENS H. ve MARTENS M. (2000). Multivariate analysis of quality. Chichester, Wiley
- MARTENS H. ve NAES T. (1989). Multivariate calibration. Chichester, Wiley
- MASSART D. L., BRERETON R. G., DESSY R. E., HOPKE P. K., SPIEGELMAN C. H. ve WEGSCHEIDER W. (Editors) (1990). *Chemometrics Tutorials*, Elsevier, Amsterdam
- MASSART D. L., VANDEGĪNSTE B. G. M., BUYDENS L. M. C., DE JONG SLEWĪ ., P. J. ve SMEYERS
- MELOUN M., MĪĹTKY J. AND FORĪNA M. (1992). *Chemometrics for Analytical Chemistry*, Vol. 1, Ellis Horwood, Chichester
- MILLER RB, DADGAR D, LALANDE M. (1993). High-Performance Liquid-Chromatographic method for the determination of indapamide in human whole-blood, *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 614 (2): 293-298
- NIE F, LU JR, NIU WF. (2005). Chemiluminescence determination of indapamide using indapamide-imprinted polymer as recognition material. *Analytica Chimica Acta* 545 (2): 129-136
- OTTO M. (1998). *Chemometrics: Statistics and Computer Applications in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim
- ÖZDEMİR D ve DİNÇ E, (2005a). "Determination of Benazepril HCl and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations Using UV-Visible Spectrophotometry and Genetic Multivariate Calibration Methods" *Journal of Food and Drug Analysis*, 13(4)
- PADVAL MV, BHARGAVA HN. (1993). Liquid-chromatographic determination of indapamide in the presence of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 11 (10): 1033-1036
- RADI A. (2001). Stripping voltammetric determination of indapamide in serum at castor oil-based carbon paste electrodes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24 (3): 413-419
- RADI A. (2003). Adsorptive cathodic stripping voltammetric determination of indapamide as copper complex at a hanging mercury drop electrode. *Chemia Analityczna* 48 (2): 273-281
- RAHMAN N, ANWAR N, KASHĪF M. (2006). Optimized and validated initial-rate method for the determination of perindopril erbumine in tablets, *Chemical and pharmaceutical bulletin* 54 (1): 33-36
- RENAUD IM, CHAINEY A, BELAIR MF, MANDET C, MICHEL O, MYARA I, CHEVALIER J, PLANTE GE. (2004). Long-term protection of obese Zucker rat kidneys from fibrosis and renal failure with an angiotensin-converting enzyme inhibitor/diuretic combination. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 18 (4): 437-447
- RODRIGUEZ JC, BARCIELA J, GARCIA S, HERRERO C, PENA RM. (2005). Optimization of two flow-injection spectrophotometric methods for the determination of indapamide in pharmaceutical dosage forms, *Journal of Aoac International* 88 (4): 1148-1154
- SALEH HM, AMIN AS, EL-MAMMLI M. (2001). New colorimetric methods for the determination of indapamide and its formulations. *Mikrochimica Acta* 137 (3-4): 185-189

- STEFAN RI, VAN STADEN JF, MULAUDZI LV, ABOUL-ENEIN HY. On-line simultaneous determination of S- and R-perindopril using amperometric biosensors as detectors in flow systems, : *Analytica chimica acta* 467 (1-2): 189-195
- STEFAN RI, VAN STADEN JKF, ABOUL-ENEIN HY. (1999). Determination of S-perindopril using a flow injection system with an amperometric biosensor, *Sensors And Actuators B-Chemical* 54 (3): 261-265
- SUO XB, DENG YJ, HAO AJ. (2005). Determination of lauroyl-indapamide in rat whole blood by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 819 (1): 191-196
- SÜSLÜ I, ALTINÖZ S. (2002). Two derivative spectrophotometric determinations of indapamide in pharmaceutical dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30 (2): 357-364
- TANG JL, LI J, SUN J, YIN J, HE ZG. (2005). Rapid and sensitive determination of indapamide in human blood by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study, *Pharmazie* 60 (11): 819-822
- ÜSTÜNDAĞ Ö. ve DİNÇ E. (2003). Simultaneous resolution of a binary mixture of captopril and hydrochlorothiazide in tablets by bivariate and multivariate spectral calibrations, *Die Pharmazie*, 58, 623-628
- VANDEGINSTE B. M. G., MASSART D. L., BUYDENS L. M. C., DE JONG S., LEWİ P. J. AND SMEYERS-VERBEKE. J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part B*, Elsevier, Amsterdam
- VANDENBERG H, RESPLANDY G, DEBIE ATHJ, FLOOR W, BERTRAND M, ARTS CJM. (1991). A new radioimmunoassay for the determination of the angiotensin-converting enzyme-inhibitor perindopril and its active metabolite in plasma and urine - advantages of a lysine derivative as immunogen to improve the assay specificity, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* 9 (7): 517-524
- VERBEKE J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam
- VERBEKE J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part B*, Elsevier, Amsterdam
- WALCZAK B. (2000). *Wavelets in Chemistry*, Elsevier Press: Amsterdam, The Netherlands
- WANG ZP, ZHANG ZJ, ZHANG XO, FU ZF. (2004). Flow-injection inhibition chemiluminescence determination of indapamide based on luminol-ferricyanide reaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (1): 1-7
- YOUSSEF NF. (2003). Spectrophotometric, spectrofluorimetric, and densitometric methods for the determination of indapamide, : *Journal of Aoac international* 86 (5): 935-940
- ZENDELOVSKA D, STAFILOV T, STEFOVA M. (2003). Optimization of a solid-phase extraction method for determination of indapamide in biological fluids using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 788 (1): 199-206

ÖZGEÇMİŞ

I-Kişisel Bilgiler

Adı: Gözde

Soyadı: Pektaş

Doğum yeri: Ankara

Doğum tarihi: 30.03.1983

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Saltoğlu Bulvarı E-12 Blok No:22

Angoraevleri Beysukent/Çankaya/ANKARA 0312 225 19 82

II-Eğitimi:

Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2001-2005)

Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi (1997-2000)

Ankara Namık Kemal İlköğretim Okulu (1994-1997)

Batıkent İlkokulu (1989–1994)

Yabancı Dil: İngilizce

Ünvanlar: Kimyager

Mesleki Deneyimi: Kimyager