



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**AMLODİPİN BESİLAT VE İRBESARTAN’NIN
FARMASÖTİK PREPARATLARDAN AYNI ANDA
TAYİNLERİ İÇİN GELİŞTİRİLEN KEMOMETRİK
YÖNTEMLERDE ÇOKLU METOT OPTİMİZASYONU
TEKNİKLERİNİN KULLANIMI**

Metin Can ALKAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. İsmail Murat PALABIYIK

ANKARA

2019

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMLODİPİN BESİLAT VE İRBESARTAN’NIN
FARMASÖTİK PREPARATLARDAN AYNİ ANDA
TAYİNLERİ İÇİN GELİŞTİRİLEN KEMOMETRİK
YÖNTEMLERDE ÇOKLU METOT OPTİMİZASYONU
TEKNİKLERİNİN KULLANIMI**

Metin Can ALKAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. İsmail Murat PALABIYIK

ANKARA

2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Amlodipin Besilat ve İrbesartan'nın Farmasötik Preparatlardan Aynı Anda Tayinleri İçin Geliştirilen Kemometrik Yöntemlerde Çoklu Metot Optimizasyonu Tekniklerinin Kullanımı” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma /araştırma tarafımdan yapılmış olup tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Metin Can ALKAN

Tarih: 23/08/2019

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Metin Can ALKAN tarafından hazırlanan

“Amlodipin Besilat ve İrbesartanın Farmasötik Preparatlarda Aynı Anda Tayinleri İçin Geliştirilen Kemometrik Yöntemlerde Çoklu Metot Optimizasyonu Tekniklerinin Kullanımı” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29.08.2019



İmza

Prof. Dr. Incilay SÜSLÜ

Hacettepe Üniversitesi

Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Bengi USLU

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza



Doç. Dr. İsmail Murat PALABIYIK

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1.Giriş ve Amaç	1
1.2.Amlodipin Besilat ve İrbesartan Maddelerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
1.2.1. Amlodipin Besilat'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
1.2.2. İrbesartan'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	5
1.3. Amlodipin Besilat ve İrbesartan Maddelerinin Farmakolojik Özellikleri	5
1.3.1. Amlodipin Besilat'ın Farmakolojik Özellikleri	5
1.3.2. İrbesartan'ın Farmakolojik Özellikleri	6
1.4. Amlodipin Besilat ve İrbesartan Maddeleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	7
2. GEREÇ VE YÖNTEM	14
2.1. Kemometrik Yöntemler	14
2.1.1. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (TBR)	15
2.1.2. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (KIEK)	19
2.1.3. Çoklu Metot Optimizasyonu Teknikleri	20
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
2.3. Kullanılan Cihazlar	21
2.4. Kullanılan Bilgisayar	22
2.5. Kullanılan Bilgisayar Konfigürasyonu	22
2.6. Üzerinde Çalışma Yapılan Farmasötik Preparatlar	22
2.7. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	22
3. BULGULAR	23
3.1. Kullanılan Etkin Maddelerin Saflık Kontrolleri	23
3.1.1. AML İçin Saflık Kontrolü	23
3.1.2. IRB İçin Saflık Kontrolü	25
3.2. Kemometrik Yöntemlerle UV Spektrofotometre Cihazından Alınan Spektroskopik Verilerin Değerlendirilmesi İle Elde Edilen Sonuçlar	26
3.2.1. Temel Bileşen Regresyonu (TBR) Yöntemi İle Analiz Sonucunda Elde Edilen Veriler	27
3.2.2. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanışı	35
3.2.3. Kısmi En Küçük Kareler (KIEK) Yöntemi İle Analiz Sonucunda Elde Edilen Veriler	40
3.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanışı	46

4. TARTIŞMA	51
4.1. Geliştirilen TBR ve KIEK Yöntemlerinin Validasyonu	55
4.1.1. Geliştirilen KIEK TBR ve KIEK Yöntemlerinin Farmasötik Preparata Uygulanması	56
4.1.2. Literatür Yöntemleri ile Karşılaştırma	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
ÖZET	63
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	71

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında hipertansiyon tedavisinde kullanılan kalsiyum kanal blokörü olan amlodipin besilat ve Anjiotensin-II antagonisti olan İrbesartan etkin maddelerinin ayrı ayrı ve kombine halindeki preparatlarından aynı anda tayini için spektrofotometri yöntem geliştirilmiştir.

Yüksek lisans tezimin hazırlanmasında ve 5 yıllık Eczacılık Fakültesi eğitimim de bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İ. Murat PALABIYIK'a teşekkür ediyorum.

Anabilim Dalımız öğretim üyelerine her konuda bana yaptıkları yardımlardan ve anlayışlarından dolayı teşekkür ediyorum.

Bütün yaşantım ve görevim sırasında maddi ve manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bana her türlü konuda destek olan aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AML	Amlodipin Besilat
TBR	Temel Bileşen Regresyon Yöntemi
KIEK	Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi
IRB	İrbesartan
ARB	Anjiotensin II Reseptör Blokörleri
HCTZ	Hidroklorotiyazid
VAL	Valsartan
ATV	Atorvastatin
OLM	Olmesartan
UV	Ultraviyole
IR	İnfrared
PAF	Popülasyona Bağlı Fraksiyon
FDA	Food and Drug Administration
AT 1	Anjiyotensin 1
ARB	Anjiyotensin Reseptör Blokörü
RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DAD	Diyot Dizi Dedektörü
RSD	Bağıl Standart Sapma
ICH	Uluslararası Uyumlaştırma Kongresi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
THKT	Tahmin Hatalarının Karelerinin Toplamı

YYM	Yüzey Yanıt Metodu
TAS	Tayin Alt Sınırı
FDC	Sabit Doz Kombinasyonu
TBA	Temel Bileşen Analizi
RMS	Karelerin Ortalamalarının Karekökü



ŞEKİLLER

Şekil 3.1. AML 'nin, metanol içerisinde 25 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ çözeltisinin UV spektrumu	24
Şekil 3.2. AML 'nin IR spektrumu	24
Şekil 3.3. IRB 'nin, metanol içerisinde 30 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ çözeltisinin UV spektrumu	25
Şekil 3.4. IRB 'nin, IR spektrumu	26
Şekil 3.5. Metanol içerisinde a) 10 $\mu\text{g/mL}$ AML , b) 20 $\mu\text{g/mL}$ IRB , c) 10 $\mu\text{g/mL}$ AML + 20 $\mu\text{g/mL}$ IRB çözeltilerinin UV spektrumları	27
Şekil 3.6. AML için TBR yönteminde elde edilen yüzey grafikleri	33
Şekil 3.7. IRB için TBR yönteminde elde edilen yüzey grafikleri	34
Şekil 3.8. AML için KIEK yönteminde elde edilen yüzey grafikleri	44
Şekil 3.9. IRB için KIEK yönteminde elde edilen yüzey grafikleri	45

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. AML ve IRB karışımı için TBR yönteminde kullanılan deneme veya kalibrasyon seti	28
Çizelge 3.2. TBR yönteminde kullanılan faktör seviyelerine karşılık gelen değerler	30
Çizelge 3.3. TBR ve KIEK yönteminde kullanılan faktör seviyeleri ile oluşturulan denemeleri gösteren Box – Behnken tasarım tablosu	31
Çizelge 3.4. Box – Behnken tasarımı uygulandıktan sonra TBR yöntemi için ikinci derece denklem için elde edilen katsayılar	32
Çizelge 3.5. AML ve IRB 'ın standart karışımları için TBR yöntemi ile elde edilen geri kazanım sonuçları	37
Çizelge 3.6. TBR yönteminin gün içi ve günler arası uygulama bulguları (Olması gereken değerler: AML = 6 µg/mL, IRB = 20 µg/mL)	38
Çizelge 3.7. İRDAPİN® film tablet preparatına standart ekleme tekniğiyle eklenen maddelerin TBR yöntemi kullanılarak tayin edilen miktarları (AML eklenen miktar = 10 mg, IRB için eklenen miktar = 20 mg)	38
Çizelge 3.8. İRDAPİN® film tablet preparatına TBR yönteminin uygulanması ile elde edilen sonuçlar (Etiket üzerinde yazılı olan miktar: AML = 10mg, IRB = 150m)	39
Çizelge 3.9. KIEK yönteminde kullanılan faktör seviyelerine karşılık gelen değerler	42
Çizelge 3.10. Box – Behnken tasarımı uygulandıktan sonra KIEK yönteminde ikinci derece denklem için elde edilen katsayılar	43
Çizelge 3.11. AML ve IRB 'ın standart karışımları için KIEK yöntemi ile elde edilen geri kazanım sonuçları	48
Çizelge 3.12. KIEK yönteminin gün içi ve günler arası uygulama bulguları (Olması gereken değerler: AML = 6 µg/mL, IRB = 20 µg/mL)	49

Çizelge 3.13. İRDAPİN® film tablet preaparatına standart ekleme tekniğiyle 49
eklenen maddelerin KIEK yöntemi kullanılarak tayin edilen miktarları
(**AML** için eklenen miktar = 10 mg, **IRB** için eklenen miktar = 20 mg)

Çizelge 3.14. İRDAPİN® film tablet preparatına KIEK yönteminin uygulanması 50
ile elde edilen sonuçlar (Etiket üzerinde yazılı olan miktar:
AML = 10 mg **IRB** = 150 mg)



1. GİRİŞ

1.1.Giriş ve Amaç

Hipertansiyon veya bazen arteriyel hipertansiyon denilen yüksek kan basıncı, kanın kronik bir tıbbi durum olduğu atardamarlardaki basıncın yükselmesidir. Kan basıncı, sistolik ve diyastolik basınç olmak üzere iki ölçümle özetlenir. Kalp kası büzüldüğünde sistol, atımlar arasında rahatlıyor ise diastol olarak tanımlanır. Bu sırasıyla, maksimum ve minimum basınca eşittir. İstirahat halinde normal kan basıncı 100-140 mmHg sistolik ve 60–90 mmHg diyastolik arasındadır. Yüksek kan basıncı 140/90 mmHg'de veya daha fazla olması durumunda mevcut olduğu söylenir. Hipertansiyon primer hipertansiyon ve sekonder hipertansiyon olarak sınıflandırılır. Hipertansiyon kalbe baskı yapar, bu da tedavi edilmezse hipertansif kalp hastalığına ve koroner arter hastalıklarına yol açmaktadır. Hipertansiyon ayrıca inme, arterlerin anevrizmaları (örneğin aort anevrizması), periferik arter hastalığı ve kronik böbrek hastalıkları gibi rahatsızlıkların majör risk faktörüdür. Diyet ve yaşam tarzı değişiklikleri, kan basıncı kontrolünü artırabilir ve azaltabilir. Yaşam tarzı değişikliğinin yetersiz ve etkili olmadığı insanlarda ilaçla tedavinin hala sıklıkla kullanılmasına rağmen; diyet ve yaşam tarzı değişikliği kan basıncının kontrol altına alınması ve sağlık komplikasyonlarının azaltılmasında olanak sağlamaktadır. (Nandhini ve ark., 2014)

Esansiyel hipertansiyon (primer hipertansiyon veya idiyopatik hipertansiyon) hipertansif hastaların % 95'ini kapsayan yaygın tipte hipertansiyondur. Esansiyel hipertansiyon, çevresel ve genetik faktörler arasındaki etkileşimler sonucunda ve ailesel kaynaklı olabilir. Yaş ile birlikte hipertansiyon yaygınlığı artar ve geç yaşta yüksek kan basıncına sahip bireyler sonradan gelişmiş hipertansiyon riskini artırır. Hipertansiyon serebral, kardiyak ve böbrek hastalıkları riskini artırır. (Nandhini ve ark., 2014)

Hipertansiyon kardiyovasküler hastalık için değıştirilebilir bir risk faktörüdür ve dünya çapında mortalite için popölasyona bağılı fraksiyonun (PAF) %10'undan fazlasını oluşturur. Son birkaç on yılda, hipertansiyon teşhisi, tedavisi ve kontrolünde başarı elde edilmiş, ancak hastalığın önlenmesindeki çalışmalar azalmıştır. Elde edilen veriler ve biriken kanıtlar doğrultusunda, sağlıklı yaşam tarzı faktörlerinin (sağlıklı bir diyet ve artan fiziksel aktivite gibi) kan basıncını düşürmeye katkıda bulunduğı ve bu risklerin yönetilmesinin, en azından bir dereceye kadar iyileştirdiğı, genetik yatkınlığın hipertansiyona ve sonraki kardiyovasküler sekel gelişiminin dengelenmesine neden olabileceğini gösterilmiştir. Ayrıca, toplum temelli yaklaşımlar, popölasyondaki diğer kardiyovasküler risk faktörleriyle birlikte kan basıncını düşürmede etkili olabilmektedir. Yaşlanan popölasyonun olası etkisi, obezite, hareketsiz yaşam tarzları ve yüksek sodyum tüketimi, hipertansiyon ile ilişkili ana risk faktörlerinin daha iyi anlaşılmasını ve araştırılmasını gerektirmektedir. Önceki çalışmalarda yaygın olarak yaşlılık, kadın cinsiyet, artan vücut kitle indeksi veya bel çevresi ve ailede hipertansiyon veya erken kardiyovasküler hastalık öyküsü, yüksek kan basıncının önemli belirleyicileri olduğu da gösterilmiştir. Ancak, mevcut tahmin modellerinin birçoğı beyaz etnik kökenliler ve diyabetsiz bireylerle sınırlı kalmıştır. Birkaç model beslenme, fiziksel aktivite veya yaşam tarzı ile hipertansiyon arasındaki ilişki incelemiştir. Kanada'da elde edilen verilerle hipertansiyon için ana risk faktörlerinin belirlenmesi, sağlık politikasını ve hedeflenen ulusal müdahaleleri bilgilendirmek için önemlidir. Bu amaçla, Kanada Sağlık Önlemleri Anketi'nin ilk dört döngüsünden elde edilen verileri kullanarak, bu çalışma 20 ila 79 yaşları arasındaki Kanadalılar arasındaki hipertansif durum için ana risk faktörleri incelenmiş ve kadınlarda hipertansiyonu tahmin etmek için bileşik bir risk puanı kullanmıştır. (Leung ve ark., 2019)

AML kalsiyum kanal blokörü antihipertansif ilaç olarak geçmişten günümüze kadar uzunca bir süredir kullanılmaktadır. Kalsiyum kanal blokörlerinin hipertansif hastalıkların tedavisinde kullanılanları, yapıca 1,4 Dihidropiridin, Fenilalkilamin, Benzotiyazepin olmak üzere 3 farklı gruba ayrılırlar. Ele aldığımız **AML** etkin maddesi 1,4 Dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokörü olup güçlü bir periferik vazodilatördür. Dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokörü ilaçlar arasında

kalsiyum kanallarına bağlanma ve ayrılmasının ve ayrıca metabolik inaktivasyonunun da yavaş olması nedeniyle yarı ömrü fazla olan bir ilaçtır. Bu nedenle günde tek dozluk kullanıma olanak sağlaması ile diğerlerinden farklılık gösterir. Bu etkisi sebebiyle günümüzde yalnız başına ve kombine halindeki preparatları bulunmaktadır. Günümüzde tek başına **AML** içeren farklı miligram ve adetlerde yaklaşık 78 adet (74 adet tablet formu ve 4 adet efervesan tablet formu) farmasötik preparat ticari olarak satılmaktadır.

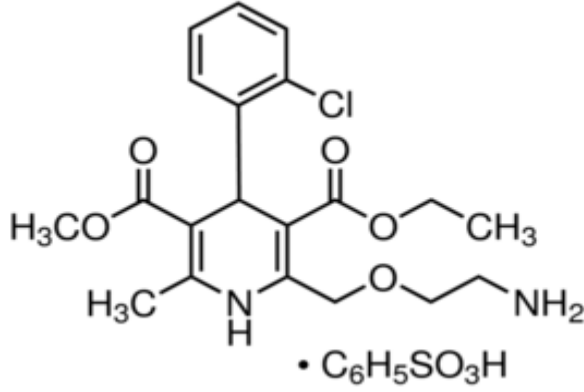
İRDAPİN® ise Anjiotensin II antagonisti olarak günümüzde kullanılır ve anjiotensin II etkilerinin hepsini bloke etmesi beklenmektedir. Hipertansiyon tedavisinde kalp atım hızını minimum düzeyde etkileyerek kan basıncını düşürür. Etkisini minimum boyutlarda gösterdiği için güvenilirlik oranı yüksektir. Günümüzde tek başına ve kombine halinde kullanılan **IRB**'nin tek başına olarak farklı miligram ve adetlerde yaklaşık 32 adet ticari preparatları bulunmaktadır.

Yukarıda anlatıldığı gibi çok sayıda preparatın içerisinde yer alan **AML** ve **IRB**'nin tek tek ve kombine haldeki formlarının aynı anda miktar tayinlerinin yapılması oldukça önemlidir. Bu nedenle yapılacak olan yüksek lisans tezinde sayılan preparatlar içerisinde **AML** ve **IRB**'nin ayrı ayrı ve birlikte, doğrudan etkin madde ve ticari preparatları üzerinden seçilmiştir. Bu etkin maddelerin analizinde rutin olarak kullanılacak kolay ve duyarlı analiz tekniklerini geliştirmek tezimizin temel amacıdır. Tezimizde spektrofotometrik verilerin kullanılmasıyla kemometrik yöntemlerin geliştirilmesi ve analiz esnasında ortam koşullarının tüm analizlerde aynı olacak şekilde optimize edilmesi hedeflenmiştir.

Yaptığımız literatür çalışmalarında iki etkin maddenin aynı anda kombine bir şekilde herhangi bir çalışmanın yapılmamış olması, geliştirdiğimiz bu yöntemler ile yaptığımız bu çalışmaların özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Ayrıca bu şekilde karışım analizlerinin, diğer çalışmalara ışık tutması ve bu konuda yeni yöntemlerin geliştirmesi açısından önemlidir.

1.2. Amlodipin Besilat ve İrbesartan Maddelerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

1.2.1. Amlodipin Besilat'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Kimyasal Adlandırması: Benzensülfonikasıit;3-O-etil-5-O-metil-2-(2-aminoetoksümetil)-4-(2-klorofenil)-6-metil-1,4-dihidropridin-3,5-dikarboksilat

Kapalı Formülü: C₂₀H₂₅ClN₂O₅ . C₆H₅SO₃H

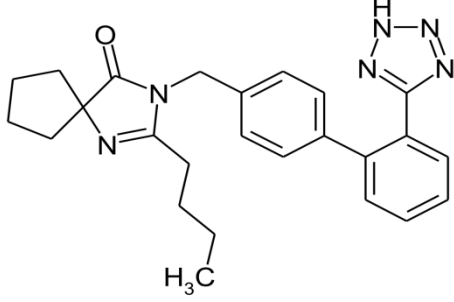
Molekül ağırlığı: 567.1 g/mol

Erime noktası: 199-201 °C

Fiziksel özellikler: Beyaz veya kapalı- beyaz kristal toz halindedir.

https://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=amlodipin

1.2.2. İrbesartan'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Kimyasal Adlandırması: 2-butil-3 - [[4- [2- (2H -tetrazol-5-il) fenil] fenil] metil] - 1,3-diazaspiro [4.4] non-1-en-4-on

Kapalı Formülü: C₂₅H₂₈N₆O

Molekül ağırlığı: 428.5g/mol

Erime noktası: 180-181 ° C

Fiziksel özellikler: Kristal beyaz toz

(https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4454663_EN.htm).

1.3. Amlodipin Besilat ve İrbesartan'ın Farmakolojik Özellikleri

1.3.1. Amlodipin Besilat'ın Farmakolojik Özellikleri

Clavijo ve arkadaşları 1994 yılında, **AML**'nin kimyası, farmakolojisi, farmakokinetiği, etkinliği ve olumsuz etkilerini gözden geçirmiştir. **AML**, kalsiyum antagonistlerinin dihidropiridin alt sınıfına aittir. **AML**, vasküler düz kas için yüksek seçiciliğe ve miyokard kasılmasına minimal etkiye sahip güçlü bir periferik ve koroner vazodilatördür. Oral uygulamadan sonra emilim yavaştır ve etki süresi 36-45 saatlik bir yarılanma ömrü ile uzundur. **AML**, hipertansiyon, kronik stabil angina ve vazospastik angina tedavisinde kullanılmak üzere FDA onaylı bir ilaçtır. Ayrıca sistolik disfonksiyon (New York Kalp Derneği sınıfları II ve III) nedeniyle konjestif kalp yetmezliği olan hipertansif veya anginal hastalarda kullanılır. Klinik çalışmalar, günde bir kez **AML** 5-10 mg tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde hipertansiyon ve anjinaların 24 saat kontrol altına alındığı gözlenmektedir. Bugüne

kadar klinik olarak önemli bir ilaç etkileşimi gözlenmemiştir. **AML**, serum glikoz veya lipid seviyeleri üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermemiştir. En yaygın olumsuz etki periferik ödemdir. **AML**, hipertansiyon ve angina tedavisi için tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde verildiğinde etkili ve iyi tolere edilir. **AML**, sistolik disfonksiyona bağlı konjestif kalp yetmezliği olan hipertansiyon veya angina hastalarında verapamil, diltiazem ve nifedipine göre avantajlar sunabilir (Clavijo ve ark., 1994).

1.3.2. İrbesartan'ın Farmakolojik Özellikleri

Yeni geliştirilen ve pazarlanan anjiyotensin II tip 1 (AT1) reseptör blokörleri (ARB), iyi tolere edilebilirlik profilleri ile, diğer önde gelen antihipertansif maddelere eşdeğer etkinlik göstermektedir. Bu ajanların sağladığı AT1 reseptörünün spesifik hedeflemesi, renin-anjiyotensin sisteminin anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin önerdiğinden daha fazla ve tam bir blokaj göstermiştir. Bununla birlikte, ARB sınıfındaki farklılıklar sınırlı kalmaktadır. ARB'lerle ek veri birikimi ile birlikte, büyük ölçüde ARB'lerin bireysel farmakolojik profillerine dayanan sınıf içi ayrımlar yapmak mümkündür. Bu amaçla emilim, dağılım, yarı ömür, doz tepkisi ve anjiyotensin II antagonizmi için kullanılan ilaçlar içerisinde üstünlük göstermektedir. Bu özellikler bir grup olarak görüldüğünde, **IRB**'nin diğer ARB'lerle elde edilenlerin ötesinde avantajlar sunduğu görülmektedir. **IRB** iyi emilir, antihipertansif aktivitesini sergilemek için aktif bir metabolit biyotransformasyona ihtiyaç duymaz. **IRB** geniş bir dağılım hacmine ve günlük doza izin vermek için yeterli yarı ömre sahiptir. Ayrıca bu etkilerini güçlü ve tutarlı bir doz ile sağlamaktadır. Bu farmakolojik farklılıklar, ARB sınıfının ilk üyesi olan losartan ile karşılaştırıldığında **IRB**'nin klinik üstünlüğünü açıklamaktadır. ARB'ler hakkında daha da fazla veri mevcut olduğu zaman, bu sınıfa ait diğer üyelerin avantajlarını belirleme, etkinliklerini daha da geliştirme olanağı sunabilir (Adams ve ark., 2000).

1.4. Amlodipin Besilat ve İrbesartan Maddeleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Nimmu ve arkadaşları, sıçan plazmasında ve idrarda olmesartan (**OLM**), amlodipin (**AML**) ve hidroklorotiyazid (**HCTZ**) tayini için duyarlı, hızlı ve tekrar üretilebilir bir LC-MS / MS yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada irbesartan (**IRB**) iç standart olarak kullanılmıştır. Analitler, 1.0 mL/dak akış hızında asetronitril ve 10 mM amonyum asetat tamponu (pH 3.5, asetik asit ile ayarlanmış) karışımı kullanılarak gradient elüsyon yardımıyla bir Waters XTerra-C-18 kolonunda ayrılmıştır. Yöntemde analiz edilecek 3 etken madde için pozitif iyon elektrosprey yöntemi tercih edilmiştir. Spesifiklik, matris etkisi, geri kazanım, hassasiyet, doğrusallık, doğruluk ve stabilite gibi validasyon parametreleri **AML** için 0.4 - 100 ng/mL, **OLM** için 0.2 – 100 ng/mL, **HCTZ** için 0.1 - 100 ng/mL konsantrasyon aralığında incelenmiştir. Biyolojik örneklerle her bir etkin maddenin oral yolla 15 mg/kg alınması sonrasında konsantrasyonlar sırasıyla **OLM**, **AML** ve **HCTZ** için 10.32, 587 ve 3.4 mg/kg olarak bulunmuştur (Nimmu ve ark., 2018).

Ali ve arkadaşları kombine farmasötik preparasyonlarda **HCTZ** ve **IRB**'nin eşzamanlı analizi için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, öncelikle, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) tarafından önerilen farklı stres testi koşulları altında **HCTZ** ve **IRB** bozunmuştur. Bozunmuş örnekler, **HCTZ** ve **IRB** tayini için stabilite göstergeli bir ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirmek için kullanılmışlardır. İki etkin madde, 50 mM potasyum dihidrojen ortofosfat : asetronitril (55: 45, h / h) tamponundan (pH 2.5) oluşan hareketli faz kullanılarak, 1.3 mL / dk akış hızında, 30°C kolon sıcaklığında, 210 nm dalga boyunda ve 20 µL enjeksiyon hacmi ile bir C-18 kolonu üzerinde bozunma ürünlerinden ayrılmışlardır. **HCTZ** ve **IRB**'nin alıkonma süresi, sırasıyla yaklaşık 3 ve 5.2 dakika olarak gözlemlenmiştir. Yöntem doğrusallık, hassasiyet, doğruluk, özgünlük ve sağlamlık için valide edilmiştir. Sonuçlar, tarif edilen yöntemin, çeşitli stres koşulları altında oluşturulan bozunma ürünlerinin varlığında **HCTZ** ve **IRB**'nin miktar tayinleri için uygun olduğunu göstermiştir. Geliştirilen yöntemin, **HCTZ** ve **IRB** ilaçlarının stabilitesinin belirlenmesine de uygulanabilir olduğu belirlenmiş ve üretim ve kalite kontrol aşamalarında kullanılabileceği gösterilmiştir (Ali ve ark., 2016).

Bkhaitan ve arkadaşları 2015 yılında yayımlanan bir çalışmalarında Atorvastatin (**ATV**) , İrbesartan (**IRB**) ve Amlodipin'in (**AML**) ayrılması ve aynı anda tayinleri için bir stabilite göstergeli yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde, **ATV**, **IRB**, **AML** ve bunların ana bozunma ürünleri arasında ayrılma, 1 mL / dakika akış hızında asetonitril ve ortofosforik asit tamponu (pH 2.2) tamponunu bir gradient elüsyon yardımı ile kullanarak Waters XBrigde C18 kolonu üzerinde (5 µm, 25 x 0.46 cm) gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 240 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu etkin maddeler, asidik ve bazik hidroliz, oksidasyon, UV ışığına maruz kalma ve sıcaklık gibi stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Yöntemin doğrusalılık çalışmaları gerçekleştirilmiş ve her etkin madde için 5 - 30 µg / mL aralığında, sırasıyla **ATV**, **IRB** ve **AML** için korelasyon katsayısı değerleri (r^2) 0.9982, 0.9973 ve 0.9986 bulunmuştur. Tayin sınırları, bu üç madde için sırasıyla 0.05, 0.06 ve 0.08 µg / mL'dir. Geliştirilen yöntemlerde parçalanma ürünlerinin analiz edilen maddeler üzerinde herhangi bir girişim yapıcı etkisi gözlenmemiştir. (Bkhaitan ve ark., 2015).

Uslu ve arkadaşları 2016 yılında yayımlanan bir çalışmalarında, yeni geliştirilen sabit doz kombinasyonlu (FDC) İRDAPİN PLUS® (İrbesartan/ Amlodipin/ Hidroklorotiyazid, 300 mg / 10 mg / 12.5 mg) film kaplı tabletin, farmakokinetik özelliklerini ve tolere edilebilirliğini araştırmışlardır. Bu çalışma için 36 denek, bilgisayar tarafından oluşturulan randomizasyon şemasına göre rastgele iki gruba ayrılmıştır. **AML**, **IRB** ve **HCTZ** tayini, heparinize insan plazmasında tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farmakokinetik bulgular, Nobel'in yeni geliştirilen FDC tabletinin, çalışılan koşullar altında sağlıklı popülasyondaki pazarlanan yenilikçi formülasyonlara biyoeşdeğer olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak Nobel'in yeni FDC formülasyonunun yenilikçilerin geleneksel formülasyonları ile birbirinin yerine kullanılabileceğini göstermiştir (Uslu ve ark., 2016).

Ebeid ve arkadaşları 2014 yılında yayımlanan bir çalışmalarında hidroklorotiazid, **AML**, moeksipril hidroklorür, valsartan, kandesartan sileksetil ve aliskiren hemifumaratın aynı anda tayinleri için bir ters faz sıvı kromatografisi

yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde **IRB** iç standart olarak kullanılmıştır. Kromatografik ayırma, Eclipse XDB-C-18 (4.6 x 150 mm, 5m) kolonu kullanarak ortam sıcaklığında, gradyan elüsyon modunda 1 mL/dakika akış hızında asetonitril : sodyum fosfat dibazik tampon çözeltisi (0.02 M, pH 5.5) kullanılarak sağlanmıştır. Ölçümler 220 nm'de gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet, parametreleri validasyon çalışmalarında incelenmiştir. Geliştirilen yöntemin belirtilen etkin maddelerin farmasötik dozaj formlarını kalite kontrolü ve rutin analizi için uygun olduğu görülmüştür (Ebeid ve ark., 2014).

Khalil ve arkadaşları 2011 yılında yayımlanan bir çalışmalarında, insan plazmasında valsartan (**VAL**) ve amlodipin (**AML**) aynı anda tayini için floresans dedektörün kullanıldığı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Irbesartan (**IRB**) çalışmada iç standart olarak kullanılmıştır. **VAL**, **AML** ve **IRB**, sadece metanol kullanılarak proteinlerin çöktürülmesi ile plazmadan izole edilmişlerdir. Yöntemde fosfat tamponu, metanol ve asetonitril karışımı gradient elüsyon yöntemi ile hareketli faz olarak kullanılmış ve ayırmalar Hipersil marka fenil kolonu üzerinde 0.8 mL / dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde uyarma dalga boyu olarak **VAL** için 253 nm ve emisyon dalga boyu olarak 374 nm ve **AML** için 393 nm ve emisyon dalga boyu olarak 446 nm seçilmiştir. Teşhis sınırları sırasıyla **VAL** ve **AML** için 0.3 ve 1.6 ng / mL olarak belirlenmiştir. Yöntemde aynı zamanda gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları gerçekleştirilmiştir. **VAL** ve **AML**'nin insan plazmasından geri kazanımı sırasıyla % 96.6 - 100.9 ve % 92.0 - 104.4 bulunmuştur. Basit numune hazırlama prosedürü ve kısa analiz süresinin avantaj olarak değerlendirildiği bu yöntemin farmakokinetik çalışmalara da başarıyla uygulanabileceğinden bahsedilmiştir (Khalil ve ark., 2011).

Rane ve arkadaşları kombine farmasötik dozaj formunda irbesartan (**IRB**) ve hidroklorotiyazid (**HCTZ**)'nin kantitatif eşzamanlı tahmini için basit ve kesin bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmiş ve geliştirilen bu yöntemin validasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Kromatografik ayırım asetik asit ile pH 5.5'e ayarlanmış 50 mM amonyum asetat tamponu - asetonitril (70:30 h / h) kullanılarak bir ACE5 C18

25 cm analitik kolon ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde dalga boyu olarak 235 nm seçilmiştir. **IRB**, **HCTZ** ve bunların kombine farmasötik preparatı, termal, fotolitik, hidrolitik ve oksidatif stres koşullarına maruz bırakılmış ve örnekler, geliştirilen yöntemle analiz edilmiştir. Bozunma ürünlerinin analiz üzerinde herhangi bir girişim yapıcı etkisinin olmadığı görülmüştür. Doğrusal çalışma aralığı **IRB** için 10 – 200 µg / mL ve **HCTZ** için 5 – 100 µg / mL'dir. Yöntemde iç standart olarak metilparaben kullanılmıştır. **IRB** ve **HCTZ** için korelasyon katsayıları sırasıyla 0.998 ve 0.999 olarak bulunmuş ve ortalama geri kazanım değerleri ise %100.45 - %101.25 aralığında hesaplanmıştır. **IRB** ve **HCTZ** için teşhis sınırları sırasıyla 0.019 ve 0.023 µg / mL ve tayin alt sınırları ise sırasıyla 0.053 ve 0.070 µg / mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin, **IRB** ve **HCTZ**'nin farmasötik preperatlardan tayini için uygun olduğu çalışmada belirtilmiştir (Rane ve ark., 2010).

Kristoffersen ve arkadaşları atenolol, sotalol, metoprolol, bisoprolol, propranolol ve karvedilol gibi beta-blokerlerin, diltiazem, amlodipin ve verapamil gibi kalsiyum kanal antagonistlerinin, losartan, irbesartan, valsartan ve telmisartan gibi anjiyotensin-II antagonistlerin ve flekainid gibi antiaritmik ilaçların, adli otopilerden alınan tam kan örneklerinden aynı anda tayini için bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi – k ütle spektrometresi (HPLC-MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Örnek ekstraksiyonu katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde, faktöriyel ve yanıt yüzey tasarımları da dahil olmak üzere deneysel tasarımları kullanılarak deneysel faktörlerin analiz üzerine etkisi incelenmiş ve sağlamlık test edilmiştir. Geliştirilen yöntem, adli otopsi vakalarından otopsi sonrası tam kan örneklerinde kardiyovasküler ilaçların belirlenmesi için kullanılmıştır (Kristoffersen ve ark., 2007).

Shaikh ve arkadaşları 2014 yılında yayımlanan bir çalışmalarında, **AML** ve **IRB**'nin aynı anda tayini için basit, hızlı ve kesin bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayrılma, su (pH:3.5) – asetonitril (60:40, h/h) hareketli fazının bir gradient elüsyon ile kullanımıyla Hypersil BDS C18 (250 mm X 4.6 mm, 5 µm) üzerinde 1.0 ml / dak akış hızında enjeksiyon hacmi 20 µl ve 245 nm dalga boyu seçilerek

gerçekleştirilmiştir. **AML** ve **IRB** için alıkonma süreleri sırasıyla 3.17 ve 5.133 dakika olarak görülmüştür. Doğrusal çalışma aralıkları **AML** ve **IRB** için sırasıyla 5 - 15 µg / ml ve 50 - 150 µg / ml'dir. Korelasyon katsayıları, **AML** ve **IRB** için 0.998 ve 0.998'dir. Geliştirilen metot, doğruluk, hassasiyet, tayin alt sınırı ve teşhis sınırı için ICH kılavuzuna göre doğrulanmış ve sonuçların kılavuza uygun olduğu görülmüştür. Geliştirilen yöntemin bu etkin maddeleri içeren farmasötik preparata uygulanabileceği çalışmada belirtilmiştir (Shaikh ve ark., 2014).

Swamy ve arkadaşları 2014 yılında **AML** ve **IRB**'nin farmasötik preparatlardan aynı anda tayini için basit, doğru ve kesin bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, 60:40 h/h oranında bir metanol ve potasyum dihidrojen orto fosfat (ortofosforik asit ile pH 3.4'e ayarlanmış) hareketli fazı kullanılarak bir Waters C18 kolonunda (Xbridge -150 x 4.6 mm, 5 p partikül boyutu) izokratik olarak gerçekleştirilmiştir. Yöntemde akış hızı olarak 1.0 ml / dakika ve ölçüm dalga boyu olarak 250 nm seçilmiştir. Uygun hale getirilmiş analiz koşulları altında **IRB** ve **AML**'nin alıkonma süreleri sırasıyla 5.80 dakika ve 3.12 dakika olarak görülmüştür. Yöntem ICH kurallarına göre valide edilmiştir. Kısa analiz süresi, yüksek geri kazanım, basitlik ve tekrar edilebilirliğin geliştirilen yöntemin avantajları olduğu ve bu yöntemin bu etkin maddeleri içeren farmasötik preparatlara uygulanabileceği çalışmada belirtilmiştir. (Swamy ve ark., 2014).

Acharya ve arkadaşları, hipertansiyonu tedavi etmek için kullanılan üçlü kombinasyon içeren farmasötik preparatlardan **HCTZ**, **AML** ve **IRB**'nin aynı anda tayinleri için basit, spesifik, doğru ve kesin bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi Yöntemde fosfat tamponu (pH : 4.5) : asetonitril (55 : 45, h/h) mobil fazı kullanılarak Phenomenax C18 kolonu (25 cm x 0.46 cm, 5µ) üzerinde 1 mL/dakika akış hızında ayırım gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 224 nm'de yapılmıştır. En uygun koşullar altında **HCTZ** i.in alıkonma süresi 3.489 dakika, **AML** için alıkonma süresi 4.181 dakika ve **IRB** için alıkonma süresi 11.376 dakika olarak belirlenmiştir. Bu yöntemde korelasyon katsayıları yine sırasıyla 0.9970, 0.9974 ve 0.9973 olarak bulunmuştur ve geri kazanım değerleri % 99.37, % 100.70

ve % 100.28 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, ICH kurallarına göre doğruluk, hassasiyet, özgünlük ve sağlamlık parametreleri incelenmiştir. Geliştirilen yöntemin, hızlı, spesifik ve doğru olduğu ve iyi bir çözünürlük ve kısa çalışma süresine sahip olduğu görülmüş olup bu sebeplerden dolayı rutin analizde kullanılabileceği çalışmada belirtilmiştir. (Acharya ve ark., 2018).

Shah ve arkadaşları 2015 yılında yayımlanan bir çalışmalarında **IRB** ve **AML**'nin aynı anda tayini için basit, hassas ve kesin bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi geliştirilmiştir. Sabit faz olarak silika jel 60-F254 ile önceden kaplanmış TLC alüminyum plakaları ve bir kloroform / toluen / metanol / asetik asit (6 / 2.5 / 1.5 / 0.5, h / h / h) çözücü sistemi kullanılmıştır. R_f değerleri **IRB** için 0.57 ± 0.02 ve **AML** için 0.30 ± 0.02 olarak belirlenmiştir. Ayrılan noktalar, 244 nm'de absorbanans modunda dansitometrik olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, **IRB** için bant başına 50 - 500 ng, **AML** için bant başına 400 - 900 ng aralığında, bant başına 14.4 ng ve bant başına 12.7 ng teşhis sınırlarıyla birlikte verilmiştir. Tayin alt sınırları, **IRB** için bant başına 47.4 ng ve **AML** için bant başına 42.0 ng dir. **IRB** ve **AML** stok çözeltileri asit ve alkali hidrolizine, kimyasal oksidasyona, kuru ısı bozunmasına ve foto bozunmaya tabi tutulduktan sonra HPTLC yöntemiyle analiz edilmişlerdir. Yöntem doğrusalılık, doğruluk, hassasiyet ve sağlamlık açısından valide edilmiş ve farmasötik preparatlara uygulanabileceği çalışmada belirtilmiştir (Shah ve ark., 2015).

Bodapati ve arkadaşları 2015 yılında farmasötik formülasyonlardaki **AML** ve **IRB**'nin stabilite göstergeli bir çalışma ile aynı anda tayinleri için basit, spesifik, doğru, kesin ve hassas bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografik (RP-HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. İki etkin maddenin kromatografik olarak ayrılması, sodyum asetat tamponu (pH 4.0) ve asetonitril (% 30 : 70, h / h) içeren hareketli faz ile izokratik modda Enable C18G kolonu (250 x 4.6 mm; 5 µm) üzerinde 0.6 ml / dak akış hızında gerçekleştirilmiş ve ölçümler 238 nm'de yapılmıştır. Geliştirilen yöntem doğrusalılık, aralık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı için valide edilmiştir. Tablet formülasyonu, asidik, alkali, oksidatif, termal ve fotoliz de dahil olmak üzere stresin bozunma koşullarına maruz bırakılmıştır. Yöntemde **AML**

ve **IRB**'nin alıkonma süresi sırasıyla 5.512 ve 6.321 dk olarak bulunmuştur. Doğrusallık, **AML** ($r^2 = 0.9999$) için 4 - 32 µg / ml ve **IRB** için 10 - 70 µg / ml konsantrasyon aralığında gözlenmiştir ($r^2 = 0.9998$). Gün içi ve günler arası kesinlik için % bağıl standart sapma (RSD), **AML** için 0.436 ve 0.699, **IRB** için 0.435 ve 0.30 olarak bulunmuştur. **AM,L** asidik ve termik karşı stabilite gösterirken, bazik, oksidatif ve fotolitik olarak daha fazla bozunduğu için daha az stabilite göstermiştir. **IRB** ısı koşullara karşı kararlılık gösterirken, geri kalan şartlarda özellikle oksidatif şartlarda daha fazla bozunmaktadır. Sonuç olarak, geliştirilmiş ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografik (RP-HPLC) yönteminin, tablet dozaj formunda **AML** ve **IRB**'nin eşzamanlı tespiti için basit, kesin ve duyarlı olduğu çalışmada belirtilmiştir (Bodapati ve ark, 2015).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kemometrik Yöntemler

Kemometrik yöntemler analizler sonucu elde edilen verilerin ölçüm işlemleri sırasında matematiksel ve istatistiksel işlemlerin birlikte kullanıldığı bir alandır. Bu teknikler kimya alanında özellikle analitik kimyada oldukça sık olarak kullanılmaktadır. Çeşitli enstrümental cihazlardan elde edilen veriler kemometrik yöntemlerle analiz edilebilmektedir. Bu alanda, spektrofotometri ve spektrofotometri gibi cihazlardan elde edilen verilerin analizinde kemometrik yöntemler oldukça sık olarak kullanılmaktadır ve bunlar her laboratuvarında bulunabilecek ve maliyeti diğerlerine göre daha düşük olan cihazlardır.

Spektrofotometrik yöntemler kullanılarak gerek tek başına gerekse karışım halindeki bileşenlerin analizi gerçekleştirilebilmektedir. Tek madde analizleri eğer uygun bir matris ortamı içerisinde yer alıyorsa ve diğer maddelerden ya da bulunduğu ortamdan kaynaklanabilecek herhangi bir girişim yoksa basit spektrofotometrik yöntemlerle klasik olarak tek değişkenli kalibrasyon yöntemleriyle gerçekleştirilebilir. Fakat tek madde tayinlerinin yanında özellikle ilaç endüstrisinde birden fazla etkin maddenin tayininin gerçekleştirileceği analizlerde bulunmaktadır. Bu durumda spektroskopik olarak tayin yapılmak istendiğinde spektrumların üst üste çakıştığı ve girişim yaptığı görülebilir. Bu durumda herhangi bir ön ayırma işlemine gerek olmaksızın bazı teknikler uygulanabilir. İlk olarak düşünebilecek yöntemler arasında türev spektrofotometri ve spektrum oranları – türev spektrofotometri yöntemleri gelebilir. Bu yöntemler uygun olsa da dalga boyu seçim zorunluluğu ve belli dalga boylarında ölçüm alınabilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu durumda analizler için çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri olan kemometrik yöntemlere başvurulabilir. Analiz edilecek matris ortamından gelen girişim yapan etkilerde bu yöntemler yardımıyla ortadan kaldırılabilir. Çok değişkenli analiz yöntemlerinde çok sayıda veri herhangi bir seçme işlemine gerek kalmaksızın kullanılarak cihazdan kaynaklanan gürültü pikleri bile en aza indirilebilir.

2.1.1. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (TBR)

Klasik en küçük kareler ve ters en küçük kareler yöntemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için faktör analizi olarak da bilinen kemometrik yöntemler geliştirilmiştir. Faktör analizlerinde, bir data seti içerisindeki varyansları modellendirmek için faktör olarak adlandırılan terimler kullanılır. Her bir faktör, hangi kaynaktan geldiği önemli olmaksızın, bir data içerisindeki varyansın maksimum miktarını içerir. Bu teknikler Temel Bileşen Regresyonu (TBR) ve Kısmi En Küçük Kareler Tekniği (KIEK) olmak üzere ikiye ayrılır (Smith, 2002; Otto, 1999; Özdemir, 1999).

Bu yöntemlerde kalibrasyon matrisi aşağıdaki gibi gösterilebilir.

$$\mathbf{A} = \mathbf{S}\mathbf{F} \quad (1)$$

Burada

$\mathbf{A}$ = Absorbansların $n \times p$ matrisi

$\mathbf{S}$ = Skorların $n \times f$ matrisi

$\mathbf{F}$ = Faktörlerin $f \times p$ matrisi

n = Standard spektrum sayısı

p = Absorbansların sayısı

f = Faktör sayısı

$\mathbf{A}$ matrisinde her bir sıra bir standart spektrumu içermektedir. $\mathbf{S}$ matrisinin sıraları ise her bir standart spektrum için skorları içermektedir. Bu skorların her biri $\mathbf{F}$ matrisindeki her bir sraya karşılık gelen faktörle çarpılarak $\mathbf{A}$ matrisini meydana getirmektedir (Smith, 2002).

TBR yönteminde ilk olarak bir set faktörler ve skorlar standart spektrumlarından hesaplanır. Bunu takiben, konsantrasyon verileri, kalibrasyon katsayılarını tayin etmek için skorlar ile bir doğrusal regresyon eşitliğinde birleştirilir. Temel bileşen regresyonu temel anlamda, temel bileşen analizi (TBA) ile regresyonun birleştirilmesidir. Analizler iki boyutlu bir sistem içerisinde temel bileşen ya da öz (eigen) vektör olarak da adlandırılan ve birbirine dik olan akslar kullanılarak gerçekleştirilir. En uygun vektör seçiminde analiz sonucunda elde edilen veriler kaçınıcı temel bileşen ya da öz vektörün üzerine düşüyorsa o temel bileşen tercih edilir. Bunun için aynı zamanda yazılım programları içerisinde çapraz validasyon teknikleri kullanılabilir. Mümkün olduğu kadar çok analitik bilgi içeren en az sayıda temel bileşeni analizlerde kullanmak oldukça önemlidir. Çok sayıda temel bileşen kullanıldığında sapmalar çok daha azalmasına rağmen, veriler birbirleri ile örtüşmeye başlar ve bu da hatalı sonuçlara yol açabilir (Smith, 2002).

$$\mathbf{C} = \mathbf{B}\mathbf{S}^T \quad (2)$$

Burada

$\mathbf{C}$ = Bileşen konsantrasyonlarının $m \times n$ matrisi

$\mathbf{B}$ = Kalibrasyon katsayılarının $m \times f$ matrisi

$\mathbf{S}^T$ = Skorların $f \times n$ matrisinin transpozu

n = Standard spektrum sayısı

p = Absorbansların sayısı

f = Faktör sayısı

m = Analit sayısı

$\mathbf{C}$ matrisinde, her bir kolon verilen bir örnek için analit konsantrasyonunu içermektedir. $\mathbf{B}$ matrisinin her bir sırası analit için katsayıları, her bir kolonu ise faktör için katsayıları içermektedir. $\mathbf{S}^T$ matrisinin her bir kolonu her bir standart için skorları içermektedir. Bu matrisler $\mathbf{B}$ matrisinin sırası ile çarpıldığında, her bir standart numune için analit konsantrasyonu elde edilir (Smith, 2002).

Kalibrasyon katsayılarının **B** matrisi denklemin diğer tarafına geçirildiğinde;

$$\mathbf{B} = \mathbf{CS}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1} \quad (3)$$

haline dönüşür. $(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}$ matrisi bir kare matristir yani satır sayısı sütun sayısına eşittir.

(1) eşitliğinde **S** yalnız bırakılırsa denklem aşağıdaki gibi düzenlenir.

$$\mathbf{S} = \mathbf{AF}^T \quad (4)$$

Bu aşamadan sonra, konsantrasyon bilgisi gibi bağımlı değişkeni içeren bir eşitliğe ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, (4) eşitliğinin her iki tarafında transpozu alınır.

$$\mathbf{S}^T = (\mathbf{AF}^T)^T \quad (5)$$

Buradan hareketle aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\mathbf{S}^T = \mathbf{FA}^T \quad (6)$$

Bu eşitlik eşitlik (2) ile birleştirildiğinde

$$\mathbf{C} = \mathbf{BFA}^T \quad (7)$$

halini alır. Herhangi bilinmeyen bir spektrum ölçüldüğünde absorbands matrisinin transpozu alınır. Katsayılar matrisi ve faktör matrisi kalibrasyondan bilindiği için bilinmeyen konsantrasyon (7) eşitliğinden hareketle hesaplanır (Smith, 2002).

Bu yöntemin avantajları aşağıdaki gibidir.

- a) Dalga boyu seçimi için herhangi bir kurala bağlı olunmaksızın spektrumun tamamı dahi kullanılabilir.

- b)** Analizler esnasında çok sayıda dalga boyunun kullanılması gürültü piklerinin etkisini en aza indirir.
- c)** Sadece analite spesifik katsayıların hesaplanmasını sağlar.
- d)** Karmaşık karışımların analizlerinde kullanılabilir.
- e)** Özel durumlarda, kalibrasyon içerisinde yer almayan bileşenlerin tayininde de kullanılabilir (Smith, 2002; Otto, 1999; Özdemir, 1999) .

.

TBR yönteminin dezavantajları:

- a)** Elle hesaplama yapıldığında klasik kemometrik yöntemlere göre daha yavaştır.
- b)** Geliştirilen modeller anlaşılabilirlik ve yorumlanabilirlik açısından karmaşıktır.
- c)** Çok sayıda standart numuneye uygun bir kalibrasyon için ihtiyaç duyulabilir.
- d)** Kalibrasyon numunelerinin hazırlanmasında konsantrasyonlar belirlenirken eş doğrusallıktan (ko-linearite) kaçınmak gereklidir. (Smith, 2002; Otto, 1999; Özdemir, 1999) .

Her analiz edilen numunenin konsantrasyonu, onun orijinal değeriyle karşılaştırılarak Tahmin hatalarının karelerinin toplamı (THKT) ölçülür. THKT, ölçüm değerlerinin, kalibrasyonda yer alan verilere uyum derecesini gösterir.

$$THKT = \sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2$$

Burada c_i , i . analiz numunesinin bilinen konsantrasyonunu gösterir. $\hat{c}_i$ ise i . analiz numunesinin kalibrasyon çözeltileri kullanılarak ölçülen konsantrasyonudur. Bu değer kısmi TBR ve KIEK yönteminde en uygun faktör seçimi için kullanılır. Mutlaka THKT değerinin minimum olması istenmez. Bazı durumlarda minimum olursa sonuçlar üst üste uyar ve böylece validasyon setinde daha zayıf sonuçlar elde edilir (Smith, 2002; Otto, 1999; Özdemir, 1999) .

2.1.2. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (KIEK)

Matriks hesaplamaları esasına dayanan Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi için hesaplama algoritması aşağıdaki gibidir.

(https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=1631359).

$$N = W'Y$$

$$Y = PN + E$$

N matrisi, Y matrisi içine yerleştirildiğinde,

$$Y = PW'Y + E = PW'Y + (I - PW')Y$$

Burada;

N: Temel Bileşen

Y: Gözlenen skorların seti

W: Ağırlıkları oluşturan bir set matrisi

P: Temel bileşen yüklemelerinden oluşan matris

E: Artık varyans

Burada matris çözümleri matris inversiyonu gerektirmeyen tek değerli bir ayrışmaya dayanır.

$$R = W'DP$$

Burada

W = Sol tekli vektörler için bir ortonormal matris

WW' = I, kimlik matrisi

P: Sağ tekli değerler için diğer bir ortonormal matris

D: Tekli değerler için bir diagonal matris.

2.1.3. Çoklu Metot Optimizasyonu Teknikleri

Cihazlardan elde edilen yanıtlar üzerinde deneysel faktörlerin etkisinin incelenerek yöntemin en uygun hale getirilmesi bir analizin en önemli parametresidir. Günümüzde hala bu amaçla klasik olarak aşama aşama optimizasyon çalışmaları uygulanmaktadır. Klasik yöntemlerin en önemli dezavantajı, diğer parametreleri sabit tutarak her defasında bir deneysel parametrenin etkisinin incelenmesidir. Bu durumda deneme sayısı oldukça artacak, zaman kaybı oluşacak ve faktörlerin birbirleri arasındaki olası etkileşimler incelenemeyecektir. Bu problemlerin çözümü için cihaz yanıtları üzerinde faktörlerin etkilerinin aynı anda çalışılması amacıyla çoklu uygulamaları da içeren bazı deneysel tasarım teknikleri Yüzey Yanıt Metodu (YYM) bir analiz yönteminin geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve optimizasyonu için kullanılan ve yanıtlar ve faktör etkileri arasındaki ilişkiyi değerlendiren istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir tekniktir. YYM'nin önemli bir kısmı, deneysel tasarım teknikleri YYM'nin temelini oluşturmaktadır. Deneysel tasarımın amacı, deneyleri en aza indirmek, analiz süresini düşürmek ve yanıtların değerlendirilebildiği yerlerde noktalar seçmektir. (Wang ve ark., 2011; Chaudhari ve ark., 2018; Igder ve ark., 2012).

Box - Behnken Deney Tasarımı YYM için oluşturulan deney tasarımlarının bir sınıfıdır. 3 seviyeli tamamlanmamış faktöriyel tasarım temeline dayanan dönebilir ya da yaklaşık olarak dönebilir ikinci dereceden bir tasarım tekniğidir (Box ve Behnken, 1960; Wang ve ark., 2011). Merkezi bir noktadan ve bir küre üzerinde sınırlanmış bir küpün kenarlarının orta noktalarından oluşur. Deneme sayısı N , $N = 2k(k-1) + C_0$ formülü ile belirlenir. Burada k ; faktör sayısı, C_0 ise merkezi deneme sayısıdır. MINITAB programında 3 faktör için deneme sayısı 3 merkezi noktada tekrarlarla birlikte 15 olarak belirlenmiştir (Wang ve ark., 2011). Denemeler sonucunda elde edilen 2. Dereceden denklem aşağıdaki şekilde hesaplanır (Wang ve ark., 2011; Chaudhari ve ark., 2018; Igder ve ark., 2012).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Burada; β_0 , sabit sayı, β_i , doğrusal etki, β_{ii} , kare etkisi, β_{ij} , etkileşim etkisi, X_i ve X_j ise i. ve j. faktörler için boyutsuz kodlanmış değerlerdir.

Box – Behnken Deney Tasarımı'nın avantajları şu şekilde sıralanabilir (Chaudhari ve ark., 2018).

- 1) Deneysel parametrelerin ikinci dereceden modelini tahmin eder.
- 2) Sıralı tasarımların yapısını oluşturur.
- 3) Modelin varsa uyumsuzluğunu tanımlar.
- 4) Tasarım sırasında faktörlerden kaynaklanan farklı blokların birlikte etkisini aynı anda inceleyebilir.

2.2. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Yapılacak olan yüksek lisans tezi kapsamında seçilen **AML** ve **IRB** ile üçlü karışımının analizinde bu etkin maddeler Nobel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. tarafından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan metanol Merck Inc., Almanya' dan temin edilmiştir.

2.3. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

- 1) SHIMADZU UV – 1601 UV – Görünür Bölge spektrofotometre Cihazı
- 2) Agilent Technologies Carry 630 marka IR spektrofotometri cihazı
- 3) BUCHI SMP-20 marka erime noktası tayin cihazı
- 4) Shimadzu ATX224 Tartım Cihazı
- 5) Velp Scientifica, Avrupa marka ARE ısıtmalı manyetik karıştırıcı
- 6) J.P. Selecta, İspanya marka ultrasonik banyo

2.4. Tez Kapsamında Kullanılan Bilgisayar Programları

Multivariate Analysis Add-in for MS Excel v1.3 software programı kullanılmıştır (Brereton, 2002).

2.5. Tez Kapsamında Kullanılan Bilgisayar Konfigürasyonu

Intel Pentium 4 CPU, 3.20 GHz, 504 MB RAM

2.6. Üzerinde Çalışma Yapılan Farmasötik Preparatlar

1. İRDAPİN® film tablet (150 mg / 10 mg)(Nobel)

Amlodipin Besilat.....10 mg

İrbesartan.....150 mg

2.7. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Tez kapsamında stok çözelti olarak metanol içerisinde hazırlanmış **AML** için 200 µg/mL ve **IRB** için 400 µg/mL çözeltileri kullanılmıştır. Bu stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak kalibrasyon (deneme) ve validasyon seti çözeltileri belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Analizlerde Kullanılan Etkin Maddeler için Gerçekleştirilen Saflık Kontrolleri

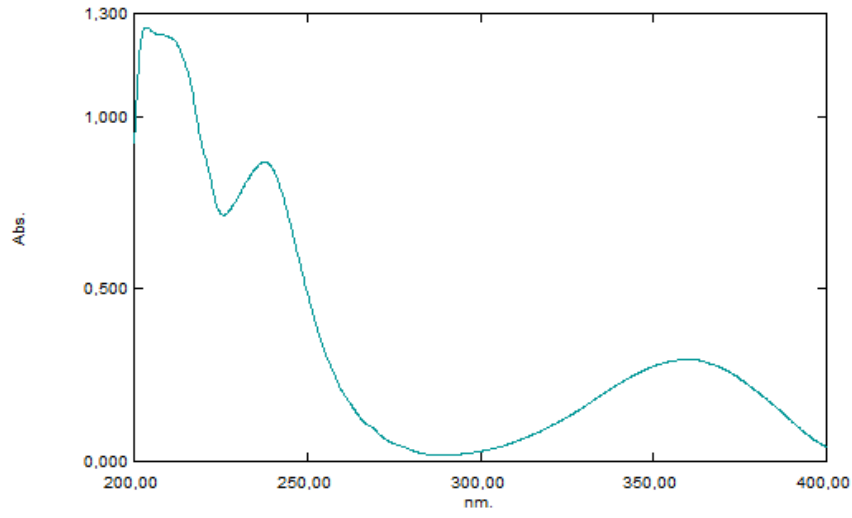
Çalışmalarda analiz edilmek amacı ile kullanılan **AML** ve **IRB**'nin standartlarının saflık kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle erime noktaları tespit edilmiş ve daha sonra UV ve IR (Infrared) spektrumları alınarak referanslarla karşılaştırma işlemine geçilmiştir.

3.1.1. AML için Saflık Kontrolü

Erime noktası: 200°C. Bu değer referans değerle uyum göstermektedir (https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB4127875.aspx).

UV spektrumu: **AML**'nin metanol içerisindeki 25 µg / mL⁻¹ çözeltisinin 200 – 400 nm arasındaki spektrumu Şekil 3.1'de görülmektedir. Bu spektrumda referansta belirtildiği gibi 237 ve 366 nm' de iki adet maksimum görülmektedir (Kavathia ve ark., 2013).

IR spektrumu: **AML**'nin 650 – 4000 cm⁻¹ arasındaki IR spektrumu referansla spektrumla uyum göstermiştir (Şekil 3.2) (Mubtasim ve ark., 2016).



Şekil 3.1. AML'in, metanol içerisinde $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ çözeltisinin UV spektrumu



Agilent Technologies

Sample ID: Amlodipin

Sample Scans: 32

Background Scans: 32

Resolution: 4

System Status: Good

File Location: C:\Program Files\Agilent\MicroLab PC\Results\Amlodipin_2019-07-04T15-51-12.a2r

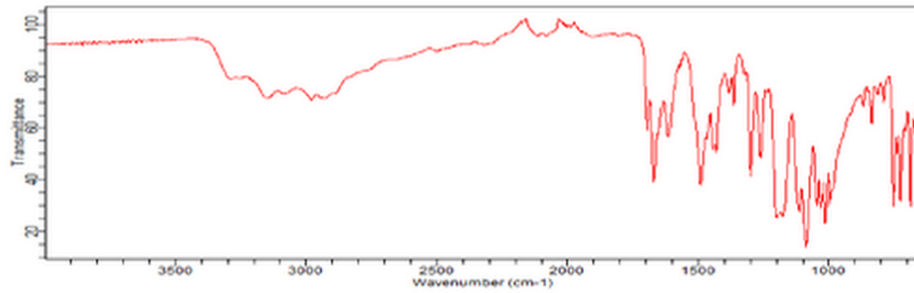
Method Name: TR Data Collect

User: Admin

Date/Time: 2019-07-04T15:51:12.6481121+03:00

Range: 4000 - 650

Apodization: Triangular



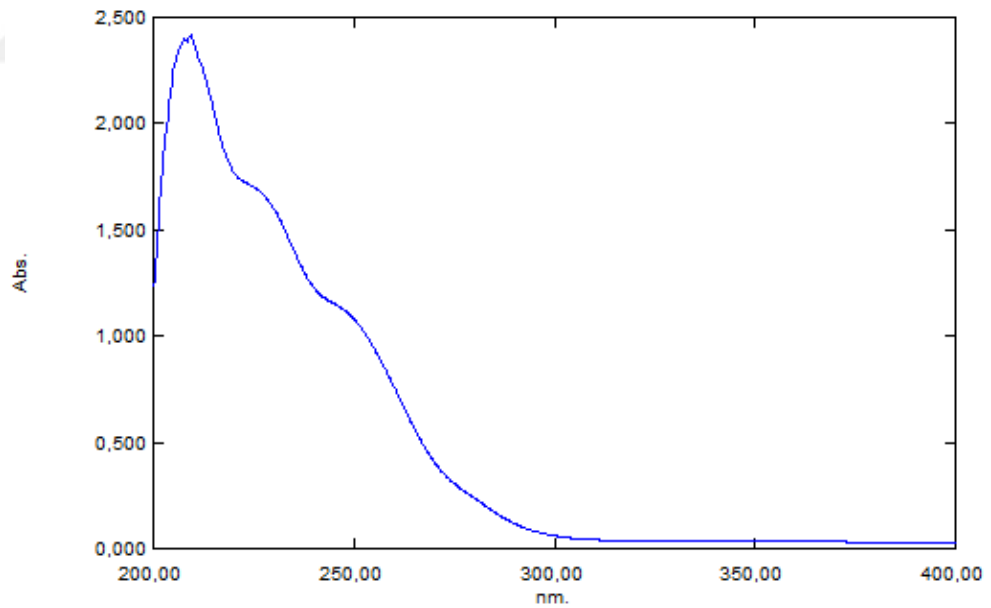
Şekil 3.2. AML'nin IR spektrumu

3.1.2. IRB için Saflık Kontrolü:

Erime noktası: 181°C. Bu değer referans değerle uyumludur (https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4454663_EN.htm).

UV spektrumu: Metanol içerisindeki 30 µg/mL⁻¹ çözeltisinin 200 – 400 nm arasındaki spektrumu Şekil 3.3’de görülmektedir. Bu spektrumda referansta belirtildiği gibi 273 nm’de maksimum görülmektedir (Shakya ve ark., 2015).

IR spektrumu: IRB’nin 650 – 4000 cm⁻¹ arasındaki IR spektrumu referans spektrumla uyum göstermiştir (Şekil 3.4) (Parmar ve ark., 2018).



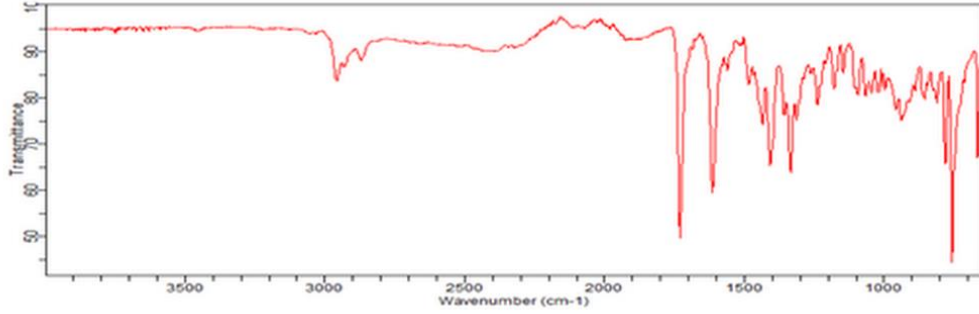
Şekil 3.3. IRB’in, metanol içerisinde 30 µg/mL⁻¹ çözeltisinin UV spektrumu



Agilent Technologies

Sample ID: Irbesartan
Sample Scans: 32
Background Scans: 32
Resolution: 4
System Status: Good
File Location: C:\Program Files\Agilent\MicroLab PC\Results\Irbesartan_2019-07-04T15-47-14.a2r

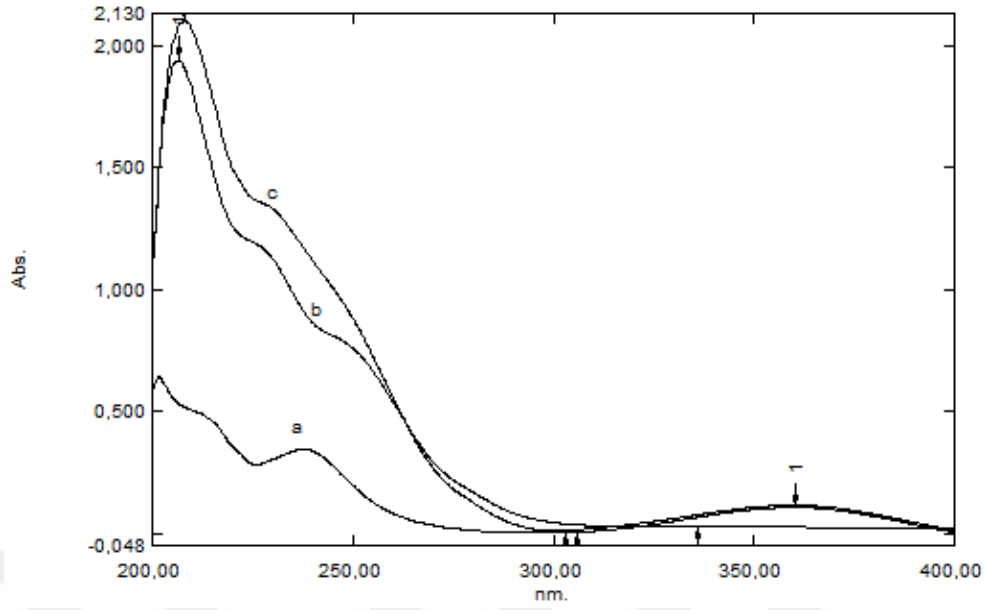
Method Name: TR Data Collect
User: Admin
Date/Time: 2019-07-04T15:47:14.2640934+03:00
Range: 4000 - 650
Apodization: Triangular



Şekil 3.4. IRB'nin IR spektrumu

3.2. Kemometrik Yöntemlerle UV Spektrofotometre Cihazından Alınan Spektroskopik Verilerin Değerlendirilmesi ile Elde Edilen Sonuçlar

Yüksek Lisans tezi kapsamındaki analitik çalışmalarda elde edilen spektroskopik verilerin kemometrik tekniklerle değerlendirilmesi için Temel Bileşen Regresyonu (TBR) ve Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (KIEK) yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerin **AML** ve **IRB**'in aynı anda tayinleri için bu etkin maddeleri içeren ikili karışıma ve bu ikili karışımı içeren IRDAPIN® film tablet (150mg / 10mg, **IRB** / **AML**) preparatına uygulaması gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.5'de **AML** ve **IRB** 'nin metanol içerisindeki gerek tek başına gerekse karışım halindeki çözeltilerinin spektrumları görülmektedir.



Şekil 3.5. Metanol içerisinde a) 10 µg/mL **AML**, b) 20 µg/mL **IRB**, c) 10 µg/mL **AML** + 20 µg/mL **IRB** çözeltilerinin UV spektrumları

3.2.1. Temel Bileşen Regresyonu (TBR) Yöntemi ile Analiz Sonucunda Elde Edilen Veriler

Yöntemin Geliştirilmesi

Tez çalışmasında **AML** ve **IRB**' nin ikili karışımları içerisinde aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirebilmek için öncelikle bu etkin maddelerin metanol içerisinde farklı konsantrasyonlardaki 2'li kombinasyonlarını içeren ve 25 adet karışım çözeltisinden oluşan bir kalibrasyon seti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kalibrasyon çözeltilerini içeren set Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. AML ve IRB karışımı için TBR ve KIEK yönteminde kullanılan deneme veya kalibrasyon seti

Karışım No	AML (µg/mL)	IRB (µg/mL)
1	5	35
2	1	15
3	1	35
4	10	20
5	2	35
6	10	25
7	5	20
8	2	20
9	2	30
10	8	35
11	10	30
12	8	25
13	5	35
14	10	35
15	10	15
16	1	30
17	8	15
18	1	25
19	5	30
20	8	30
21	8	20
22	2	15
23	1	20
24	2	25
25	8	0

Daha sonra hazırlanan bu kalibrasyon setindeki her bir karışım için UV spektrofotometre cihazında spektrumlar alınmış ve bunu takiben 200 – 400 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen bu absorbans değerlerinin TBR yönteminde kullanılabilmesi için Multivariate Analysis Add-in for Excel v1.3 yazılım programı (Brereton, 2002) yüklü bir Microsoft Excel programına daha önceden hazırlanan kalibrasyon setinde yer alan konsantrasyon değerleri ile birlikte bir matris meydana getirmek üzere yerleştirilmiştir.

Bu yöntem **AML** ve **IRB**'nin aynı anda tayinleri için verimli bir şekilde uygulanabilmesi amacıyla uygun dalga boyu aralığı ve sayısı araştırıldığında, **AML** için 240 – 280 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 41 dalga boyunda, **IRB** için ise

270 – 320 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 51 dalga boyundaki absorban değerleriyle çalışmanın uygun olduğu tespit edilmiştir.

Analizler için uygun dalga boyu aralığı seçimini takiben yöntemde en iyi sonucu alabilmek için daha önceden bahsedilen yazılım programı içerisinde bulunan veri ön işleme yöntemlerinden standardizasyon ve ortalama merkezli işlemler (mean centering) denenmiştir. **AML**'nin analizi için verilere standardizasyon işleminin uygulanması uygun bulunmuştur. Ortalama merkezli işlemde, analizler sonucu bulunan her bir veri ortalama değerden çıkarılmıştır. Standardizasyon işleminde ise ortalama merkezli işlemde elde edilen değerler hesaplanan standart sapmaya bölünmektedir. **IRB** için ise herhangi bir veri ön işleme yapılmadan ham verilerin analizler için kullanılması en iyi sonuca ulaşabilmek için tercih edilmiştir.

En uygun dalga boyu aralığı ve sayısı ve veri ön işleme yöntemi tespit edildikten sonra TBR yönteminde uygun faktör sayısı veya temel bileşen sayısı araştırılmıştır. Bunun için, daha önce belirtilen yazılım programının içerisinde bulunan çapraz validasyon işlemi uygulanmış ve **AML** için dört ve **IRB** için yedi adet temel bileşenin bu etkin maddelerin karışımları içerisinde analizleri için uygun olduğu tespit edilmiştir.

AML ve **IRB**'nin TBR tekniği kullanılarak spektrofotometrik yöntemler ile aynı anda tayinlerinin optimizasyonu için bir YYM metodu olan Box – Behnken tasarımı uygulanmıştır. Bu deneysel tasarımın oluşturulabilmesi için MINITAB programı kullanılmıştır. Deneysel faktörler olarak dalga boyu sayısı ve aralığı (X_1), temel bileşen sayısı (X_2) ve veri ön işleme teknikleri (X_3) seçilmiştir. Bu faktörler için faktör seviyeleri -1, 0 ve 1 olarak belirlenmiştir. Bu seviyelere karşı gelen faktör değerleri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. TBR yönteminde kullanılan faktör seviyelerine karşılık gelen değerler

Deneysel Faktörler	AML		
	-1	0	1
Dalga Boyu Sayısı ve Aralığı (X_1)	260 – 280 nm $\Delta\lambda$ = 1 21 dalga boyu	250 – 280 nm $\Delta\lambda$ = 1 31 dalga boyu	240 – 280 nm $\Delta\lambda$ = 1 41 dalga boyu
Temel Bileşen Sayısı (X_2)	2	3	4
Veri Ön İşleme Tekniği (X_3)	Ortalama merkezli	Standardize edilmiş	Herhangi bir veri ön işleme tekniği uygulanmamış
	IRB		
	-1	0	1
Dalga Boyu Sayısı ve Aralığı (X_1)	220 – 250 nm $\Delta\lambda$ = 1 31 dalga boyu	270 – 320 nm $\Delta\lambda$ = 1 51 dalga boyu	230 – 290 nm $\Delta\lambda$ = 1 61 dalga boyu
Temel Bileşen Sayısı (X_2)	6	7	8
Veri Ön İşleme Tekniği (X_3)	Ortalama merkezli	Herhangi bir veri ön işleme tekniği uygulanmamış	Standardize edilmiş

Bu faktör seviyeleri 15 denemeden oluşan Box – Behnken tasarım tablosu Çizelge 3.3’deki gibidir.

Yöntem optimizasyonu için Box – Behnken tasarımı uygulandığında ikinci dereceden denklemde elde edilen katsayılar Çizelge 3.4.’de gösterilmiştir. Deneysel faktörlerin etkilediği yanıt olarak deneme setinden alınan karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) seçilmiştir.

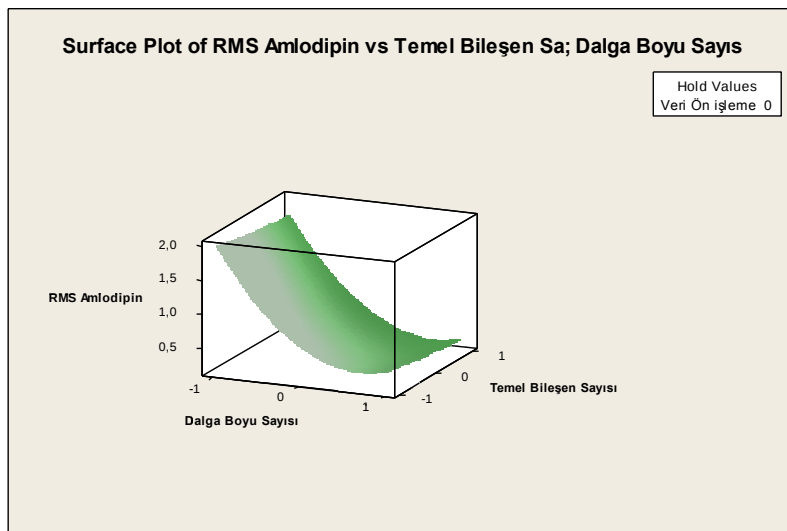
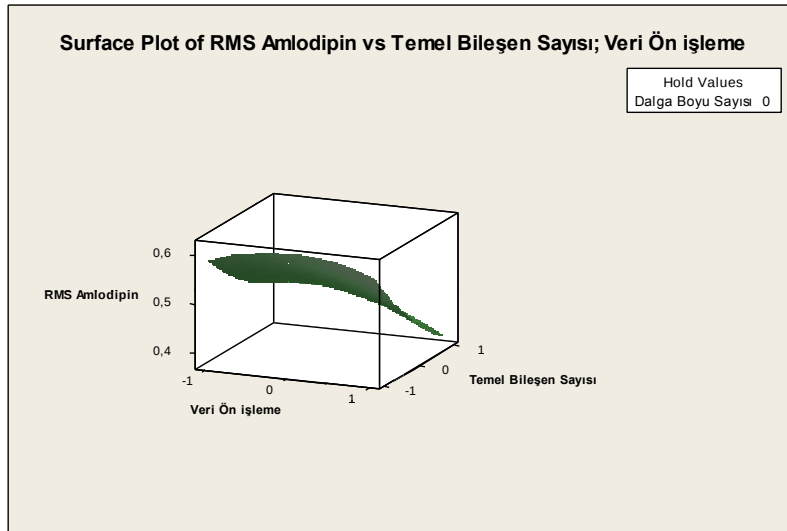
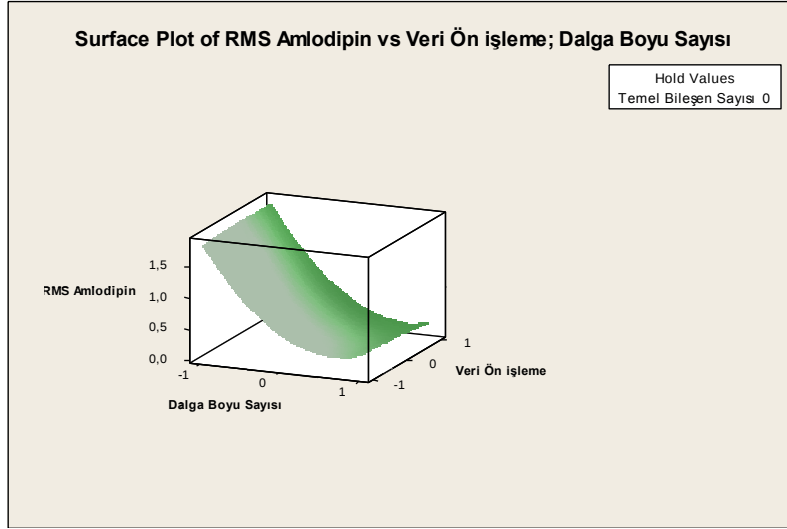
Çizelge 3.3. TBR ve KIEK yönteminde kullanılan faktör seviyeleri ile oluşturulan denemeleri gösteren Box – Behnken tasarım tablosu

Deneme No	Dalga Boyu Sayısı ve Aralığı (X_1)	Temel Bileşen Sayısı (X_2)	Veri Ön İşleme Tekniği (X_3)
1	-1	-1	0
2	-1	0	-1
3	0	-1	1
4	1	0	-1
5	1	0	1
6	1	-1	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	1	1
10	0	0	0
11	-1	0	1
12	0	-1	-1
13	1	1	0
14	0	1	-1
15	-1	1	0

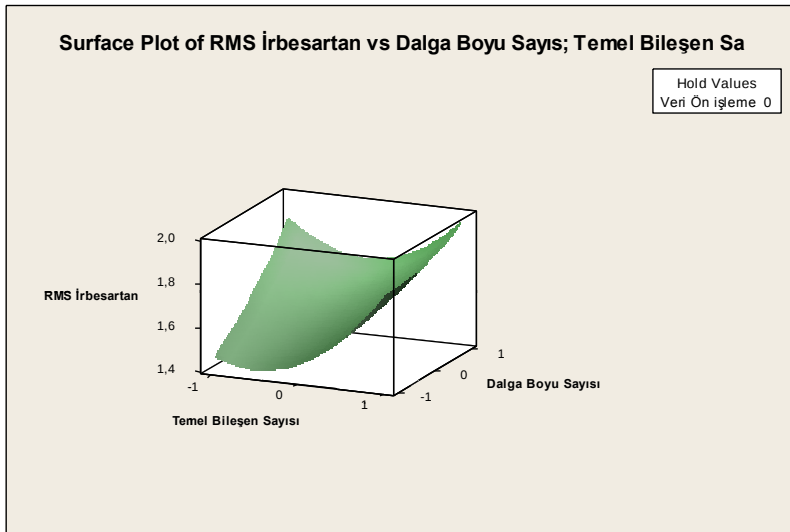
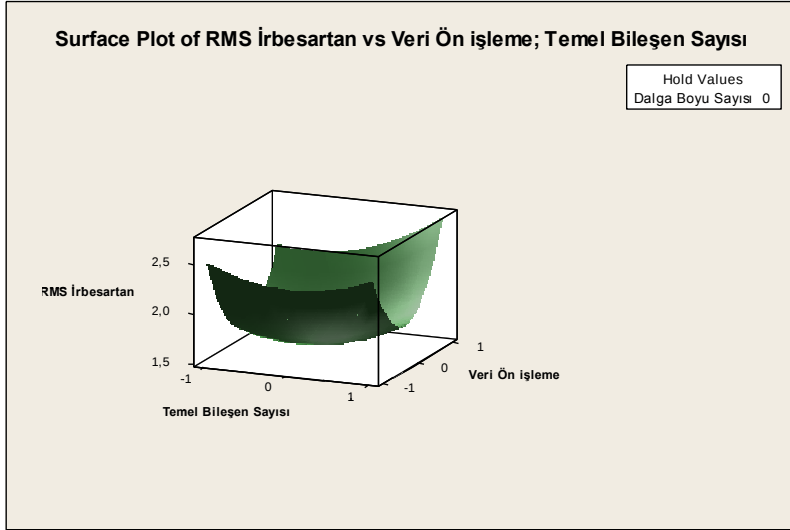
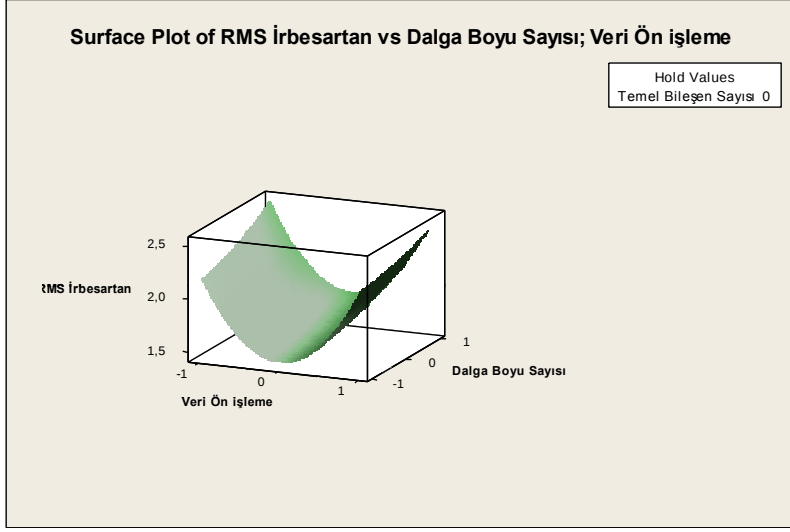
Çizelge 3.4. Box – Behnken tasarımı uygulandıktan sonra TBR yöntemi için ikinci derece denklem için elde edilen katsayılar

Katsayılar	AML	IRB
Sabit	0.515	1.574
X₁	- 0.775	0.141
X₂	- 0.082	0.109
X₃	- 0.019	- 0.004
X₁ * X₁	0.573	0.038
X₂ * X₂	0.020	0.178
X₃ * X₃	- 0.031	0.735
X₁ * X₂	0.005	- 0.078
X₁ * X₃	- 0.039	- 0.039
X₂ * X₃	- 0.020	0.111

Box – Behnken tasarımı ile yöntem optimize edildikten sonra elde edilen yüzey grafikleri (surface plot) **AML** için Şekil 3.6. ve **IRB** için Şekil 3.7’de gösterilmiştir.



Şekil 3.6. AML için TBR yönteminde elde edilen yüzey grafikleri



Şekil 3.7. IRB için TBR yönteminde elde edilen yüzey grafikleri

Geliştirilen TBR Yöntemi'nin Validasyonu

Yöntem optimizasyonu için uygun dalga boyu aralığı ve sayısı, veri ön işleme yöntemi ve temel bileşen sayısı seçildikten sonra absorbans ve konsantrasyonlardan oluşan kalibrasyon seti kullanılarak, bu 2 etkin maddenin farklı konsantrasyonlarından oluşan bir validasyon setindeki konsantrasyonlar tahmin edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir. Çalışma konsantrasyon aralığı **AML** için 1 – 10 µg/mL ve **IRB** için 15 – 35 µg/mL olarak belirlenmiştir. Tayin alt sınırı değeri ise **AML** için 1 µg/mL ve **IRB** için 15 µg/mL'dir.

AML ve **IRB**'nin sırasıyla 6 µg/mL ve 20 µg/mL karışımını içeren çözelti için gün içi (3 kez ve 3'er saat aralıklarla ölçümler gerçekleştirilmiştir) ve günler arası absorbans değerleri (2 gün) okunarak TBR yöntemi uygulanmış ve bu karışımlar için bulunan miktarlar F testi ile karşılaştırılmıştır. Edilen sonuçlar Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

3.2.2. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanışı

Geliştirilen TBR yönteminin içerisinde **AML** ve **IRB** bulunan İRDAPİN® film tablet preparatına uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadaki ilk amaç, preparatta girişim yapabilecek yardımcı maddelerin olası etkilerini incelemektir. Bunun için seçilen 6 adet film tablet içeriği öncelikle havanda toz edilmiştir. Sonra bir film tablete karşılık gelen miktar tartılmış ve 100 mL' lik balon joje içerisine alınıp üzerine 20 mL metanol ilave edilmiştir. Balon jojelerin içerisindeki bu karışımların içerisine **AML**'den 10 mg ve **IRB**'den 20 mg standart olarak ilave edilip balon jojelerin hacmi metanol ile 100 mL' ye tamamlanmıştır. 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon, Whatman No:42 kağıdından süzülükten sonra süzüntü etkin maddelerinin miktarı çalışma aralıklarının içerisine gelecek şekilde gereken oranda metanol ile seyreltilmiş ve devamında UV

spektrofotometrede ölçümler alındıktan sonra geliştirilen TBR yöntemi uygulanmıştır. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır. Standart eklemeler ve seyreltmeler sonucunda ilave edilen etkin madde miktarları standart sapma, bağıl standart sapma ve standart hata değerleriyle birlikte Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7’de de görüldüğü gibi standart eklemeler sonucunda **AML** ve **IRB** için elde edilen değerler ilave edilen madde miktarı ile uyumlu olduğu için preparat içerisindeki yardımcı maddelerin etkisinin olmadığı anlaşıldıktan sonra seçilen 5 adet film tablet preparatı içeriği havanda toz edilmiştir. Sonra bir film tablet preparatına karşılık gelen miktar tartılıp metanol içerisinde çözülerek hacmi 100 mL’ye tamamlanmıştır. 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon, Whatman No:42 kağıdından süzöldükten sonra süzüntü etkin maddelerinin miktarı çalışma aralıklarının içerisinde gelecek şekilde gerekli oranda metanol ile seyreltildikten sonra elde edilen çözeltiye yöntem uygulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.5’ de gösterilmiştir. Sonuçların bu farmasötik preparata KIEK yöntemi uygulanması ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması için Student t testi ve F testi uygulanmış ve bulgular çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. AML ve IRB'nin standart karışımları için TBR yöntemi ile elde edilen geri kazanım sonuçları

AML Konulan (µg/mL)	AML Bulunan (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	IRB Konulan (µg/mL)	IRB Bulunan (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
4.00	4.08	102.16	20.00	20.65	103.26
4.00	4.02	100.53	20.00	20.12	100.60
4.00	3.86	96.69	20.00	20.67	103.35
6.00	6.03	100.66	25.00	25.16	100.64
6.00	6.02	100.34	25.00	26.55	106.20
6.00	5.96	99.48	25.00	26.66	106.65
8.00	8.12	101.53	30.00	32.25	107.50
8.00	8.13	101.66	30.00	30.77	102.59
8.00	8.28	103.56	30.00	32.35	107.86
	Ortalama	100.73		Ortalama	104.29
	± GA	± 1.48		± GA	± 2.18
	SS	1.92		SS	2.83
	BSS %	1.91		BSS %	2.71
	SH	0.64		SH	0.94

GA: $p = 0.05$ için Güven Aralığı

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma

SH: Standart Hata

Çizelge 3.6. TBR yönteminin gün içi ve günler arası uygulama bulguları (Olması gereken değerler: **AML** = 6 µg/mL, **IRB** = 20 µg/mL)

	AML	IRB
Gün içi bulunan ortalama değer (µg/mL)	6.06 ± 0.45	20.62 ± 0.72
Günler arası bulunan ortalama değer (µg/mL)	5.98 ± 0.42	20.79 ± 0.59
Gün içi varyans	0.006	0.18
Günler arası varyans	0.007	0.17
F değeri	1.17	1.08
Gün içi ortalama % geri kazanım	101.07	103.10
Günler arası ortalama % geri kazanım	99.78	103.99
Gün içi GA	1.03	1.65
Günler arası GA	0.96	1.31
Gün içi SS	1.34	2.14
Günler arası SS	1.45	2.07
Gün içi BSS %	1.32	2.08
Günler arası BSS %	1.46	1.99
Gün içi SH	0.45	0.72
Günler arası SH	0.42	0.59

GA: Güven Aralığı

SS: Standart sapma

BSS: Bağlı standart sapma

SH: Standart Hata

F değerinin serbestlik derecesi 8 ve 11' ye göre çizelge değeri 4.74'dür

Çizelge 3.7. İRDAPİN® film tablet preparatına standart ekleme tekniğiyle eklenen maddelerin TBR yöntemi kullanılarak tayin edilen miktarları (**AML** için eklenen miktar = 10 mg, **IRB** için eklenen miktar = 20 mg)

	AML (mg)	IRB (mg)
Bulunan ortalama değer (mg)	9.90 ± 0.12	20.01 ± 0.22
SS	0.27	0.48
% BSS	2.73	2.43
SH	0.12	0.22

BSS: Bağlı Standart Sapma

SS: Standart Sapma

SH: Standart Hata

Çizelge 3.8. İRDAPİN® film tablet preparatına TBR yönteminin uygulanması ile elde edilen sonuçlar (Etiket üzerinde yazılı olan miktar: **AML** = 10mg, **IRB** = 150mg)

No	AML (mg)	IRB (mg)
1	9.92	152.04
2	10.01	151.85
3	10.04	150.91
4	10.09	150.65
5	9.80	147.82
Ortalama	9.97	150.65
SS	0.11	1.69
% BSS	1.15	1.12
Varyans	0.013	2.87
<i>t</i> testi (TBR – KIEK)	0.42	1.14
<i>F</i> testi (TBR – KIEK)	2.93	0.52

SS: Standart sapma

BSS: Bağlı standart sapma

t testi tablo değeri p: 0.05 için 2.31

F testi tablo değeri p: 0.05 için 15.98

3.2.3. Kısmi En Küçük Kareler (KIEK) Yöntemi ile Analiz Sonucunda Elde Edilen Veriler

Yöntemin Geliştirilmesi

Tez çalışmasında **AML** ve **IRB**' nin ikili karışımları içerisinde aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirebilmek için KIEK yönteminin uygulanabilmesi amacıyla Bölüm 3.2.2'de Çizelge 3.1'de yer alan ve bu etkin maddelerin metanol içerisinde farklı konsantrasyonlardaki ikili kombinasyonlarını içeren ve 25 adet karışım çözeltisinden oluşan bir kalibrasyon seti kullanılmıştır.

Daha önce TBR yöntemi için her bir kalibrasyon setindeki çözeltilerin UV spektrofotometre cihazında alınmış spektrumları üzerinden 200 – 400 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde okunan absorbans değerlerinin KIEK yönteminde kullanılabilmesi için Bölüm 3.2.2.'de belirtildiği şekilde TBR yönteminde olduğu gibi Multivariate Analysis Add-in for Excel v1.3 yazılım programı (Brereton, 2002) yüklü bir Microsoft Excel programına daha önceden hazırlanan kalibrasyon setinde yer alan konsantrasyon değerleri ile birlikte bir matris meydana getirmek üzere yerleştirilmiştir.

KIEK yönteminde **AML** ve **IRB**'nin aynı anda tayinleri için öncelikle uygun dalga boyu aralığı ve sayısı araştırılmıştır. En iyi sonuçları elde etmek için, **AML** için 240 – 280 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 41 dalga boyunda, **IRB** için ise 270 – 320 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 51 dalga boyundaki absorbans değerleriyle çalışmanın uygun olacağı tespit edilmiştir.

KIEK yönteminde analizler için uygun dalga boyu aralığı ve sayısını seçtikten sonra yöntem optimizasyonundaki bir sonraki aşama uygun veri ön işleme tekniğinin seçimidir. Bunun için bahsedilen yazılım programı içerisinde bulunan standardizasyon ve ortalama merkezli işlemler (mean centering) yöntemlerinin

denemesi yapılmıştır. Daha önce TBR yönteminde olduğu gibi **AML**'nin analizi için verilere standardizasyon işleminin uygulanması uygun bulunmuş ve bunun için analizler sonucu bulunan her bir değer ortalama değerden çıkarıldıktan sonra standart sapmaya bölünmüştür. **IRB** için ise ham verileri kullanarak herhangi bir veri ön işlemine ihtiyaç olmaksızın en iyi sonuçlara ulaşılabilirdiği tespit edilmiştir.

KIEK yönteminin optimizasyon çalışmalarında en uygun dalga boyu aralığı ve sayısı ve veri ön işleme yöntemi tespit edildikten sonra uygun faktör sayısı veya temel bileşen sayısı araştırılmıştır. Bunun için, daha önce belirtilen yazılım programının içerisinde bulunan çapraz validasyon işlemi ve KIEK-1 yöntemi uygulandığında **AML** ve **IRB** için dört adet temel bileşenin bu etkin maddelerin karışımları içerisinde analizleri için uygun olduğu bulunmuştur.

AML ve **IRB**'nin KIEK tekniği kullanılarak spektrofotometrik yöntemler ile aynı anda tayinlerinin optimizasyonu için bir YYM metodu olan Box – Behnken tasarımı uygulanmıştır. Bu deneysel tasarımın oluşturulabilmesi için MINITAB programı kullanılmıştır. Deneysel faktörler olarak TBR yönteminde olduğu gibi dalga boyu sayısı ve aralığı (X_1), temel bileşen sayısı (X_2) ve veri ön işleme teknikleri (X_3) seçilmiştir. Bu faktörler için faktör seviyeleri -1, 0 ve 1 olarak belirlenmiştir. Bu seviyelere karşı gelen faktör değerleri Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. Bu faktör seviyeleri 15 denemeden oluşan Box – Behnken tasarım tablosu Çizelge 3.3'deki gibidir.

Çizelge 3.9. KIEK yönteminde kullanılan faktör seviyelerine karşılık gelen değerler

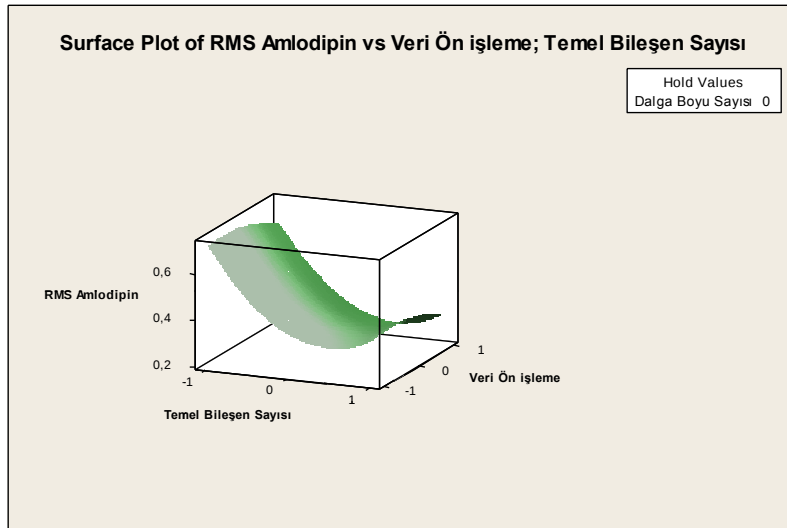
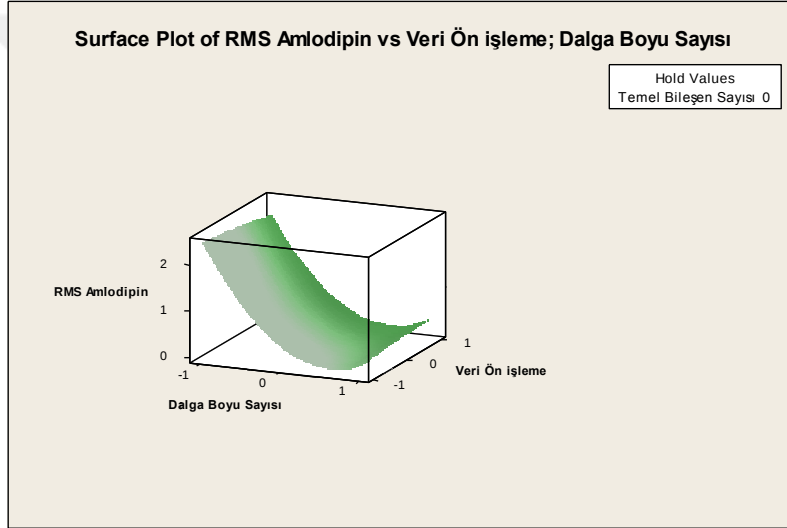
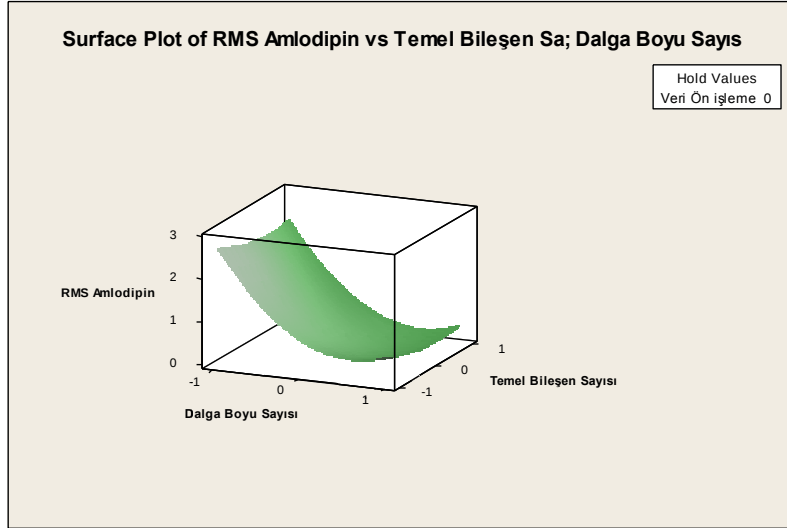
Deneysel Faktörler	AML		
	-1	0	1
Dalga Boyu Sayısı ve Aralığı (X_1)	260 – 280 nm $\Delta\lambda$ = 1 21 dalga boyu	250 – 280 nm $\Delta\lambda$ = 1 31 dalga boyu	240 – 280 nm $\Delta\lambda$ = 1 41 dalga boyu
Temel Bileşen Sayısı (X_2)	2	3	4
Veri Ön İşleme Tekniği (X_3)	Ortalama merkezli	Standardize edilmiş	Herhangi bir veri ön işleme tekniği uygulanmamış
	IRB		
	-1	0	1
Dalga Boyu Sayısı ve Aralığı (X_1)	220 – 250 nm $\Delta\lambda$ = 1 31 dalga boyu	270 – 320 nm $\Delta\lambda$ = 1 51 dalga boyu	230 – 290 nm $\Delta\lambda$ = 1 61 dalga boyu
Temel Bileşen Sayısı (X_2)	3	4	5
Veri Ön İşleme Tekniği (X_3)	Ortalama merkezli	Herhangi bir veri ön işleme tekniği uygulanmamış	Standardize edilmiş

Yöntem optimizasyonu için Box – Behnken tasarımı uygulandığında ikinci dereceden denklemde elde edilen katsayılar Çizelge 3.10.'da gösterilmiştir. Deneysel faktörlerin etkilediği yanıt olarak deneme setinden alınan karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) seçilmiştir.

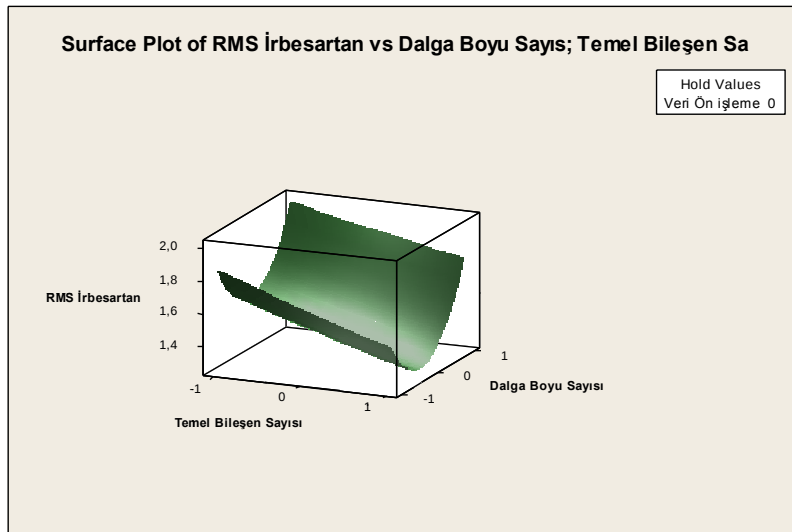
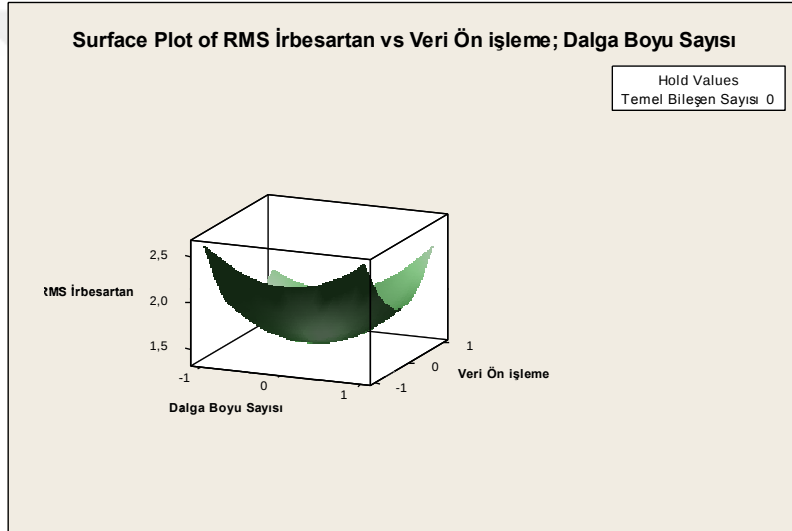
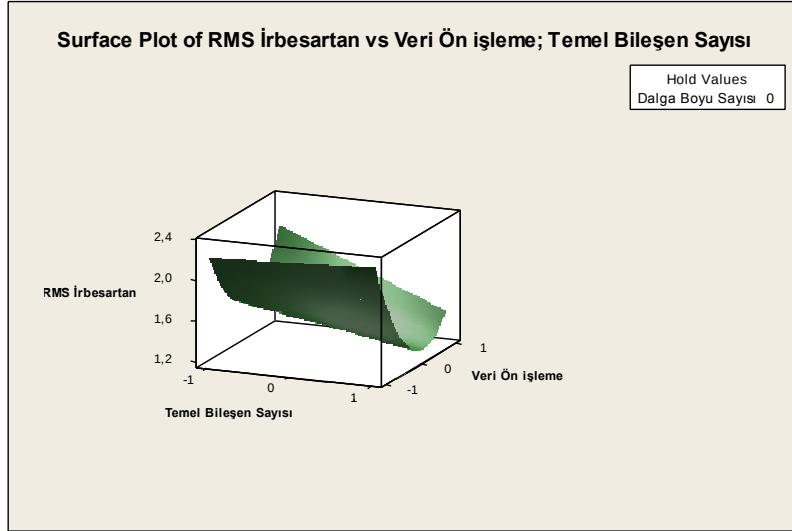
Çizelge 3.10. Box – Behnken tasarımı uygulandıktan sonra KIEK yönteminde ikinci derece denklem için elde edilen katsayılar

Katsayılar	AML	IRB
Sabit	0.366	1.423
X₁	- 1.031	0.108
X₂	- 0.159	- 0.148
X₃	- 0.037	- 0.235
X₁ * X₁	0.944	0.358
X₂ * X₂	0.183	0.005
X₃ * X₃	- 0.035	0.585
X₁ * X₂	0.028	0.033
X₁ * X₃	0.096	0.113
X₂ * X₃	0.003	- 0.183

Box – Behnken tasarımı ile yöntem optimize edildikten sonra elde edilen yüzey grafikleri (surface plotlar) **AML** için Şekil 3.8. ve **IRB** için Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.8. AML için KIEK yönteminde elde edilen yüzey grafikleri



Şekil 3.9. IRB için KIEK yönteminde elde edilen yüzey grafikleri

Geliştirilen KIEK Yöntemi'nin Validasyonu

Yöntem optimizasyonu için uygun dalga boyu aralığı ve sayısı, veri ön işleme yöntemi ve temel bileşen sayısı seçildikten sonra absorbans ve konsantrasyonlardan oluşan kalibrasyon seti kullanılarak, bu 2 etkin maddenin farklı konsantrasyonlarından oluşan bir validasyon setindeki konsantrasyonlar tahmin edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11'de gösterilmiştir. Çalışma konsantrasyon aralığı **AML** için 1 – 10 µg/mL ve **IRB** için 15 – 35 µg/mL olarak belirlenmiştir. Tayin alt sınırı değeri ise **AML** için 1 µg/mL ve **IRB** için 15 µg/mL'dir.

AML ve **IRB**'nin sırasıyla 6 µg/mL ve 20 µg/mL karışımını içeren çözelti için gün içi (3 kez ve 3'er saat aralıklarla ölçümler gerçekleştirilmiştir) ve günler arası absorbans değerleri (2 gün) okunarak TBR yöntemi uygulanmış ve bu karışımlar için bulunan miktarlar F testi ile karşılaştırılmıştır. Edilen sonuçlar Çizelge 3.12'de gösterilmiştir.

3.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanışı

Geliştirilen KIEK yönteminin içerisinde **AML** ve **IRB** bulunan İRDAPİN® film tablet preparatına uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada öncelikle tablet içerisindeki yardımcı maddelerden bir girişim olup olmadığının saptanması için standart ekleme yöntemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için TBR yönteminde hazırlanan çözeltiler kullanılmıştır. 6 adet film tablet içeriği öncelikle havanda toz edilmiştir. Sonra bir film tablete karşılık gelen miktar tartılmış ve 100 mL' lik balon joje içerisine alınıp üzerine 20 mL metanol ilave edilmiştir. Balon jojelerin içerisindeki bu karışımların içerisine **AML**'den 10 mg ve **IRB**'den 20 mg standart olarak ilave edilip balon jojelerin hacmi metanol ile 100 mL' ye tamamlanmıştır. 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon, Whatman No:42 kağıdından süzildükten

sonra süzüntü etkin maddelerinin miktarı çalışma aralıklarının içerisinde gelecek şekilde gereken oranda metanol ile seyreltilmiş ve sonrasında UV spektrofotometrede ölçümler alındıktan sonra geliştirilen KIEK yöntemi uygulanmıştır. Standart eklemeler ve seyreltmeler sonucunda ilave edilen etkin madde miktarları standart sapma, bağıl standart sapma ve standart hata değerleriyle birlikte çizelge 3.13’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.13’de de görüldüğü gibi standart eklemeler sonucunda **AML** ve **IRB** için elde edilen değerler ilave edilen madde miktarı ile uyumlu olduğu için preparat içerisindeki yardımcı maddelerin etkisinin olmadığı anlaşıldıktan sonra farmasötik preparat analizlerine geçilmiştir. Bu uygulamada kullanılacak çözeltiler TBR yönteminde kullanılan çözeltiler ile aynıdır. Seçilen 5 adet film tablet preparatı içeriği havanda toz edilmiştir. Sonra bir film tablet preparatına karşılık gelen miktar tartılıp metanol içerisinde çözülerek hacmi 100 mL’ye tamamlanmıştır. 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon, Whatman No:42 kağıdından süzildikten sonra süzüntü uygun biçimde gerekli oranda metanol ile seyreltildikten sonra elde edilen çözeltiye yöntem uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar ve TBR yöntemi uygulanması ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması için student t testi ve F testi uygulandığında elde edilen veriler çizelge 3.13’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. AML ve IRB'nin standart karışımları için KIEK yöntemi ile elde edilen geri kazanım sonuçları

AML Konulan (µg/mL)	AML Bulunan (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	IRB Konulan (µg/mL)	IRB Bulunan (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
4.00	4.08	102.04	20.00	20.54	102.74
4.00	4.03	100.95	20.00	20.02	100.10
4.00	3.87	96.99	20.00	20.26	101.31
6.00	6.05	100.89	25.00	25.04	100.19
6.00	6.03	100.54	25.00	26.20	104.80
6.00	6.01	100.10	25.00	26.61	106.44
8.00	8.14	101.87	30.00	32.16	107.22
8.00	8.16	102.03	30.00	30.53	101.79
8.00	8.32	104.00	30.00	31.86	106.22
	Ortalama	101.05±0.63		Ortalama	103.43±0.93
	± GA	± 1.46		± GA	± 2.14
	SS	1.90		SS	2.79
	BSS %	1.88		BSS %	2.69
	SH	0.63		SH	0.93

GA: $p = 0.05$ için Güven Aralığı

SS: Standart sapma

BSS: Bağıl standart sapma

SH: Standart Hata

Çizelge 3.12. KIEK yönteminin gün içi ve günler arası uygulama bulguları (Olması gereken değerler:
AML = 6 µg/mL, **IRB** = 20 µg/mL)

	AML	IRB
Gün içi bulunan ortalama değer (µg/mL)	6.05 ± 0.32	20.31 ± 0.61
Günler arası bulunan ortalama değer (µg/mL)	6.02 ± 0.34	20.11 ± 0.45
Gün içi varyans	0.002	0.13
Günler arası varyans	0.005	0.09
F değeri	2.50	1.44
Gün içi ortalama % geri kazanım	100.96	101.57
Günler arası ortalama % geri kazanım	100.36	100.56
Gün içi GA	0.78	1.41
Günler arası GA	0.74	0.99
Gün içi SS	0.78	1.83
Günler arası SS	1.16	1.55
Gün içi BSS %	0.77	1.80
Günler arası BSS %	1.15	1.54
Gün içi SH	0.32	0.61
Günler arası SH	0.34	0.45

GA: Güven Aralığı

SS: Standart sapma

BSS: Bağlı standart sapma

SH: Standart Hata

F değerinin serbestlik derecesi 8 ve 11' ye göre çizelge değeri 4.74'dür.

Çizelge 3.13. İRDAPİN® film tablet preaparatına standart ekleme tekniğiyle eklenen maddelerin KIEK yöntemi kullanılarak tayin edilen miktarları (**AML** için eklenen miktar = 10 mg, **IRB** için eklenen miktar = 20 mg)

	AML (mg)	IRB (mg)
Bulunan ortalama değer (mg)	9.98 ± 0.11	19.32 ± 0.11
SS	0.25	0.24
% BSS	2.55	1.22
SH	0.11	0.11

BSS: Bağlı Standart Sapma

SS: Standart Sapma

SH: Standart Hata

Çizelge 3.14. İRDAPİN® film tablet preparatına KIEK yönteminin uygulanması ile elde edilen sonuçlar (Etiket üzerinde yazılı olan miktar: **AML** = 10 mg **IRB** = 150 mg)

No	AML (mg)	IRB (mg)
1	9.93	152.69
2	9.97	153.73
3	9.92	153.35
4	10.04	153.53
5	10.19	148.15
Ortalama	10.01	152.31
SS	0.11	2.35
% BSS	1.13	1.54
Varyans	0.012	5.52
<i>t</i> testi (TBR – KIEK)	1.02	1.14
<i>F</i> testi (TBR – KIEK)	2.88	0.52

SS: Standart sapma

BSS: Bağlı standart sapma

t testi tablo değeri p:0.05 için 2.31

F testi tablo değeri p: 0.05 için 15.98

4. TARTIŞMA

Bu kısımda gerçekleştirilen analiz çalışmalarında elde edilen sonuçlar kullanılan yöntemler bazında tartışılmıştır:

Şekil 3.5’de **AML** ve **IRB**’nin metanol içerisindeki çözeltilerinin spektrumları üst üste çizilmiş halde görülmektedir. Şekil 3.5’de görüldüğü gibi bu etkin maddelerin karışımında özellikle **IRB**’nin miktar tayinini **AML**’nin girişimi olmaksızın yapmak mümkün görünmemektedir. Yine aynı biçimde **IRB**’nin spektrumunun **AML** spektrumu üzerinde azda olsa girişim yaptığı görülmektedir. **AML**’nin 366 nm’de maksimum absorpsiyon yaptığı noktada ölçümler denenmiş ve uygun sonuçlar elde edilememiştir. Bu durum girişimi desteklemektedir. Bu sebepten dolayı herhangi bir ayırım işlemi yapmaksızın karışımları içerisinde bu etkin maddelerin spektrofotometrik tayinleri gerçekleştirilemeyeceği için bazı yöntemlere başvurulması gerektiği düşünülmüştür. Bunun için öncelikle türev spektrofotometri yöntemi denenmiş fakat sonuçların özellikle farmasötik preparatlarda uygun bulunmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar tezde verilmemiştir. Preparat içerisindeki **IRB** konsantrasyonun (150 mg/film tablet) **AML** konsantrasyonundan oldukça büyük olması (10 mg/film tablet) bu etkin maddelerin basit spektrofotometrik yöntemlerle ölçümünü mümkün kılmamaktadır. Bu sebepten dolayı analizlerde kemometrik yöntemlerden yararlanılması düşünülmüştür. Kemometrik yöntemlerde çok sayıda veri kullanılarak ve bu veriler matematiksel ve istatistiksel olarak değerlendirilerek karışım analizlerinde yaygın olarak kullanılma avantajı bulunmaktadır.

Tez kapsamında planlanan analizlerde klasik en küçük kareler ve ters en küçük kareler gibi daha klasik kemometrik yöntemler yerine 3 boyutlu olarak gerçekleştirilen dalga boyu seçimi için herhangi bir özel kuralın olmadığı, sadece ilgilenilen bileşene özgü ve girişim etkisini en aza indiren TBR ve KIEK teknikleri **AML** ve **IRB**’nin karışımlarında ve bu karışımı içeren İRDAPİN® film tablet

preparatı içerisinde herhangi bir ayırım işlemi yapmaksızın etkin maddelerin miktar tayinleri için kullanılabileceği düşünülmüştür.

Kemometrik yöntemlerde de öncelikle her geliştirilen analiz yönteminde olduğu gibi bir kalibrasyon modelinin hazırlanması gereklidir. Gerek TBR gerekse KIEK yöntemleri olsun, çok sayıda standart numune hazırlanarak güvenilir bir kalibrasyon sistemi oluşturulabilir. Fakat bu kalibrasyon çözeltileri hazırlanırken eş doğrusallıktan (ko-linearite) özellikle kaçınmak gereklidir. Bunun için tez kapsamında bu etkin maddelerin farklı konsantrasyonlardaki 2'li kombinasyonlarını içeren ve 25 numunedan oluşan bir seri deneme veya kalibrasyon seti çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kalibrasyon seti Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Hazırlanan bu kalibrasyon çözeltilerinin Bölüm 2.3'de anlatılan UV- Görünür bölge spektrofotometre cihazında spektrumları alınmış ve elde edilen bu spektrumlar üzerinde 200 – 400 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 201 dalga boyunda absorbans ölçümleri alınmış ve daha sonra okunan bu absorbans tespit edilen kemometrik yöntemlerde kullanılmak üzere Multivariate Analysis Add-in for Excel v1.3 yazılım programı yüklü bir Microsoft Excel programına daha önceden hazırlanan kalibrasyon setindeki (Çizelge 3.1.) konsantrasyonlar ile birlikte bir matris meydana getirmek üzere yerleştirilmiştir.

Kemometrik analizlerde yöntem optimizasyonunda ilk işlem uygun dalga boyu aralığı ve sayısının seçimidir. Bu amaç doğrultusunda tez kapsamında **AML**'nin analizi için pek çok aralık denenmiş ve uygun olabilecek aralık ve dalga boyu sayısı olarak deneme setinde 240 – 280 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 41 dalga boyunda çalışmak olarak bulunmuştur. Bu dalga boyu aralığı ve sayısının seçilmesinin sebebi, tespit edilen koşullar altında çalışıldığında THKT (Tahmin hatalarının karelerinin toplamı) değerinin diğer koşullar ile karşılaştırıldığında en az olmasıdır. **IRB** içinde aynı denemeler gerçekleştirilmiştir.

Denemeler esnasında 220 – 270 nm arasında **IRB** üzerindeki **AML**’nin spektral girişiminden kaynaklanan uygun olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Bu sebepten dolayı denemelere 270 nm üzerinde devam edilmiştir. Bu alanda da **AML**’nin spektral girişimi bulunmasına rağmen **IRB** analizi için en uygun sonucun deneme setinde 270 – 320 nm arasında 51 dalga boyunda çalışmak olarak bulunmuştur. Aynı **AML**’de olduğu gibi, **IRB**’de de bu dalga boyu aralığı ve sayısında çalışıldığında THKT değerleri daha düşüktür. Belirlenen bu aralıklar bu iki etkin madde için hem TBR hem de KIEK yöntemlerinde geçerlidir.

Analiz için uygun dalga boyu ve aralığı seçildikten sonra tez kapsamında kullanılan yazılım programı içerisinde bulunan veri ön işleme tekniklerinden en iyi sonucu alabilmek için hangisinin uygun olup olmadığının tespiti ile optimizasyon işlemine devam edilmiştir. Yazılım içerisinde bulunan bu tekniklerden ortalama merkezli işlemde veriler, deneysel yöntemle bulunan her bir verinin ortalama değerden çıkarılması elde edilmektedir. Bu yolla her bir spektrumdan alınan sonuçlar 0 absorbans noktası etrafında merkezleştirilmektedir. Standardizasyon işleminde ise, ortalama merkezli işlemde elde edilen işlenmiş verilerin standart sapmaya bölünmesi gerçekleştirilir. Sonuç olarak bu veri ön işleme yöntemleri 2’li karışım içerisindeki her bir etkin madde için denendiğinde, **AML**’nin analizi için verilere standardizasyon işleminin uygulanması uygun görülmüştür. **IRB** için ise herhangi bir veri ön işleme işlemi olmaksızın ham verilerin kullanılması ile analiz işleminin gerçekleştirilmesinin uygun olduğu bulunmuştur. Optimizasyon işleminin bu kısmı bu iki etkin madde için hem TBR hem de KIEK yöntemlerinde geçerlidir.

Uygun veri ön işleme tekniği seçildikten sonra bu iki etkin maddenin hem TBR hem de KIEK tekniği ile analizi için uygun faktör veya temel bileşen sayısı incelenmiştir. Mümkün olan en az temel bileşenin kullanılmasıyla analizlerin tamamlanması önemlidir. Bunun için daha önce bölüm 2.2.’de bahsedilen bilgisayar programı içerisinde bulunan çapraz validasyon işlemi uygulanmıştır. Çapraz validasyon işlemi sonucunda TBR yönteminde **AML** için 4 ve **IRB** için 7 temel bileşen kullanıldığında THKT değerlerinin minimum olduğu görülmüştür. KIEK yönteminde ise bu değer hem **AML** hem de **IRB** için 4 olarak tespit edilmiştir.

AML ve **IRB**'nin TBR tekniği kullanılarak spektrofotometrik yöntemler ile aynı anda tayinlerinin optimizasyonu için bir YYM metodu olan Box – Behnken tasarımı MINITAB programı kullanılarak uygulandığında optimizasyon çalışmalarında kullanılabilecek ikinci dereceden denklem de yer alan katsayılar Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Bu çizelgeye göre Çizelge 1'de yer alan deneme setinden alınan karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) değeri üzerine **AML**'de her 3 deneysel faktörün negatif etkisi olduğu gözlenmiştir. **AML** analizlerinde etki derecesinin büyüklüğüne göre faktörler dalga boyu sayısı ve aralığı, temel bileşen sayısı ve veri ön işleme tekniği olarak sıralanmaktadır. Bu veriler kullanılarak elde edilen yüzey grafiklerinde Şekil 3.6'da da görüldüğu gibi **AML** için dalga boyu sayısı ve temel bileşen sayısı azaldığında karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) değerin azaldığı görülmektedir. **IRB** için ise deneme setinden elde edilen karelerin ortalamaların karekökü üzerinde dalga boyu sayısı ve aralığı ile temel bileşen sayısının pozitif etkisinin olduğu, veri ön işleme tekniğinin ise negatif etkisinin olduğu görülmektedir. Faktörlerin etki derecesinin büyüklüğü **AML**'ye benzer olarak dalga boyu sayısı ve aralığı, temel bileşen sayısı ve veri ön işleme tekniği olarak sıralanmaktadır. Bu veriler kullanılarak elde edilen yüzey grafiklerinde Şekil 3.7'de de görüldüğu gibi **IRB** için dalga boyu sayısı ve temel bileşen sayısı arttığında karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) değerin arttığı görülmektedir. Şekil 3.7'den de görülebildiği gibi herhangi bir veri ön işleme tekniği kullanılmadığında karelerin ortalamaların karekökü değeri en az seviyededir.

AML ve **IRB**'nin KIEK tekniği kullanılarak spektrofotometrik yöntemler ile aynı anda tayinlerinin optimizasyonu için bir YYM metodu olan Box – Behnken tasarımı MINITAB programı kullanılarak uygulandığında optimizasyon çalışmalarında kullanılabilecek ikinci dereceden denklemde yer alan katsayılar Çizelge 3.10'da gösterilmiştir. Bu çizelgeye göre Çizelge 1'de yer alan deneme setinden alınan karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) değeri üzerine **AML**'de her 3 deneysel faktörün negatif etkisi olduğu gözlenmiştir. **AML** analizlerinde etki derecesinin büyüklüğüne göre faktörler TBR yönteminde olduğu gibi dalga boyu sayısı ve aralığı, temel bileşen sayısı ve veri ön işleme tekniği olarak

sıralanmaktadır. Bu veriler kullanılarak elde edilen yüzey grafiklerinde şekil 3.8’de görüldüğü gibi **AML** için dalga boyu sayısı ve temel bileşen sayısı arttığında karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) değerinin azaldığı görülmektedir. **IRB** için ise deneme setinden elde edilen karelerin ortalamaların karekökü üzerinde dalga boyu sayısı ve aralığının pozitif, temel bileşen sayısı ve veri ön işleme tekniğinin ise negatif etkisinin olduğu görülmektedir. Faktörlerin etki derecesinin büyüklüğü veri ön işleme tekniği, temel bileşen sayısı ve dalga boyu sayısı ve aralığı olarak sıralanmaktadır. Bu veriler kullanılarak elde edilen yüzey grafiklerinde şekil 3.7’de de görüldüğü gibi **IRB** için temel bileşen sayısı arttığında karelerin ortalamaların karekökü (Root Mean Square) değerinin azaldığı görülmektedir. Şekil 3.7’den de görülebildiği gibi herhangi bir veri ön işleme tekniği kullanılmadığında ve dalga boyu sayısı ve aralığı olarak 0 faktör seviyesine karşılık gelen 270 – 320 nm dalga boyu aralığı ve 51 dalga boyu kullanıldığında karelerin ortalamaların karekökü değeri en az seviyededir.

4.1 Geliştirilen TBR ve KIEK Yöntemlerinin Validasyonu

Tez kapsamında geliştirilen TBR ve KIEK yöntemlerinin **AML** ve **IRB**’nin analizinde uygulanabilirliği için uygun koşullar tespit edildikten sonra yöntem validasyonu çalışmalarına geçilmiştir. Validasyon çalışmalarında öncelikle çalışma konsantrasyon aralıkları tespit edilmiş ve bu parametrenin kalibrasyon için hazırlanan Çizelge 3.1’den de görülebildiği gibi **AML** için 1.00 – 10.00 µg/mL ve **IRB** için ise 15.00 – 35.00 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Bu aralıklar tespit edilirken spektrofotometrik ölçümlerdeki absorbans aralıklarının dışına taşılmamasına ve çalışılabilecek minimum absorbans aralığının altına inilmemesine dikkat edilmiştir. Yine deneme setindeki kalibrasyon çözeltileri konsantrasyonları seçilirken bir önceki hususa dikkat edilmiştir. Bu sebeplerden dolayı tayin alt sınırı değerleri **AML** için 1.00 µg/mL ve **IRB** için ise 15 µg/mL olarak alınmıştır.

Absorbans ve konsantrasyonların yer aldığı kalibrasyon seti ya da deneme seti kullanılarak, yine bu iki etkin maddenin farklı konsantrasyonlarından oluşan bir validasyon setindeki konsantrasyonlar tahmin edilmiş ve elde edilen sonuçlar TBR yöntemi için Çizelge 3.5.'de ve KIEK yöntemi için Çizelge 3.11'de gösterilmiştir. Çizelgelerden de görülebileceği gibi ortalama % geri kazanım değerleri TBR yönteminde **AML** için % 100.73, **IRB** için % 104.29 ve KIEK yönteminde **AML** için % 101.05 ve **IRB** için % 103.43 olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu gözlemlendiği için geliştirilen yöntem doğru olarak kabul edilmiştir. Hesaplanan bağıl standart sapma değerlerinin **AML** ve **IRB** için % 2 civarında olması ise yöntemimizin yeterli kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir. **IRB** için kesinlik değerlerinin **AML**'ye göre daha yüksek olmasının sebebi **AML**'nin **IRB** üzerinde yüksek spektral girişime sahip olduğu şeklinde düşünülebilir. Bu kanıya **IRB** için elde edilen % geri kazanım değerlerinin bazılarının % 100'ün oldukça üzerinde olduğu şeklindeki sonuçlara da varılabilir.

AML ve **IRB** karışımı için (**AML** = 6 µg/mL, **IRB** = 20 µg/mL) gün içi (3'er saat aralıkla 3 kez okunmuştur) ve günler arası (2 gün) absorbans değerleri okunarak TBR ve KIEK yöntemlerinden bulunan sonuçlar F testi ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar TBR yöntemi için Çizelge 3.6 ve KIEK yöntemi için ise Çizelge 3.12'de gösterilmiştir. Çizelgelerden de görülebileceği gibi gün içi ve günler arası standart sapma değerlerinin düşük olması ve F değerlerinin p:0.05 için tablo değerinden daha küçük olması bu yöntemin 2 gün boyunca uygun bir kesinlikle bu etkin maddelerin analizi için başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir.

4.1.1. Geliştirilen TBR ve KIEK Yöntemlerinin Farmasötik Preparata Uygulanması

Geliştirilen TBR ve KIEK yöntemlerinin içerisinde **AML** ve **IRB** bulunan İRDAPİN® film tablet preparatına uygulamasının yapılması için de çalışmalar yapılmıştır. Amacımız etkin maddelerin miktarını tayin etmek olduğu için öncelikle bu preparattaki yardımcı maddelerden kaynaklanan herhangi bir girişimin olup

olmadığının tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaç için standart ekleme yöntemi uygulanmış ve elde edilen sonuçlar TBR yöntemi için Çizelge 3.7 ve KIEK yöntemi için Çizelge 3.13’de gösterilmiştir. Çizelgelerden de görülebileceği gibi eklenen saf etkin maddelerin hem KIEK hem de TBR yöntemi ile hesaplanan miktarlarla uyumlu olması ve ortalama % geri kazanım değerlerinin ile elde edilen ortalama % geri kazanım sonuçlarının her iki etkin madde içinde 100 % civarında olması bize preparat içerisinde bulunan yardımcı maddelerin analiz üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda yardımcı maddelerin bu etkin maddelerin farmasötik preparattan analizleri üzerine etkisinin olmadığı anlaşıldıktan sonra İRDAPİN® film tablet preparatının analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.14’de gösterilmiştir. Çizelgelerden de görülebileceği gibi hesaplanan bağıl standart sapma ve standart sapma sonuçları düşüktür. Geliştirilen TBR ve KIEK yöntemlerinden elde edilen sonuçların ortalaması Student *t* testi ile karşılaştırılmıştır. Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.14’ de görülebileceği gibi her iki etkin madde için de hesaplanan *t* değerleri, $p:0.05$ için çizelge değeri olan 2.31’den daha küçüktür. Sonuçların aynı zamanda F testi ile de karşılaştırılması yapıldığında hesaplanan F değerleri çizelge F değeri olan 15.38’den daha küçüktür. Elde edilen bu sonuçlar, TBR ve KIEK yöntemleri arasında preparat içerisindeki etkin maddelerin ortalama miktarları ve kesinliğin bir ölçütü olan standart sapmaları ve varyansları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ve hem TBR hem de KIEK yöntemlerinin **AML** ve **IRB** içeren farmasötik preparatın analizi için başarıyla uygulanabileceğini göstermiştir.

4.1.2.Literatür Yöntemleri ile Karşılaştırma

Literatür taraması gerçekleştirildiğinde **AML** ve **IRB**’nin aynı anda tayini için spektrofotometrik yöntemlerin kullanıldığı herhangi bir analiz metodu tespit edilememiştir. Bu durum, farmasötik preparat içerisinde **IRB**’nin miktarının **AML** miktarına göre oldukça yüksek değerlerde olması ve basit spektrofotometrik

yöntemler ile bu iki etkin maddenin aynı anda tayininin yapılamaması şeklinde olabilir.

Literatür çalışması gerçekleştirildiğinde **AML** ve **IRB** için tek başlarına ya da başka etkin maddeler ile çok sayıda analiz çalışması olduğu görülmektedir. Tez kapsamında ise **AML** ve **IRB**'nin aynı anda yer aldığı literatür çalışmalarına yer verilmiştir.

Shaikh ve arkadaşları 2014 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışmalarında, **AML** ve **IRB**'in aynı anda tayinleri için bir yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada doğrusal çalışma aralıkları **AML** için 5 – 15 µg/mL ve **IRB** için ise 50 – 150 µg/mL olarak bulunmuştur. Tez kapsamında geliştirilen TBR ve KIEK yöntemlerinde her iki etkin madde içinde çalışma alt sınırı literatür yöntemiyle karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur (Shaikh ve ark., 2014).

Swamy ve arkadaşları 2014 yılında yayımlana çalışmalarında, **AML** ve **IRB**'nin tayini için bir ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişler ve geliştirilen bu yöntemin validasyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalarında **AML** ve **IRB** için TAS değerlerini sırasıyla 16.10 µg/mL ve 2.304 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Tez kapsamında geliştirilen yöntemler ile elde edilen TAS değerleri literatür yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur (Swamy ve ark., 2014).

Acharya, 2018 yılında yayımlanan bir çalışmasında **AML** ve **IRB** ile birlikte **HCTZ**'nin tabletlerden aynı anda tayinleri için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada doğrusal çalışma aralıkları **AML** için 9.74 – 18.09 µg/mL ve **IRB** için 210 – 390 µg/mL olarak belirlenmiştir. Tez kapsamında geliştirilen TBR ve KIEK yöntemlerinde her iki etkin madde içinde çalışma alt sınırı literatür yöntemiyle karşılaştırıldığında sonuçlar daha düşük bulunmuştur (Acharya ve ark., 2018).

Shah ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımlanan çalışmalarında **AML** ve **IRB**'nin aynı anda tayinleri için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada **AML** için TAS değeri her bir bant için 12.7 ng ve **IRB** için TAS değeri her bir bant için 14.4 ng olarak bulunmuştur. Bu değerler tez kapsamında geliştirilen TBR ve KIEK yöntemlerinden elde edilen sonuçlar daha düşük bulunmuştur (Shah ve ark., 2015).

Bkhaitan ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımlanan çalışmalarında atorvastatin, **IRB** ve **AML**'nin aynı anda tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada her üç etkin madde için doğrusal çalışma aralıkları 5 – 30 µg/mL olarak tespit edilmiştir. En düşük çalışma konsantrasyonu olarak literatür yönteminde **AML** için elde edilen değer TBR ve KIEK yöntemlerinden elde edilenler ile karşılaştırıldığında daha yüksek, **IRB** için elde edilen değer ise daha düşük bulunmuştur (Bkhaitan ve ark., 2015).

Kristoffersen ve arkadaşları 2007 yılında yayımlanan çalışmalarında içerisinde **AML** ve **IRB** olan hipertansiyon ilaçlarının yer aldığı bir karışımın tam kan örneklerinden analizi için katı faz ekstraksiyonunun kullanıldığı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Gerekli karşılaştırmalar yapıldığında TBR ve KIEK yöntemlerinden elde edilen TAS değerlerinin literatür yöntemi ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür (Kristoffersen ve ark., 2007).

Khalil ve arkadaşlarının 2011 yılında yayımlanan çalışmalarında **AML** ve valsartanın plazmadan tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada **IRB** sadece iç standart olarak kullanılmıştır. Literatür yönteminde **AML** için tespit edilen çalışma aralığının en küçük değeri 10 ng'dır. Bu değer tez kapsamında geliştirilen yöntemler ile karşılaştırıldığında daha düşüktür (Khalil ve ark., 2011).

Nimmu ve arkadaşlarının 2018 yılında yayımlanan çalışmalarında sıçan plazmasında ve idrarda **OLM**, **AML** ve **HCTZ** aynı anda tayinleri için Sıvı Kromatografi - Kütle Spektrometri / Kütle Spektrometri yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada **IRB** iç standart olarak kullanılmıştır. **AML** için doğrusal çalışma aralığı 0.4 – 100 ng/mL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen TBR ve KIEK yöntemlerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında doğrusal çalışma aralığının en düşük konsantrasyonu literatür yönteminde daha düşüktür (Nimmu ve ark., 2018).

Bodapati ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımlanan ters faz – yüksek performanslı sıvı kromatografisi çalışmasında **AML** için doğrusal çalışma aralığının en küçük değeri geliştirdiğimiz yöntemden daha yüksektir (Bodapati ve ark., 2015).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında hipertansiyon tedavisinde kombine olarak kullanılan **AML** ve **IRB**'nin ikili karışımının içeren bir farmasötik prepattan aynı anda tayinleri için spektrofotometrik verilerin kullanıldığı TBR ve KIEK kemometrik yöntemleri geliştirilmiştir.

AML ve **IRB**'nin spektral girişimi sebebiyle bu iki etkin maddenin spektrofotometrik olarak tayinleri aynı anda yapılamayacağı için kemometrik yöntemlerin uygulanmasına başvurulmuştur. TBR ve KIEK yöntemlerinin geliştirilmesi sırasında uygun dalga boyu aralığı ve sayısı araştırıldığında **AML** için 240 – 280 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 41 dalga boyunda ve **IRB** için ise 270 – 320 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 51 dalga boyunda çalışmanın uygun olduğu görülmüştür. Bu dalga boyu değerlerinde ölçülen absorbans değerleriyle hazırlanan absorbans matrisi ve bunların standart konsantrasyonlarına göre hazırlanan konsantrasyon matrisleri ile tez kapsamında belirtilen bilgisayar yazılım programı kullanılarak yeni koordinatları üzerinden hesaplanan kalibrasyon katsayıları yardımıyla etkin maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Uygun sonuçlar elde edebilmek için kullanılacak temel bileşen sayısı araştırıldığında TBR yönteminde **AML** için 4 ve **IRB** için 7, KIEK yönteminde ise her iki etkin madde içinde 4 sayısı tespit edilmiştir. Uygun veri ön işleme tekniği araştırıldığında her iki yöntemde de **AML** için standardize edilmiş veriler kullanılırken, **IRB** için herhangi bir veri ön işleme tekniğine ihtiyaç duyulmamıştır. Yöntem Box – Behnken deneysel tasarım tekniği kullanılarak optimize edilmiş ve elde edilen sonuçlar gerek ikinci derece denklemler ile gerekse yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen bütün bu yöntemlerin validasyon testleri gerçekleştirilmiş ve **AML** ve **IRB** içeren İRDAPİN® film tablet preparatına uygulamaları başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar yöntemler bazında istatistiksel olarak Student t test ve F test ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farkların olmadığı gözlenmiştir.

Literatürlerde **AML** ve **IRB**'nin ikili karışımının analizi için geliştirilmiş herhangi bir kemometrik ve spektrofotometrik yöntemle rastlanmamıştır. Yaptığımız literatür araştırmalarında seçtiğimiz karışımlar ile ilgili herhangi bir çalışmanın yapılmamış olması, geliştirdiğimiz bu yöntemler **AML** ve **IRB** için tez kapsamında gerçekleştirilen analiz çalışmalarının orijinal olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, her laboratuvarında bulunabilecek olan ve çalışma teknikleri diğer analiz yöntemlerine göre daha basit olan spektrofotometre cihazı kullanılarak kemometrik yöntemlerinin uygulanabilir olduğunun gösterilmesi, ilaç endüstrisinde farmasötik preparat içerisinde aralarında büyük derecede konsantrasyon farklılığı bulunan etkin maddelerin analizinde kullanımı açısından gelecek çalışmalara ışık tutacaktır.



ÖZET

Amlodipin Besilat ve İrbesartanın Farmasötik Preparatlarda Aynı Anda Tayinleri İçin Geliştirilen Kemometrik Yöntemlerde Çoklu Metot Optimizasyonu Tekniklerinin Kullanımı

Bu tez çalışmasında hipertansiyon tedavisinde kombine olarak kullanılan **AML** ve **IRB**'nin ikili karışımının içeren farmasötik prepatan aynı anda tayinleri için spektrofotometrik verilerin kullanıldığı TBR ve KIEK kemometrik yöntemleri geliştirilmiştir.

AML ve **IRB**'in ile ikili karışımının analizi için geliştirilen yöntemlerden birincisi Temel Bileşen Regresyonu (TBR) dur. Bu yöntemde; **AML** için 240 – 280 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 41 dalga boyunda ve **IRB** için 270 – 320 nm arasında $\Delta\lambda = 1$ nm olacak şekilde 51 dalga boyunda okunan absorbans değerleriyle hazırlanan absorbans matrisleri ve bunların standart konsantrasyonlarına göre hazırlanan konsantrasyon matrisleri ile hesaplanan kalibrasyon katsayıları yardımıyla **AML** ve **IRB**'nin aynı anda miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. TBR yöntemde **AML** için 4 ve **IRB** için 7 temel bileşenin analizlerde kullanılmasının uygun olduğu belirlenmiştir. KIEK yönteminde ise **AML** ve **IRB**'nin her ikisi içinde 4'er adet temel bileşen kullanılmıştır. Uygun veri ön işleme tekniği araştırıldığında her iki yöntemde de **AML** için standardize edilmiş veriler kullanılırken, **IRB** için herhangi bir veri ön işleme tekniğine ihtiyaç duyulmamıştır. Yöntem Box – Behnken deneysel tasarım tekniği kullanılarak optimize edilmiş ve elde edilen sonuçlar gerek ikinci derece denklemler ile gerekse yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.

Yöntemlerde, kalibrasyon setindeki çalışma aralıkları **AML** ve **IRB** için sırasıyla 1 – 10 $\mu\text{g/mL}$ ve 15 – 35 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Yöntemdeki ortalama % geri kazanım değerleri TBR yönteminde **AML** ve **IRB** için sırasıyla %100.73 ve %104.79, KIEK yönteminde ise sırasıyla % 101.05 ve % 103.43 hesaplanmıştır. Bağlı standart sapma değerleri ise TBR yönteminde **AML** ve **IRB**

için sırasıyla %1.91 ve %2.71, KIEK yönteminde ise sırasıyla %1.88 ve %2.79 olarak bulunmuştur.

Türkiye ilaç piyasasında bulunan **AML** ve **IRB**'nin ikili karışımını içeren İRDAPİN® film tablet preparatına geliştirilen ve valide TBR ve KIEK yöntemleri başarıyla uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar kendi aralarında Student's *t* testi ve Fisher *F* testi yardımı ile karşılaştırılmışlar ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Amlodipin Besilat, İrbesartan, Temel bileşen regresyonu, Kısmi en küçük kareler yöntemi, UV spektrofotometri, Aynı anda miktar tayini, Farmasötik preparat, Validasyon

SUMMARY

Using of Multiple Method Optimization Techniques in the Chemometric Methods Developed for the Determination of Amlodipine Besylate and Irbesartan in Pharmaceutical Preparations

In this thesis, Principal Component Regression (PCR) and Partial Least Squares (PLS) chemometric methods have been developed using spectrophotometric data for the simultaneous determination of **AML** and **IRB** from a pharmaceutical preparation which is used in combination for the treatment of hypertension.

The first method developed for the analysis of binary mixture of **AML** and **IRB** is PCR. In this method; Absorbance matrices prepared at 41 wavelengths between 240 - 280 nm $\Delta\lambda = 1$ nm for **AML** and 51 wavelengths between 270 - 320 nm $\Delta\lambda = 1$ nm for **IRB** and concentration matrices prepared according to their standard concentrations. Simultaneous quantification of **AML** and **IRB** was performed using the calculated calibration coefficients. In PCR method, it was determined that 4 components for **AML** and 7 components for **IRB** were suitable for analysis. In PLS method, 4 basic components were used in both **AML** and **IRB**. When the appropriate data preprocessing technique was searched, both methods used standardized data for **AML**, while no data preprocessing technique was required for **IRB**. The method has been optimized by using Box - Behnken experimental design technique and the results are shown by using second order equations and surface graphs.

In the methods, the working ranges in the calibration set were 1 - 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 15 - 35 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for **AML** and **IRB**, respectively. The average% recovery values in the method were calculated as 100.73% and 104.79% for **AML** and **IRB** in the PCR method, and 101.05% and 103.43% in the PLS method, respectively. The relative standard deviation values were 1.91 and 2.71% for **AML** and **IRB** in PCR and 1.88 and 2.79, respectively, in PLS.

These developed and validity proved methods were applied successfully to İRDAPİN[®] film tablet containing double mixture of **AML** and **IRB**, commercially exist in Turkish drug market. Results obtained were compared by Student's *t* test and *F* test with each other and it was found that there was no significant statistical difference among them.

Keywords: Amlodipine Besylate, Irbesartan, Principal component regression, Partial Least Squares Method, UV spectrophotometry, Simultaneous quantitative analysis, Pharmaceutical preparation, Validation



KAYNAKLAR

- ACHARYA V. M., (2018). RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of irbesartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in tablet. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **7(9)**, 690-701.
- ADAMS, M. A., & TRUDEAU, L. (2000). Irbesartan: review of pharmacology and comparative properties. *The Canadian journal of Clinical Pharmacology= Journal Canadien de Pharmacologie Clinique*, **7(1)**, 22-31.
- ALİ, T. A., MOHAMED, G. G., AGLAN, A. A., & HEAKAL, F. E. T. (2016). RP-HPLC Stability-indicating method for estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide in bulk and pharmaceutical dosage form. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **44(1)**, e1601-e1608.
- BKHAITAN, M. M., & MIRZA, A. Z. (2015). Stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of atorvastatin, irbesartan, and amlodipine in bulk and pharmaceutical preparations. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **36(9)**, 2230-2237.
- BOX GE, BEHNKEN DW. (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, **2**, 455-475.
- BRERETON, R. G. (2002). *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons.
- BODAPATI, K., VAIDYA, J. R., SIDDIRAJU, S., & GOWRISANKAR, D. (2015). Stability Indicating RP-HPLC Studies for the Estimation of Irbesartan and Amlodipine Besylate in Pharmaceutical Formulations and Identification and Characterization of Degradants Using LC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **38(2)**, 259-270.
- CHAUDHARI, S. R., & SHIRKHEDKAR, A. A. (2018). Application of Box-Behnken Design for Validation of High-Per-Formance Thin-Layer Chromatography/Densitometry Method for Robustness Determination of Apremilast in Bulk and inhouse Tablets. *Pharmaceutical Methods*, **9(1)**
- CLAVIJO, G. A., DE CLAVIJO, I. V., & WEART, C. W. (1994). Amlodipine: a new calcium antagonist. *American Journal of Health-System Pharmacy*, **51(1)**, 59-68.

- EBEID, W. M., ELKADY, E. F., EL-ZAHER, A. A., EL-BAGARY, R. I., & PATONAY, G. (2014). Synchronized separation of seven medications representing most commonly prescribed antihypertensive classes by using reversed-phase liquid chromatography: Application for analysis in their combined formulations. *Journal of separation science*, **37**(7), 748-75
- IGDER, A. A. R. A., RAHMANI, A. A., FAZLAVI, A., AHMADI, M. H., AZQHANDI, A., HOSSEIN, M., & OMIDI, M. H. (2012). Box-Behnken Design of Experiments Investigation for Adsorption of Cd⁺² onto carboxymethyl Chitosan Magnetic Nanoparticles. *Journal of Mining and Environment*, **3**(1), 51-59.
- KAVATHIA, A., & MISRA, M. (2013). Development and validation of RP-HPLC and UV- spectrophotometric methods for rapid simultaneous estimation of amlodipine and benazepril in pure and fixed dose combination. *Arabian J. Chem.*
- KHALIL, N. Y., WANI, T. A., ABUNASSIF, M. A., & DARWISH, I. A. (2011). Sensitive HPLC method with fluorescence detection and on-line wavelength switching for simultaneous determination of valsartan and amlodipine in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **34**(20), 2583-2595.
- KRISTOFFERSEN, L., ØIESTAD, E. L., OPDAL, M. S., KROGH, M., LUNDANES, E., & CHRISTOPHERSEN, A. S. (2007). Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post- mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry: method development and robustness testing by experimental design. *Journal of Chromatography B*, **850**(1-2), 147-160.
- LEUNG, A. A., BUSHNIK, T., HENNESSY, D., MCALISTER, F. A., & MANUEL, D. G. (2019). Risk factors for hypertension in Canada. *Health reports*, **30**(2), 3-13.
- MUBTASIM, N., KABIR, E. R., PODDER, A. K., & BHADRA, S. (2016). A pragmatic approach to the analysis of a combination formulation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **24**(6), 689-697.
- NANDHINI S., (2014). Essential Hypertension. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **6**(9), 305-307.
- NIMMU, N. V., ARNIPALLI, M. S., APPU, K., KHALID, S., & RAMISETTI, N. R. (2018). LC–MS/MS Determination of Antihypertension Drugs in Rat Plasma and Urine: Applications to Pharmacokinetics. *Chromatographia*, **81**(11), 1551-1557.

- OTTO, M. (1999). *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. WILEY-VCH, Germany
- ÖZDEMİR, D., (1999) “Multi-instrument calibration using genetic regression in UV-visible and near-infrared spectroscopy”. Doktora tezi, Clemson University, South Carolina, USA.
- PARMAR, K., SHAIKH, A., & DALVADI, H. (2018). Chronomodulated drug delivery system of Irbesartan: Formulation and development using Design of Experiment (DoE). *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, **56(1)**, 11-17.
- RANE, V. P., PATIL, K. R., SANGSHETTI, J. N., YEOLE, R. D., & SHINDE, D. B. (2010). Stability indicating LC method for simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatographic Science*, **48(7)**, 595-600.
- SHAH, D. A., PATEL, D. V., MEHTA, F. A., CHHALOTIYA, U. K., & BHATT, K. K. (2015). High-performance thin-layer chromatography method for estimating the stability of a combination of irbesartan and amlodipine besylate. *Journal of Taibah University for Science*, **9(2)**, 177-186.
- SHAIKH, M. M., MASTER, S. T. A. V. A. N., & CHAUDHRY, A. M. (2014). Development And Validation of RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate And Irbesartan. *Int. bul. Drug res*, **4(7)**, 1-15.
- SHAKYA, P., JAIN, P.K., SHRIVASTAVA, P., GAJBHIYE, A. (2015). Simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide by UV spectroscopy. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **7(6)**, 389 – 391.
- SMITH, B. C. (2002). *Quantitative Spectroscopy : Theory and Practice*, Academia Press, An imprint of Elsevier Science, California, USA
- SWAMY G. K., KUMAR J., SESAGIRI RAO J.V.L.N., (2014). A validated reverse phase HPLC method for the simultaneous estimation of irbesartan and amlodipine in pharmaceutical dosage form. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3(11)**, 996-1007.
- USLU, A., DİKMEN, İ., ÜNSALAN, S., KILINÇ, B., SAĞLAM, O., EREN-MEMİŞOĞLU, A., ... & OCAK, Ö. (2016). Fasting And Fed Bioequivalence Studies Of Etodolac Sustained Release Tablets Manufactured In Turkey In Healthy Volunteers. *EVALUATION*, **60**, 65.

WANG, Z., LI, J., CHEONG, S., BHASKAR, U., AKIHIRO, O., ZHANG, F., & LINHARDT, R. J. (2011). Response surface optimization of the heparosan N-deacetylation in producing bioengineered heparin. *Journal of biotechnology*, **156**(3), 188-196.

https://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=amlodipin .

https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4454663_EN.htm .

https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=1631359 .

https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB4127875.aspx .

https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4454663_EN.htm .



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Metin Can ALKAN

E-mail Adresi: metincan.alkan@hotmail.com

İletişim Adresi: Altunkalem Mah. Örnek Sok. Çakır Sitesi Günseli Apt. No:4/8
Akşehir/KONYA

Telefon: 05063261669

Doğum Tarihi ve Yeri: 20.08.1992, Konya

Uyruğu: T.C.

Sürücü Belgesi: B Sınıfı

Yabancı Lisan: İngilizce

Eğitim

2015 - Devam Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Yüksek
Lisans

2010 - 2015 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

2006 - 2010 Akşehir Anadolu Öğretmen Lisesi

1998 - Akşehir Yıldırım İlköğretim Okulu

İş Deneyimi

Ankara Eczacı Odası Sıralı Dağıtım Birimi

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

Sertifikalar

KOSGEB

İş Güvenliği