



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**MOEKSİPRİL HİDROKLORÜR – HİDROKLOROTİAZİD
İÇEREN TİCARİ FARMASOTİK PREPARATIN
KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE KANTİTATİF ANALİZİ**

Ozan HALİSÇELİK

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MOEKSİPRİL HİDROKLORÜR – HİDROKLOROTİAZİD İÇEREN TİCARİ
FARMASOTİK PREPARATIN KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE
KANTİTATİF ANALİZİ**

Ozan HALİŞÇELİK

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

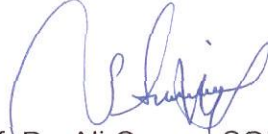
2010-ANKARA

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: 20/08/ 2010



Prof. Dr. Ali Osman SOLAK
Ankara Üniversitesi Fen Faköltesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Faköltesi



Prof. Dr. Göksel ARLI
Anadolu Üniversitesi Eczacılık Faköltesi



Prof. Dr. Erdal DİNÇ
Ankara Üniversitesi Eczacılık Faköltesi
Danışman



Yrd. Doç. Dr. Saadet DERMiŞ
Ankara Üniversitesi Eczacılık Faköltesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
GİRİŞ	1
1.1. Moeksipril Hidroklorür	5
1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	5
1.1.2. Farmakolojik özellikleri	6
1.2. Hidroklorotiazid	10
1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler	10
1.2.2. Farmakolojik Özellikleri	12
Farmakodinamik Özellikleri	12
Farmakokinetik Özellikleri	14
1.3. Moeksipril Hidroklorür ve Hidroklorotiazid İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri	16
1.3.1. Moeksipril Hidroklorür-Hidroklorotiazidin Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler	16
Spektrofotometri ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	16
1.3.2. Hidroklorotiazidin Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler	17
Spektrofotometrik Yöntemler	17
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	20

2.GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Spektrofotometri	23
2.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi	29
2.2. Kemometri	32
2.2.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları (Multivariate Calibration Algorithms)	35
Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (Principal component regression method)	35
Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Least Squares Regression Method)	38
2.2.2. Kalibrasyon (Konsantrasyon) Setinin Tasarımı	40
2.2.3. Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-validation Procedure)	40
2.2.4. Sürekli Dalgacık Dönüşümü (SDD) (wavelet transform)	41
2.2.5. Dalgacıklar Ailesi	42
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 Bilgisayar Yazılımları	45
2.3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
2.3.4. Analiz Edilen Bileşiklerin Ticari Preparatı	46

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	51
3.1.3. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi	54
Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu	54
(Principal Component Regression Calibration)	
PCR Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	55
PCR Kalibrasyon Yöntemi için Varyans Analizi	59
PCR Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi	60
Çapraz Validasyon ve Faktör Sayısının Seçimi	60
PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	63
3.1.4. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi	65
Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu	65
(Partial Least-Square Calibration)	
PLS Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu	66
PLS Kalibrasyon Yöntemi için Varyans Analizi	70
PLS Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi	71
Çapraz Validasyon ve Faktör Sayısının Seçimi	71
PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	74

3.2. Doubechies Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi (Doubechies Continuous Wavelet Transform Method)	76
3.2.1. Standart Çözeltiler	76
3.2.2. Doğrusal Regresyon Analizi	76
3.2.3. Kemometrik db5-SDD Yönteminin Validasyonu	80
3.2.4. kemometrik db5-SDD Yöntemi için Varyans Analizi	86
3.2.5. db5-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	87
3.3. Karşılaştırma Yöntemleri	89
3.3.1. Türev Spektrofotometri (Karşılaştırma Yöntemi)	89
Standart Çözeltiler	89
Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması	90
Türev Yönteminin Validasyonu	94
Türev Yöntemi için Varyans Analizi	100
Türev Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	101
3.3.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	103
Standart Çözeltiler	103
YBSK Yönteminde Kromatografik Şartlar	104
Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması	105
YBSK Yönteminin Validasyonu	108
YBSK Yöntemi için Varyans Analizi	115
YBSK Yönteminin Farmasötik tabletlere Uygulaması	116
3.3.3. Sonuçların İstatistiksel Karşılaştırılması	118
4. TARTIŞMA	120
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	125
 ÖZET	 127
SUMMARY	130
KAYNAKLAR	133
ÖZGEÇMİŞ	147

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında moeksipril hidroklorür ve hidroklorotiazid içeren farmasotik preparatın kantitatif analizi hiçbir ayırma işlemi uygulanmadan sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri geliştirilerek gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen numerik hesaplama dayanan kemometrik kalibrasyon ve grafik işlemlere dayanan kemometrik sinyal işleme yöntemlerinin sonuçları, türev spektrofotometri ve sıvı kromatografisi yöntemleriyle karşılaştırıldı. Geliştirilen analitik yöntemlerin moeksipril hidroklorür ve hidroklorotiazid bileşiklerini içeren tabletlerin kalite kontrol ve rutin analizlerine uygulanabileceğini, yöntemlerin analitik validasyonu yapılarak analiz sonuçlarıyla ortaya konmuştur. Bu tez kapsamında çalışma amacına ulaşılmıştır. Ayrıca bu yüksek lisans tezinin sonuçları MOEX ve HCT analiziyle ilgili olarak AR-GE ve ilaç endüstrisinde de kullanılabilecektir.

Yüksek lisans tezimdaki konu seçimi, çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ile sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini aktaran danışman Hocam Prof. Dr. Erdal DİNÇ'e teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans programı ders döneminde teorik bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen anabilim dalımız hocalarına sonsuz teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca ve tezim sırasında desteklerini üzerimden eksik etmeyen Aileme ve Sevgili Ebru Saygeçitli'ye; tezim esnasındaki destekleri ve yardımları için Sayın Muharrem Ölçer'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
BH	% Bağlı hata
BSS	% Bağlı standart sapma
db5-SDD	(Doubachies dalgacık dönüşümü yöntemi)
GA	Güven aralığı
GK	% Geri kazanım
HCT	Hidroklorotiazid
LOD	(Limit of Dedection) Yakalama sınırı
LOQ	(Limit of Quantification) Tayin sınırı
MOEX	Moeksipril Hidroklorür
PCR	Principal Component Regression (Temel bileşen regresyon yöntemi)
PLS	Partial Least-Squares (Kısmi en küçük kareler yöntemi)
r	Korelasyon katsayısı
RMSECV	Root Mean Square Error in the Cross Validation (Çapraz validasyonda hataların karelerinin ortalamasının karekökü)
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration (Kalibrasyonda hataların karelerinin ortalamasının karekökü)
SEC	Standard Error of Calibration (Kalibrasyonun standart hatası)
SEP	Standard Error of Prediction (Tayinin standart hatası)
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
YBSK (HPLC)	Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Moeksipril Hidroklorür'in açık formülü	5
Şekil 1.2. Moeksipril Hidroklorür'ün (10 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu	6
Şekil 1.3. Moeksipril Hidroklorürün farmakolojik etkisi	7
Şekil 1.4. Hidroklorotiazidin Açık Formülü	10
Şekil 1.5. Hidroklorotiazid'in (10 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu	11
Şekil 2.1. Enerji seviyeleri arasındaki fark	24
Şekil 2.2. Moleküldeki enerji seviyeleri	25
Şekil 2.3. Sürekli spektrum (moleküldeki elektronik geçişler ve UV-görünür spektrum)	26
Şekil 2.4. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti	27
Şekil 2.5. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları	29
Şekil 2.6. Bir çift ışık yollu (double beam) spektrofotometrenin optik sistemi ve bileşenleri	31
Şekil 2.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler	34
Şekil 2.8. PLS2 kalibrasyonu	38
Şekil 3.1. Kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği	51
Şekil 3.2. MOEX (6 µg/mL) ve HCT (10 µg/mL) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın absorpsiyon spektrumları (Metanol çözeltisi içerisinde)	52
Şekil 3.3. MOEX ve HCT için Çizelge 3.1. ve Şekil 3.1. de verilen kalibrasyon setinin absorpsiyon spektrumları (Metanol çözeltisi içerisinde)	53
Şekil 3.4. MOEX için temel bileşen sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizildiğinde elde edilen grafik	61
Şekil 3.5. HCT için temel bileşen sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizildiğinde elde edilen grafik	62
Şekil 3.6. MOEX için örtünmüş değişken sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizildiğinde elde edilen grafik	72
Şekil 3.7. HCT için örtünmüş değişken sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizildiğinde elde edilen grafik	73

Şekil 3.8. MOEX(1.0-18.0 µg/mL) ve HCT (1.0-18.0 µg/mL) Absorpsiyon Spektrumları	77
Şekil 3.9. MOEX(1.0-18.0 µg/mL) ve HCT (1.0-18.0 µg/mL) db5-SDD Spektrumları	78
Şekil 3.10. Standart İlavesi tekniği ile 1,20; 4,80; 9,60 µg/mL MOEX konsantrasyonları için db5-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	84
Şekil 3.11. Standart İlavesi tekniği ile 2.00; 8.00; 16.00 µg/mL HCT konsantrasyonları için db5-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	85
Şekil 3.12. MOEX(1.0-18.0 µg/mL) ve HCT (1.0-18.0 µg/mL) konsantrasyon aralığında absorpsiyon apektumları	91
Şekil 3.13. MOEX(1.0-18.0 µg/mL) ve HCT (1.0-18.0 µg/mL) konsantrasyon aralığında 1.Dereceden türev spektrumları	92
Şekil 3.14. Standart İlavesi tekniği ile 1,20; 4,80; 9,60 µg/mL MOEX konsantrasyonları için türev yöntemi genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	98
Şekil 3.15. Standart İlavesi tekniği ile 2,00; 8,00; 16,00 µg/mL HCT konsantrasyonları için türev yöntemi genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	99
Şekil 3.16. MOEX(10.0 µg/mL) ve HCT (10 µg/mL) ve IS (Valsartan) 5 µg/mL konsantrasyondaki kromatogramı	107
Şekil 3.17. MOEX(5.0 µg/mL) ve HCT (10 µg/mL) ve IS (Valsartan) 5 µg/mL konsantrasyondaki kromatogramı	108
Şekil 3.18. Standart İlavesi tekniği ile 1,50; 6,00; 12,00 µg/mL MOEX konsantrasyonları için YBSKyöntemi genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	113
Şekil 3.19. Standart İlavesi tekniği ile 2,50; 10,00; 20,00 µg/mL HCT konsantrasyonları için YBSK yöntemi genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	114

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1.	MOEX ve HCT analizi için konsantrasyon seti	49
Çizelge 3.2.	PCR yönteminin MOEX-HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	56
Çizelge 3.3.	PCR yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	57
Çizelge 3.4.	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.	PCR yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)	64
Çizelge 3.7.	PLS yönteminin MOEX-HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	67
Çizelge 3.8.	PLS yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	68
Çizelge 3.9.	PLS yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % Geri kazanım sonuçları	69
Çizelge 3.10.	Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	70
Çizelge 3.11.	PLS yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)	75
Çizelge 3.12.	db5-SDD yöntemiyle MOEX ve HCT kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	79
Çizelge 3.13.	db5-SDD yönteminin MOEX ve HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	81
Çizelge 3.14.	db5-SDD yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	82
Çizelge 3.15.	db5-SDD yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % Geri kazanım sonuçları	85
Çizelge 3.16.	Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	86

Çizelge 3.17. Kemometrik db5-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)	88
Çizelge 3.18. TS yöntemiyle MOEX ve HCT kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	89
Çizelge 3.19. TS yönteminin MOEX-HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	95
Çizelge 3.20. TS yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	96
Çizelge 3.21. TS yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % Geri kazanım sonuçları	99
Çizelge 3.22. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	100
Çizelge 3.23. TS yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)	102
Çizelge 3.24. YBSK yöntemiyle MOEX ve HCT kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	106
Çizelge 3. 25. YBSK yönteminin MOEX ve HCT ikili yapay karışımlara uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	110
Çizelge 3.26. YBSK yöntemiyle gün içi, günler arası MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	111
Çizelge 3.27. YBSK yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % Geri kazanım sonuçları	114
Çizelge 3.28. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları	115
Çizelge 3.29. YBSK yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)	117
Çizelge 3.30. Geliştirilen analitik yöntemlerin tablet analizine uygulamasıyla elde edilen sonuçlar	118
Çizelge 3.31. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için Varyans test sonuçları	119

1. GİRİŞ

Analitik kimya, analiz için analitik teknik ve yöntemlerin geliştirilmesini kapsayan bir disiplindir. Gıda, klinik çalışmalar, çevre, ziraat, adli tıp için, eczacılık, kimya endüstrisi ve endüstrinin diğer branşları uygulama alanlarıdır. Özellikle insan sağlığı için ilaç endüstrisinde formülasyon öncesinde ve formülasyon sonrası ticari farmasötik ürünlerdeki kimyasal bileşenlerin rutin analizi ve kalite kontrolü, her ülkede olduğu gibi ülkemizde de Sağlık Bakanlığı ve ilgili kurumlarca yasa, yönetmelik ve yönergelerle zorunluluk olduğundan dolayı analitik kimyanın analiz teknik ve yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ticari ilaç preparatları yardımcı maddelerden oluşan sabit matriks ile bir veya daha fazla aktif bileşen içeren sistemlerdir. Analitik kimyanın ana hedeflerinden birisi ilaç preparatlarının üretiminde önce ham madde analizi ve üretimi esnasında ise kalite kontrolü için ucuz, hızlı, kolay uygulanabilir ve güvenilir sonuçlar veren analiz yöntemlerinin geliştirilmesidir.

Yukarıda da açıklandığı gibi analitik kimyanın yöntem ve teknikleri analiz işlemlerinde vazgeçilmez hayati öneme sahiptir. Analiz işlemlerinde spektrofotometri, sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, elektrokimyasal yöntemler yanında daha birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulamasında analiz işlemlerinin temel problemleri, analiz yönteminin kolay uygulanabilirliği, analiz maliyeti, analiz hızı, sonuçların kesinliği ve doğruluğudur.

Kompleks Analiz işlemleri 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 bazen türevlendirme ve ekstraksiyon gibi ön işlemlerinin kullanımını gerektirmektedir.

İlaç sanayinde, rutin kalite kontrol laboratuvarlarında ve AR-GE 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 alıcı olmaktadır. Deneylerin zaman alıcı olması kimyasalların sarfiyatını da artırmaktadır. Bazı durumlarda da beklenen kalitede sonuçlar alınamamaktadır. Karmaşık bileşenlere sahip ayırmaya dayalı kromatografik veya diğer yöntemlerin uygulamalarındaki olumsuzlukları dikkate alındığında iki veya daha fazla aktif bileşiği ve numune matriksini içeren kompleks karışımların analizi 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, günümüzün modern yeni sinyal işleme ve çok değişkenli matematiksel kalibrasyon algoritmaları klasik analitik yaklaşımlarıyla kombine olarak kullanılması yeni hibrid (melez) yöntemleri doğurmaktadır. Son zamanlarda kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri kemometrik yöntemler olarak spektral, kromatografik ve diğer analitik cihazlardan elde edilen verilere kompleks karışımların analizi için uygulanmaktadır.

Kemometrik çalışmalarda sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyonlar, bütün analitik cihazlardan elde edilen verilerin analizine uygulanabilmesine rağmen, daha çok spektrofotometrik çalışmalarda kullanıldığı

gözlenmektedir. Bunun nedeni spektrofotometrik cihazlardan kolay, hızlı ve tekrar edilebilir 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).

Günümüzde dalgacık dönüşüm (wavelet transform→WT) sürekli dalgacık dönüşüm (continuous wavelets transform – CWT) ve kesirli dalgacık dönüşüm (Fractional wavelet transform – FWT) gibi sinyal işleme 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 bandlarının girişim yaptığı bileşiklerin 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).

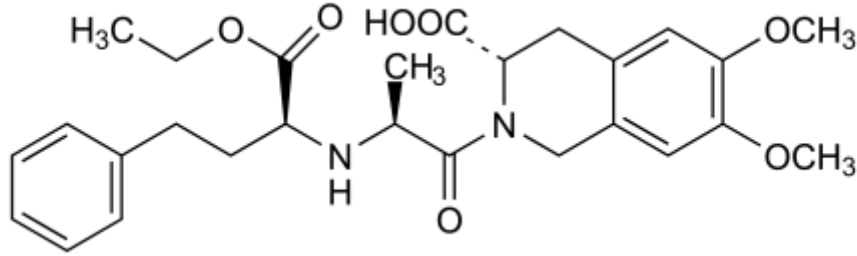
Bu çalışmanın temel amacı, moeksipril hidroklorür ve hidroklorotiazid içeren antihipertansif kombine preparatın analizi için pahalı analitik cihazlar gerektiren, analiz süresi uzun ve analiz maliyeti pahalı olan ayırma

yöntemlerine alternatif olacak daha hızlı, daha ekonomik ve daha güvenilir kemometrik sürekli dalgacık dönüşüm ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu yüksek lisans tezinin kapsamında, moeksipril hidroklorür ve hidroklorotiazid bileşiklerini birlikte içeren farmasötik kombinasyonda bu etkin maddelerin hiçbir ayırma işlemi gerektirmeksizin ve aynı anda miktar tayinlerinin, Dubechies 5 sürekli dalgacık dönüşüm (db5 - SSD) sinyal işleme (sürekli dalgacık dönüşüm yöntemleri) ve temel bileşen regresyon (principal component regresyon→PCR) ve kısmi en küçük kareler (partial least squares→PLS) çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri geliştirildi. Tez çalışmasında analiz için geliştirilen nümerik hesaplamalara dayanan PCR ve PLS kalibrasyon ve grafik işlemlerine dayanan db5-SSD yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla türev spektrofotometrisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri geliştirildi. Tez kapsamında geliştirilen kemometrik sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri ve karşılaştırma yöntemleri olarak kullanılan türev ve kromatografik yöntemleri valide edildi. Karşılaştırma için varyans analizi (ANOVA) istatistiği kullanıldı. Ticari tabletlerdeki MOEX ve HCT'nin analizi için geliştirilen bütün yöntemlerin uygulamasından başarılı sonuçlar elde edildi.

1.1. Moeksipril Hidroklorür

1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 1.1. Moeksiprilin açık formülü

Molekül Formülü: $C_{27}H_{34}N_2O_7 \cdot HCl$

Molekül Ağırlığı : 535.04

CAS No: 82586-52-5

pKa 3.05 (25°); 5.40 (25°).

Ayrılma Katsayısı. Log P(pH 7.5), 0.25; (pH 1.0), 2.34.

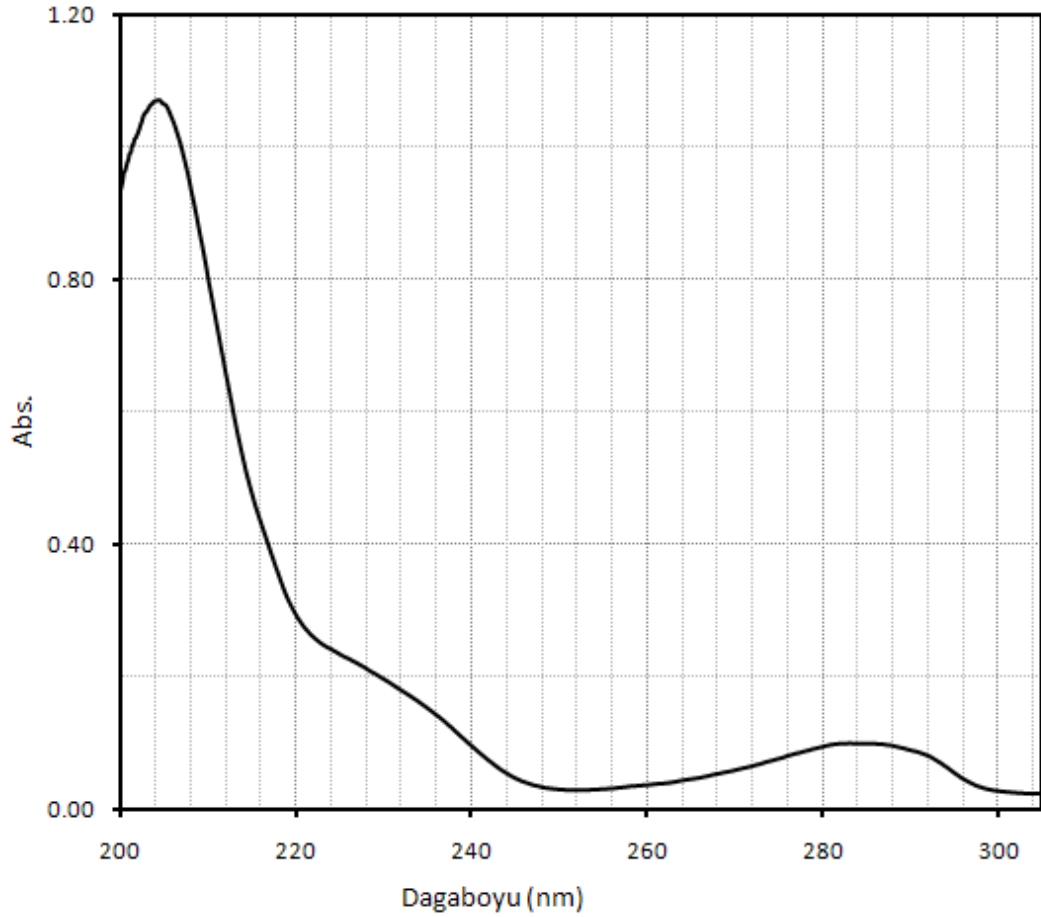
Açık Formülü: [3S-[2[R*(R*)], 3R*]]-2-[2-[[1-(etoksikarbonil)-3-fenilpropil]amino]-1-oksopropil]-1,2,3,4-tetrahidro -6,7- dimetoksi-3-izokinolinkarboksilik asit,monohidroklorür (Şekil 1.1)

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

Erime Noktası: 141°C ila 161°C

Fiziksel Özellikleri: Moeksipril hidroklorür ince, beyaz veya kirli beyaz renkte bir tozdur. Distile suda oda sıcaklığında çözünür (yaklaşık %10 ağırlık/hacim). Moeksipril hidroklorür 15-30°C arasındaki oda sıcaklığında sıkıca kapalı kaplarda saklanmalıdır. Nemden korunmalıdır.

Metanol içerisinde çözülmüş 10 µg/mL MOEX'in UV spektrumu Şekil 1.2 de gösterilmiştir.



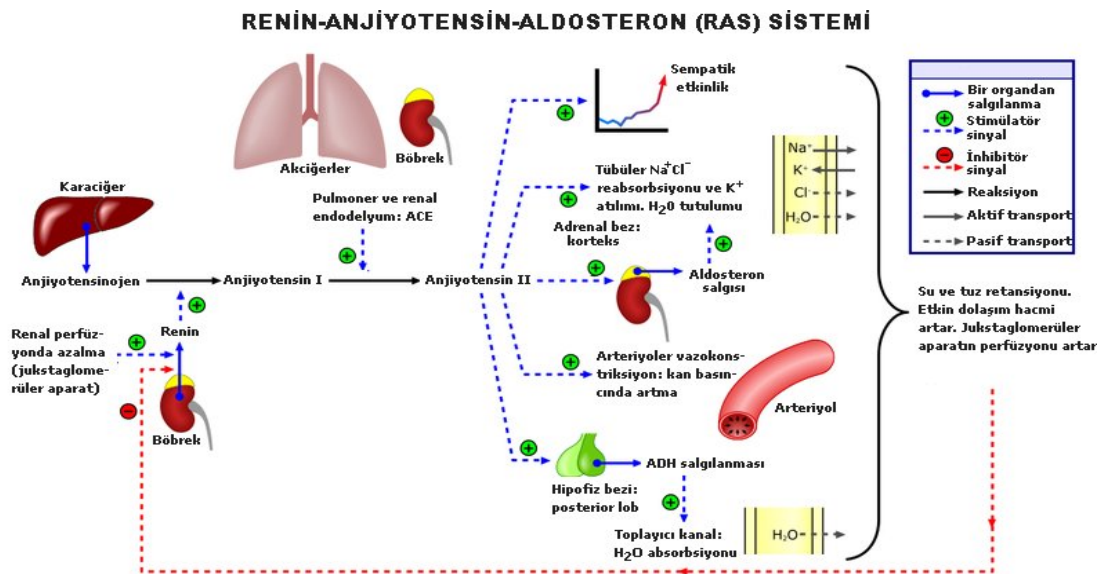
Şekil 1.2. Moeksipril hidroklorürün (10 µg/mL) UV spektrumu, (Çözücü:metanol)

1.1.2. Farmakolojik özellikleri

Moeksipril hipertansiyon tedavisi için oral yoldan kullanılan bir anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. Moeksiprilat, moeksipril'in ön ilacıdır (prodrug) ve ondan 1000 kat daha güçlüdür. Moeksipril'in uzun süreli antihipertansif etkisi günde bir kez verilerek kullanılmasına olanak verir. Kaptopril'den farklı olarak, moeksipril, advers etki profili ile yakından ilişkili olduğu düşünülen bir sülfhidril grubu içermez. Moeksipril FDA tarafından

Nisan 1995'te onaylanmıştır. Moeksipril ile birlikte hidroklorotiyazit adlı diüretik kombine olarak içeren ilaç preparatları (Uniretic®) da vardır.

Moeksiprilin moleküler yapısındaki aktif bölümü oluşturan moeksiprilat, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE)'nin üzerindeki bağlanma yeri için anjiyotensin I ile yarışır. Bunun bir sonucu olarak anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü bloke eder. Anjiyotensin II güçlü bir vazokonstriktör ve renin aktivitesinin negatif geri bildirim (feedback) mediyatörüdür. Bu nedenle, moeksiprilat anjiyotensin II'nin plazma düzeylerini düşürdüğü zaman, kan basıncı düşerken plazma renin aktivitesi yükselir. Ayrıca, kan basıncındaki düşmeye yanıt olarak baroreseptör refleks mekanizma uyarılır. Moeksiprilat, ADE ve kininaz II enzimini inhibe etmesi bakımından moeksiprilden 1000 kat daha etkilidir. ADE'ye özdeş olan kininaz II enzimi güçlü bir vazodilatör olan bradikininin inaktif peptidlere parçalar. ADE inhibitörlerinin hipotansif etkileri bakımından bradikininin kan basıncını düşürücü etkisinin ikincil bir önem taşıdığına inanılmaktadır (Şekil 1.3). Bununla birlikte, bradikinin, ADE inhibitörlerinin neden olduğu anjiyonörotik ödem ve öksürüğe katkıda bulunabilir (İsraili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. AnnIntern Med 1992;117:234-42).



Şekil 1.3. Moeksiprilin hidroklorürün farmakolojik etkisi

ADE-inhibitörü ilaçlar lokal anjiyotensin II'nin yaptığı sempatik ve/veya vazokonstriktör aktiviteyi azaltmalarına bağlı vasküler tonusu lokal olarak düşürebilirler. ADE inhibitörleri presinaptik noradrenalin salıverilmesini ve postsinaptik adrenerjik reseptör aktivitesini de inhibe edebilirler; böylece vazopresör etkinliğe karşı vasküler duyarlılığı azaltırlar. Ancak, moeksipril alışılmış klinik dozlarda kullanıldığında bu etkileri belirgin değildir. Plazma anjiyotensin II düzeylerindeki düşme aldosteron salgılanmasında da azalmaya neden olur ve bu nedenle vücuttaki sodyum ve su tutulumu azalır. Antihipertansif ilaçlar olarak, ADE inhibitörleri sol ventrikül hipertrofisini azaltır, insülin rezistansı veya hiperlipideminin kötüleşmesine yol açmazlar. Bu ilaçlar genellikle seksüel disfonksiyona da neden olmazlar.

Moeksiprilat arterlerde dilatasyon yaparak total periferik damar rezistansını düşürür. Hipertansif hastaların kan basıncını kalp hızı, atım hacmi veya kalp debisinde değişme yapmaksızın düşürürler. Moeksipril hem ayakta hem de yatar durumdaki hastalarda kan basıncını düşürür. Moeksipril tedavisi altındaki hastalarda semptomatik hipotansiyon nadirdir. İlaça karşı hipotansiyon yanıtı daha çok hipovolemik veya hiponatremik hastalarda görülür. Diğer ADE inhibitörleri ile olduğu gibi, moeksiprilin hipotansif etkisi beyaz ırka göre siyah ırkta daha zayıftır.

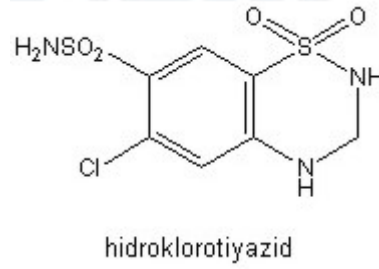
Moeksipril oral yoldan verilir. Bu yoldan uygulandığında tam olarak absorbe olmaz. Moeksiprilat olarak biyoyararlanımı sadece %13'tür. Absorbsiyonu besinlerden önemli ölçüde etkilenir; moeksiprilat'ın Cmaks ve AUC değerleri fazla yağlı olmayan bir kahvaltıdan sonra alındığında, sırasıyla, yaklaşık %70 ve %40 oranında azalır; yağlı bir diyetten sonra bu azalma % 80 ve % 50 oranlarında gerçekleşir. Moeksiprilat plazma proteinlerine % 50 oranında bağlanır. Moeksipril'in verilmesinin ardından ilacın moeksiprilat'a dönüşmesi oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşir, fakat önilaç moeksipril'in yarı-ömrü 1 saatin üzerindedir ve AUC değeri anlamlıdır. Moeksipril ve moeksiprilat'ın

yarı-ömür değerleri sırasıyla 1.3 ve 9.8 saattir. Moeksipril bu özelliği ile önilaç özelliği taşıyan diğer ACE inhibitörü ilaçlardan ayrılır. Moeksipril ve moeksiprilat diketopiperazin ve tanımlanmamış diğer metabolitlerine metabolize edilir. Oral yoldan verildiğinde, idararda sadece % 7 kadarı moeksiprilat olarak bulunur; %1'i moeksipril ve % 5'i de diğer metabolitleri halindedir. Feçeste oral yoldan verilen dozunun yaklaşık % 52'si moeksiprilat ve %1 kadarı da moeksipril halinde bulunur.

Özel popülasyonlar: Böbrek işlevlerinin azalması hem moeksipril hem de moeksiprilat metabolitlerinin yarı-ömür ve AUC değerlerinin artmasına neden olur. Kreatinin klirensi 10-40 mL/dk. olan hastalarda moeksipril'in yarı-ömrü 3-4 kat uzar. Moeksipril ve moeksiprilat'ın hemodiyalizle uzaklaştırılıp uzaklaştırılamayacağı bilinmemektedir. Hafif-orta derecede sirozlu hastalarda, moeksiprilat'ın AUC değeri hemen hemen %300 artar ve moeksiprilat serum konsantrasyonları %50 oranında azalır; buna karşın, önilaç moeksipril'in C_{maks} ve AUC değerlerinde artma görülür. Hepatik ve renal fonksiyonu normal olan yaşlı erkek hastalarda (65 yaş üzeri), moeksiprilat'ın AUC ve C_{maks} değerleri genç deneklere nazaran %30 daha yüksektir.

1.2. Hidroklorotiazid

1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler



Şekil 1.4. Hidroklorotiazidin açık formülü

Molekül Formülü: $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

Molekül ağırlığı: 297.7

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

Erime Noktası: 273°C ila 275°C.

pKa 7.0, 9.2.

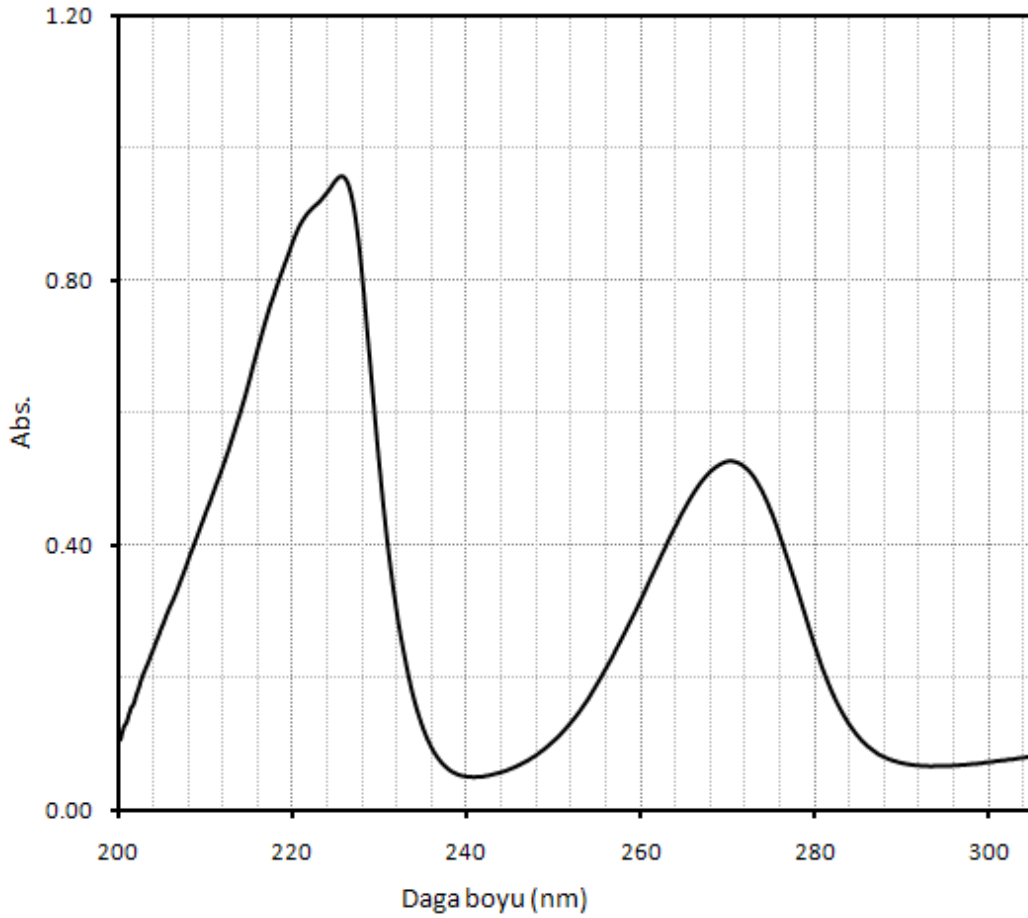
Ayrılma Katsayısı. Log P(oktanol/su), -0.1.

Açık formülü (Şekil 1.4):

1. 6-Kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiyadiazin-7-sülfonamid
1,1-dioksit
2. 6-Klor-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiyadiazin-7-sülfonamit-1,1-
dioksit (IUPAC)
3. 6-Kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiyadiazin-7-sülfonamit
1,1-dioksit (WHO)
4. 6-Klor-1,1-diokso-3,4-dihidro-2H-1λ6,2,4-
benzotiyadiazin-7-sülfonamit

Fiziksel Özellikleri:

Hidroklorotiyazid beyaz veya beyaza yakın renkte, kokusuz veya çok az kokulu kristalize bir tozdur. Suda hafif veya çok hafif çözünür; alkolde az çözünür; asetonda çözünür; dimetilformamid, n-butilamin ve alkali hidroksit çözeltilerinde çözünür; eter, kloroform ve seyreltik mineral asitlerde çözünmez. Hidroklorotiyazid 15-30°C arasındaki oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır. Işık ve rutubetten korunmalıdır. Metanol içerisinde çözünmüş 10 µg/mL MOEX'in UV spektrumu Şekil 1.5 de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Hidroklorotiazidin (10 µg/mL) UV spektrum, Çözücü : metanol

1.2.2. Farmakolojik özellikleri

Farmakodinamik Özellikleri

Hidroklorotiazid ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazit yapılı bir diüretiktir. Tiazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine kullanılırlar. Kıvrım diüretiklerinden farklı olarak, böbrek yetmezlikli hastalarda etkinlikleri zayıflar. Hidroklorotiazid diabetes insipidus ve hiperkalsüri tedavisi içinde de kullanılır. Hidroklorotiazid, FDA gebelikte ilaç kullanımı risk sınıflamasında B kategorisine dahildir (hayvan deneyleri ve gebelerde yapılan kontrollü çapraz çalışmalarda risk olasılığı doğrulanmamış ilaçlar). Çoğu uzman kalp hastalığı veya esansiyel hipertansiyonu olan gebe hastaların tedavisinde diüretik ilaçları rezerv olarak saklama eğilimindedir. Bunun nedeni diüretik kullanımının plasental perfüzyonda azalmaya yol açabilmesi ve eldeki bulguların gebelikte preeklampsi rahatsızlığında diüretik kullanımının pozitif bir yararı olduğunun gösterilememesidir (Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000;183:S1-S22.). Tiazit grubu diüretiklerin FDA gebelikte ilaç kullanımı risk sınıflamasındaki yeri uteroplakental perfüzyonu azalmış gebe kadınlarda (örn., preeklampsi veya intrauterin büyüme geriliği olan gebeler) D kategorisine yükselir (ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin.Chronic hypertension inpregnancy .Obstet Gynecol 2001;98:suppl 177-85.). Genelde, bulguların çoğunluğu tiazit diüretiklerin birinci trimesterde teratojenik olmadığını göstermesine rağmen, çoğu uzman diüretikleri ikinci ve üçüncü trimesterde kullanmayı tercih eder. Hidroklorotiazid ABD'de FDA tarafından 1959 yılında onaylanmıştır.

Tiazit grubu diüretikler böbrek tubulus epitelyumundan sodyum iyon transportunu inhibe ederek sodyum, klor ve suyun atılımını artırır. Tiazitlerin bu etkiyi göstermelerinde farklı mekanizmalar rol oynayabilirse de, yaptıkları diürezden sorumlu esas mekanizma Henle kıvrımının çıkan kolunun kortikal bölümü (kortikal dilüe edici segment) ile distal tubulusun proksimal bölümünde aktif klorür reabsorbsiyonunu inhibe etmeleridir. İkincil olarak sodyum reabsorbsiyonunu da azaltırlar. Klorür transportunu nasıl azalttıkları tam olarak bilinmemektedir. Tiazitler ayrıca potasyum ve bikarbonat atılımını artırır, kalsiyum ve ürik asit eliminasyonunu azaltırlar. Hidroklorotiazidlerin potasyum atılımını artırmaları renal tübülüslerin distal bölümünde sodyum yükünü artırmalarına (Na^+ iyonundan zengin filtrat) bağlıdır; böylece sodyum-potasyum değiş-tokuş mekanizmasını harekete geçirerek potasyum salgılanmasını indirekt olarak artırmış olurlar. Neden oldukları hipokloremi ve hipokalemi hafif metabolik alkalozu yol açabilir. Hidroklorotiazidlerin diüretik etkileri hastanın asit-baz dengesinden etkilenmez. Hidroklorotiazidler aldosteron antagonisti etki göstermezler ve esas etkileri karbonik anhidraz enzim inhibisyonundan bağımsızdır.

Hidroklorotiazidlerin antihipertansif etki mekanizması bilinmemektedir. Genellikle normal kan basıncını etkilemezler. Diüretikler başlangıçta kalp debisini düşürerek, plazma ve ekstraselüler sıvı hacmini azaltarak (hipovolemi) kan basıncını düşürürler. Ancak tedaviye birkaç hafta devam edildiğinde, düşen plazma hacmi yavaş yavaş normale dönmesine rağmen yaptıkları hipotansiyon devam eder. Bunun nedeni periferik vasküler rezistansta yaptıkları azalmadır ve olasılıkla damar düz kas hücrelerinin sempatik mediyatör noradrenalin'e karşı duyarlıklarının azaltılmasından kaynaklanır. Tiazit grubu diüretikler böbreklerde glomerüler filtrasyon hızını da azaltırlar; bu etkileri böbrek zafiyeti olan hastalarda efikasitelerinin düşük olmasını açıklar. Plazma hacminde yaptıkları azalma plazma renin aktivitesinin yükselmesine ve aldosteron salgılanmasının artmasına neden

olur; bu tiazid grubu diüretiklerle tedavide görülen potasyum kaybına katkıda bulunan bir faktördür.

Farmakokinetik Özellikleri

Hidroklorotiazidin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu verildiği farmasötik şekle ve verilen doza bağlı olarak değişkenlik gösterir. Sistemik biyoyararlanımı yaklaşık % 50-60'tır. Etkisi oral yolla verildikten 2 saat sonra başlar ve doruk etki düzeyine 4 saatte ulaşır. Toplam etki süresi 6-12 saattir. Hidroklorotiazid plasentayı aşmasına rağmen kan-beyin engelini aşamaz. Anne sütüne geçebilir. Hidroklorotiazid metabolize olmaz ve esas olarak idrarla değişmeden atılır; verilen dozun %61'i 24 saatte elimine olur.

Özel popülasyonlar: HCTZ'nin renal fonksiyonun durumuna bağlı farmakokinetiğini değerlendiren araştırmalardan elde edilen sonuçlar, eliminasyon yarı ömrünün renal yetmezlik derecesine göre değiştiğini ortaya koymuştur. Eliminasyon yarı ömrü böbrek fonksiyonu normal kimselerde 6.4 saat olmasına karşın, hafif renal yetmezliği olanlarda (30-90 mL/dak) 11.5 saate ve kreatinin klirensi 30 mL/dak değerinin altında olan hastalarda 20.7 saate kadar çıkar.

Moeksipril Hidroklorür-Hidroklorotiazid'in kombine kullanımında;

Moeksipril hidroklorür/Hidroklorotiazid'in olağan günlük dozu, 7.5 mg moeksipril hidroklorür/12.5 mg hidroklorotiazid veya 15 mg moeksipril hidroklorür/25 mg hidroklorotiazid'dir. 15mg moeksipril hidroklorür/25 mg hidroklorotiazid üzerindeki dozlar pek tavsiye edilmemektedir. Klinik bir çalışmada, dozun günde 30 mg moeksipril hidroklorür/50 mg hidroklorotiazid'e çıkarılması halinde, antihipertansif etkin maddenin 15 mg moeksipril hidroklorür/25 mg hidroklorotiazid uygulanmasının ardından görülen antihipertansif etkiyle kıyaslanabilir olduğunu göstermiştir. Günde 25

mg hidroklorotiazid ile kan basınçları yeterince kontrol altına alınan ancak bu rejim ile büyük miktarda potasyum kaybı yaşayan hastalar, Moeksipril hidroklorür/Hidroklorotiazid'in 7.5 mg/12.5 mg kombinasyon tedavisini uygulamaya başladığında daha az elektrolit düzensizliği ile kan basıncı üzerinde aynı kontrol sağlanabilir. Moeksipril hidroklorür/Hidroklorotiazid'in özel popülasyonlarda kullanımı izole edilmiş sistolik hipertansiyonlu hastalar, ayrıca incelenmemiştir.

Moeksipril monoterapisi -diğer ADE inhibitörü tedavilerinde olduğu gibi- siyahi bireylerde siyahi olmayanlara oranla daha az etkilidir. Yine de, klinik deneylerde Moeksipril hidroklorür/Hidroklorotiazid ile tedavi edilen siyahi hastaların 6'sında, antihipertansif etken maddesinin tüm popülasyona oranla kıyaslanabilir olduğu anlaşılmıştır. Her iki ilaç bir arada uygulandığında, moeksipril ve hidroklorotiazid'in farmakokinetik parametreleri değişmemiştir.

1.3. Moeksipril Hidroklorür ve Hidroklorotiazid için Günümüze Kadar Uygulanan Analiz Yöntemleri

1.3.1. Moeksipril Hidroklorür ve Hidroklorotiazid Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

Spektrofotometri ve YBSK

Ertürk ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada Moeksipril hidroklorür ve Hidroklorotiazid ikili karışımı içeren farmasötik formülasyonları için iki yeni basit ve seçici tayin metotları yayınlanmışlardır. İlk metot UV spektrometri ile sıfıra 215 ve 234 nm’de moeksipril ve hidroklorotiazid için ölçüm yapılarak, 2.dereceden türevlendirme ile oluşturulmuştur. Bu tayin moeksipril için 1.0 – 11.00 µg/mL konsantrasyonlarının üstünde ve hidroklorotiazid için 0.5 – 9.0 µg/mL konsantrasyonlarının üstünde doğrusaldır. Teşhis limiti moeksipril için 0.2 µg/mL ve Hidroklorotiazid için 0.1 µg/mL iken tayin limiti moeksipril ve hidroklorotiazid için 0.1 – 0.5 µg/mL’dir. İkinci metotta ise, isokritik ters faz kromatografi baz alınarak % 50 ACN, % 50 20mM pH=4.0 Fosfat tamponundan oluşmuş bir mobil faz kullanılmıştır. Burada Lisinopril iç standart olarak kullanılmıştır (IS) ve 212 nm’de tayin gerçekleştirilmiştir. Her iki etkin madde için de 0.5 – 12.0 µg/mL arasında çalışılmıştır. Tayin ve Teşhis limiti moeksipril için sırasıyla 0.1 µg/mL ve 0.01 µg/mL’dir; Hidroklorotiazid için sırasıyla 0.025 µg/mL ve 0.005 µg/mL olarak bulunmuştur. Metodun amacı ticari ve sentetik olarak yapılan bu iki etkin maddeyi içeren ilaçların yüksek yüzdeli, geri kazanılabilir, doğru ve kesin bir tayininin olmasıdır.

1.3.2. Hidroklorotiazid Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

Spektrofotometrik Yöntemler

Dinç ve Baleanu. (2002) yaptıkları bir çalışmada, Bir tabletteki Cilazapril ve Hidroklorotiazid'in eş zamanlı tayini için dört kemometrik metot uygulamışlardır. Klasik en küçük kareler, ters en küçük kareler kalibrasyonu, temel bileşen regrasyon ve kısmi en küçük kareler metotları iki etkin maddeli karışımlarda herhangi bir öncelikli grafiksel işlem gerektirmez. Tüm kemometrik kalibrasyonlarda iki etkin maddeyi içeren karışım 0.1 M HCl ve Metanolün 1:1'lik karışımı ile çözülüp hazırlanmıştır. 210 – 290 nm'lik spektrum bölgesinde $\Delta\lambda = 4$ nm aracılığıyla 15 dalgaboyu noktasın için 222 nm'den 276 nm'ye UV spektrumu ölçülmüştür. İncelen metotların kalibrasyonları sadece absorbans ve konsantrasyon matrislerini içerir. Geliştirilen kalibrasyonlar iki etkin maddeyi içeren sentetik karışımlar için test edilmiştir ve "Maple V" programı kemometrik hesaplamalarda kullanılmıştır. metotların her bir sonucu HPLC metotları ile de karşılaştırılmış ve iyi bir kabul edilebilirlikle karşılaştırılmıştır.

Carlucci ve ark. (2000) geliştirdikleri metotda Losartan potasyum ve hidroklorotiazidin eş zamanlı olarak tayini için tanımlamışlardır. Prosedürde ters faz HPLC baz alınmıştır; losartan potasyum için doğrusal konsantrasyon 3.0 – 7.0 µg/mL ve Hidroklorotiazid için ise 0.5 – 2.0 µg/mL'dir. Hızlı ve kolay doğruluk ve kesinlik sonuçları elde edilmiştir. Teşhis limiti Losartan için 0.08 µg/mL ve hidroklorotiazid için 0.05 µg/mL 'dir.

Panderi (1999) İkinci dereceden türevlendirme spektrofotometrik metodu bir farmasötik dozaj formundaki benazopril hidroklorür ve hidroklorotiazidin eş zamanlı tayini için tanımlanmıştır. Benazepril hidroklorür için doğrusal dinamik aralık 14.80 – 33.80 µg/mL ve hidroklorotiazid için 18.50 – 42.40 µg/mL'dir. Korelasyon katsayısı kalibrasyon grafiğinde 0.9998'dan daha iyi

olmalıdır.5 ölçüm için kesinlik yüzde bağıl standart sapması % 1.43 'dür ve doğruluk yeterli olmalıdır.teşhis limiti benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazid için 2.46 µg/mL ve 1.57 µg/mL bulunmuştur. Bu metodun ticari ilaçların kalite kontrolünde hızlı ve tekrar edilebilir kalitede olduğu ispatlanmıştır.

Dinç ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada, 4 kemometrik teknik,klasik en küçük kareler,ters en küçük kareler kalibrasyonu, temel bileşen regrasyon ve kısmi en küçük kareler metotları bir farmasötik preparattaki amiloride ve hidroklorotiazidin absorpsiyon ve türev spektrofotometresine uygulanmıştır. Dört kemometrik kalibrasyon sıfır ve birinci dereceden spektrum için yapılmış ve bunların dA/dλ değerleri 205 – 395 nm aralığında 2 – 10 µg/mL amiloride ve 4 - 28 µg/mL hidroklorotiazide karşılık gelecek 25 konsantrasyon aralığında karışımlar dizayn edilmiş ve 34 noktada ölçümü yapılmıştır.Kemometrik kalibrasyon kullanılan iki etkin maddeli karışımı doğrular. Absorpsiyon spektrumu ve birinci dereceden türevlendirmeyeyle elde edilen spektrum baz alınarak çalışılan teknik,istatistiksel olarak birbiriyle uyumlu olduğu sonuçlar kanıtlamıştır.

Ferraro ve ark.(2002) Ticari ve sentetik olarak hazırlanan bir tabletteki Hidroklorotiazid ve Amilorid hidroklorürün eş zamanlı analizi için çok değişkenli spektrofotometrik kalibrasyon kullanılmıştır.Kismi en küçük kareler analiziyle diğer ön hazırlık ve işlemlere gerek kalmadan karışımdaki analit oranı 10.1 v/v olacak şekilde spektrumda, hızlı ve doğru bir çözüm sağlamıştır. Metot her iki etkin maddeyi içeren sentetik karışımla valide edilmiştir; Burada kullanılan konsantrasyon aralığı hidroklorotiazid için 21.7 ila 30.4 µg/mL ve amilorid hidroklorür için 1.8 – 3.0 µg/mL'dir. Metotda, stabilitesinin iyi olması için analitler metanol su karışında çözünmüştür, ticari tabletlerin dissolüsyon profilleri değerlendirildiğinde sonuçlar USP metodunda gösterilenle uyumludur. Metot iki farklı etkin maddeyi içeren farmasötik formülasyonda işe yaramıştır, sonuçlar HPLC'de de mükemmel bir kabul edilebilirlik içerir.

Kartal ve Erk (1999) , Hızlı,kesin,eksiksiz ve spesifik oran spektrumları türev spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik işlemler;birleştirilmiş ilaç dozaj şekillerinde hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün eş zamanlı tayini için tanımlanmıştır.İlk metot için,oran spektrumları türev spektrofotometresinde,oran spektrumunun ilk türevinde karışımdaki sinyaller hidroklorotiazid için 285.7 nm ve amilorid hidroklorür için 302.5 nm’de ölçülmüştür. İkinci metot HPLC metodudur, 1.2 mL/dk. Akış oranında 0.025 M ortofosforik asit (Trietilamin ile pH’sı 3.0’a ayarlanmıştır), asetronitril hacmen 84:16 oranında karıştırılarak mobil faz hazırlanmıştır, LiChrosorb RP-C18 kolon (5 µm,200×4.6 mm) kullanılmış ve 278.0 nm’de dedeksiyon gerçekleşmiştir. Ticari ve sentetik olarak hazırlanmış her iki maddeyi içeren karışımların kantitatif tayinleri için metotlar geliştirilmişlerdir.

Erk (2001) Fosinopril ve Hidroklorotiazidin eş zamanlı olarak tayini için üç yeni spektrofotometrik prosedür tanımlanmıştır. 1.Metot Türev diferansiyel spektrofotometrisi, sırasıyla 227.6 nm ve 276.4 nm’deki dalga boylarında metanol içindeki eş molar 0.1 N Sodyum hidroksitte çözünmüş tabletin birinci dereceden türevinin alınmasına bağlıdır. İkinci metot, spektrumların üst üste getirilmesine orantılı olarak spektrum türevlendirme spektrofotometrik metod uygulamasına bağlıdır. Metanoldeki karışım orantılı spektrum birinci dereceden türevinde ikili karışımdaki Fosinopril için analitik sinyaller 237.4 ve 24.8 nm’de ve hidroklorotiazid için 262.4 , 269.3 ve 278.6 nm olarak ölçülmüştür. İkili karışımda kalibrasyon grafiği fosinopril için 4.0 – 50.0 µg/mL ve hidroklorotiazid için 2.0 -14.0 µg/mL’dir. Üçüncü metot,absorbans oran metosu, bu karışımın sıfırinci dereceden spektrumunda 210.0 , 219.5 ve 271.7 nm’de okunan absorbans değerleri kullanılarak fosinopril ve hidroklorotiazid tayini yapılmıştır. Geliştirilen metotlar absorbans oran metoduyla karşılaştırılmıştır. Bu bileşiklerin sentetik akışımları ve farmasötik preparatlarındaki tayinlerin başarılı bir şekilde uygulandığı gösterilmiştir.

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Carlucci ve ark. (2000) geliştirdikleri metotda Losartan potasyum ve hidroklorotiazidin eş zamanlı olarak tayini için tanımlamışlardır. Prosedürde ters faz HPLC baz alınmıştır; losartan potasyum için doğrusal konsantrasyon 3.0 – 7.0 µg/mL ve Hidroklorotiazid için ise 0.5 – 2.0 µg/mL'dir. Hızlı ve kolay doğruluk ve kesinlik sonuçları elde edilmiştir. Teşhis limiti Losartan için 0.08 µg/mL ve hidroklorotiazid için 0.05 µg/mL 'dir.

Thusleem ve ark. (2008) Basit ve kesin bir HPLC metodu geliştirilmiştir ve bisoprolol fumarat ve hidroklorotiazid içeren bir tablet formülasyonunda iki metot geliştirilerek valide edimiştir. Kromatografi 25 °C 'de 4 mm × 250 mm, 5 µm Siyano kolonla izokritik 1.0 mL/dk. Akışta, mobil fazın 0.1 N M susuz fosfat tamponu: Asetonitril: Tetrahidrofuran olduğu sistemde gerçekleşmiştir. UV dedeksiyonu 225 nm'dir. Hidroklorotiazid ve bisoprolol fumarat 10 dakikadan daha az sürede iyi bir rezolüsyon, düşük kuyruklanma ve başka bir pikolmaksızın ayrışır. Metot "ICH Guidelines"a göre valide edilmiştir ve doğruluk, kesinlik, seçicilik, sistem uygunluğu ve doğrusalite için kabul edilebilir kriterler taşır. Metot bisoprolol fumarat için 50 – 150 µg/mL ve hidroklorotiazid için 125 – 375 µg/mL aralığında doğrusaldır.

Ouyang ve ark. (1999) Dar çaplı likit kromatografide, hidroklorotiazid ve kaptopril'in tayini için ve iki bileşenli tablet formülasyonlarının kemiluminesans teşhisinde birleştirilmiştir. C₁₈ dar çaplı ters faz kolonu, sodyum oktan sülfonat iyon çifti reaktifine uygun olarak kullanılmıştır. Tiopronin iç standart olarak kullanılmıştır. Hidroklorotiazid için doğrusal konsantrasyon 0.6 – 200 µmol/L ve Kaptopril için 8 – 300 µg/mL olarak belirlenmiştir. Teşhis limiti her bir hidroklorotiazid enjeksiyonunda 5 pmol ve kaptopril için 67 pmol'dür. 30 µg/mL hidroklorotiazid için RSD(bağıl standart sapma) % 1.8 ve 66 µmol/L kaptopril için % 4.0'dır.

Vries ve ark. (1993), Diüretik etken madde olan hidroklorotiazid temel olarak ılımlı bir şekilde hipertansiyon tedavisinde kullanılır, ve genellikle diğer hammaddelerle etkinleştirilir. Bir insan plazmasındaki ve idrardaki hidroklorotiazidin HPLC ile miktar tayini geliştirilmiştir. Numuneler çözücü ekstaksiyonu ile saflaştırılmış ve ters faz kromatografi ile Ultraviolede analiz edilmiştir. Bu çalışmada hidroflumetiazid kullanılmıştır. Plazma gradient sistem kullanılarak ayrıştırılmış ve idrar izokritik olarak analiz edilmiştir. Metot baasitçe uygulanır, hassastır (Plazmadaki dedeksiyon limiti 0.01 µg/mL 'dir ve idrarda ise 0.02 µg/mL 'dir. Bu metot iyi bir tekrarlanabilirlik sergilemiştir (%3 - % 8). Metot oldukça kullanışlıdır fakat hastalar üzerinde numune yüksek hassasiyetle analiz edilerek kullanılmalıdır.

Idress ve Momani. (1998), Farmasötik tabletlerdeki hidroklorotiazid ve enalapri maleat tayini için bir HPLC prosedürü yayınlanmıştır. Tiyofillil'in iç standart olarak kullanıldığı % 15'lik asetronitrilin çözücü olarak kullanıldığı, supelcosil LC-8 150×4.6 mm, 5 µm kolonla yapılan yöntemle mobil faz 3mM tetrabutylamonyum hidroksi sülfat tamponu; Asetonitril; Su karışımından oluşup pH'sı 4.1'e glasiyel asetik asit ile ayarlanmıştır. Dedeksiyon 220 nm'de gerçekleşir. Metodun doğrusalılığı, güvenilirliği, seçiciliği ve tekrarlanabilirliği test edilmiştir

Şatana ve ark. (2001), Birinci dereceden türev UV spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) , birleştirilmiş ilaç dozaj şekillerinde hidroklorotiazid ve valsartan için eş zamanlı tayini için kullanılmıştır. Türev işleminde, etkin madde konsantrasyonu vesırasıyla valsartan ve hidroklorotiazid için 270.6 nm ve 335 nm'de ilk türev büyüklükleri arasındaki doğrusal ilişki esas alınmıştır. Kalibrasyon grafikleri, hidroklorotiazid için 4.0 – 12.1 µg/mL ve valsartan için 12.0 – 36.1 µg/mL oranında doğrusaldır. Buna ilaveten, 225 nm'de dedekte edilen UV ile yüksek performanslı sıvı kromatografi işlemi kıyaslanan metot için geliştirilmiştir. HPLC işlemi için 0.02 M Fosfat tamponu (pH 3.2): Asetonitril hacmen 55:45 oranında karıştırılarak mobil faz yapılmış ve ters faz kolon, hidroklorotiazid ve valsartan için

ayrılmasında kullanılmıştır. Valsartan ve Hidroklorotiazid sırasıyla 0,06 – 1,8 µg/mL ve 0.07 – 0.5 µg/mL’de çizgisel olarak bulunan konsantrasyonlarına karşılık her bir etkin maddenin iç standardının pik alanı oranı gösterilmiştir. Bu metodun amacı ticari tabletler ve laboratuarda hazırlanan karışımlarda bu etkin maddelerin tayininin başarılı olarak yapılabilmesidir.

Ferthing ve ark. (2005), İnsan idrarındaki hidroklorotiazidin tayini için kullanılabilir bir dar çaplı kromatografi HPLC’de geliştirilmiştir. Çalışmadaki ayırma işleminde mobil faz olarak % 0.1 susuz asetik asit ve asetonitril (93:7, v/v) karışımı pH 3.0’e ayarlanarak C₁₈ analitik kolon ve UV dedektör kullanılmıştır. Metot, 2 – 50 µg/mL aralığında doğrusaldır. 50 µL idrarda teşhis limiti 1 µg/mL’dir. Bu metot hidroklorotiazidin dinamik ve farmakokinetik farklılıkları olduğunda çalışmalarına yararlılık getirmek için kullanılmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, moeksipril ve hidroklorotiazid içeren farmasotik preparatın kantitatif analizi, hiç bir ayırma işlemi uygulanmadan sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemlerinin sonuçları, türev spektrofotometri ve sıvı kromatografisi yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

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 etkileşimleri incelerken, günümüzde madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri 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/s), genlik, frekans (ν) ve dalga boyu (λ) gibi çeşitli parametreler ile karakterize edilir.

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

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

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

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

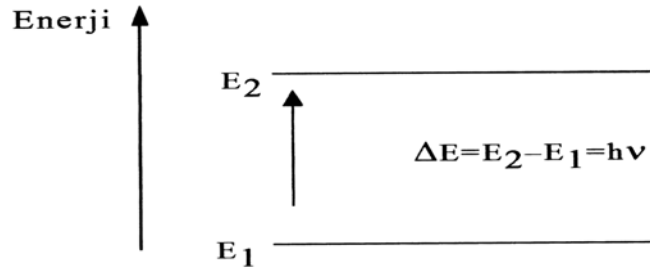
Işık; atom ve moleküller tarafından absorbe edilebilir. UV ve görünür alandaki ışığın absorpsiyonu molekülü oluşturan atomların bağ elektronları ile ilgilidir.

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:

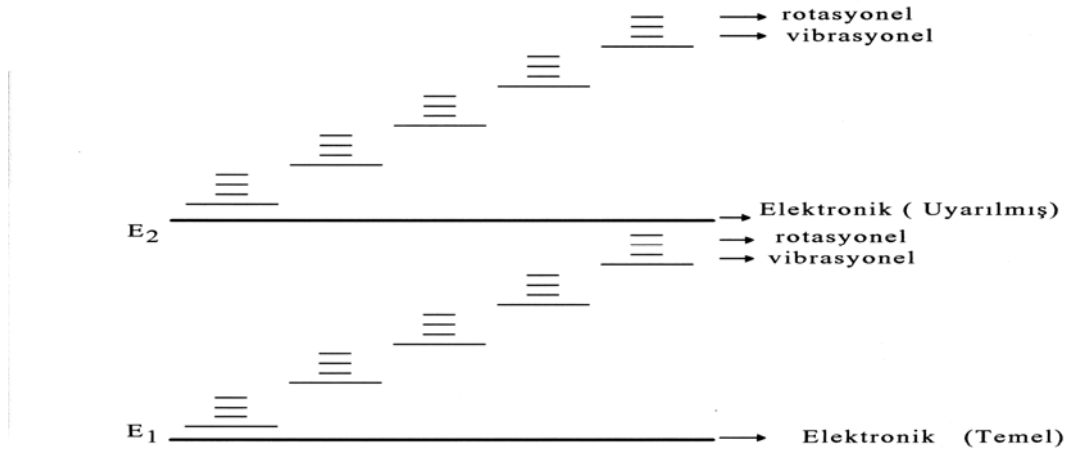
$$E_{\text{toplam}} = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}} + E_{\text{ötelenme}}$$

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 bütününe 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.

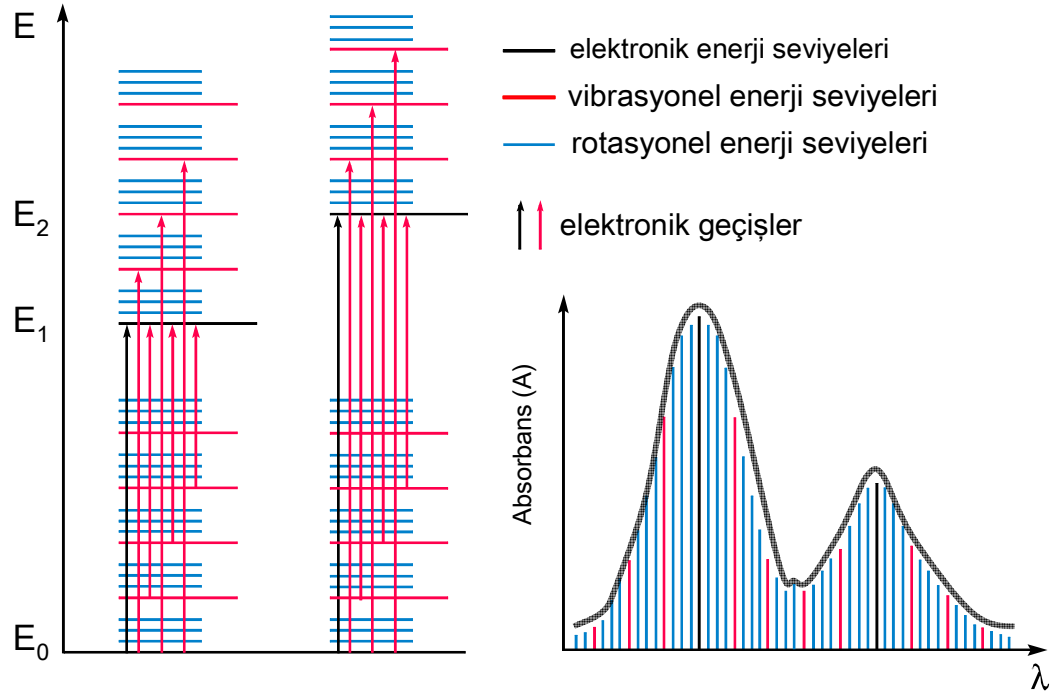
ii-Nükleer vibrasyon: 1-15 Kcal/mol derecesinde bir enerji (2-25 mikrondaki ışık) ile gerçekleşebilir ve bu olay sonucunda infrared (IR) spektrumu meydana gelir.

Hangi spektrum bölgesinde olursa olsun belli bir dalga boyundaki ışığın absorpsiyonu enerjisi 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

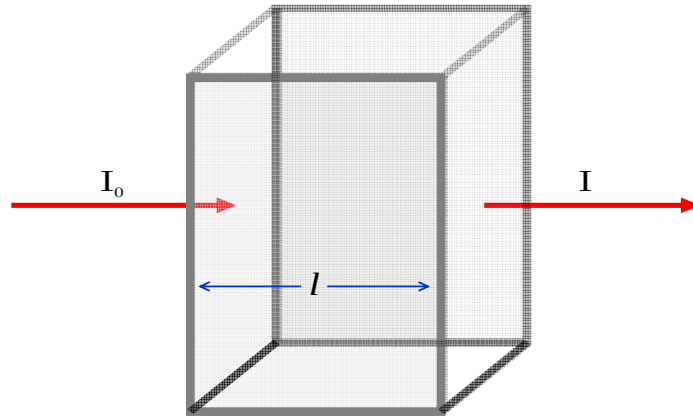
sayıda çizgiden meydana gelen “çizgi spektrumu” görülür (atomik absorpsiyon spektrofotometresi).

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 alan 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,

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

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,

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

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

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

Bu eşitlik kısaca,

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

şeklinde verilir ve bu eşitlikten konsantrasyon (C) hesaplanabilir.

Bu bağıntıda A değeri C 'ye karşı grafiğe geçirilirse eğimi $E \cdot l$ 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.

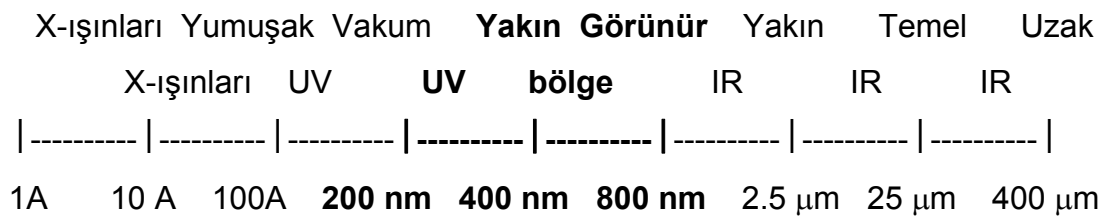
ii) *Kimyasal maddelerden kaynaklanan sapmalar*: Ölçüm yapılan çözeltide meydana gelen iyonlara ayrışma, birleşme, kompleks oluşumu, fosforesans

ve floresans 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.

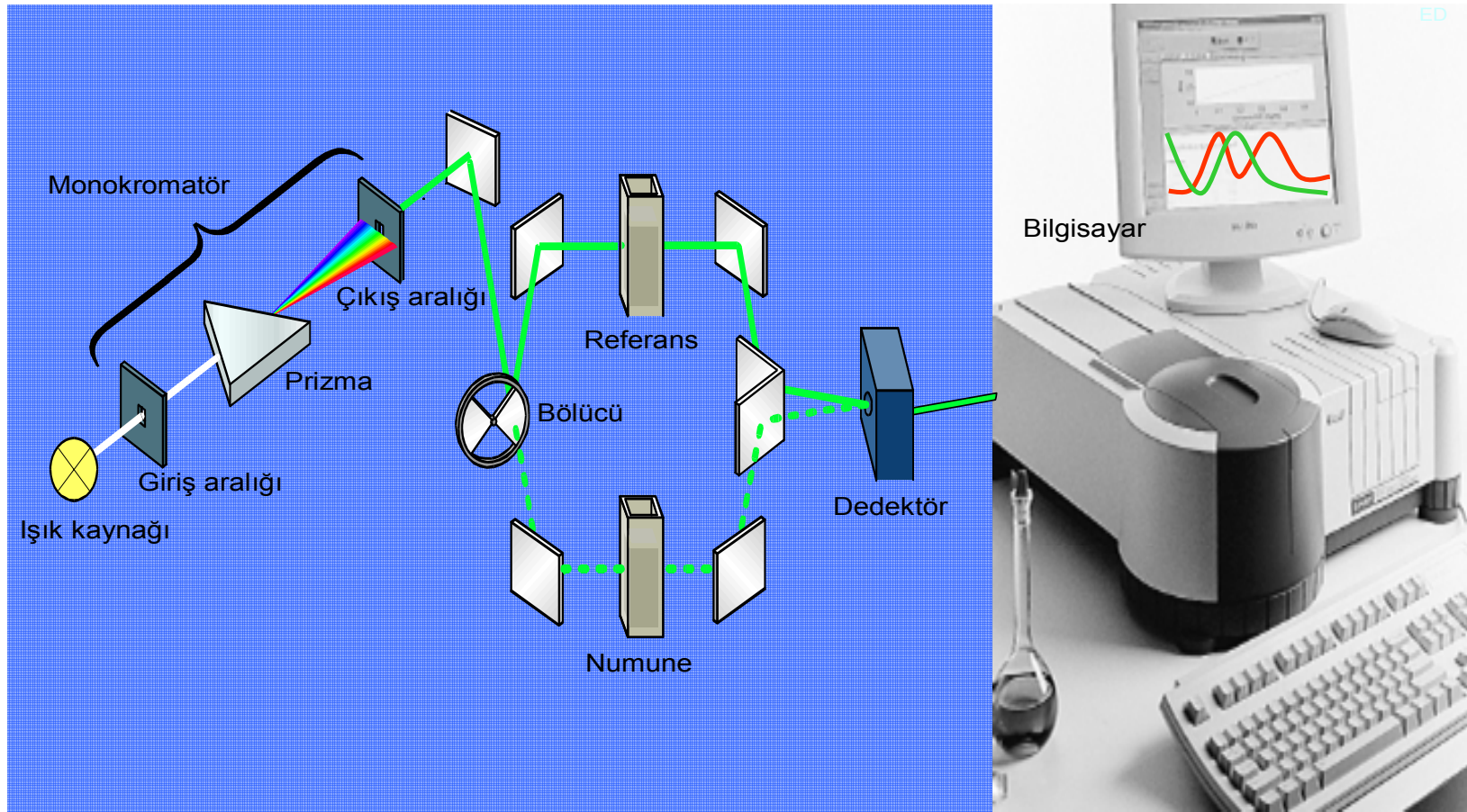
Moleküllerin elektromanyetik dalgalarla, özellikle ultraviyole, görünür alan ve enfraruj ışınları ile uyarılması sonucu meydana gelen absorpsiyondan, molekül hakkında kalitatif ve kantitatif bilgi edinmek mümkündür

(Absorbsiyon 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 absorbsiyon 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)

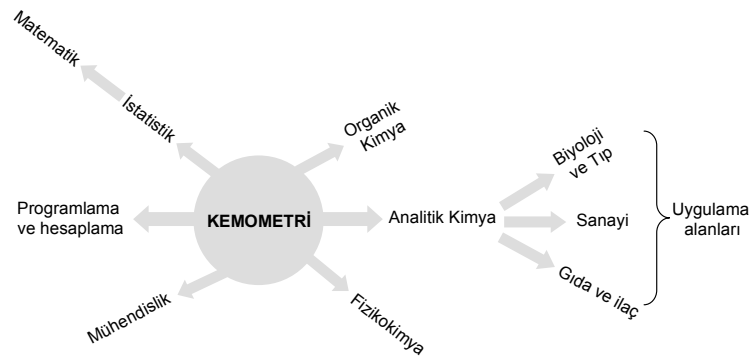
Bu kemometrik yöntemlere rağbet edilmesi, kimya ve de analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunmasına bağlanabilir. Yapılan bilimsel çalışmaların sonucu yayınlanan makaleler göstermiştir ki son 15 yıl içinde 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), görüntü 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 malzeme 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 tez kapsamında kullanılan kemometrik yöntemler olan PCR ve PLS algoritmaları aşağıda sunulmaktadır.

2.2.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları (Multivariate Calibration Algorithms)

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 absorban 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 doğrusal bileşenidir.

PCR algoritmasında genel doğrusal regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A \quad (1)$$

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

$$b = P \cdot q \quad (2)$$

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:

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_o \quad (3)$$

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

$$t_1 = A_0.P_1 \quad (4)$$

Ortalanmış absorbands ve konsantrasyon, A_0 ve C_0 ile gösterilebilir. Burada a sabiti genel doğrusal regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir :

$$a = C_0 - A_0^T \cdot b \quad (5)$$

Herbir aşamada elde edilen değerler 1 no'lu denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

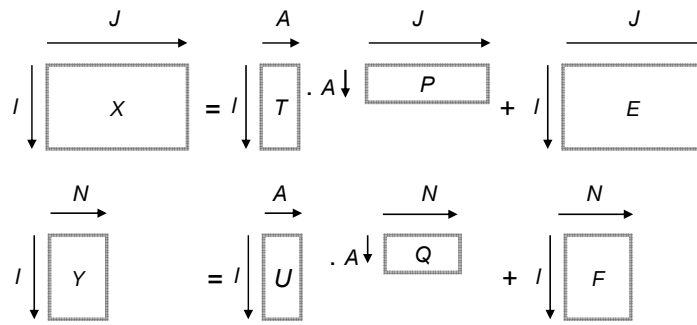
a) Yöntemin avantajları; i) dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir, ii) çok bileşen analiz için kullanılabilir, iii) PCR data işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına 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 absorbandsların 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.

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

$$\begin{aligned}
 X &= T P^T + E \\
 Y &= U Q^T + F \\
 Y &= X B + F \\
 B &= W (P^T W)^{-1} Q^T
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

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 = $\max(\text{kovaryans}(E, F))$

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 yansıtmaları 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 doğrusalılıktan 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 (mean squares error of validations → MSEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (mean squares error of cross validations → MSECv) gibi parametreler kullanılmaktadır. MSEC ve MSECv değerlerinin minimum yapan faktör sayısı kalibrasyon koşulları kullanılır.

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemi (cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için hesaplanan MSEC ve MSECv değerleri faktör sayısına karşı grafiğe geçilir ve ilk minimum

MSEC ve MSECv değerlerine karşılık gelen faktör sayısı kalibrasyonlarda dikkate alınır. (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.

$$SDD_{a,b}(x) = \frac{1}{\sqrt{|a|}} \Psi\left(\frac{x-b}{a}\right), \quad a, b \in \mathbb{R}, \quad a \neq 0 \quad (7)$$

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:

$$\begin{aligned} SDD \{f(x); a, b\} &= \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \psi_{ab}^*(x) \\ &= \langle f(x), \psi_{a,b} \rangle \end{aligned} \quad (8)$$

Vektörlerin dönüşümünde, vektörlerin 2^n sayıda ölçüm verisini içermesi şart olup, analitik uygulamalarda bu gözetilmeyebilir. (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	<i>'haar'</i>
Mexican Hat Function	<i>'mexh'</i>
Daubechies	<i>'db1 ve 'db2'..., 'db10'</i>
Coiflets	<i>'coif1', ... , 'coif5'</i>
Symlets	<i>'sym2', ... , 'sym8'</i>
Discrete Meyer	<i>'dmey'</i>
Biorthogonal	<i>'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'</i>
Reverse Biorthogonal	<i>'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'</i>
Gauss	<i>'gaus1', ... , 'gaus8'</i>
Meyer	<i>'meyr'</i>
Morlet	<i>'morl'</i>

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:

$$A_{kar., \lambda_i} = \alpha_{M, \lambda_i} C_M + \beta_{N, \lambda_i} C_N \quad (9)$$

Bu eşitlikte, $A_{kar., \lambda_i}$ λ dalga boyunda karışımın absorbansı. 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 :

$$SDD [A_{kar., \lambda_i}] = SDD [\alpha_{M, \lambda_i}] C_M + SDD [\beta_{N, \lambda_i}] C_M \quad (10)$$

Yukarıdaki 2 nolu eşitlik SDD-katsayısı cinsinden ifade edilebilir:

$$C_{a,b} (A_{kar., \lambda_i}) = SDD [\alpha_{M, \lambda_i}] C_M + SDD [\beta_{N, \lambda_i}] C_M \quad (11)$$

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

$$C_{a,b}(A_{kar,\lambda_i}) = SDD[\alpha_{M,\lambda_i}]C_M \quad (12)$$

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

Karışımdaki 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 karışımdaki M bileşiğinin konsantrasyonu hesaplanır. Bu işlem karışımdaki 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

Shimadzu Auto Sampler SIL 20 A HPLC Sistem

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

GL Science Inertsil® ODS 3V HPLC Kolonu.

Agilent Vial

Spektrofotometre (UV/ VIS): Shimadzu UV- 2550

Kuvartz küvet

Hassas terazi: Schimadzu 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 Bilgisayar Yazılımları

Microsoft Excel

Matlab 7.10 Software

PLS Toolbox 3.5 Software

Shimadzu LC Solution Software

UV Probe 2.33

2.3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol (Merck)

Potasyum Dihidrojen Fosfat(K_2HPO_4)

2.3.4. Analiz Edilen Bileşiklerin Ticari Preparatı

Fempress PLUS[®] (Tablet) Actavis Deutschland

Moeksipril hidroklorür:15.0 mg

Hidroklorotiazid:..... 25.0 mg

3. BULGULAR

Bir kombine farmasötik preparattaki MOEX ve HCT bileşiklerinin kantitatif analizine çok değişkenli kalibrasyona ve sinyal işlemeye dayalı kemometrik yöntemler geliştirilmesi amaçlandı. Bu kapsamda, MOEX ve HCT karışımının çok değişkenli kalibrasyon yöntemleriyle analizi için çok değişkenli kalibrasyon yöntemi kalibrasyon yöntemleri geliştirildi. Bu yöntemler PCR (Temel bileşen regresyon yöntemi) ve PLS (Kısmi en küçük kareler yöntemi) olarak adlandırılır. Ayrıca MOEX - HCT karışımının analizi için sinyal işleme yöntemi (Doubachies sürekli dalgacık dönüşüm $\rightarrow$ db5-SDD) geliştirildi. Bu yöntemin geliştirilmesinde optimal koşulların bulunması en yüksek geri kazanım sonuçlarına göre saptandı. Geliştirilen kemometrik yöntemler MOEX ve HCT içeren yapay karışımların ve tabletlerin kantitatif analizine uygulandı.

Tez kapsamında MOEX ve HCT bileşiklerinin aynı anda kantitatif analizi için geliştirilen çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla türev spektrofotometri ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi geliştirilerek karşılaştırma yöntemleri olarak karışımlardaki MOEX ve HCT'nin analizine uygulandı.

3.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Çok Değişkenli kalibrasyon yöntemleri olarak PCR, PLS kalibrasyonlarının uygulaması için spektral koşulların optimizasyonu ve optimal kalibrasyon setinin hazırlanması için ön çalışmalar yapıldı. Saptanan spektral koşullarda kalibrasyon setinin ve numunelerin 200-305 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda=0.05$ nm aralıkları ile absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve bilgisayarın hafızasına

kaydedildi. Kemometrik kalibrasyonlar, bilgisayarın hafızasına kaydedilen konsantrasyon (kalibrasyon) setinin spektrumları çağrılarak 218-290 nm dalga boyu bölgesinde 1441×36 boyutunda absorbans setinin matrisi kullanılarak elde edildi. Bu işlem için PCR ve PLS algoritmaları konsantrasyon setine (36×2) ve absorbans setine (1441×36), Bölüm 2.2.1.1 ve 2.2.1.2 de açıklandığı gibi uygulanarak PCR ve PLS kalibrasyonları hesaplandı. Bu çok değişkenli PCR ve PLS yöntemleri yapay karışımlardaki ve tabletlerdeki MOEX ve HCT analizine uygulandı.

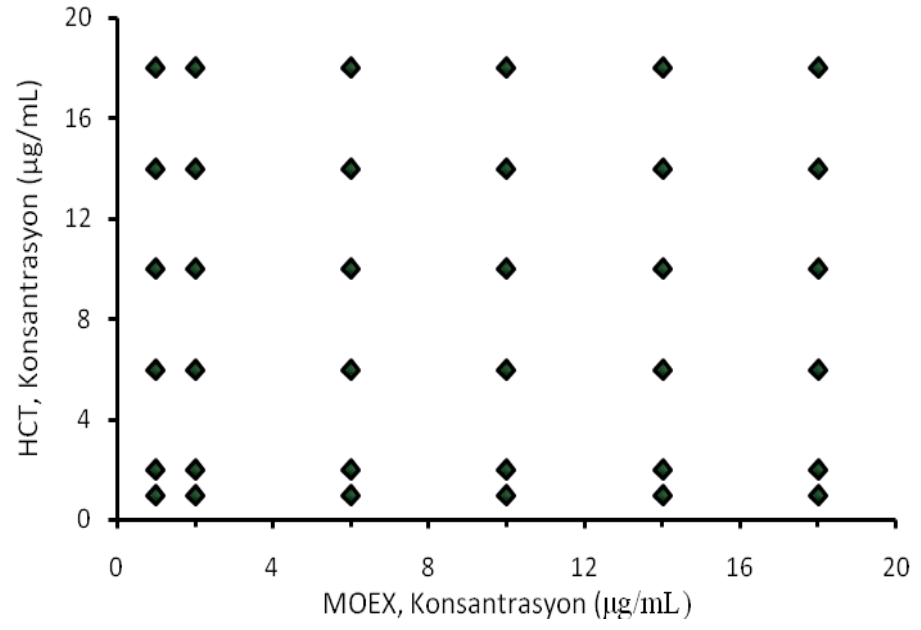
3.1.1. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Çalışmada PCR ve PLS kalibrasyonları için metanol içerisinde MOEX için 1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$ ve HCT için 1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında her iki bileşiği içeren 36 değişik kompozisyonda simetrik bir kalibrasyon seti hazırlandı. Bu hazırlanan konsantrasyon seti Çizelge 3.1. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. MOEX ve HCT analizi için konsantrasyon seti

Konsantrasyon seti					
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)			Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)		
No.	MOEX	HCT	No.	MOEX	HCT
1	1	1	19	10	1
2	1	2	20	10	2
3	1	6	21	10	6
4	1	10	22	10	10
5	1	14	23	10	14
6	1	18	24	10	18
7	2	1	25	14	1
8	2	2	26	14	2
9	2	6	27	14	6
10	2	10	28	14	10
11	2	14	29	14	14
12	2	18	30	14	18
13	6	1	31	18	1
14	6	2	32	18	2
15	6	6	33	18	6
16	6	10	34	18	10
17	6	14	35	18	14
18	6	18	36	18	18

PLS ve PCR kalibrasyonları için Çizelge 3.1.'de gösterildiği gibi simetrik bir konsantrasyon seti hazırlandı. Bu simetrik konsantrasyonun faydası rastgele oluşabilecek hataların minimize edilmesidir. Çizelge 3.1.'deki simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki projeksiyon grafiği Şekil 3.1.'de görülmektedir.



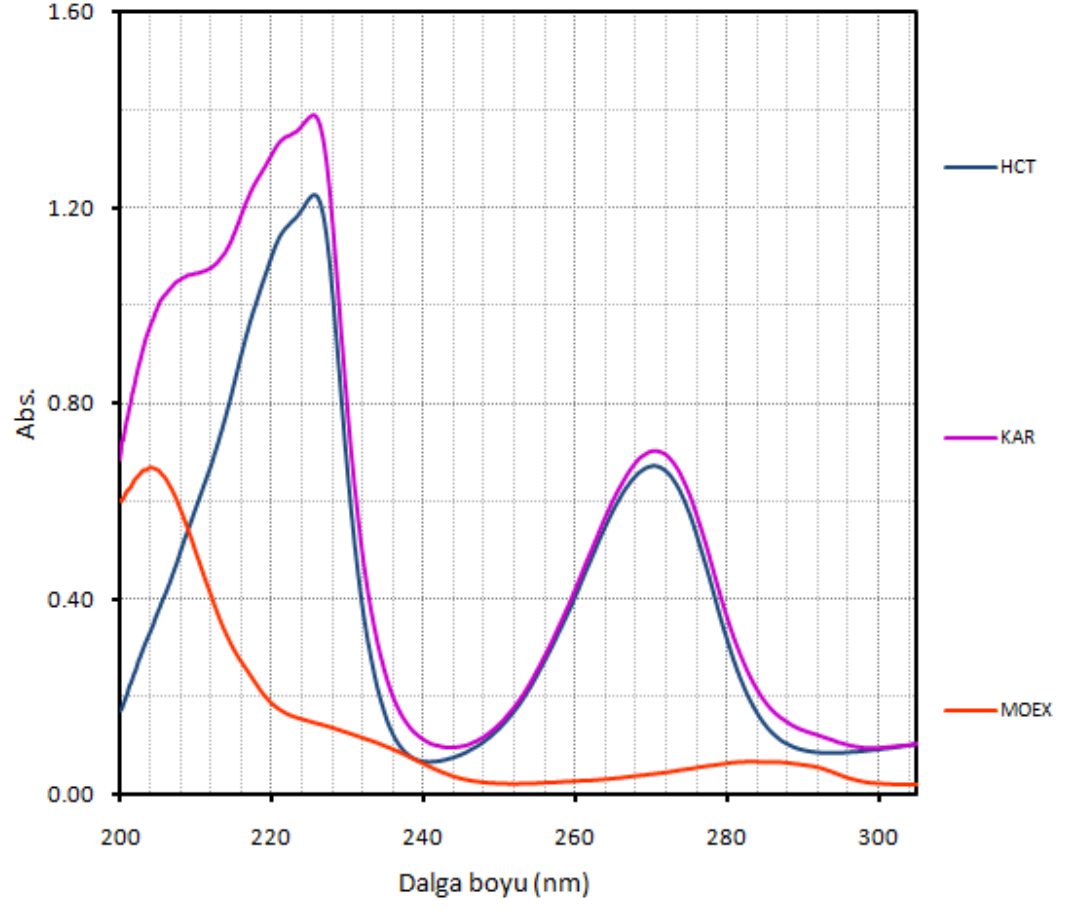
Şekil 3.1. Kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği

Analizi yapılacak bileşikleri içeren simetrik konsantrasyon seti 1.0–18.0 µg/mL çalışma aralığında olup, farmasötik preparatta yer alan MOEX ve HCT'in seyreltilmiş konsantrasyonlarını kapsamaktadır.

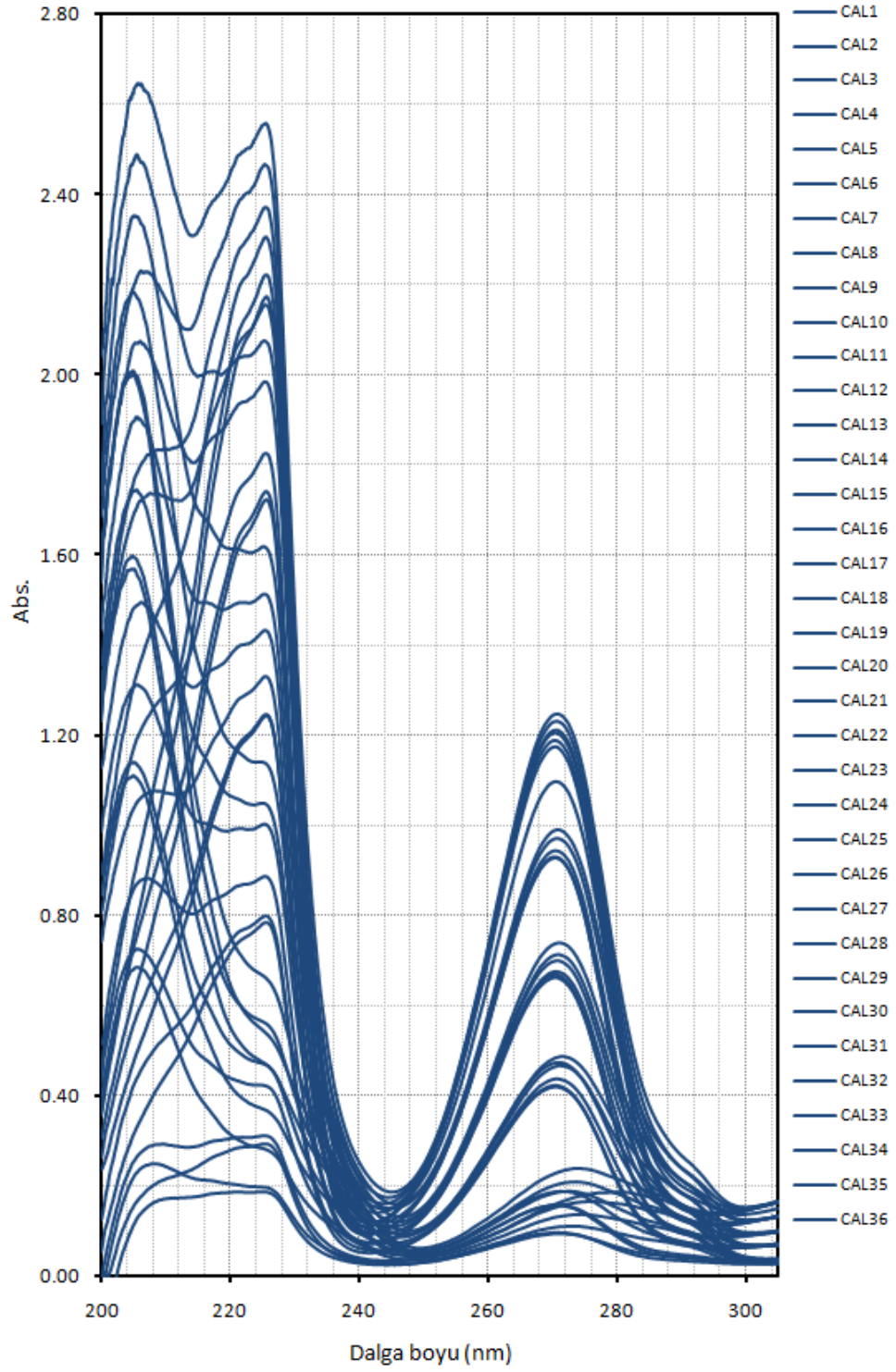
3.1.2. Çok Değişkenli Kalibrasyonların Absorpsiyon Spektrumlarına Uygulamasında Spektral Koşulların Optimizasyonu

Analitik yöntemlerin geliştirilmesinde optimal deneysel koşulların saptanması yaşamsal öneme sahiptir. Bu kapsamda PCR ve PLS yöntemlerinin uygulanmasında, MOEX ve HCT spektrumların veya spektral verilerin elde edilmesi için metanolün uygun çözücü olduğu saptandı. Bu çözücü içerisinde MOEX ve HCT bileşiklerin ve karışımlarının 200-305 nm dalga boyu aralığında spektrumları çizdirildi (Şekil 3.2.). Şekil 3.2. den de görüldüğü gibi MOEX–HCT’in spektral bantları aynı dalga boyu aralığında çakışmaktadır. Dolayısıyla klasik spektroskopik yaklaşımlarla MOEX ve HCT bileşiklerinin aynı anda miktar tayinleri olanaklı değildir. Bu nedenle PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri tabletlerdeki MOEX ve HCT’nin analizine uygulandı.

Bu kapsamda kalibrasyon yöntemleri için Çizelge 3.1. deki kalibrasyon seti hazırlandı ve bu kalibrasyon setinin 200-305 nm dalga boyu aralığındaki spektrumları çizdirildi (Şekil 3.3). Aynı spektral işlemler yapay ve gerçek numuneler içinde uygulandı. Kemometrik PCR ve PLS kalibrasyonlarının hesaplanmasında hazırlanan konsantrasyon seti için 200-305 nm dalga boyu bölgesinde absorbans değerleri ölçüldü. Ancak Kalibrasyon için 218-290 nm dalga boyu aralığındaki $\Delta\lambda=0.05$ nm aralıklar ile absorbans ölçümlerinden oluşan 1441x36 absorbans verilerinin matrisi kullanıldı (Şekil 3.3). Bunun nedeni Spektral ölçümlerde tablet yardımcı maddelerinin etkisinin olmadığı ve spektral duyarlılığın yüksek olacağı düşünülen 218-290 nm dalga boyu aralığındaki ölçülen absorbans verileri absorbans seti olarak seçildi. Çalışmalarımızda 218-290 nm dalga boyu aralığı PCR ve PLS kalibrasyonlar için optimal olduğu yapılan test analizleriyle saptandı.



Şekil 3.2. MOEX (6.0 µg/mL) ve HCT (10.0 µg/mL) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın (KAR) absorpsiyon spektrumları (Metanol içerisinde).



Şekil 3.3. MOEX ve HCT için Çizelge 3.1. ve Şekil 3.1. de verilen kalibrasyon setinin absorpsiyon spektrumları (Metanol içerisinde).

3.1.3. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi

Bu bölümde PCR yöntemi; Bölüm 3.1.1.de açıklandığı gibi hazırlanan konsantrasyon setinin Bölüm 3.1.2'de açıklandığı gibi ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşenlerin regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 2.2.1.2. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu (Principal Component Regression Calibration)

Çalışmada, Kemometrik PCR kalibrasyon için Çizelge 3.1 de hazırlanan konsantrasyon setinin 218-290 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklarla 1441 noktada absorbans değerleri okundu (Şekil 3.3). Bölüm 2.2.1.'de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Konsantrasyon seti için ölçülen 1441x36 veriler matrisinin parçalanma işlemine tabi tutulmasından sonra elde edilen temel bileşenlerin, konsantrasyon seti ile arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kuruldu. MOEX ve HCT içeren numunelerin 218-290 nm dalga boyu aralığında absorbans değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda yerine konularak MOEX ve HCT'nin konsantrasyonları hesaplandı.

PCR Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Kemometrik PCR yönteminin validasyon işlemi için metanol çözeltisi içerisinde MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 20 adet yapay karışımını içeren çözeltilerden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. PCR ile geri kazanım değerleri MOEX için % 101.2, HCT için % 99.1 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri MOEX için % 2.24 ve HCT için %2.78 olarak hesaplandı. PCR kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2 de sunuldu.

Çizelge 3.2. PCR yönteminin MOEX-HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	İkili Karışım		Bulunan		Geri Kazanım	
	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1	1.0	10.0	0.96	9.95	95.8	99.5
2	2.0	10.0	1.90	9.79	94.8	97.9
3	4.0	10.0	4.06	9.73	101.5	97.3
4	6.0	10.0	6.20	9.73	103.3	97.3
5	8.0	10.0	8.16	9.82	102.0	98.2
6	10.0	10.0	10.22	9.85	102.2	98.5
7	12.0	10.0	12.26	9.78	102.1	97.8
8	14.0	10.0	14.17	9.81	101.2	98.1
9	16.0	10.0	16.12	9.80	100.7	98.0
10	18.0	10.0	18.23	9.94	101.3	99.4
11	6.0	1.0	6.22	0.93	103.7	92.8
12	6.0	2.0	6.08	2.14	101.4	107.2
13	6.0	4.0	6.11	4.14	101.8	103.5
14	6.0	6.0	6.11	6.05	101.8	100.8
15	6.0	8.0	6.14	7.95	102.3	99.4
16	6.0	10.0	6.20	9.73	103.3	97.3
17	6.0	12.0	6.09	11.98	101.5	99.8
18	6.0	14.0	6.11	13.88	101.9	99.1
19	6.0	16.0	6.13	16.08	102.2	100.5
20	6.0	18.0	5.95	17.93	99.1	99.6
				$\bar{X}$	101.2	99.1
				SS	2.24	2.78
				BSS	2.22	2.81

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

Diğer bir validasyon işlemi olarak PCR yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analiz çalışmalarında kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (MOEX için 4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim için beş 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. PCR yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.0	3.00	4.09	3.03	0.16	0.04	3.94	1.18	2.26	0.94	102.3	100.9
8.0	10.00	8.17	9.96	0.41	0.09	4.97	0.92	2.07	-0.36	102.1	99.6
12.0	15.00	12.55	15.03	0.42	0.03	3.38	0.18	4.54	0.23	104.5	100.2

Günler arası (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.0	3.00	4.05	3.05	0.04	0.12	0.99	3.79	1.20	1.61	101.2	101.6
8.0	10.00	8.34	10.03	0.38	0.09	4.61	0.94	4.24	0.26	104.2	100.3
12.0	15.00	12.40	15.13	0.26	0.10	2.12	0.68	3.32	0.84	103.3	100.8

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

BH=% Bağıl Hata, SS=Standart Sapma, BSS=% Bağıl Standart Sapma,

Tez kapsamında geliştirilen PCR kalibrasyon yöntemini gerçek tablet numunelerine ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce tablet yardımcı maddelerinin MOEX ve HCT içeren farmasötik preparatların analizine etkisi olup

olmadığını gözlemlemek için hesaplanan kalibrasyon için test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmelerin yapılmasıyla preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 1.20 µg/mL MOEX ve 2.00 µg/mL HCT'e karşılık gelen numune ve bu içeriğin üzerine 1.20, 4.80 ve 9.60 µg/mL MOEX ve 2.00, 8.00 ve 16.00 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Fempress PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen MOEX ve HCT miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki MOEX ve HCT için geri kazanım ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. PCR yönteminin uygulanmasında standart ilavesi tekniği ile elde edilen sonuçlar çizelge 3.4'te sunuldu.

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

Standart İlavesi											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1.20	2.00	1.20	1.96	0.03	0.01	2.23	0.36	0.28	-1.78	100.3	98.2
4.80	8.00	4.81	8.10	0.11	0.19	2.37	2.37	0.14	1.28	100.1	101.3
9.60	16.00	10.08	16.30	0.15	0.25	1.50	1.51	5.01	1.85	105.0	101.8

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

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=% Bağıl Standart Sapma

PCR Yöntemi İçin Varyans Analizi

Kemometrik PCR yöntemiyle gün içi günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantrasyonda (MOEX için 4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim ve beş farklı numune için elde edilen sonuçlara varyans analizi testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında serbestlik derecesi $n_1 = 5$ ve $n_2 = 24$ için % 95 olasılık düzeyinde F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık MOEX için hesaplanan F-test değeri 0.62 ve p-değeri 0.68, HCT için hesaplanan F-test değeri 0.77 ve p-değeri 0.58 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri > $p=0.05$ olduğu için % 95 olasılık düzeyinde gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. ANOVA sonuçları 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
MOEX	Gruplar arası	43.27	5	8.65	0.62	0.68	2.62
	Grup içi	333.30	24	13.89			
	Toplam	376.57	29				
HCT	Gruplar arası	11.87	5	2.37	0.77	0.58	2.62
	Grup içi	73.86	24	3.08			
	Toplam	85.74	29				

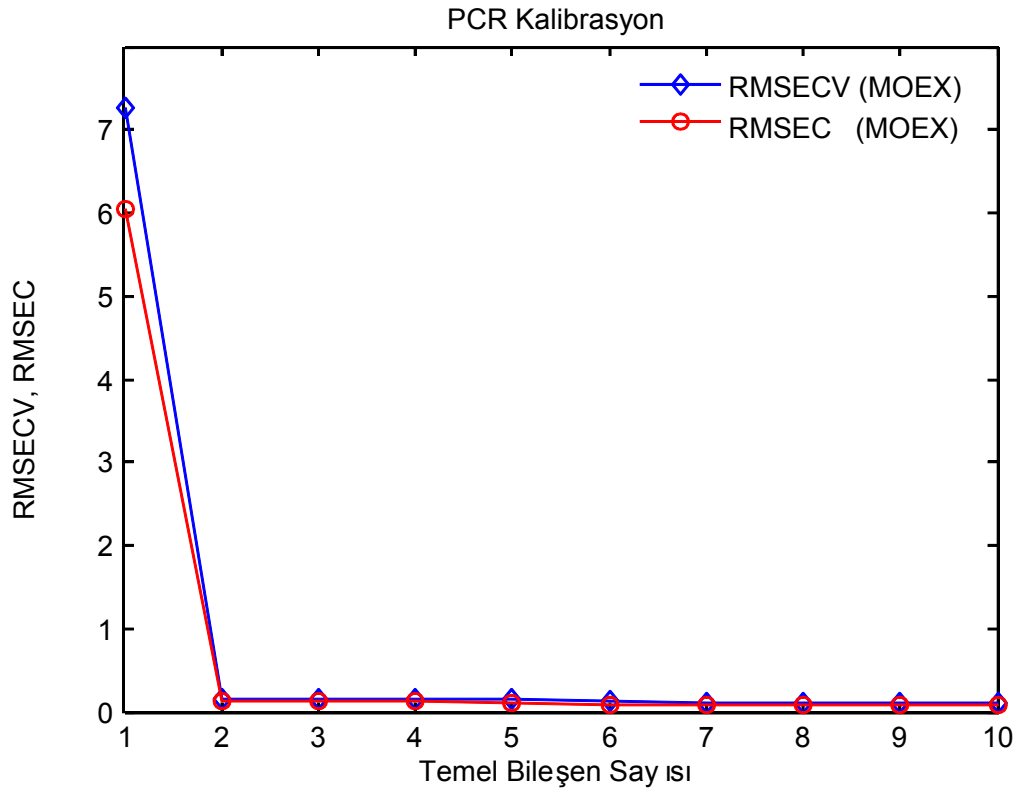
PCR Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Çapraz Validasyon ve Faktör Sayısının Seçimi

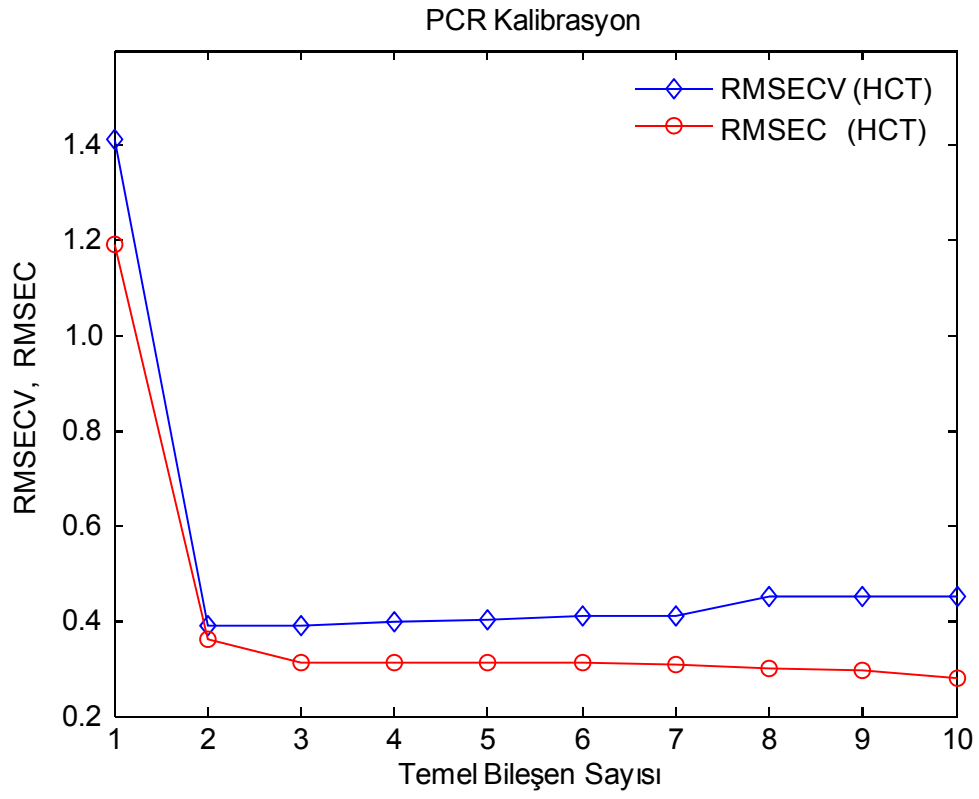
Çalışmalarda PCR kalibrasyonunun kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon (cross-validation) işlemi uygulandı. Bunun için minimum RMSECV (çapraz validasyonda hataların karelerinin ortalamasının karekökü) değerine karşılık gelen faktör sayısı dikkate alındı. Ayrıca, PCR kalibrasyonu için optimal faktör seçimi için RMSEC (kalibrasyonda hataların karelerinin ortalamasının karekökü) değerinin en küçük değere sahip olduğu faktör sayısında işlemlerde göz önünde bulunduruldu.

PCR kalibrasyonunda Şekil 3.4' de MOEX için ve Şekil 3.5'de HCT için temel bileşen (faktör) sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen projeksiyondan kalibrasyon için optimal kullanılması gereken faktör temel bileşen sayısı görülmektedir.

PCR yöntemiyle MOEX ve HCT analizi için ilk iki faktörün uygun olduğu ve sırasıyla RMSECV ile RMSEC değerleri, MOEX için 0.1305 ve 0.1592 ile HCT için 0.3618 ve 0.4019 olduğu bulundu.



Şekil 3.4. MOEX için temel bileşen sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizdirildiğinde elde edilen grafik



Şekil 3.5. HCT için temel bileşen sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizdirildiğinde elde edilen grafik

PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada kemometrik 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 içerisinde çözöldü. Balonjoje içeriğı mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzöldü. Bu numune çözeltilerinin 200-305 nm dalga boyu bölgesinde spektrumları çizdirildi ve 218-290 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05 \text{ nm}$ aralıklarla öölçölen absorbens değeriğine bölüm 2.2.1.3. de açıklanan PCR algoritmasına göre PCR kalibrasyonuna ait denklemde yerine konularak tablet içeriğindeki MOEX ve HCT miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

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

Çizelge 3.6. PCR yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)

No.	mg/tablet	
	MOEX	HCT
1	15.46	25.31
2	15.17	25.32
3	15.07	25.02
4	14.52	25.03
5	15.00	24.58
6	15.13	25.41
7	15.20	25.28
8	15.62	25.78
9	15.71	25.34
10	15.53	25.09
$\bar{X}$	15.24	25.21
SS	0.35	0.31
BSS	2.32	1.24
SH	0.11	0.10
GA	15.24 $\pm$ 0.22	25.21 $\pm$ 0.19

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

3.1.4. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi Partial Least-Squares (PLS) Calibration Method

Kemometrik PLS yöntemi, konsantrasyon seti ve ölçülen absorbands matrisinin parçalanmasıyla elde edilen bileşenlerin korelasyonuna dayanan bir yöntemdir. PLS algoritmasının ayrıntılı kuramsal temeli Bölüm 2.2.1. de verilmiştir.

Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu

Kemometrik PLS kalibrasyon için Çizelge 3.1 de hazırlanan konsantrasyon setinin 218-290 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklarla 1441 noktada absorbands değerleri okundu (Şekil 3.3). Bölüm 2.2.1.2. de açıklanan PLS algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbands ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Konsantrasyon seti için ölçülen 1441x36 veriler matrisinin parçalanma işlemine tabi tutulmasından sonra elde edilen gerçek değişkenler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kuruldu. MOEX ve HCT içeren numunelerin 218-290 nm dalga aralığında $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklar ile absorbands değerleri okunarak PLS kalibrasyonunda yerine konularak MOEX ve HCT'nin konsantrasyonları hesaplandı.

PLS Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

Kemometrik PLS yönteminin validasyon işlemi için metanol çözeltisi içerisinde MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 20 adet yapay karışımını içeren çözeltilerden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan PLS kalibrasyon yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi. PLS ile geri kazanım değerleri MOEX için % 101.1, HCT için % 99.0 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri MOEX için % 2.38 ve HCT için %1.81 olarak hesaplandı. PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7 de sunuldu.

Çizelge 3.7. PLS yönteminin MOEX-HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	İkili Karışım		Bulunan		Geri Kazanım	
	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1	1.0	10.0	0.95	9.95	95.3	99.5
2	2.0	10.0	1.89	9.79	94.3	97.9
3	4.0	10.0	4.06	9.73	101.5	97.3
4	6.0	10.0	6.20	9.73	103.3	97.3
5	8.0	10.0	8.16	9.82	102.0	98.2
6	10.0	10.0	10.22	9.85	102.2	98.5
7	12.0	10.0	12.26	9.78	102.1	97.8
8	14.0	10.0	14.17	9.81	101.2	98.1
9	16.0	10.0	16.12	9.80	100.7	98.0
10	18.0	10.0	18.23	9.94	101.3	99.4
11	6.0	1.0	6.22	0.96	103.7	95.8
12	6.0	2.0	6.08	2.04	101.4	102.2
13	6.0	4.0	6.11	4.14	101.8	103.5
14	6.0	6.0	6.11	6.05	101.8	100.8
15	6.0	8.0	6.14	7.95	102.3	99.4
16	6.0	10.0	6.20	9.73	103.3	97.3
17	6.0	12.0	6.09	11.98	101.5	99.8
18	6.0	14.0	6.11	13.88	101.9	99.1
19	6.0	16.0	6.13	16.08	102.2	100.5
20	6.0	18.0	5.95	17.93	99.1	99.6
				$\bar{X}$	101.1	99.0
				SS	2.38	1.81
				BSS	2.36	1.82

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

Diğer bir validasyon işlemi olarak PLS yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (MOEX için 4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim için beş farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Gün içi ve günler arası analiz çalışmalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.8. PLS yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.0	3.00	4.04	3.05	0.06	0.04	1.52	1.39	1.08	1.73	101.1	101.7
8.0	10.00	8.07	9.92	0.27	0.02	3.33	0.19	0.88	-0.76	100.9	99.2
12.0	15.00	12.20	15.03	0.13	0.03	1.10	0.18	1.69	0.23	101.7	100.2

Günler arası (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.0	3.00	4.14	3.11	0.12	0.08	2.89	2.58	3.48	3.65	103.5	103.7
8.0	10.00	8.28	10.10	0.28	0.49	3.38	4.82	3.47	0.96	103.5	101.0
12.0	15.00	12.07	15.13	0.02	0.10	0.15	0.68	0.58	0.84	100.6	100.8

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

BH=% Bağıl Hata, SS=Standart Sapma, BSS=% Bağıl Standart Sapma

Tez çalışmasında geliştirilen PLS kalibrasyon yöntemini gerçek ticari tabletlere uygulamadan önce tablet yardımcı maddelerinin MOEX ve HCT içeren

farmasötik preparatların analizi üzerine 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 içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltme yapılarak preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 1.20 µg/mL MOEX ve 2.0 µg/mL HCT'e karşılık gelen numune ve bu içeriğin üzerine 1.20, 4.80 ve 9.60 µg/mL MOEX ve 2.00, 8.00 ve 16.00 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Fempres PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen MOEX ve HCT miktarları PLS kalibrasyonu ile hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki MOEX ve HCT için geri kazanım ve istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu deneyler üç farklı konsantrasyon seviyesinde üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Bu uygulamayla standart ilavesi tekniği ile elde edilen sonuçlar çizelge 3.9'da sunuldu.

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

Standart İlavesi (n=3)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1.20	2.00	1.20	1.95	0.03	0.02	2.28	0.90	0.00	-2.27	100.00	97.73
4.80	8.00	4.82	8.32	0.04	0.04	0.91	0.49	0.52	4.06	100.52	104.06
9.60	16.00	9.87	16.14	0.06	0.03	0.60	0.21	2.82	0.90	102.82	100.90

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

GK=Geri Kazanım, SS=Standart Sapma, BSS=% Bağıl Standart Sapma

PLS Yöntemi İçin Varyans Analizi

Kemometrik PLS yöntemiyle gün içi günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantrasyonda (MOEX için 4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve herbir derişim için beş farklı numune için elde edilen sonuçlara varyans analizi (ANOVA) testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında serbestlik derecesi $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 olasılık düzeyinde F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık MOEX için hesaplanan F-test değeri 1.41 ve p-değeri 0.26, HCT için hesaplanan F-test değeri 2.02 ve p-değeri 0.11 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 olasılık düzeyinde gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. ANOVA test sonuçları Çizelge 3.10 de sunulmuştur.

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
MOEX	Gruplar arası	42.26	5	8.45	1.41	0.26	2.62
	Grup içi	144.22	24	6.01			
	Toplam	186.48	29				
HCT	Gruplar arası	56.09	5	11.22	2.02	0.11	2.62
	Grup içi	144.22	24	6.01			
	Toplam	186.48	29				

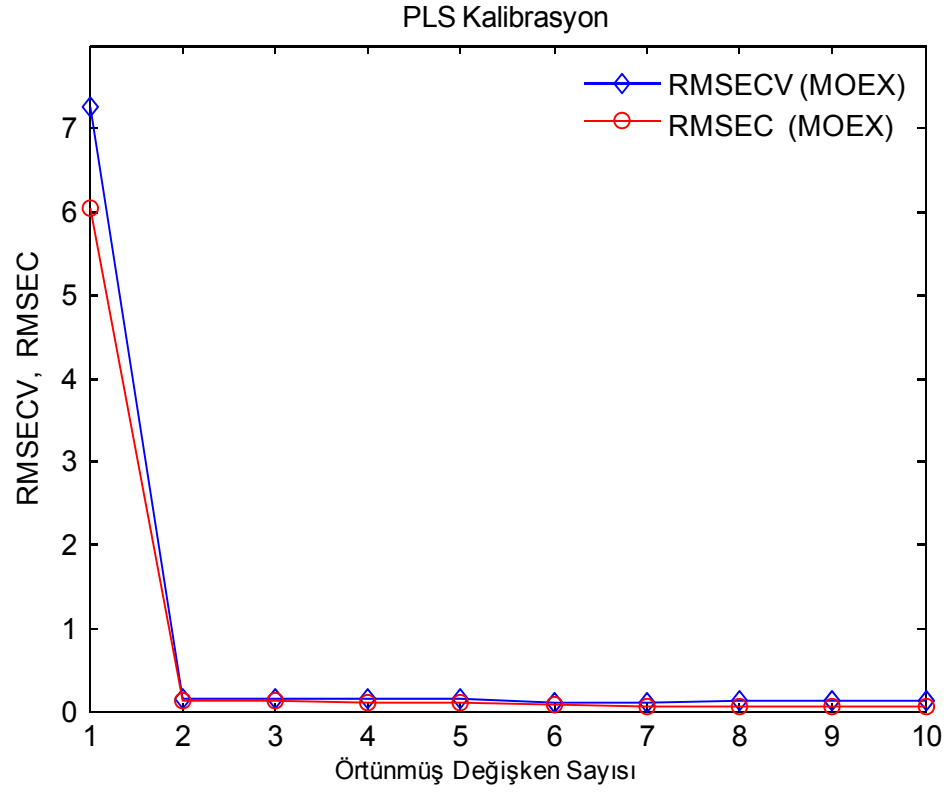
PLS Yönteminde Kalibrasyon Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Çapraz Validasyon ve Faktör Sayısının Seçimi

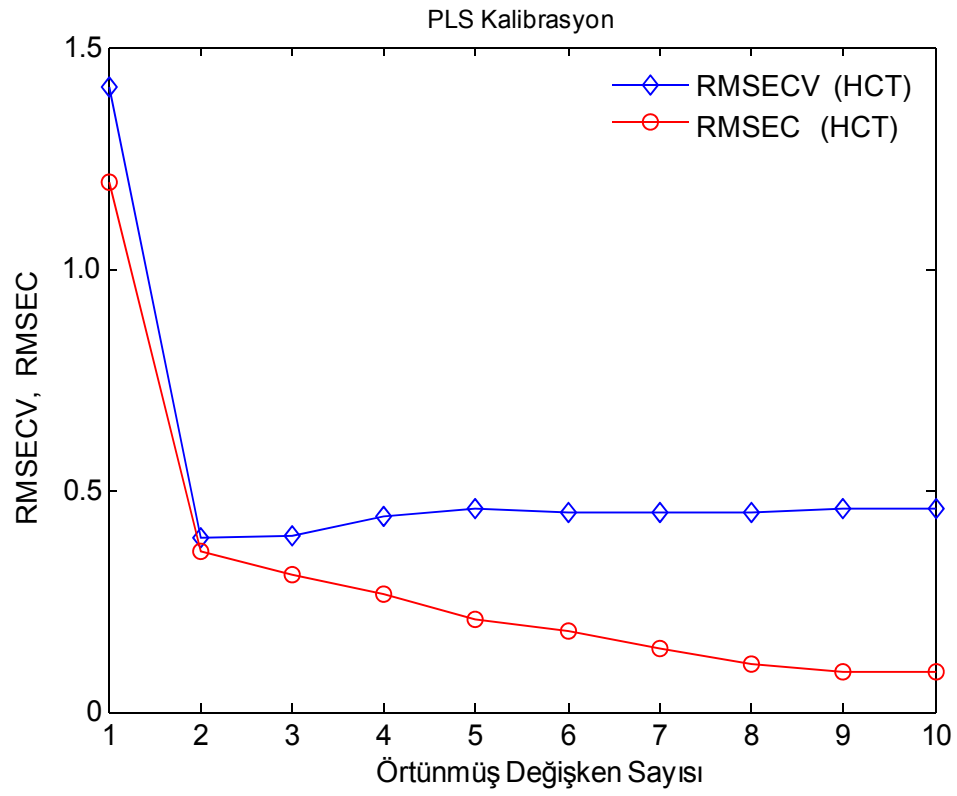
Bağımsız (konsantrasyon) ve bağımlı (absorbans) değişkenlerin kovaryansına dayanan PLS kalibrasyonunun kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon (cross-validation) işlemi uygulandı. Bunun için minimum RMSECV (çapraz validasyonda hataların karelerinin ortalamasının karekökü) değerine karşılık gelen faktör (örtünmüş değişken) sayısı dikkate alındı. Ayrıca, PLS kalibrasyonu için optimal faktör seçimi için RMSEC (kalibrasyonda hataların karelerinin ortalamasının karekökü) değerinin en küçük değere sahip olduğu değere karşılık gelen faktör sayısında PLS kalibrasyon algoritmasında dikkate alındı.

Şekil 3.6' da MOEX için ve Şekil 3.7'de HCT için örtünmüş değişken (faktör) sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen projeksiyondan kalibrasyon için optimal kullanılması gereken örtünmüş değişken sayısı görülmektedir.

PLS kalibrasyonunda karışımlardaki MOEX ve HCT analizi için kurulacak PLS kalibrasyonu için ilk iki faktörün uygun olduğu ve sırasıyla RMSECV ve RMSEC değerleri MOEX için 0.1290 ve 0.1553; HCT için 0.3598 ve 0.3919 olarak hesaplandı.



Şekil 3.6. MOEX için örtünmüş değişken (faktör) sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizdirildiğinde elde edilen grafik



Şekil 3.7. HCT için örtünmüş değişken (faktör) sayısı RMSECV ve RMSEC değerlerine karşı çizdirildiğinde elde edilen grafik

PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada kemometrik PLS yönteminin ticari preparata uygulanmasında 20 tablet, sırasıyla tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol 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 200-305 nm dalga boyu bölgesinde spektrumları çizdirildi ve 218-290 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbans değerlerine bölüm 2.2.1.2. de açıklanan PLS algoritmasına göre PLS kalibrasyonuna ait denklemde yerine konularak tablet içeriğindeki MOEX ve HCT miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

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

Çizelge 3.11. PLS yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)

No.	PLS mg/tablet	
	MOEX	HCT
1	15.40	25.24
2	14.90	25.24
3	15.18	24.76
4	15.09	24.97
5	14.95	24.62
6	15.94	25.35
7	15.36	25.20
8	15.33	25.24
9	15.42	25.21
10	15.04	25.03
$\bar{X}$	15.26	25.09
SS	0.30	0.24
BSS	1.98	0.95
SH	0.10	0.08
GA	15.26 $\pm$ 0.19	25.09 $\pm$ 0.15

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

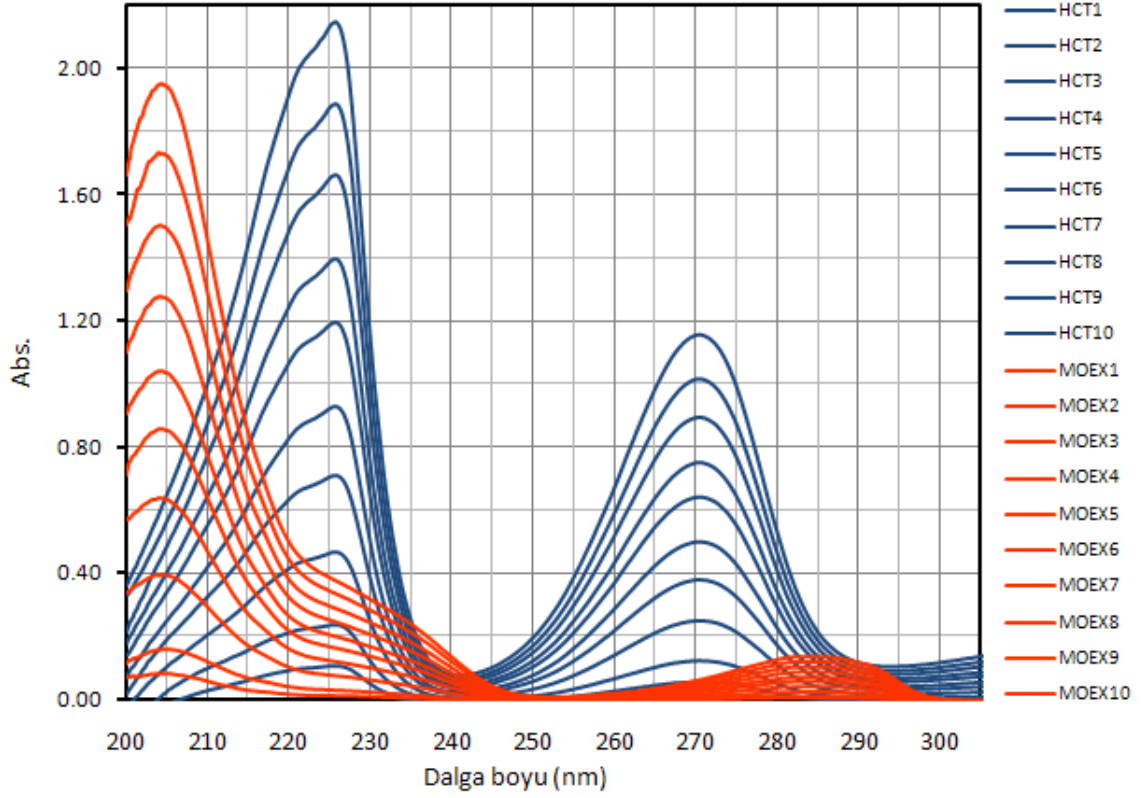
3.2. Doubechies Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi (Doubechies Continuous Wavelet Transform Method)

3.2.1. Standart Çözeltilerde

- a) MOEX ve HCT stok çözeltileri, metanol içerisinde 100 mL'lik hacimde 25 mg MOEX ve 25 mg HCT bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) MOEX için 1.0-18.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) HCT için 1.0-18.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- d) Kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında MOEX ve HCT bileşiklerini içeren 20 değişik konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon seti hazırlandı.

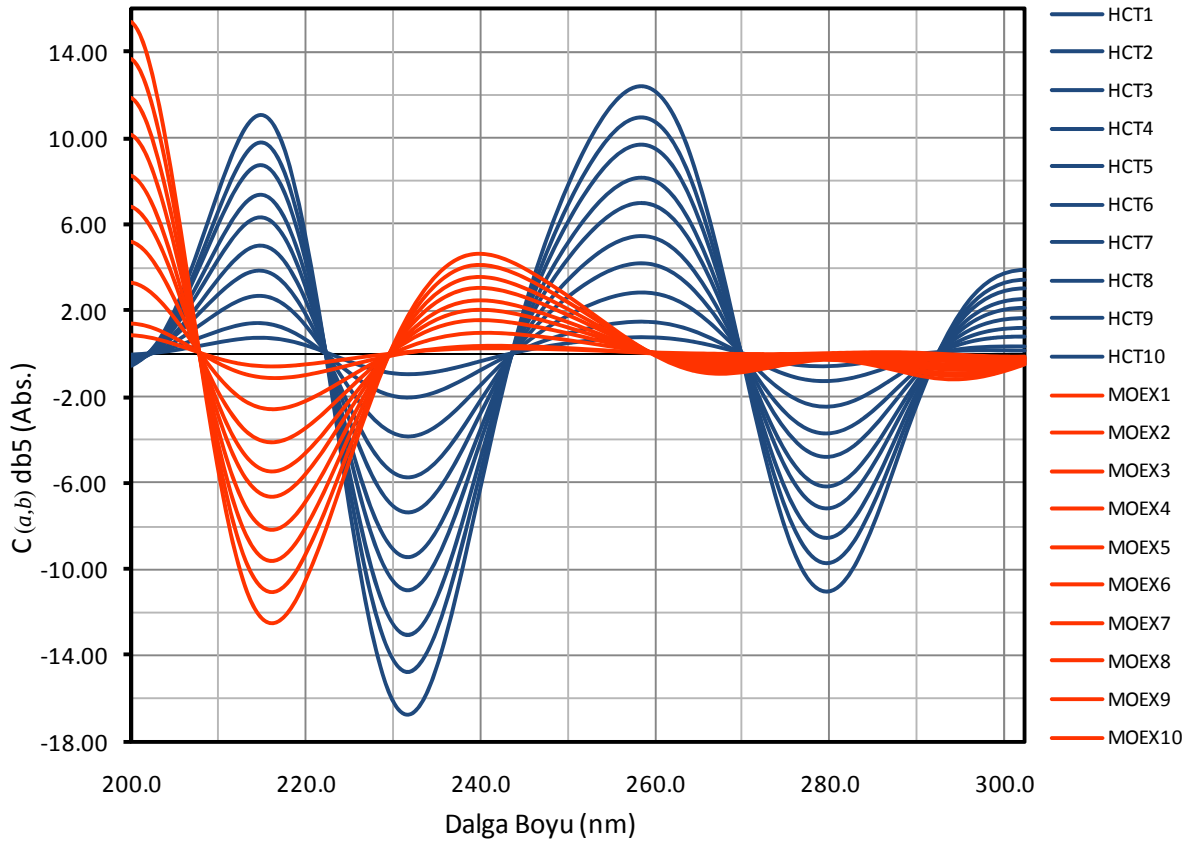
3.2.2. Doğrusal Regresyon Analizi

Tez kapsamında MOEX-HCT karışımının kantitatif analizi için db5 sürekli dalgacık dönüşümü (db5-SDD) yönteminin uygulanmasında metanol içerisinde MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak 200-305 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve HCT1, HCT2, ..., HCT10 ile MOEX1, MOEX2, ..., MOEX10 şeklinde kodlanarak bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.8 de bileşiklerin orjinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Bu spektrum alma işlemi MOEX ve HCT bileşiklerini içeren diğer bütün numuneler için de tekrar edildi.



Şekil 3.8. MOEX (1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$) ve HCT (1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$) bileşiklerinin; Absorbans Spektrumları (Çözücü:Metanol).

Çalışmada MOEX ve HCT bileşiklerinin ultraviyole (UV) spektrumlarına ait sinyalleri işlemek için her bir konsantrasyon değeri için bilgisayar hafızasından çağrılarak absorbans verilerinin vektörleri olarak *Microsoft Excel*'e transfer edildi ve 200.0-305.0 nm dalga boyu aralığında 2048 noktadan oluşan absorbans veriler dizisi seçildi ve dalgacık alanına taşındı.



Şekil 3.9. MOEX (1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$) ve HCT (1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$) bileşiklerinin; db5-SDD Spektrumları (Çözücü: Metanol).

Karışımındaki MOEX ve HCT bileşiklerinin analizi için SDD (continuous wavelet transform) aileleri arasında optimal sinyal işleme yöntemi olarak saptanan db5-SDD sinyal işleme yöntemi 200.00-302.35 nm dalga boyu bölgesinde 2^{11} değerine karşılık gelen 2048 noktada kalibrasyon spektrumlarına uygulandı. db5-SDD spektrumları, dalgacık dönüşüm katsayılarının ($C_{a,b}$) dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edildi (Şekil 3.9).

Çalışmada db5-SDD yöntemiyle MOEX ve HCT bileşiklerinin analizi için doğrusal regresyon denklemleri, kalibrasyon çözeltileri kullanılarak MOEX için 243.60 nm'deki HCT için 259.95 nm'deki db5-SDD genlikleri ölçülerek hesaplandı. Bu iki dalga boyundaki doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları Çizelge 3.12. de verilmektedir.

Çizelge 3.12. db5-SDD yöntemiyle MOEX ve HCT kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon Parametreleri	db5-SDD	
	MOEX	HCT
λ (nm)	243.60	259.95
Kon. Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	1.0-18.0	1.0-18.0
m	0.2397	0.6740
n	-0.0579	0.0961
r	1.0000	1.0000
SH(m)	7.24E-04	1.30x10 ⁻³
SH(n)	7.73E-03	1.38E-02
SH(r)	1.28E-02	0.02
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0.31	0.19
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	1.02	0.65
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 3.12 deki doğrusal regresyon analizine göre hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak numunelerin içindeki MOEX ve HCT miktarları hesaplandı.

3.2.3.Kemometrik db5-SDD Yönteminin Validasyonu

Çalışmalarımızda db5-SDD sinyal işleme yönteminin validasyon işlemi için metanol içerisinde MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 10 adet yapay karışımı içeren çözeltilerden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan db5-SDD sinyal işleme yönteminin kesinliği ve doğruluğu test edildi. db5-SDD yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.13 da sunulmaktadır. Geri kazanım değerleri, MOEX için % 100.9 , HCT için % 99.9 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri, MOEX için % 1.72 ve HCT için %1.86 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.13. db5-SDD yönteminin MOEX-HCT yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	Karışım		Bulunan		Geri Kazanım	
	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1	1.0	10.0	1.02	10.04	101.7	100.4
2	2.0	10.0	1.96	9.91	98.1	99.1
3	4.0	10.0	4.09	9.81	102.1	98.1
4	6.0	10.0	6.26	9.78	104.3	97.8
5	8.0	10.0	8.05	9.88	100.6	98.8
6	10.0	10.0	10.27	9.87	102.7	98.7
7	12.0	10.0	12.06	9.82	100.5	98.2
8	14.0	10.0	14.11	9.83	100.8	98.3
9	16.0	10.0	16.04	9.79	100.3	97.9
10	18.0	10.0	18.14	9.93	100.8	99.3
11	6.0	1.0	6.09	1.02	101.4	102.1
12	6.0	2.0	5.99	2.09	99.8	104.6
13	6.0	4.0	5.92	4.08	98.7	102.0
14	6.0	6.0	5.94	6.15	99.0	102.5
15	6.0	8.0	5.92	8.06	98.7	100.8
16	6.0	10.0	6.26	9.78	104.3	97.8
17	6.0	12.0	6.07	12.04	101.1	100.4
18	6.0	14.0	6.04	13.94	100.6	99.6
19	6.0	16.0	6.16	16.14	102.6	100.9
20	6.0	18.0	5.98	17.99	99.6	100.0
				$\bar{X}$	100.9	99.9
				SS	1.73	1.86
				BSS	1.72	1.86

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

Diğer bir validasyon işlemi olarak db5-SDD yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analiz çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda MOEX için (4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL) ve HCT için (3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) her derişim için 5 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. db5-SDD yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

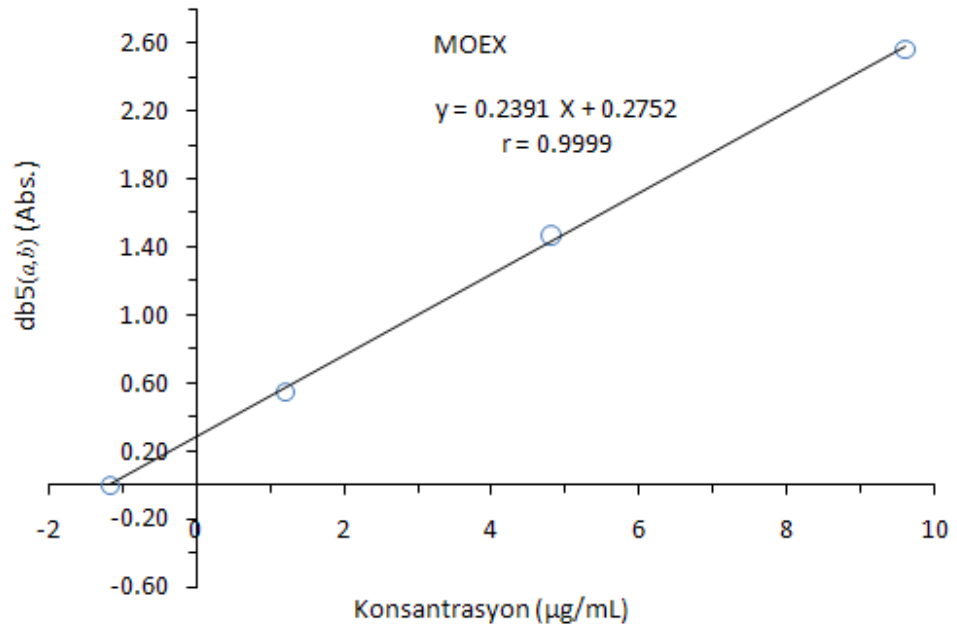
Gün içi (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.00	3.00	4.10	3.05	0.06	0.02	1.43	0.78	2.57	1.60	102.6	101.6
8.00	10.00	8.19	9.95	0.14	0.07	1.69	0.70	2.37	-0.53	102.4	99.5
12.00	15.00	12.51	14.96	0.05	0.06	0.40	0.40	4.28	-0.26	104.3	99.7

Günler arası (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.00	3.00	4.17	3.05	0.09	0.04	2.08	1.24	4.33	1.60	104.3	101.6
8.00	10.00	8.33	10.13	0.20	0.17	2.45	1.65	4.10	1.31	104.1	101.3
12.00	15.00	12.66	15.31	0.27	0.44	2.14	2.85	5.54	2.07	105.5	102.1

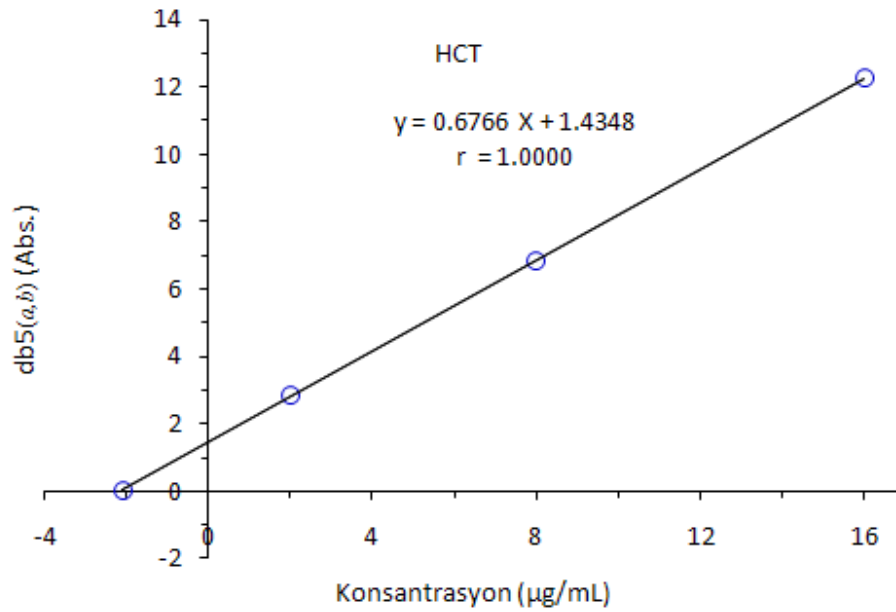
$$BH = \% \text{ Bağıl hata} = \frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$$

GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = % Bağıl Standart Sapma

Tez kapsamında önerilen db.5-SDD sinyal işleme yöntemi gerçek ticari farmasötik tabletleme uygulamadan önce, MOEX ve HCT bileşiklerinin db.5-SDD yöntemiyle analizi üzerine tablet yardımcı maddelerinin girişim etkisi olup olmadığı test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 1.20 µg/mL MOEX ve 2.00 µg/mL HCT'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 1.20, 4.80 ve 9.60 µg/mL MOEX ve 2.00, 8.00 ve 16.00 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Fempres PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen MOEX ve HCT miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki MOEX ve HCT için geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde herbiri için üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Standart ilavesi tekniğinde db.5-SDD yönteminin uygulamasında tablet içerisindeki MOEX için x-eksenini kestiği nokta 1.15 µg/mL konsantrasyonuna (Şekil 3.10); HCT için x-ekseni kestiği nokta 2.08 µg/mL konsantrasyonuna (Şekil 3.11) karşılık gelmektedir.



Şekil 3.10. Standart ilavesi tekniğinde 1.20, 4.80 ve 9.60 µg/mL MOEX konsantrasyonları için db5-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiğidir.



Şekil 3.11. Standart ilavesi tekniğinde 2.00, 8.00 ve 16.00 µg/mL HCT konsantrasyonları için db5-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiğidir.

Çizelge 3.15. db5-SDD yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

Standart İlavesi (db5-SDD)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1.20	2.00	1.23	2.07	0.03	0.02	2.13	0.78	2.56	3.57	102.6	103.6
4.80	8.00	5.03	7.87	0.07	0.25	1.49	3.23	4.82	-1.57	104.8	98.4
9.60	16.00	9.58	15.93	0.01	0.27	0.06	1.67	-0.23	-0.42	99.8	99.6

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

3.2.4. Kemometrik db5-SDD İçin Varyans Analizi

Sonuçları karşılaştırmak amacıyla, db5-SDD sinyal işleme yöntemiyle gün içi ve günler arası elde edilen sonuçların doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için üç farklı konsantasyonda (MOEX için 4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim için beş farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında serbestlik derecesi $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 olasılık düzeyinde F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık MOEX için hesaplanan F-test değeri 1.98 ve p-değeri 0.12, HCT için hesaplanan F-test değeri 2.49 ve p-değeri 0.06 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 olasılık düzeyinde gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Test sonuçları Çizelge 3.16 de sunulmuştur.

Çizelge 3.16. 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
MOEX	Gruplar arası	35.69	5	7.14	1.98	0.12	2.62
	Grup içi	86.53	24	3.61			
	Toplam	122.22	29				
HCT	Gruplar arası	29.39	5	5.88	2.49	0.06	2.62
	Grup içi	56.58	24	2.36			
	Toplam	85.97	29				

3.2.5. db5-SDD Yönteminin Farmasötik Tabletlere Uygulaması

Çalışmada db5-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 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 200-300 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.05 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlardan 210.0-305.0 nm dalga boyu aralığında ölçülen absorbans değerlerine db5-SDD yöntemi uygulandı. db5-SDD spektrumlarından MOEX için 243.60 nm'deki ve HCT için 259.95 nm'deki SDD genlikleri ölçülerek kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki MOEX ve HCT miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **Fempress PLUS®** Tablet preparatına uygulandı. **Fempress PLUS®** Tablet sonuçları çizelge 3.17 de sunuldu.

Çizelge 3.17. Kemometrik d5-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat, etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /Tablet)

No.	mg/tablet	
	MOEX	HCT
1	14.92	25.26
2	15.16	25.24
3	14.96	25.43
4	15.23	24.97
5	14.93	25.14
6	15.13	25.29
7	14.82	25.16
8	14.97	25.30
9	14.95	25.28
10	15.05	24.96
$\bar{X}$	15.01	25.20
SS	0.13	0.15
BSS	0.85	0.58
SH	0.04	0.05
GA	15.01 $\pm$ 0.08	25.20 $\pm$ 0.09

$\bar{X}$ =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)

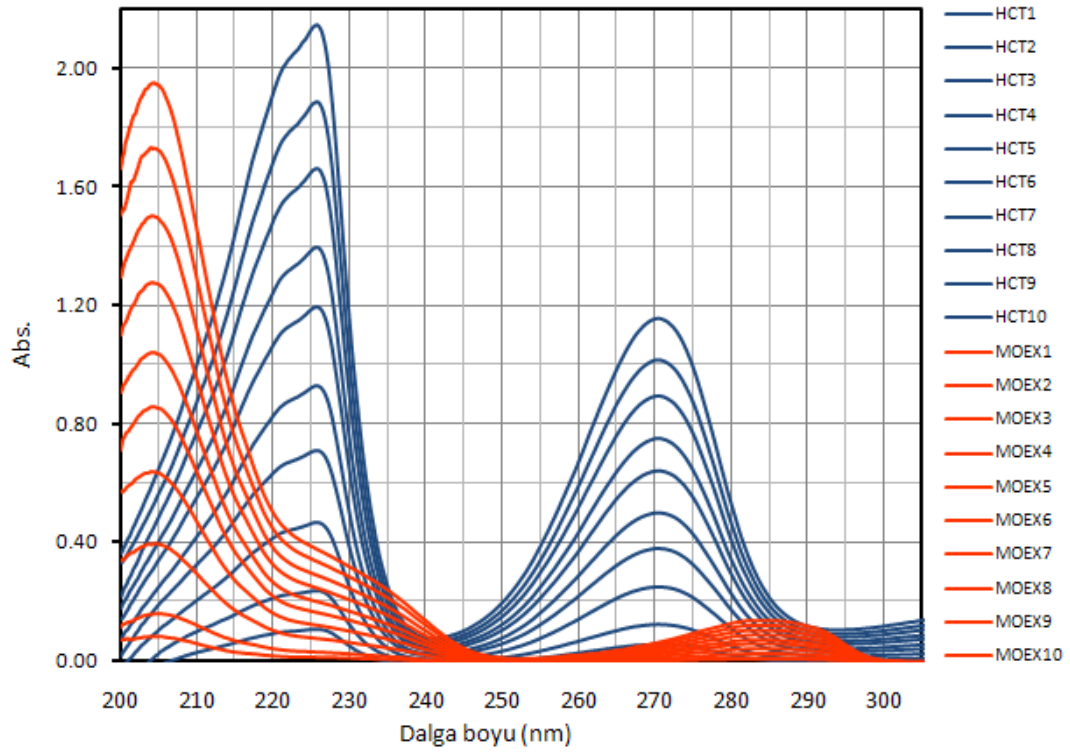
Türev spektrofotometrisi, karışım analizinde orijinal absorpsiyon eğrilerinin türevlerinin alınması ve bileşiklerden birisinin sıfır kesim noktasına karşılık diğer bileşiğin türev absorbans değerinin ölçümüyle hesaplanan kalibrasyon denklemlerinin elde edilmesiyle karışımların analizine dayanır. Spektrofotometrik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

Standart Çözeltiler

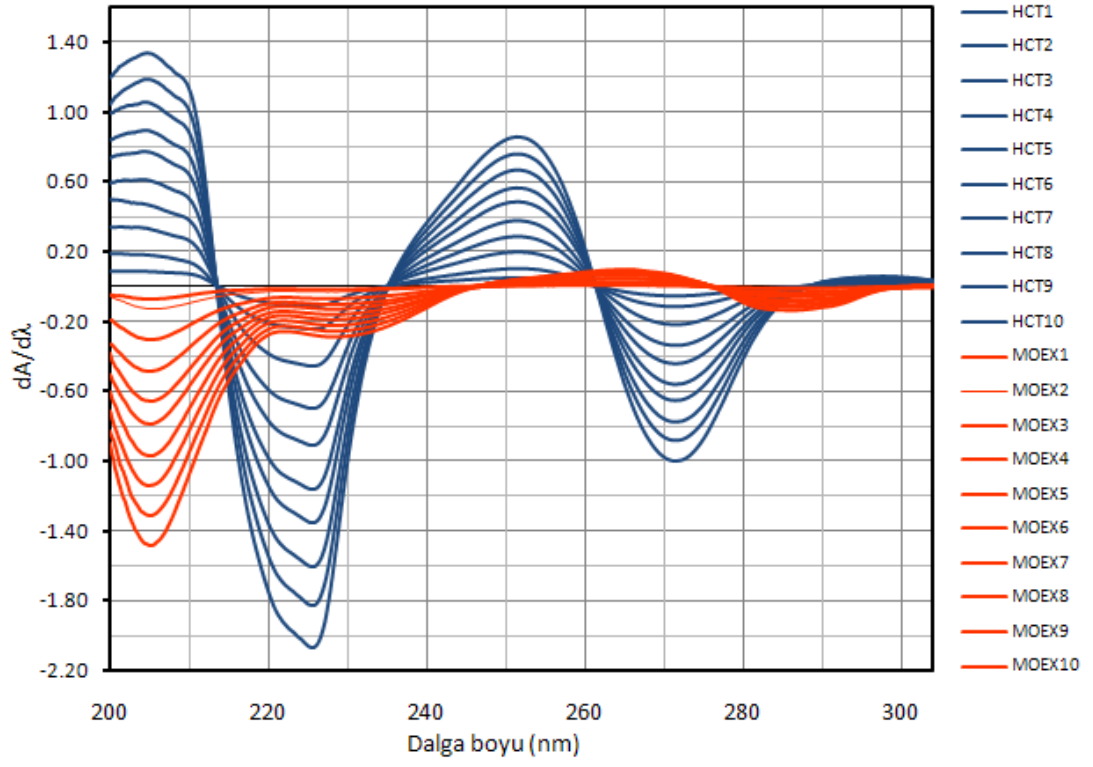
- a) Metanol çözeltisi içinde MOEX ve HCT'nin sırasıyla 250 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlu stok çözeltileri hazırlandı.
- b) MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 20 değişik konsantrasyonlarda yapay karışımlardan oluşan validasyon seti hazırlandı.

Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması

Tez kapsamında türev yönteminin uygulamasında, MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin 200.0-305.0 nm dalga boyu aralığında spektrumları çizdirildi ve bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.12’de orijinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Analiz edilen MOEX ve HCT 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, skala faktörü 16 olan her iki bileşiğin absorpsiyon spektrumlarının $\Delta\lambda=16$ nm aralıkları ile birinci dereceden türevlerinin analiz için uygun olduğu elde edilen % geri kazanım değerlerinden saptandı. Bu birinci türev spektrumları, $\Delta\lambda=16$ nm aralıklarla 321 noktada düzeltirildi. Şekil.3.13, MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında her iki bileşiğin birinci dereceden türev spektrumlarını göstermektedir. Kalibrasyon grafikleri, MOEX için 235.20 nm’de ve HCT için 247.50 nm’de $dA/d\lambda$ değerlerinin ölçümüyle elde edildi. Doğrusal regresyon analizi için istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.18. de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. MOEX için 1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$ (—) ve HCT için 1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$ (—) konsantrasyon aralığında; absorpsiyon spektrumları,



Şekil 3.13. MOEX için 1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$ (—) ve HCT için 1.0-18.0 $\mu\text{g/mL}$ (—)konsantrasyon aralığında; Birinci türev spektrumları ($\Delta\lambda= 16$ nm aralıklarla ve skala faktörü = 16)

Çizelge 3.18 Türev yöntemiyle MOEX ve HCT kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

	MOEX	HCT
λ (nm)	235.20	247.50
Kon. Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	1.0 – 18.0	1.0 – 18.0
m	-0.0127	0.0419
n	0.0029	0.0051
r	0.9999	1.0000
SH(m)	4.60E-05	1.47E-04
SH(n)	4.91E-04	1.57E-03
SH(r)	8.14E-04	0.00
LOD	0.37	0.36
LOQ	1.22	1.18

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

Türev Yönteminin Validasyonu

Türev yönteminin validasyon işlemi için metanol çözeltisi içerisinde MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/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 3.19. de gösterildi. Geri kazanım değerleri MOEX için % 104.5, HCT için % 100.5 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri MOEX için % 2.22 ve HCT için % 1.76 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.19. Türev yönteminin MOEX-HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	Karışımlar($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan($\mu\text{g/mL}$)		Geri Kazanım (%)	
	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1	1.0	10.0	1.03	10.04	102.9	100.4
2	2.0	10.0	2.08	9.88	103.9	98.8
3	4.0	10.0	4.31	9.84	107.7	98.4
4	6.0	10.0	6.44	9.88	107.4	98.8
5	8.0	10.0	8.47	9.97	105.8	99.7
6	10.0	10.0	10.46	10.01	104.6	100.1
7	12.0	10.0	12.37	9.95	103.1	99.5
8	14.0	10.0	14.23	10.03	101.7	100.3
9	16.0	10.0	16.05	10.03	100.3	100.3
10	18.0	10.0	18.20	10.19	101.1	101.9
11	6.0	1.0	6.44	0.99	107.3	98.7
12	6.0	2.0	6.34	2.06	105.7	103.1
13	6.0	4.0	6.30	4.23	105.1	105.7
14	6.0	6.0	6.36	6.14	106.0	102.3
15	6.0	8.0	6.37	8.05	106.2	100.7
16	6.0	10.0	6.44	9.88	107.4	98.8
17	6.0	12.0	6.37	12.10	106.2	100.8
18	6.0	14.0	6.27	13.99	104.6	99.9
19	6.0	16.0	6.18	16.22	103.0	101.4
20	6.0	18.0	6.06	18.06	100.9	100.4
				$\bar{X}$	104.5	100.5
				SD	2.33	1.77
				RSD	2.22	1.76

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

Çalışmada diğer bir validasyon işlemi olarak türev yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analiz çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (MOEX için 4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) her derişim için 5 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.20 da gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. Türev yöntemiyle MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk sonuçları

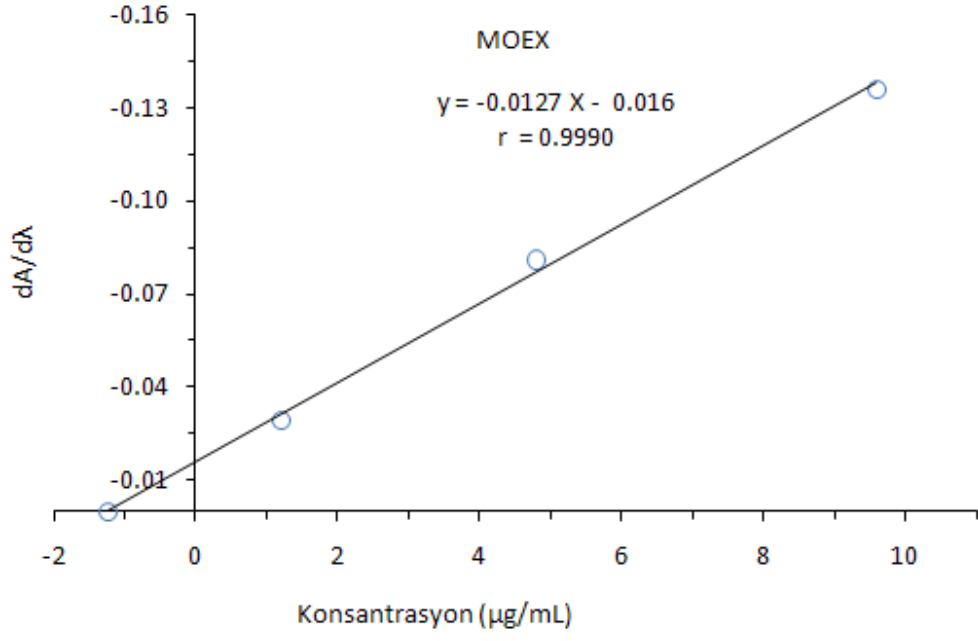
Gün içi (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.0	3.00	4.05	3.07	0.06	0.04	1.48	1.37	1.14	2.17	101.1	102.2
8.0	10.00	8.06	10.10	0.07	0.10	0.83	1.03	0.74	0.99	100.7	101.0
12.0	15.00	12.09	15.16	0.12	0.09	1.03	0.59	0.79	1.06	100.8	101.1

Günler arası (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
4.0	3.00	4.14	3.04	0.12	0.04	2.96	1.28	3.42	1.45	103.4	101.5
8.0	10.00	8.06	10.04	0.09	0.05	1.12	0.48	0.71	0.44	100.7	100.4
12.0	15.00	12.14	15.18	0.19	0.08	1.59	0.55	1.17	1.21	101.2	101.2

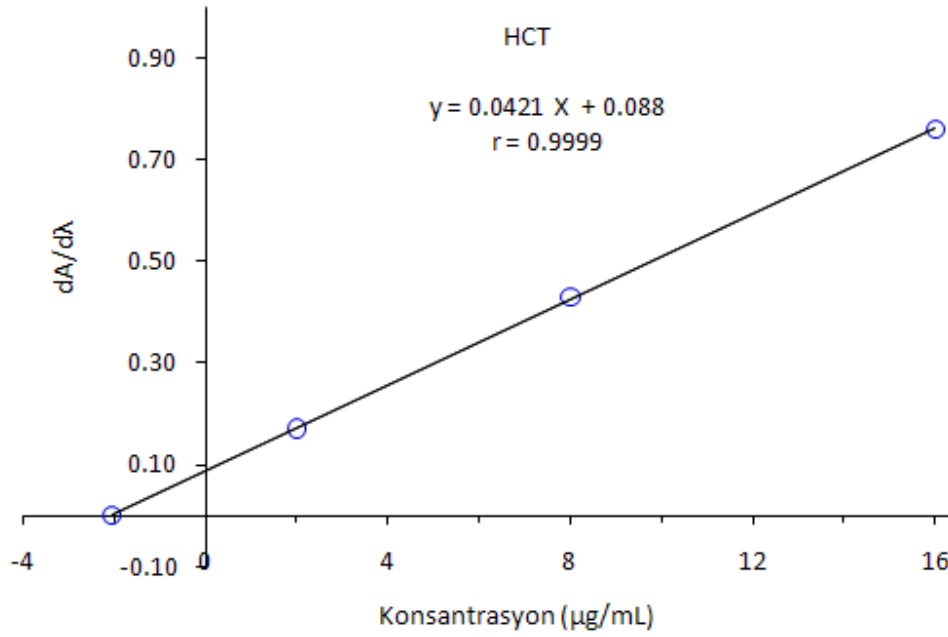
BH= % Bağlı hata = $\frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$

GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = % Bağlı Standart Sapma

Bu tez çalışmasında karşılaştırma yöntemi olarak geliştirilen türev yöntemini ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce MOEX ve HCT içeren tabletlerde, tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerinde bir etkisinin olup olmadığı türev yöntemi için test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 1.20 µg/mL MOEX ve 2.00 µg/mL HCT'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 1.20, 4.80 ve 9.60 µg/mL MOEX ve 2.00, 8.00 ve 16.00 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Fempress PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen MOEX ve HCT miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki MOEX ve HCT için geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. türev yönteminin tablete uygulamasında MOEX için ekseni kestiği nokta 1.26 µg/mL konsantrasyonuna; HCT için ekseni kestiği nokta 2.09 µg/mL konsantrasyonuna denk gelir



Şekil 3.14. Standart ilavesi tekniğinde 1.20, 4.80 ve 9.60 µg/mL MOEX konsantrasyonları için türev genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiğidir.



Şekil 3.15. Standart ilavesi tekniğinde 2.00, 8.00 ve 16.00 µg/mL HCT konsantrasyonları için türev genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiğidir.

Çizelge 3.21. Türev yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

Standart İlavesi (Türev)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1.20	2.00	0.97	1.91	0.03	0.03	2.68	1.32	-19.51	-4.37	80.5	95.6
4.80	8.00	5.03	8.10	0.08	0.18	1.68	2.17	4.85	1.22	104.9	101.2
9.60	16.00	9.35	15.94	0.11	0.03	1.21	0.17	-2.58	-0.40	97.4	99.6

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

Türev Yöntemi için Varyans Analizi

Türev yönteminin doğruluk ve kesinliğinin validasyon işleminde üç farklı konsantrasyon seviyesinde (MOEX için 4.0, 8.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL), her derişim için beş farklı numune için elde edilen sonuçlara varyans analiz (ANOVA) testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında serbestlik derecesi $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 olasılık düzeyinde F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık MOEX için hesaplanan F-test değeri 1.90 ve p-değeri 0.13, HCT için hesaplanan F-test değeri 1.76 ve p-değeri 0.16 olarak bulunmuştur. ANOVA testinde F-hesaplanan < F-tablo ve p-değeri > $p=0.05$ olduğu için % 95 olasılık düzeyinde gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.22. de sunulmuştur.

Çizelge 3.22. 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
MOEX	Gruplar arası	27.27	5	5.45	1.90	0.13	2.62
	Grup içi	68.95	24	2.87			
	Toplam	96.21	29				
HCT	Gruplar arası	8.25	5	1.65	1.76	0.16	2.62
	Grup içi	22.46	24	0.94			
	Toplam	30.71	29				

Türev Yönteminin Farmasötik Tabletlere Uygulaması

Karşılaştırma türev 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 içerisinde çözöldü. Balon jodedeki çözelti mekanik bir karıştırıcı ile yaklaşık 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzöldü. Bu analiz çözeltilerinin 200-300 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 16 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlardan 210.0-312.3 nm dalga boyu aralığında ölçölen absorbens değörlere türev yöntemi uygulandı. türev spektrumlarından MOEX için 243.60 nm deki ve HCT için 259.95 nm'deki türev genlikleri ölçölerek kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki MOEX ve HCT miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **Fempres PLUS®** Tablet preparatına uygulandı. **Fempres PLUS®** Tablet sonuçları çizelge 3.23 de sunuldu.

Çizelge 3.23. Türev yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /Tablet)

No.	mg/tablet	
	MOEX	HCT
1	14.77	24.53
2	14.75	25.53
3	15.38	24.42
4	15.00	25.63
5	15.03	25.49
6	14.95	24.73
7	14.51	25.44
8	14.76	25.60
9	14.65	25.07
10	15.39	25.20
$\bar{X}$	14.92	25.17
SS	0.29	0.46
BSS	1.97	1.81
SH	0.09	0.14
GA	14.92 $\pm$ 0.18	25.17 $\pm$ 0.28

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

SH=Standart Hata, GA=Güven Aralığı

3.3.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, 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 kromatografisinde iç çeperi sabit faz 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 kromatogram olarak kaydedilir. Bu YBSK yöntemi yukarıda verilen esasa göre maddelerin ayırımına dayanan bir yöntemdir.

Standart Çözeltiler

- a) Metanol içinde MOEX'in 250 µg/mL, HCT'nin 250 µg/mL ve bu deneyde iç standart (IS) olarak kullandığımız Valsartan'nın ise 250 µg/mL konsantrasyonlu stok çözeltileri hazırlandı.
- b) MOEX için 1.0-18.0 µg/mL konsantrasyon aralığındaki 10 adet çözeltisinin her birine 5.0 µg/mL IS eklenerek kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. HCT için 1.0-18.0 µg/mL konsantrasyon aralığındaki 10 adet çözeltisinin her biri üzerine aynı şekilde 5.0 µg/mL IS eklenerek kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.

- c) MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL (yine her bir çözelti üzerine 5 µg/mL IS eklenerek) çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 20 değişik konsantrasyonlarda validasyon seti hazırlandı.

YBSK Yönteminde Kromatografik Şartlar

- | | | |
|----|-------------------------|---|
| a) | Hareketli Faz | : Analiz işleminde, MOEX,HCT ve IS'ın kromatografik ayırımı için asetonitril ve 0.5 M KH ₂ PO ₄ tampon sistemi (pH=4.50) (50:50 h/h) oluşan bir çözelti kullanıldı. |
| b) | Kolon Cinsi | : Inertsil® ODS 3V kolonu kullanıldı. |
| c) | Kolon Sıcaklığı | Kolon sisteminde maddelerin ayırımı oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirildi. |
| d) | Basınç | : Kolondan çözelti akışı sırasında kolon basıncı ortalama 100 bar civarındadır. |
| e) | Akış Hızı | Deneyde akış hızı 1.0 mL/dak. olacak şekilde ayarlandı. |
| f) | Enjeksiyon Hacmi | Analiz süresinde her bir vial'den 20 µL alınacak şekilde enjeksiyon hacmi ayarlandı. |
| g) | Dalga Boyu | MOEX ve HCT analizi için dalga boyu 235 nm olarak seçildi. |
| e) | Çözücü | : Metanol |

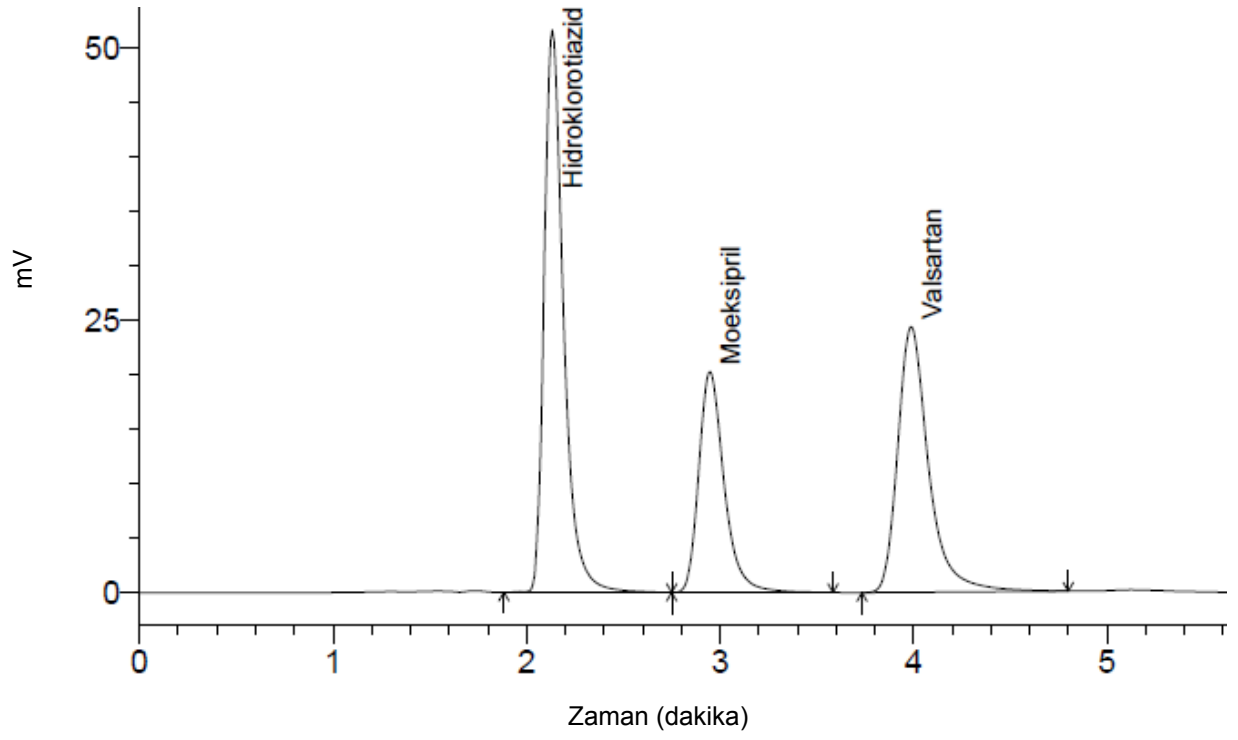
Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması

Bu tez çalışmasında karşılaştırma yöntemi olarak YBSK yönteminin geliştirilmesinde, MOEX için 1.0-18.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan 5 adet kalibrasyon çözeltisinin her biri üzerine 5.0 µg/mL sabit konsantrasyonda IS (Valsartan) eklenerek ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin üzerine aynı şekilde 5.0 µg/mL sabit konsantrasyonda IS eklenerek 235 nm'de DAD dedektörü kullanılarak kromatogramlar çizdirildi. Elde edilen bu kromatogramlarda MOEX , HCT ve IS için kolonda tutulma süreleri sırasıyla ortalama 2.98, 2.14 ve 4.03 dk. olarak gözlemlendi (Şekil 3.16). Kromatografik analizde MOEX ve HCT bileşiklerinin kromatogramlarından integrasyonla bulunan alanlar IS'ın kromatogram alanlarına oranı (MOEX/IS ve HCT/IS oranları) konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek bir doğru denklemi elde edildi. MOEX/IS ve HCT/IS oranlarıyla konsantrasyon arasındaki doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.24' de sunulmuştur.

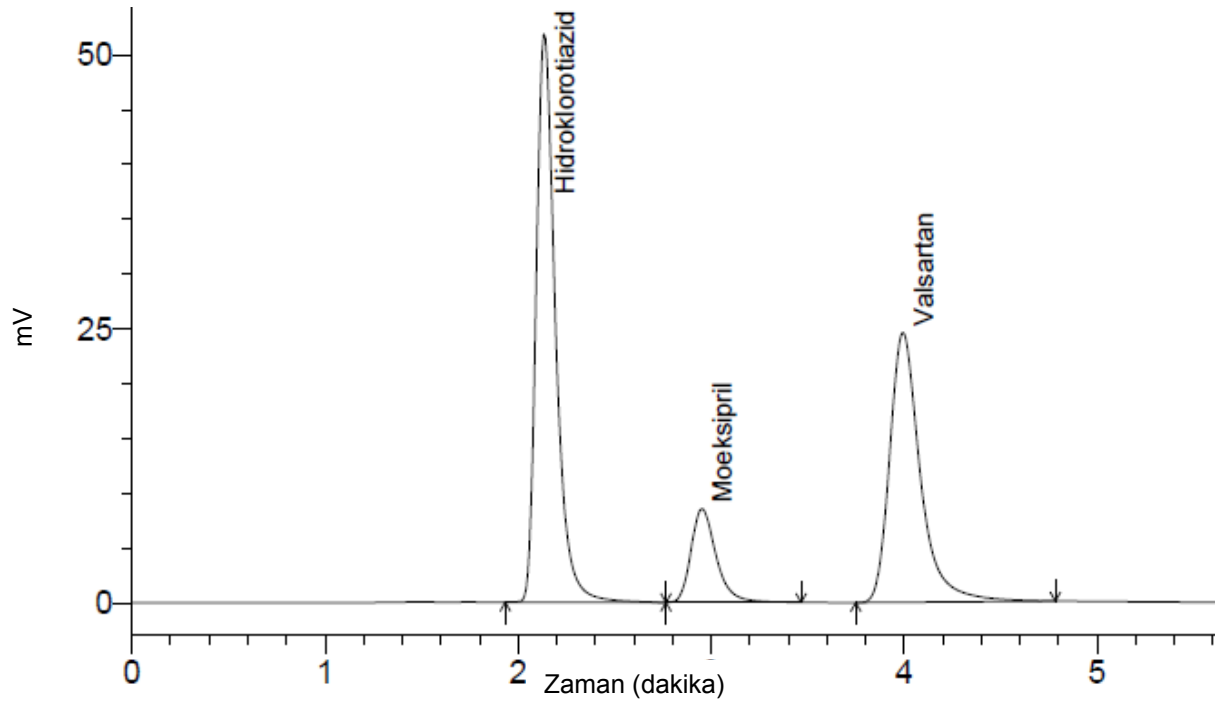
Çizelge 24. YBSK yöntemiyle MOEX ve HCT kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

	MOEX	HCT
λ (nm)	235.0	235.0
Kon. Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	2.0-20.0	1.0-18.0
m	0.0657	0.1239
n	0.0242	0.0706
r	0.9998	0.9996
SH(m)	4.46E-04	0.0011733
SH(n)	4.50E-03	4.13E-03
SH(r)	8.10E-03	2.08E-02
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0.65	0.32
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	2.17	1.05

Karışımlardaki MOEX ve HCT 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 (Valsartan) varlığında MOEX ve HCT bileşiklerinin ayrımı ve tayini için bölüm 3.3.2.2 de verilen kromatografik koşulların uygun olduğu bulundu.



Şekil 3.16. 10 µg/mL MOEX, 10 µg/mL HCT ve 5 µg/mL iç standart (Valsartan) Kromatogramları



Şekil 3.17. MOEX ve HCT ile birlikte 5 µg/mL iç standart (Valsartan) içeren tablet çözletisinin kromatogramı

YBSK Yönteminin Validasyonu

Bu tez çalışmasında karşılaştırma yöntemi olarak YBSK yönteminin validasyonu için metanol içerisinde MOEX için 1.0-18.0 µg/mL ve HCT için 1.0-18.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 20 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon setinin hazırlanmasında herbir karışım çözeltisine 5.0 µg/mL sabit konsantrasyonda IS (Valsartan) stok çözeltisinden ilave edildi. Bu validasyon seti kullanılarak YBSK yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri MOEX için % 98.5, HCT için % 100.0 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri MOEX için % 2.50 ve HCT için % 1.66 olarak hesaplandı. Geri kazanım çalışmasında YBSK yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.25 de gösterildi.

Çizelge 3.25. YBSK yönteminin MOEX-HCT ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	İkili Karışım		Bulunan		Geri Kazanım	
	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1	2.0	10.0	1.98	10.07	99.1	100.7
2	4.0	10.0	3.82	10.05	95.5	100.5
3	6.0	10.0	5.90	10.11	98.3	101.1
4	8.0	10.0	7.80	9.86	97.5	98.6
5	10.0	10.0	9.49	9.60	94.9	96.0
6	12.0	10.0	12.16	10.17	101.3	101.7
7	14.0	10.0	13.42	9.82	95.8	98.2
8	16.0	10.0	16.16	10.01	101.0	100.1
9	18.0	10.0	18.25	10.05	101.4	100.5
10	20.0	10.0	20.35	9.96	101.8	99.6
11	6.0	1.0	6.17	1.00	102.8	100.3
12	6.0	2.0	6.08	1.93	101.4	96.5
13	6.0	4.0	5.88	3.98	98.0	99.5
14	6.0	6.0	5.92	6.01	98.6	100.1
15	6.0	8.0	5.73	8.04	95.4	100.5
16	6.0	10.0	5.78	10.13	96.3	101.3
17	6.0	12.0	5.82	12.36	97.0	103.0
18	6.0	14.0	5.95	14.19	99.1	101.4
19	6.0	16.0	5.75	15.92	95.8	99.5
20	6.0	18.0	5.90	18.15	98.3	100.9
				$\bar{X}$	98.5	100.0
				SS	2.46	1.66
				BSS	2.50	1.66

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

Bu yüksek lisans tez çalışmasında diğer bir analitik validasyon işlemi olarak YBSK karşılaştırma yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analiz çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda MOEX için 2.0, 6.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL her derişim için 5 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.26' da sunulmaktadır.

Çizelge 3.26. YBSK yöntemiyle gün içi, günler arası MOEX ve HCT analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

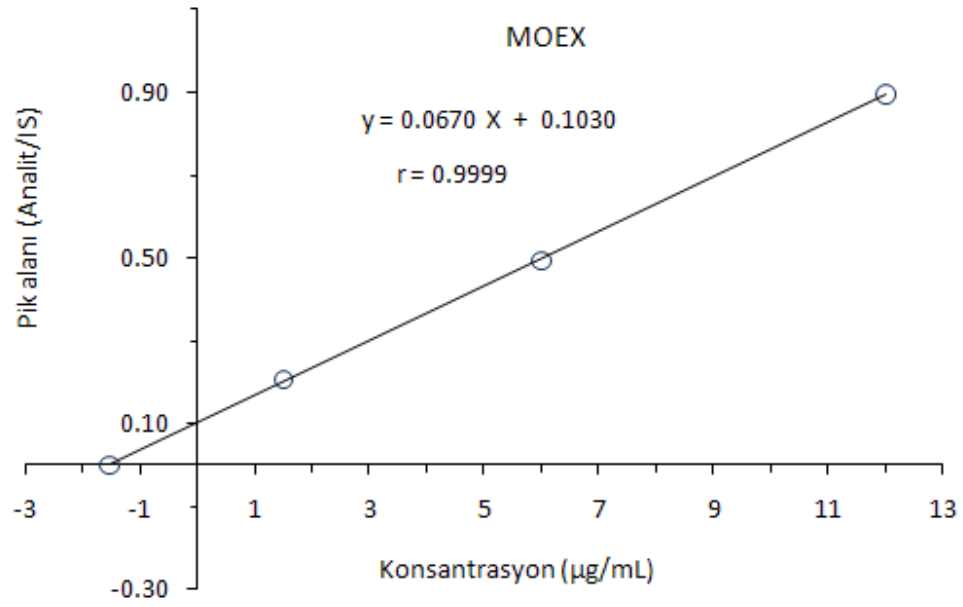
Gün içi (n=5)											
İlave edilen (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
2.0	3.0	2.0	3.0	0.02	0.06	0.8	1.9	-0.9	-0.4	99.1	99.6
6.0	10.0	5.9	10.1	0.07	0.14	1.2	1.4	-2.4	1.0	97.6	101.0
12.0	15.0	11.9	15.1	0.02	0.16	0.2	1.0	-1.1	0.7	98.9	100.7

Günler arası (n=5)											
İlave edilen (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
2.0	3.0	2.0	3.0	0.0	0.1	1.1	1.9	0.6	-0.8	100.6	99.2
6.0	10.0	5.9	10.2	0.2	0.1	3.3	1.1	-1.5	1.5	98.5	101.5
12.0	15.0	12.0	15.1	0.2	0.2	1.4	1.1	0.3	0.9	100.3	100.9

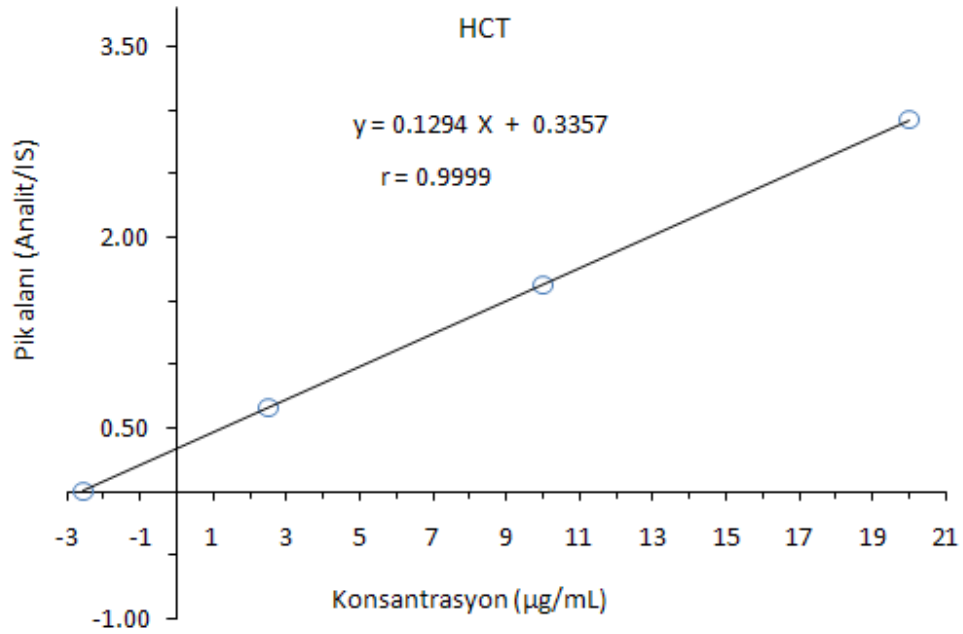
$$BH = \% \text{Bağıl hata} = \frac{\text{Bulunan miktar} - \text{ilave edilen miktar}}{\text{ilave edilen miktar}} \times 100$$

SS = Standart Sapma, BSS =% Bağıl Standart Sapma

Karşılaştırma yöntemi olarak geliştirilen YBSK yöntemini ticari farmasötik preparat analizine uygulamadan önce MOEX ve HCT içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerinde bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 1.50 µg/mL MOEX ve 2.50 µg/mL HCT'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 1.50, 6.00 ve 12.00 µg/mL MOEX ve 2.50, 10.00 ve 20.50 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Fempress PLUS®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen MOEX ve HCT miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki MOEX ve HCT için geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. YBSK yönteminin tablete uygulamasında MOEX için eksen kestigi nokta 1.54 µg/mL konsantrasyonuna; HCT için eksen kestigi nokta 2.59 µg/mL konsantrasyonuna denk gelir



Şekil 3.18. Standart ilavesi tekniğinde 1.50, 6.00 ve 12.00 µg/mL MOEX ilave konsantrasyonları için YBSK metodu genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiğidir.



Şekil 3.19. Standart ilavesi tekniğinde 2.50, 10.00 ve 20.00 µg/mL ilave HCT konsantrasyonları için türev genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiğidir.

Çizelge 3.27. YBSK yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları

Standart İlavesi (YBSK)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım	
MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
1.50	2.50	1.47	2.47	0.01	0.03	0.96	1.40	-1.89	1.33	98.1	98.7
6.00	10.00	5.87	10.28	0.03	0.11	0.53	1.10	-2.18	2.81	97.8	102.8
12.00	20.00	11.97	20.74	0.07	0.32	0.62	1.52	-0.27	3.70	99.7	103.7

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

YBSK Yöntemi İçin Varyans Analizi

YBSK karşılaştırma yönteminin doğruluk ve kesinliğinin değerlendirilmesi için üç farklı konsantrasyonda (MOEX için 2.0, 6.0 ve 12.0 µg/mL ve HCT için 3.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL ve her biri üzerine 5.0 µg/mL IS) ve her derişim için beş farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında serbestlik derecesi $n_1=5$ ve $n_2=24$ için % 95 olasılık düzeyinde F-tablo değeri 2.62 olmasına karşılık MOEX için hesaplanan F-test değeri 2.42 ve p-değeri 0.07, HCT için hesaplanan F-test değeri 1.81 ve p-değeri 0.15 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.28 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 bulunmuştur.

Çizelge 3.28. 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
MOEX	Gruplar arası	31.08	5.00	6.22	2.42	0.07	2.62
	Grup içi	61.78	24.00	2.57			
	Toplam	92.86	29.00				
HCT	Gruplar arası	19.15	5.00	3.83	1.81	0.15	2.62
	Grup içi	50.85	24.00	2.12			
	Toplam	70.00	29.00				

YBSK Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Tez çalışmasında 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 metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Gerekli seyreltme işlemi ile $5\mu\text{g/mL}$ IS ilavesi yapılarak hazırlanan tablet çözeltileri 2 mL'lik "vial" lere konularak kalibrasyon basamağındaki kromatografik şartlarda kromatogramları çizdirildi. Kromatogramlardan MOEX/IS ve HCT/IS oranları hesaplanarak Bölüm 3.3.2.3. de elde edilen kalibrasyon grafiklerinde yerine konarak tabletlerin içerisindeki MOEX ve HCT miktarları hesaplandı. Bir tablet analiz numunesi için çizdirilen kromatogram Şekil 3.17 de sunulmaktadır.

Yukarıda açıklanan kromatografik tablet analiz işlemi **Fempres PLUS[®]** Tablet preparatına uygulanmıştır. **Fempres PLUS[®]** Tablet sonuçları Çizelge 3.29 da sunuldu.

Çizelge 3.29. YBSK yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 15.0 mg MOEX ve 25.0 mg HCT /tablet)

No.	mg/tablet	
	MOEX	HCT
1	15.03	25.57
2	15.12	24.68
3	15.02	24.71
4	15.05	24.70
5	15.98	24.98
6	15.32	24.73
7	15.00	24.65
8	14.89	25.11
9	15.08	25.07
10	14.71	25.38
$\bar{X}$	15.12	24.96
SS	0.34	0.32
BSS	2.25	1.29
SH	0.11	0.10
GA (p=0.05)	15.12 $\pm$ 0.21	24.96 $\pm$ 0.20

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

SH = Standart Hata, GA = Güven Aralığı

3.3.3. Sonuçların İstatistiksel Karşılaştırılması

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında geliştirilen PCR, PLS ve db5-SDD ile karşılaştırma yöntemleri olarak geliştirilen türev spektrofotometrisi ve YBSK yöntemlerinin farmasötik tabletlerin analizine uygulamasından elde edilen Çizelge 3.30' daki deneysel sonuçlar, varyans analiz (ANOVA) testi yapılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel karşılaştırmada yöntemlerin **FEMPRESS PLUS®** ticari preparatına uygulamasında $n=10$ deneme için serbestlik derecesi $n_1=4$ ve $n_2=45$ olmak üzere % 95 olasılık düzeyinde ($p = 0.05$) t-tablo ve ANOVA F-tablo değeri (F_{teorik}) sırasıyla 2.58 olmasına karşılık hesaplanan ANOVA F-test sonuçları Çizelge 3.31' de gösterildiği gibi bulunmuştur. Geliştirilen yöntemlerinin karşılaştırılmasında $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{teorik}}$ ve MOEX için $p=0.06 > 0.05$ ve HCT için $p=0.34 > 0.05$ olduğu için yukarıda ifade edilen olasılık düzeyinde yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.30. Geliştirilen analitik yöntemlerin tablet analizine uygulamasıyla elde edilen sonuçlar

	PCR		PLS		mg/tablet db5-SDD		Türev yöntemi		HPLC	
	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT	MOEX	HCT
ORT	15.24	25.21	15.26	25.09	15.01	25.20	14.92	25.17	15.12	24.96
SS	0.35	0.31	0.30	0.24	0.13	0.15	0.29	0.46	0.34	0.32
BSS	2.32	1.24	1.98	0.95	0.85	0.58	1.97	1.81	2.25	1.29
SH	0.11	0.10	0.10	0.08	0.04	0.05	0.09	0.14	0.11	0.10
GA	0.22	0.19	0.19	0.15	0.08	0.09	0.18	0.28	0.21	0.20

SS=Standart Sapma, BSS=Bağıl Standart Sapma

SH = Standart Hata, GA = Güven Aralığı

Çizelge 3.31. Tez kapsamında geliştirilen yöntemlerin tablet analizine uygulanmasıyla elde edilen sonuçların varyans analiz (ANOVA) testi ile karşılaştırılması

Bileşik	Değişimin Kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin Ortalaması	F- hesaplanan	P- değeri	F-tablo
MOEX	Gruplar arası	0.86	4	0.22	2.48	0.06	2.58
	Grup içi	3.91	45	0.09			
	Toplam	4.78	49				
HCT	Gruplar arası	0.45	4	0.11	1.16	0.34	2.58
	Grup içi	4.39	45				
	Toplam	4.85	49				

4. TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tezi kapsamında bir antihipertansif kombine farmasötik preparat içerisindeki MOEX ve HCT'in miktar tayinleri için kemometrik PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri ve db5-SDD yöntemi geliştirildi. Bu çok değişkenli PCR, PLS kalibrasyon ve db5-SDD yöntemlerinin sonuçları, türev spektrofotometresi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleriyle karşılaştırıldı.

Çalışmalarımız kapsamında geliştirilmesi amaçlanan kemometrik PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri, kalibrasyon (konsantrasyon) seti (bağımsız değişken) ile bu set için “full” spektrum ölçümü ile elde edilen absorbans matrisi (bağımlı değişken) arasındaki matematiksel ilişki PCR ve PLS algoritmaları uygulamasıyla değerlendirilerek PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri geliştirildi.

Çalışmada çok değişkenli kalibrasyon algoritmalarının uygulamasında optimal deneysel ve spektral koşullar belirlendi. Spektral çalışmalarda metanol çözücü sistem olarak saptandı. Analiz işleminde MOEX ve HCT bileşiklerinin konsantrasyon seti ve numunelerin, 200-305 nm dalga boyu aralığında orijinal absorpsiyon spektrumları $\Delta\lambda=0.05$ nm aralıklar ile kaydedildi. PCR ve PLS kalibrasyonlarında y-blok olarak hazırlanan simetrik kalibrasyon setinin (Çizelge 3.1) ve 218-290 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda=0.05$ nm aralıklar ile ölçülen absorbans değerleri x-blok olarak kullanılan 1441x36 absorbans matrisi PCR ve PLS için optimal spektral koşullar olduğu belirlendi (Şekil 3.3).

Tez kapsamında dalgacık dönüşüm sinyal işleme yöntemi ile ticari farmasötik preparat içerisinde bulunan MOEX ve HCT bileşiklerinin miktar tayinlerinde en yüksek geri kazanım sonuçları veren optimal spektral dönüşümleri saptayabilmek için değişik dalgacık aileleri (wavelets families) uygulandı. Bu test işlemlerinden sonra db5-SDD yönteminin optimal olduğu bulundu. Optimal sürekli dalgacık dönüşüm (db5-SDD) saptanmasının ardından 1.00-18.00 µg/mL doğrusal çalışma aralığında MOEX ve HCT için standart kalibrasyon serileri hazırlandı ve bileşiklerin bu standart serilerinin 200.0 - 300.0 nm dalga boyu aralığında ultraviyole (UV) spektrumları çizdirildi (Şekil 3.8). Aynı spektral koşullarda validasyon ve numune çözeltilerinin spektrumları da çizdirildi. Sinyal analiz yönteminin uygulanmasında MOEX ve HCT bileşiklerinin standart kalibrasyon serilerinin, validasyon ve numuneleri 200.00 – 302.35 nm dalga boyu aralığında $2^{11} = 2048$ elemanlı absorbans verilerinden oluşan spektral vektörler db5-SDD yöntemi ile işlendikten sonra Şekil 3.9 daki db5-SDD spektrumları elde edildi. db5-SDD spektrumları kullanılarak MOEX için 243.60 nm de ve HCT için 259.95 nm de SDD-sinyalleri ölçülerek her iki bileşik için regresyon analiziyle doğru denklemleri hesaplandı (Çizelge 3.12).

Tez içeriğinde geliştirilen çok değişkenli kalibrasyonlar (PCR, PLS) ve sinyal işleme (db5-SDD) yöntemlerinin analitik validasyonu için çalışma aralığı içerisinde olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda MOEX ve HCT içeren yapay karışımlardan oluşan validasyon seti, yine üç farklı konsantrasyon seviyesinde beş farklı tekrarla hazırlanan yapay karışımların gün içi ve günler arası analizi için geri kazanım çalışması yapıldı (sırasıyla, Çizelge 3.3, 3.8, 3.14). Ayrıca tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerine etkisinin olup olmadığını gözlemek için tablet preparatının üzerine 3 farklı konsantrasyon seviyesinde 3 tekrarlı MOEX ve HCT standart ilavesiyle geri kazanım çalışması gerçekleştirildi (Çizelge 3.4, 3.9, 3.15). db5-SDD yönteminde standart ilavesi ile konsantrasyon db5-SDD genliklerine karşı grafiğe geçirildiğinde kalibrasyon

eğimi ve numune iğeriğinden gelen MOEX ve HCT analizi üzerine tablet yardımcı maddelerinin etkisinin olmadığı bulundu (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).

Geliştirilen yöntemlerin validasyonu için yapılan geri kazanım sonuçları ve sonuçlara uygulanan istatistiksel testler (Çizelge 3.5, 3.10, 3.16). yöntemlerin MOEX ve HCT analizi için yüksek geri kazanım değeriyle tatmin edici doğruluk ve kesinliğe sahip olduklarını ve analiz üzerine tablet yardımcı maddelerinin herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri, ticari tablet formülasyonlarındaki MOEX ve HCT bileşiklerinin aynı anda miktar tayinlerine hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulandı ve son derece tatmin edici sonuçlar alındı. (Çizelge 3.6, Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.17).

Bu tez çalışmasında geliştirilen kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla birinci türev spektrofotometresi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemleri geliştirildi ve karışımlardaki MOEX ve HCT'in kantitatif analizi için kullanıldı.

Geliştirilen PCR ve PLS kalibrasyonları ile db5-SDD sinyal işleme yönteminin validasyonu için uygulanan validasyon işlemleri, türev ve YBSK yöntemleri için de gerçekleştirildi. Sonuçlar gün içi ve günler arası analizi için geri kazanım kesinlik ve doğruluk test sonuçları (sırasıyla Çizelge 3.20, 3.26), MOEX ve HCT standart ilavesiyle geri kazanım sonuçları (Çizelge 3.21 ve 3.27), geri kazanım sonuçları ve sonuçlara uygulanan istatistiksel testler (Çizelge 3.22, 3.28) de sunuldu.

Tez kapsamında PCR, PLS, db5-SDD, türev ve YBSK yöntemlerin yapay karışımlara uygulamasında elde edilen ortalama % geri kazanım ve karşılık gelen bağıl standart sapma değerleri sırasıyla MOEX için % 101.2, % 2.22 (PCR); % 101.1, % 2.36 (PLS); % 100.9, % 1.72 (db5-SDD); % 104.5, % 2.22 (TD); % 98.5, % 2,50 (HPLC) ve HCT için % 99.1, % 2.81 (PCR); % 99.0, % 1.82 (PLS); % 99.9, % 1.86 (db5-SDD); % 100.5, % 1.76 (TD); % 100.0, % 1.66 (HPLC) olarak bulundu. Standart ilavesi yönteminde MOEX için % ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri %101.8, %2.03 (PCR); % 101.1, % 1.26(PLS); %102.4, %1.23 (db5-SDD); % 94.27, %1.86 (TD); % 98.53, % 0.70 (HPLC) ve HCT için % ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri % 100.4, % 1.41 (PCR); % 100.9, % 0.53 (PLS); % 100.53, % 1.89 (db5-SDD); % 98.80, % 1.22 (TS); % 101.73, %1.34 (HPLC) olarak elde edildi. Yöntemler için gün içi ve günler arası ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri gün içinde MOEX için % 102.1-% 104.5, % 3.38-% 4.97 (PCR); % 100.9-% 101.7, % 1.10-% 3.53(PLS); % 102.4-% 104.3, % 0.02-% 0.07(db5-SDD); % 100.7-%101.1, % 0.83-%1.48 (TS); % 97.6-% 99.1, % 0.8-% 1.2 (HPLC); ve HCT için % 99.6-% 100.9, % 0.18-% 1.18 (PCR); %99.2-%101.7, % 0.18-% 1.39 (PLS); % 99.5-%101.6, % 2.37-4.28 (db5-SDD); % 101.0-% 102.2, % 0.99-% 2.17 (TS); % 99.6-% 101.0, % 1.0-% 1.9 (HPLC); günler arasında MOEX için % 101.2-% 104.2, % 0.99-% 4.61 (PCR); % 100.6-% 103.5, % 0.15-% 2.89 (PLS); % 104.1-% 105.5, % 2.08-% 2.45 (db5-SDD); % 100.7-% 103.4, % 1.12-% 2.96 (TS); % 98.53-% 100.6, % 1.1-% 3.3 (HPLC); ve HCT için % 100.3-% 101.6, % 0.68-% 3.79 (PCR); % 100.8-% 103.7, % 0.68-% 4.82; % 101.3-% 102.1, % 1.24-% 2.85 (db5-SDD); % 100.4-% 101.5, % 0.48-% 1.28 (TS); % 99.2-% 101.5, % 1.1-% 1.9 (HPLC) olarak hesaplandı.

Analitik validasyon işleminden sonra yöntemler ticari tabletlerin analizine uygulandı ve tatmin edici sonuçlar elde edildi (Çizelge 3.23 ve 3.29). Geliştirilen PCR, PLS, ve db5-SDD yöntemleriyle ticari tabletlerdeki MOEX ve HCT

bileşiklerinin kantitatif analizinde karşılaştırma yöntemlerinin (YBSK ve türev) 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 3.30 ve Çizelge 3.31).

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar yeni geliştirilen kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemlerinin MOEX ve HCT içeren ticari farmasötik preparatların rutin analizlerinde ve kalite kontrolünde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bilindiği gibi ilaçların formülasyon öncesi ve formülasyondan sonra kalite kontrol ve rutin analizleri son derece önemlidir. Ülkemiz ve diğer ülkeler ilaçların bu rutin analiz ve kalite kontrol işlemlerini belli yasa ve yönelgelerle zorunlu kılmaktadır. Bununla birlikte günümüzde daha etkin tedavi ve az yan etkisi dolayısıyla iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren preparatlar üretilmektedir. Dolayısıyla klasik olarak kombine preparatların analizi kromatografi gibi ayırma teknikleri gerektirmektedir. Bu kromatografik yöntemler ile analizi pahalı ve zaman alıcıdır. Bu kapsamda hızlı, ucuz, kolay ve güvenilir sonuçlar veren yöntemlerin geliştirilmesi kombine preparatların analizi için son derece hayatidir.

Yukarıda açıklandığı gibi MOEX ve HCT bileşiklerini içeren bir ticari farmasötik preparatın kantitatif analizi için yeni, hızlı, kolay, uygulanabilir ve güvenli sonuçlar veren yöntemler geliştirilmesi amaçlanmış olup, bu amaç MOEX-HCT karışımın analizi için kemometrik PCR, PLS ve db5-SDD yöntemleri geliştirilerek gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tez kapsamında PCR, PLS ve db5-SDD yöntemleriyle elde edilen sonuçları doğrulamak amacıyla türev ve YBSK yöntemleri geliştirildi. Bütün geliştirilen yöntemlerin sonuçları varyans analiz (ANOVA) testi kullanılarak karşılaştırıldı. ANOVA test sonuçları, önerilen yöntemler ile elde edilen deneysel sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir.

Tez kapsamında geliştirilen ve başarılı bir şekilde MOEX ve HCT içeren tabletlerin analizine uygulanan kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme kemometrik kalibrasyon yöntemleriyle son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu tez kapsamında geliştirilen yöntemler analiz işlemlerinde son derece hızlı, kolay uygulanabilir ve ekonomiktir. Kemometrik PCR, PLS ve db5-SDD 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 MOEX ve HCT 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 MOEX ve HCT analizi için kullanılabilmesi bakımından tez çalışmasını orijinal kılmaktadır.

ÖZET

Moeksipril Hidroklorür/Hidroklortiazid İçeren Ticari Farmasötik Preparatın Kemometrik Yöntemlerle Kantitatif Analizi

Bu tezin ilk amacı MOEX ve HCT içeren yapay karışımların ve ticari farmasötik tablet numunelerinin aynı anda kantitatif analizi için yeni kemometrik sürekli dalgacık dönüşümü ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri geliştirmektir.

Çalışmanın ikinci amacı tez kapsamında yeni geliştirilen sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleriyle; türev spektrofotometrisi ve YBSK ile elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıdır.

Bu bağlamda, birkaç ayrı dalgacık türüne MOEX ve HCT'den en iyi geri kazanım tayinini elde etmek amacıyla optimal sürekli dalgacık transfer yaklaşım testi uygulanmıştır. Bunun sonucu olarak; doubechies5 sürekli dalgacık türü skala faktörü $a=512$ analiz metodu ile belirlenen sinyaller olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon grafikleri db5-SDD genlikleri ve konsantrasyon (MOEX ve HCT için 1.0 – 18.0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında) arasındaki matematiksel ilişkiye doğrusal regresyon analizi uygulanarak elde edildi.

Kemometrik çok değişkenli kalibrasyonun uygulanmasında, Temel bileşen regresyon ve En küçük kareler metotları absorbans data matrisi (1441×36) ve kalibrasyon seti (36×2) kullanılarak oluşturulmuştur.

Geliştirilen db5-SDD, Temel Bileşen Regresyon(PCR) ve En küçük Kareler metotların(PLS) doğruluğu aşağıdaki parametreler kullanılarak gösterilmiştir. Bunlar, geri kazanım çalışması, günüçi ve günler arası çalışması ve standart ilavesi çalışmasıdır.

Örneğin, yüzde olarak geri kazanım ve bağıl standart sapma db5-SDD, PCR ve PLS metotlarının uygulanmasıyla MOEX için % 100.1 ile % 0.15, HCT için % 101.2 ile % 2.51 olarak elde edilmiştir; PCR metodunda MOEX için geri kazanım % 101.2, standart sapması % 2.22 ve HCT için geri kazanım % 99.1 ve standart sapması %2.81 olarak bulunmuş; PLS metodunda MOEX için geri kazanım % 100.1, standart sapması % 2.36 ve HCT için geri kazanım % 99.0 ve standart sapması % 1.82 olarak bulunmuştur.

Buna ilave olarak MOEX – HCT karışımları için gün içi, günler arası analizleri ve standart ilavesi tekniğini içeren uygulamalardan memnun edici sonuçlar alınmıştır.

Kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve SDD sinyal işleme metotlarından elde edilen deneysel sonuçların karşılaştırılması için iki yeni metot olan birinci dereceden türev spektrofotometrik ve YBSK metotlarının aralıkları 1.0 ila 18.0 µg/mL olacak şekilde geliştirilmiştir. Yukarıda bahsedilen PCR, PLS ve db5-SDD metotlarının uygulamaları kullanılarak her iki Türev spektrofotometrik ve YBSK metotları doğrulanmıştır.

Geliştirilen SDD, PCR ve PLS, Türev ve YBSK metotlarının tümü, MOEX ve HCT'nin ticari tabletlerde eş zamanlı olarak tayinleri için başarıyla uygulanmıştır ve tüm metotlardan elde edilen sonuçlarda, iyi bir kabul edilebilirlik mevcuttur.

Anahtar Kelimeler : Çok değişkenli kalibrasyon ve sürekli dalgacık dönüşüm yöntemleri, Hidroklorotiazid, İkili karışım, Kemometri, Moeksipril Hidroklorür, Tablet.

SUMMARY

Quantitative Analysis of Moexipril Hydrochloride/Hydrochloridetiiazide Containing Commercial Pharmaceutical Preparation by Chemometric Methods

First main aim of this thesis is to develop new chemometric continuous wavelets transform and multivariate calibration methods for the simultaneous quantitative analysis of synthetic samples and commercial pharmaceutical tablet samples containing MOEX and HCT compounds. Second aim is to compare the results provided from the developed chemometric signal processing and multivariate calibration methods with those obtained by newly developed derivative spectrophotometric and HPLC methods.

In this context, several wavelet families were tested to find the optimal continuous wavelet transfer approach giving the best recovery determination results for both MOEX and HCT. As a results; doubeschies5 continuous wavelet family the scaling factor $a=512$ was found to be appropriate for the quantitative resolution of two-component mixtures.

Calibration graphs were obtained by applying the linear regression analysis to the relationship between db5-CWT amplitudes and concentration for MOEX and HCT the linear concentration range of 1.0 – 18.0 $\mu\text{g/mL}$.

In the application of the chemometric multivariate calibration, Principal component regression and partial least-square were constructed by using the calibration set (36×2) dimensional and absorbance data matrix (1441×36) .

The validity of the developed db5-CWT, principal component regression and partial least-square methods were performed by using the following sequences, recovery studies, intra-day and inter-day analyses and standard addition technique.

For example, percent mean recoveries with relative standard deviations obtained by applications of db5-CWT, PCR and PLS methods were found as 100.1% with 0.15% for MOEX and 101.2% with 2.51% for HCT; for PCR methods were found as 101.2% with 2.22% for MOEX and 99.1% with 2.81% for HCT; for PLS methods were found as 100.1% with 2.36% for MOEX and 99.0% with 1.82% for HCT.

In addition to that the applications of intra-day and inter-day analysis and Standard addition technique indicate that the above methods gave us the satisfactory results for the MOEX – HCT mixtures.

In order to compare the experimental results obtained from chemometric multivariate calibration and CWT signal processing methods, two new analytical methods first derivative spectrophotometric and HPLC in the concentration ranges 1.0 and 18.0 $\mu\text{g/mL}$ were improved respectively. Both derivative and HPLC methods were validated by using the above mentioned procedures similar to PCR, PLS and db5-CWT applications.

All of the developed CWT, PCR and PLS, derivation and HPLC methods were successfully applied to the simultaneous determination of MOEX and HCT in commercial tablets and a good agreement was observed for the results obtained by all the proposed methods.

Key Words: Binary Mixture, Chemometrics, Hydrochlorothiazide, Moexipril Hydrochloride, Multivariate calibration and continuous wavelet transform methods, Tablet

KAYNAKLAR

- ABDELLATEF HE. (1998). Utility of certain pi-acceptors for the spectrophotometric determination of Moeksipril, *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 Moeksipril 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 Hidroklorotiazide and its formulations using ammonium molybdate reagent, *Analytica 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 Hidroklorotiazide 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, Universty 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 Hidroklorotiazide 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.
- DING L ,YANG LH , LIU F, JU WZ , XIONG NN. (2006). A sensitive LC-ESI-MS method for the determination of Hidroklorotiazide 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 oxyclozanide 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, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 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, *International Journal of Pharmacy*, 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 cyproterone 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-doğrusal 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 Moeksipril and Hidroklorotiazide 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 Hidroklorotiazide in human whole blood, *Chromatographia* **61 (11-12)**: 581-585
- GUMIENICZEK A, HOPKALA H. (1998). High-performance liquid chromatographic assay for Moeksipril 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 Hidroklorotiazide 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 Hidroklorotiazide 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 Moeksipril, *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., MĪLĪTKY 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 Hidroklorotiazide in human whole-blood, *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* **614 (2)**: 293-298
- NIE F, LU JR, NIU WF. (2005). Chemiluminescence determination of Hidroklorotiazide using Hidroklorotiazide-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 Hidroklorotiazide in the presence of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **11 (10)**: 1033-1036
- RADI A. (2001). Stripping voltammetric determination of Hidroklorotiazide 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 Hidroklorotiazide as copper complex at a hanging mercury drop electrode. *Chemia Analityczna* **48 (2)**: 273-281
- RAHMAN N, ANWAR N, KASHİF M. (2006). Optimized and validated initial-rate method for the determination of Moeksipril 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 Hidroklorotiazide 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 Hidroklorotiazide 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-Moeksipril 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-Moeksipril 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-Hidroklorotiazide 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 Hidroklorotiazide 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 Hidroklorotiazide 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 Moeksipril 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 Hydrochlorotiazide 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 Hidroklorotiazide, : *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 Hidroklorotiazide 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: Ozan

Soyadı: Halisçelik

Doğum yeri: Ankara

Doğum tarihi: 15.09.1983

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Bozhöyük Caddesi Portakal Çiçeği 2.Sitesi 4/9
Eryaman / Ankara

II-Eğitimi:

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2001-2006)

Ankara Lisesi (1997-2000)

Ankara Rauf Denktaş Lisesi (1994-1997)

Alp Koleji İlkokulu (1989–1994)

Yabancı Dil: İngilizce

Ünvanlar: Kimyager

Mesleki Deneyimi: Kimyager