

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİMOLOL MALEAT İÇEREN TİCARİ FARMASÖTİK
PREPARATLARDAKİ ETKİN MADDELERİN
SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOĞRAFİK
ÖLÇÜMLERE DAYALI KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE
MİKTAR TAYİNLERİ**

Eda BÜKER

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ

Bu araştırma TÜBİTAK ARDEB tarafından 214Z186 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “TİMOLOL MALEAT İÇEREN TİCARİ FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ ETKİN MADDELERİN SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOGRFİK ÖLÇÜMLERE DAYALI KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNLERİ” 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: Eda BÜKER

Tarih: 18.05.2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Eda BÜKER tarafından hazırlanan

“TİMOLOL MALEAT İÇEREN TİCARİ FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ
ETKİN MADDELERİN SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOĞRAFİK
ÖLÇÜMLERE DAYALI KEMOMETRİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNLERİ”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

.....
.....

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

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

İmza

Prof. Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1 Dorzolamid Hidroklorür	6
1.1.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	6
1.1.2 Farmakolojik Özellikleri	7
1.2. Timolol Maleat	9
1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	9
1.2.2. Farmakolojik Özellikleri	11
1.3. Brimonidin Tartarat	13
1.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	13
1.3.2. Farmakolojik Özellikleri	15
1.4. Timolol Maleat, Dorzolamid Hidroklorür ve Brimonidin Tartarat'ın Kantitatif Analizi için Uygulanan Analitik Yöntemler	25
1.4.1. Timolol Maleat Miktar Tayini için Uygulanan Analiz Yöntemleri	25
1.4.1.1. Spektrofotometrik Yöntem	25
1.4.1.2. Kromatografik Yöntem	27
1.5.2. Dorzolamid Hidroklorür İçin Uygulanan Analitik Yöntemler	36
1.5.2.1. Kromatografik Yöntem	36
1.5.2.2. Spektrofotometrik Yöntem	38
1.6.3. Timolol Maleat ve Dorzolamid Hidroklorür Karışımının Eş Zamanlı Miktar Tayini için Uygulanan Analitik Yöntemler	39
1.6.3.1. Kromatografik Yöntem	39
1.6.3.2. Spektrofotometrik Yöntem	43
1.6.4. Brimonidin Tartarat için Uygulanan Analitik Yöntemler	44
1.6.4.1. Spektrofotometrik Yöntem	44
1.6.4.2. Kromatografik Yöntem	46

1.6.4.3. Florimetrik Yöntem	50
1.6.5. Timolol Maleat ve Brimonidin Tartarat Karışımının Eş Zamanlı Miktar Tayini için Uygulanan Analitik Yöntemler	51
1.6.5.1. Spektrofotometrik Yöntem	51
1.6.5.2. Kromatografik Yöntem	52
2. GEREÇ VE YÖNTEM	53
2.1. Gereçler	54
2.1.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	54
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	55
2.1.3. Analiz Edilen Bileşikleri İçeren Ticari Preparatlar	55
2.2. Analitik Yöntemler ve Teorik Esasları	56
2.2.1 UV-VIS Spektrofotometri	57
2.2.2. Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	65
2.2.3. Kromatografide Temel Parametreler	75
2.2.4. Temel Bileşen Regresyonu (Principal Component Regression, PCR)	86
2.2.5. Kısmi En Küçük Kareler (Partial Least Squares, PLS)	88
2.2.6. Deneysel Tasarım ve Optimizasyon	90
2.2.6.1. Deneysel Uzay Kavramı	91
2.2.6.2. Cevap Yüzeyi Kavramı	94
2.2.6.3. Matematiksel Modelleme Kavramı	96
2.2.6.4. Modelleme	97
2.2.6.5. Denklemlerin Sistemi	98
2.2.6.6. İki Seviyeli Tam Faktöriyel Tasarım	100
2.2.6.7. Merkezi Bileşenli Tasarım	113
2.2.6.8. Box-Behnken Tasarım	116
2.2.7. Cevap Faktörünün hesaplanması	119
2.2.8. Sürekli dalgacık dönüşümü (SDD) (wavelet transform)	122
3. BULGULAR	124
3.1. BRI ve TIM Karışımının Analizi	124
3.1.1. UPLC yönteminin geliştirilmesinde kemometrik optimizasyon	124
3.1.2. BRI ve TIM karışımının optimize edilen UPLC yöntemiyle kantitatif analizi	133
3.1.2.1. Standart Çözeltiler	133
3.1.2.2. UPLC Yönteminde Kromatografik Şartlar	134
3.1.2.3. Doğrusal Regresyon Denkleminin Hesaplanması	135
3.1.2.4. UPLC analitik yöntem validasyonu	139
3.1.2.5. UPLC Analizinde Sistem Uygunluk Parametreleri	144
3.1.2.6. UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	145
3.1.3. BRI-TIM karışımının PCR yöntemi ile kantitatif analizi	148

3.1.3.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri	149
3.1.3.2. Kemometrik PCR kalibrasyonu	150
3.1.3.3. PCR yönteminin analitik validasyonu	154
3.1.3.4. PCR yönteminin farmasötik preparata uygulanması	160
3.1.4. BRI ve TIM karışımının kemometrik PLS yöntemi ile kantitatif analizi	162
3.1.4.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri	163
3.1.4.2. Kemometrik PLS Kalibrasyonu	164
3.1.4.3. PLS yönteminin analitik validasyonu	168
3.1.4.4. PLS yönteminin farmasötik preparata uygulanması	174
3.1.5. BRI-TIM Karışımının Mexh-SDD ve Sym5-SDD Sinyal İşleme Yöntemleri ile Kantitatif Analizi	176
3.1.5.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri	177
3.1.5.2. Sinyal işleme yöntemlerinin validasyonu	181
3.1.5.3. Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin farmasötik preparata uygulanması	187
3.1.6. BRI-TIM Karışımı için uygulanan yöntemlerin istatistiksel karşılaştırılması	189
3.2. DOR ve TIM Karışımının Analizi	191
3.2.1. UPLC yönteminin geliştirilmesinde kemometrik optimizasyon	191
3.2.2. DOR ve TIM karışımının optimize edilen UPLC yöntemiyle kalitatif analizi	200
3.2.2.1. Standart çözeltiler	200
3.2.2.2. UPLC yönteminin kromatografik şartları	201
3.2.2.3. Doğrusal regresyon denklemlerinin hesaplanması	202
3.2.2.4. UPLC analitik yöntem validasyonu	206
3.2.2.5. UPLC analizinde sistem uygunluk parametreleri	211
3.2.2.6. UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulaması	212
3.2.3. DOR-TIM Karışımının PCR yöntemi ile kantitatif analizi	215
3.2.3.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri	216
3.2.3.2. Kemometrik PCR Kalibrasyonu	217
3.2.3.3. PCR yönteminin analitik validasyonu	221
3.2.3.4. PCR yönteminin farmasötik preparata uygulanması	227
3.2.4. DOR ve TIM karışımının kemometrik PLS yöntemi ile kantitatif analizi	229
3.2.4.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri	230
3.2.4.2. Kemometrik PLS kalibrasyonu	231
3.2.4.3. PLS yönteminin analitik validasyonu	235
3.2.4.4. PLS yönteminin farmasötik preparata uygulanması	241
3.2.5. DOR-TIM karışımının db10-SDD ve bior6.8-SDD Sinyal İşleme Yöntemleri ile kantitatif analizi	243
3.2.5.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri	244
3.2.5.2. Sinyal işleme yöntemlerinin validasyonu	248
3.2.5.3. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin farmasötik preparata uygulanması	254
3.2.6. DOR-TIM karışımı için uygulanan yöntemlerin istatistiksel karşılaştırılması	256

4. TARTIŞMA	258
4.1. UPLC Yöntemi ile BRI-TIM ve DOR-TIM Karışımlarının Analizi	260
4.2. PCR ve PLS Yöntemleri ile BRI-TIM ve DOR-TIM Karışımının Analizi	262
4.3 SDD Yöntemleri ile BRI-TIM ve DOR-TIM Karışımının Analizi	264
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	267
ÖZET	269
SUMMARY	271
KAYNAKLAR	273
ÖZGEÇMİŞ	284



ÖNSÖZ

Günümüzde hastalıklara neden olan organizmaların direnç kazanmaları, iki veya daha fazla etkin maddeli ilaçların üretimlerinin artmasına neden olmuştur. İlaç üretiminde ham madde analizi, üretimi tamamlanan numunelerin rutin analizleri ve yeni geliştirilen veya jeneriği üretilecek ilaçların Ar-Ge denemelerinde kullanılan analiz yöntemlerinin güvenilir, doğru, kesin ve hızlı sonuçlar verebilen yöntemlere dayanması ilaç endüstrisi açısından önem arz etmektedir. Bu kombine preparatlarda yardımcı maddeler ile birlikte birden fazla etkin madde bulunması girişimlere neden olduğu için analizişlemlerinde pahalı analitik tekniklerin kullanılması veya ilave kimyasal ayırma tekniklerinin analiz işlemlerinde kesinliğin ve doğruluğun düşmesine, analiz maliyetinin ve süresinin uzamasına neden olmaktadır. Kimyasal analizlerde bu olumsuz şartların ortadan kaldırılabilmesi için kemometrik yöntemler ve klasik aletli analiz teknikleri birlikte kullanılmaktadır.

Kemometri adı verilen yeni bir disiplinin oluşumuna; bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik alanlarındaki gelişmeler neden olmuştur. Özellikle analitik kimya alanında kompleks sistemlerin aydınlatılması için kemometri uygulamalarının kullanım alanı artmaya devam etmektedir. Kimyasal ve farmasötik analizlerde kemometrik yöntemlerin kullanımı ile pahalı analiz teknikleri veya ilave ayırma yöntemlerine gerek kalmaksızın hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Kromatografik, spektrofotometrik, spektroflorimetri ve benzeri yöntemlerin kimyasal ve farmasötik analiz işlemlerindeki uygulamalarında, kimyasal yapılarının benzerliği veya benzer kimyasal davranışları nedeniyle kromatografik ve spektral bandları girişim yapan

sistemlerin analizinden istenen sonuçları alınamayabilir veya böyle kompleks bir sistemin analizi uzun ve yorucu kimyasal deneyler gerektirebilir. Böyle durumlarda; kısa analiz süresi ile istenen kromatografik ayrımı sağlamak için kemometrik deneysel tasarım optimizasyon teknikleri veya spektrofotometrik girişim yapan bileşiklerin analizi için hiçbir ayırma işlemine gerek olmadan iki boyutlu PLS ve PCR gibi yöntemler kullanılabilir. Bu tez çalışmasında yukarıda bahsedilen her iki durumun uygulaması tez konusu ilaç kombinasyonlarının analizi için başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Literatürde yapılan araştırmalara bakıldığında Timolol Maleat (TIM), Dorzolamid Hidroklorür (DOR) ve Brimonidin Tartarat (BRI) bileşiklerinin kromatografik veya UV-spektrofotometri ile eş zamanlı kantitatif analizi yapılırken kemometrik yöntemlerin uygulanmıdığı görülmüştür. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen bu tez kapsamında TIM-DOR ve TIM-BRI karışımlarının kantitatif analizleri için kromatografik ve spektrofotometrik yeni, hızlı ve valide edilmiş kemometrik analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Kromatografik analizlerde kemometrik deneysel tasarım ve optimizasyon yöntemleri kullanılmıştır. UV spektrofotometresi analizlerine de ise kemometrik kalibrasyon yöntemleri uygulanarak eş zamanlı kantitatif analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına bakıldığında, daha önce literatürde uygulanan kromatografik analizlere göre çok daha ekonomik ve hızlı analiz yöntemlerinin geliştirildiği anlaşılmaktadır. Tez çalışması sonucunda yeni geliştirilen bu yöntemler ilaç endüstrisinde rutin analiz ve Ar-Ge denemelerinde güvenilir şekilde kullanılabilir.

Bu tez TÜBİTAK ARDEB tarafından 214Z186 numaralı proje ile desteklenmiştir. Bu süreçte emeği geçen herkese teşekkür ederim. insana ve mesleğine saygılı; bu saygıdan dolayı da titiz, dikkatli, çalışkan, bir o kadar da duyarlı, sabırlı olan,projenin ve doktora tezinin gerçekleşmesi süresince akademik ve manevi desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Erdal DİNÇ'e teşekkür ederim.Ayrıca bu çalışmada emeği geçen ve sabırla yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Arş. Gör. Zehra Ceren ERTEKİN ÖZKAN'a, Dr. Gülsen KENDİR'e, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde görevli Uzm. Biolog Sümeyra ÇETİNKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca geç saatlere kadar süren çalışmalar sırasında beni yalnız bırakmayıp her anımda bana yardımcı olan sevgili eşim Mustafa Çağrı BIYIK'a, çok değerli ablam ve eşine de teşekkürlerimi sunarım. Bilim yolundaki zorlu yolculuğumda bana her zaman destek olup anlayış gösteren, hakları ödenmeyecek anne ve babama en derin sevgi ve saygılarımı sunarım. Tezimin yazım aşamasında dünyaya merhaba diyen minik oğlum Batuhan Aziz BIYIK'a ayırmam gerek zamanlardan küçük bir bölümünü aldığım için teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu
α	Seçicilik faktörü
ANNs	(Artificial neural network) Yapay sinir ağları
As	Pik asimetri oranı
B	Boyuna difüzyon
BRI	Brimonidin Tartarat
BSS	Bağıl standart sapma
BSH	Bağıl standart hata
C	Fazlar arasındaki kütle aktarımı
CE-MS	Kaliper elektroforez kütle spektrofotometrisi
CLS	(Classical least squares) Klasik en küçük kareler
C_M	Hareketli fazdaki molar derişim
C_S	Çözünenin sabit fazdaki molar derişimi
DOR	Dorzolamid Hidroklorür
F	Hacimsel akış hızı
GİB	Göz içi basınç
H	Teorik tabaka yüksekliği
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ICRF	Improved chromatographic response function
K	Dağılım katsayısı
k'	Kapasite faktörü
KAI	Karbonik anhidraz inhibitörleri
m	Doğrusal regresyon eşitliğinin eğimi
L	Kolon dolgu uzunluğu

LC-MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrofotometrisi
LOD	Yakalama sınırı ($\mu\text{g/mL}$)
LOQ	Tayin sınırı ($\mu\text{g/mL}$)
N	Teorik tabaka sayısı
n	Doğrusal regresyon eşitliğinin kesim noktası
PCR	(Principal component regression) Temel bileşen regresyon
PDA	Photo Diode Array
PLS	(Partial least squares) Kısmi en küçük kareler
PG	Prostaglandin
Rs	Ayrıcılık terimi
r	Doğrusal regresyon eşitliğinin korelasyon katsayısı
SS	Standart Sapma
TEA	Trietil Amin
TIM	Timolol Maleat
t_0	Ölü zaman
t_R	Alıkonma zamanı
u	Çizgisel hız
UPLC	Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
V_0	Ölü hacim
V_M	Kolondaki hareketli faz hacmi
V_R	Alıkonma hacmi
W	Pik zemin genişliği
$W_{1/2}$	Yarı yükseklikteki pik genişliği

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dorzolamid Hidroklorür'ün açık kimyasal yapısı	6
Şekil 1.2. Dorzolamid Hidroklorür'ün metanol içerisindeki 20 ppm'lik çözeltisinin UV Spektrumu	7
Şekil 1.3. Timolol Maleat'ın açık kimyasal yapısı	9
Şekil 1.4. Timolol Maleat'ın metanol içerisindeki 24 ppm'lik çözeltisinin UV Spektrumu.	10
Şekil 1.5. Brimonidin Tartarat'ın açık kimyasal yapısı.	13
Şekil 1.6. Brimonidin tartarat'ın metanol içerisindeki 15 ppm'lik çözeltisinin UV Spektrumu.	14
Şekil 2.1. Elektromanyetik spektrum.	57
Şekil 2.2. Çift ışın yollu spektrofotometrenin şematik gösterimi.	63
Şekil 2.3. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti ($I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$ numune içinde aldığı yol)	64
Şekil 2.4. Aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) cihazının şematik gösterimi.	74
Şekil 2.5. Kromatogram üzerinden kapasite faktörünün hesaplanması.	76
Şekil 2.6. Van Deemter eğrisi.	80
Şekil 2.7. Kapasite faktörünün, etkinliğin ve seçiciliğin kromatogram üzerine etkisi.	82
Şekil 2.8. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı ve pik şekline etkileri.	83
Şekil 2.9. Pik asimetri oranının hesaplanması.	84
Şekil 2.10. Faktörün alt seviyesi -1 ile üst seviyesi +1 ile gösterilir. Faktörün değişim alanı düşük ve yüksek seviyeler arasını kapsayan bütün değerlerden oluşur.	91
Şekil 2.11. Her faktör ölçülü ve yönlendirilmiş bir eksenle temsil edilir. Bu faktörlerin eksenleri kendi aralarında birbirine diktir.	92
Şekil 2.12. Deneyisel uzayda faktörlerin seviyeleri deneyisel noktalar ile tarif edilir.	92
Şekil 2.13. Deneyisel noktalar bir araştırmacı tarafından tanımlanan inceleme alanında düzenlenir.	93
Şekil 2.14. Çalışma alanının noktaları ile ilgili cevaplar cevap yüzeyini oluşturur.	95
Şekil 2.15. Uygulanan model birinci dereceden olduğu zaman deneyisel noktaların en iyi olduğu bölgeler (yerler) çalışma alanının doruklarıdır.	101

Şekil 2.16. Faktör 2'nin ortalama düzleminde, Faktör 1'in etkisi çalışma alanının merkezi ve faktör 1'in yüksek seviyesi arasındaki cevabın değişimidir.	107
Şekil 2.17. Etkin ürün verimi üzerine NaCl ve sıcaklığın etkileri.	109
Şekil 2.18. Ürünün verimi üzerine NaCl konsantrasyonu ve sıcaklığın etkilerini gösteren izocevap eğrileri.	110
Şekil 2.19. İki faktör için tam faktöriyel 32 tasarım.	112
Şekil 2.20. Üç faktör için merkezi bileşenli tasarım.	115
Şekil 2.21. Üç faktör için merkezi kompozit tasarım.	118
Şekil 2.22. UPLC kromatogramlarından ICRF hesaplamasında kullanılan parametreler.	120
Şekil 3.1. BRI (a) ve TIM (b)'ın Tam faktöriyel tasarımı için 298.0 nm dalga boyundaki UPLC kromatogramı.	127
Şekil 3.2. a) Hareketli faz akış hızı-% 0.1 M CH ₃ COOH ile ICRF, b) kolon sıcaklığı-% 0.1 M CH ₃ COOH ile ICRF, c) Hareketli faz akış hızı-kolon sıcaklığı ile ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey cevap grafikleri ve eş yükselti eğri haritaları	131
Şekil 3.3. BRI (a) ve TIM (b) bileşikleri için kalibrasyon numunelerine (CS number) optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar A1 (246 nm) ve B1 (298 nm).	138
Şekil 3.4. BRI (a) ve TIM (b) bileşikleri için ticari göz damlası numunelerine optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar A2 (246 nm) ve B2 (298 nm).	146
Şekil 3.5. A) BRI (20.0 µg/mL), TIM (40.0 µg/mL) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.	152
Şekil 3.6. BRI ve TIM için PCR kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).	153
Şekil 3.7. PCR kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonu.	153
Şekil 3.8. A) BRI (20.0 µg/mL), TIM (40.0 µg/mL) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.	166
Şekil 3.9. BRI ve TIM için PLS kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).	167
Şekil 3.10. PLS kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonları.	167
Şekil 3.11. a) BRI ve TIM'in kalibrasyon setinin spektrumu, b) mexh-SDD yöntemi ve c) sym5-SDD yönteminin kalibrasyon setinin UV spektrumlarına uygulanması	178
Şekil 3.12. DOR (a) ve TIM (b) için 275.0 nm'de Box-Behnken Tasarımı için UPLC kromatogramı.	194

Şekil 3.13. a) Kolon sıcaklığı-% 4×10^{-4} M CCl_3COOH ile ICRF, b)akış hızı-% 4×10^{-4} M CCl_3COOH ile ICRF, c) kolon sıcaklığı–akış hızı ile ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey grafikleri ve eş yükselti eğri haritaları (countour plots). (Response: Cevap → ICRF)	198
Şekil 3.14. Kalibrasyon numuneleri için 275.0 nm’de elde edilen kromatogramlar. Kromatogramlar üzerindeki (a) ve (b), sırasıyla DOR ve TIM bileşiklerinin alıkonma zamanlarını göstermektedir.	205
Şekil 3.15. DOR (a) ve TIM (b) bileşikleri için ticari göz damlası numulerine optimal kromatografik şartın uygulanması ile 275.0 nm’de elde edilen kromatogramlar.	213
Şekil 3.16. A) DOR (20 $\mu\text{g/mL}$), TIM (20 $\mu\text{g/mL}$) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.	219
Şekil 3.17. DOR ve TIM için PCR kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).	220
Şekil 3.18. PCR kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonları.	220
Şekil 3.19. A) DOR (20 $\mu\text{g/mL}$), TIM (20 $\mu\text{g/mL}$) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.	233
Şekil 3.20. DOR ve TIM için PLS kalibrasyonunda kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).	234
Şekil 3.21. PLS kalibrasyonunun kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonu.	234
Şekil 3.22. DOR ve TIM’in kalibrasyon setinin UV spektrumu (a), db10-SDD spektrumu (b) ve bior6.8-SDD spektrumu (c).	245

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Deney çizelgesi (genel birimlerde).	102
Çizelge 2.2. Deneysel tasarım (kodlanmış birimlerle).	103
Çizelge 2.3. Deneysel tasarım ve deneysel sonuçlar.	104
Çizelge 2.4. Deneysel tasarım ve deneysel sonuçlar.	108
Çizelge 2.5. Etkilerin çizelgesi.	109
Çizelge 2.6. Tam faktöriyel iki seviyeli tasarım ve bir yıldız tasarımdan ibaret üç faktör için merkezi bileşenli tasarım.	114
Çizelge 2.7. Üç faktör için Box-Behnken tasarımı.	117
Çizelge 2.8. Her tasarımın merkezinde üç tekrarlı Box-Behnken tasarımı için faktör sayıları ve deneysel noktalar.	118
Çizelge 2.9. Wavelets (dalgacıklar) dönüşüm yöntemleri	123
Çizelge 3.1. Tam Faktöriyel tasarımda kullanılan faktörlerin çalışma aralığı ve seviyeleri.	126
Çizelge 3.2. Tam faktöriyel tasarım ve ICRF değerleri.	128
Çizelge 3.3. İkinci dereceden polinomiyal model için istatistik t- ve F- testlerinin sonuçları.	130
Çizelge 3.4. Doğrusal regresyon analizi ve istatistik sonuçları.	136
Çizelge 3.5. BRI ve TIM sentetik karışımlarının analiz sonuçları.	140
Çizelge 3.6. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.	141
Çizelge 3.7. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	143
Çizelge 3.8. Sistem uygunluk parametreleri.	144
Çizelge 3.9. Ticari göz damlasındaki BRI ve TIM'ın UPLC ile yapılan deney sonuçları (Etiket değeri: BRI 2.0 mg/mL ve TIM 5.0 mg/mL).	147
Çizelge 3.10. BRI ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.	151
Çizelge 3.11. BRI ve TIM yapay karışımlarının analiz sonuçları.	155
Çizelge 3.12. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.	157
Çizelge 3.13. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	159
Çizelge 3.14. PCR yönteminin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçları. (Etiket değeri BRI 2.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).	161
Çizelge 3.15. BRI ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.	165
Çizelge 3.16. BRI ve TIM yapay karışımlarının analiz sonuçları.	169
Çizelge 3.17. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.	171
Çizelge 3.18. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	173

Çizelge 3.19. PLS yöntemlerinin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: BRI 2.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).	175
Çizelge 3.20. BRI ve TIM kalibrasyonu için mexh-CWT ve sym5-CWT yöntemlerinin regresyon analizi sonuçları.	180
Çizelge 3.21. Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin BRI-TIM ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları.	182
Çizelge 3.22. Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin gün içi ve günler arası analiz sonuçları.	184
Çizelge 3.23. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	186
Çizelge 3.24. Mexh-CWT ve Sym5-CWT yöntemlerinin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: BRI 2.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).	188
Çizelge 3.25. BRI-TIM karışımının kantitatif analizi için uygulanan yöntemlerin ANOVA testi.	190
Çizelge 3.26. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörlerin çalışma aralığı ve seviyeleri.	193
Çizelge 3.27. Box-Behnken tasarım ve ICRF değerleri.	195
Çizelge 3.28. İkinci dereceden polinomiyal model için istatistik t- ve F- testlerinin sonuçları.	197
Çizelge 3.29. Doğrusal regresyon analizi ve istatistik sonuçları.	203
Çizelge 3.30. DOR ve TIM sentetik karışımlarının analiz sonuçları.	207
Çizelge 3.31. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.	208
Çizelge 3.32. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	210
Çizelge 3.33. Sistem uygunluk parametreleri.	211
Çizelge 3.34. Ticari göz damlasındaki DOR ve TIM'in UPLC ile yapılan deney sonuçları. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).	214
Çizelge 3.35. DOR ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.	218
Çizelge 3.36. DOR ve TIM sentetik karışım çözeltilerinin analiz sonuçları.	222
Çizelge 3.37. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.	224
Çizelge 3.38. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	226
Çizelge 3.39. PCR yönteminin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).	228
Çizelge 3.40. DOR ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.	232
Çizelge 3.41. DOR ve TIM sentetik karışım çözeltilerinin analiz sonuçları.	236
Çizelge 3.42. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.	238
Çizelge 3.43. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	240
Çizelge 3.44. PLS yönteminin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).	242

Çizelge 3.45. BRI ve TIM kalibrasyonu için mexh-CWT ve sym5-CWT yöntemlerinin regresyon analizi sonuçları	247
Çizelge 3.46. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin DOR-TIM ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları	249
Çizelge 3.47. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin gün içi ve günler arası analiz sonuçları	251
Çizelge 3.48. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.	253
Çizelge 3.49. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).	255
Çizelge 3.50. DOR-TIM karışımının kantitatif analizi için uygulanan yöntemlerin ANOVA testi	257

1. GİRİŞ

İlaç endüstrisinde ilaçların geliştirilmesinde ve üretilmesinde formülasyon öncesi ve sonrası, kalite kontrol ve rutin analiz işlemleri, ilaç üretiminde kalite ve kalite güvenliği açısından son derece hayati öneme sahiptir. Bir ilacın kantitatif analizi ve kalite kontrolü için optimize ve valide edilmiş güvenilir analitik yöntemlere ihtiyaç vardır. Genel olarak ilaç analizlerinde spektrofotometrik, voltametrik, kapiler elektroforez ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography → HPLC) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle bu yöntemlerden HPLC tekniği ilaç analizlerinde referans ve karşılaştırma yöntemi olarak kullanılmaktadır. HPLC yönteminin ilaç analizlerinde tercih edilmesinin nedeni, formülasyonda yer alan yardımcı maddeler ve aktif bileşiklerin ayırımından sonra analizin gerçekleştirilmesinden dolayı yöntemin seçiciliğinin ve duyarlılığının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Yeni ilaç geliştirilmesi çalışmalarında yeni aday ilaç maddelerinin geliştirilmemesi nedeniyle, direnci artan hastalıklar ve çeşitleri için tek aktif bileşiğin tedavide kullanılması yerine, iki veya daha fazla aktif bileşiğin aynı formülasyon içerisinde kullanımıyla farmakolojik aktivitenin artırılması yoluna gidilmektedir. Bu durum, çok sayıda bileşen içeren ticari farmasötik preparatların üretimini azımsanamayacak ölçüde artmasına neden olmuştur. Dolayısıyla ilaç üretiminde formülasyon öncesi ve sonrası analiz işlemleri daha karmaşık hale gelmiştir. Kombine farmasötik preparatların, aktif bileşenlerin girişim yapan spektral bantlar vermesi nedeniyle doğrudan spektrofotometrik analizleri olanaklı değildir. Spektral girişimlerin varlığında türev spektrofotometri ve spektrum oranları türev spektrofotometri, ikili ve üçlü bileşen içeren kombine preparatların kantitatif analizleri için kullanılmaktadır. Ancak farmasötik preparatların aktif bileşikler dışında içerdiği yardımcı maddelerin de spektral girişim verdiği koşullarda özellikle türev spektrofotometri ve spektrum oranları türev spektrofotometri başarısız analiz sonuçları vermektedir. İki veya daha fazla bileşen içeren farmasötik dozaj formların analizinde

temel bileşen regresyon (principal component regression → PCR) ve kısmi en küçük kareler (partial least square → PLS) gibi kemometrik kalibrasyonlar kullanılmaktadır. Bu kemometrik kalibrasyon yöntemleri, farmasötik formülasyonlarda yardımcı maddelerin analiz üzerine etkisinin olduğu durumlarda başarılı sonuçlar vermediği pratik uygulamalarda görülmektedir.

Her zaman kombine ticari formülasyonların klasik HPLC ile analizlerinde başarılı sonuçlar alınması mümkün olmamaktadır veya istenen kromatografik ayırımın şartlarını bulmak, uzun ve bıkırtıcı çalışmalar gerektirmektedir. Bu da analiz maliyetini arttırmaktadır. Diğer taraftan, HPLC yöntemi, farmasötik ve diğer örneklerdeki bileşiklerin analizi için standart veya karşılaştırma yöntemi olarak kullanılmaktadır. İlaveten karmaşık ve pahalı bileşenlere sahip olan kromatografik yöntemler ve onların çizgili teknikleri olan sıvı kromatografisi kütle spektrofotometrisi (LC-MS) ve kalliper elektroforez kütle spektrofotometrisi (CE-MS) versiyonları, analiz için yüksek maliyet ve uygun ayırma şartlarını araştırmak için sıkıcı ve uzun süreçler gerektirmektedir.

Analitik kimyacılar, yukarıda bahsedilen yöntemlerin dezavantajları ve zorluklarıyla başa çıkabilmek ve analitik problemlerinin etkili kantitatif çözümü için yeni analitik tekniklere veya yöntemler geliştirmeye ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenlerle, analiz işlemlerinde yukarıdaki problemlerin çözümü için klasik analitik yöntemler, birçok matematiksel algoritma ile kombine olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda, klasik HPLC yönteminin dezavantajları nedeniyle, kromatografi cihazı üreten firmalar bu cihaz yerine yeni kolon teknolojisine dayanan aşırı yüksekbasınçlı sıvı kromatografisi (Ultra Pressure Liquid Chromatography → UPLC)

cihazını piyasaya sürdüler. Bu UPLC yöntemi ilaçların kromatografik analizlerinde kısmen hızlı ve maliyeti düşük analizlere olanak sağladı. Ancak bütün bu gelişmeler, ilaç analizlerinde uygun hareketli faz bileşiminin ve sabit faz koşullarının bulunmasına bir katkı sağlamadı. İlaç analizinde yöntem geliştirilmesi için kromatografik analiz işlemleriyle uğraşan araştırmacılar, klasik tek değişkenli optimizasyon stratejisiyle optimal kromatografik koşulları bulmak için çalışmaktadır. Bu tek değişkenli optimizasyon yaklaşımı, kromatografik yöntem geliştirilmesinde bir çok sakınca yaratmaktadır. Örneğin bu tek değişkenli optimizasyon işleminde hareketli faz akışı ve kolon sıcaklığı sabit tutulurken hareketli faz bileşimi değiştirilmektedir. Oysa burada optimal hareketli faz bileşiminin oranı saptanırken, hareketli faz bileşimi ile hareketli faz akışı ve kolon sıcaklığı arasındaki faktör etkileşimlerinin kromatografik cevap üzerine etkileri göz ardı edilmektedir. Bu durum, optimal kromatografik koşulların bulunmasında yanlış yorumlara neden olduğu gibi doğru optimal kromatografik koşullarında bulunmasında doğru kararlar verilmesini önlemektedir. Bu nedenle ilaç analizlerinde yeni kromatografik yöntem geliştirilmesinde doğru ve güvenilir optimal kromatografik şartları saptamak için kromatografik cevap üzerine etki eden bütün faktörler ve faktör etkileşimlerinin de dikkate alan deneysel tasarım ve optimizasyon tekniklerinin kullanılması vazgeçilmez kemometrik optimizasyon teknikleridir (Dinç ve ark., 2015). Deneysel tasarım ve optimizasyon yaklaşımının optimal kromatografik koşulların bulunmasında genellikle akış hızı, kolon sıcaklığı ve yürütücü faz bileşimindeki % tampon miktarı gibi faktörlere karşılık cevap faktörü olarak ayırma faktörü (R_s), alıkonma zamanı, kapasite faktörü, pik asimetrisi, kuyruklanma faktörü ve benzeri kullanılmaktadır. Bu yaklaşım, analiz edilen bileşiklerin bir kromatogram üzerinde maksimum ayırma sağlayacak şekilde kromatografik koşulların bulunmasını sağlamaktadır. Ancak bu durum analiz süresini uzatmaktadır. Kromatografik yöntem optimizasyon işlemlerinde yukarıda bahsedilen sakıncayı ortadan kaldırmak için cevap faktörü olarak ayırma faktörü yerine kromatografik cevap faktörü (Improved Chromatographic Response Function → ICRF) veya Derringer'in istenebilirlik fonksiyonu (Derringer's desirability function) kullanılmasıdır (Carle, 1972). Bu ICRF değişkeninin kullanılması optimal kromatografik şartların bulunmasında minimum

alıkonma zamanı içerisinde maksimum ayırmayı dengeleyen şartların bulunmasına olanak sağlamaktadır.

Bu doktora tezinin amacı; timolol maleat içeren ticari farmasötik preparatlardaki etkin maddelerin spektrofotometrik ve kromatografik ölçümlere dayalı kemometrik yöntemlerle miktar tayinleri için yeni yöntemlerin geliştirilmesidir. Bu doktora tezi çerçevesinde deneysel tasarım ve optimizasyon yönteminin temeli ve bazı cevap faktörlerinin matematiksel esasları ayrıntılı olarak incelendi ve sunuldu.

Türkiye ilaç piyasasında timolol maleat içeren 30 adet farmasötik preparat bulunmaktadır. Bunda da üç adeti timolol maleat içeren kombine ticari formülasyondur. Doktora tez çalışmasında Timolol maleat-Brimonidin Tartarat (TIM-BRI), Timolol maleat-Dorzolamid Hidroklorür (TIM-DOR) kombinasyonlarını içeren oftalmik ticari preparatlardaki aktif bileşenlerin kantitatif analizleri için analitik yöntemlerin geliştirilmesi hedeflendi. Bu kapsamda TIM-BRI ve TIM-DOR karışımlarını içeren kombine farmasötik preparatların kantitatif analizleri için spektrofotometrik ve kromatografik ölçümlere dayalı yeni yöntemler geliştirildi.

Bu çalışmada spektrofotometrik ölçümlere dayalı kemometrik PLS ve PCR kalibrasyon yöntemleriyle TIM-BRI ve TIM-DOR ikili karışımlarındaki aktif bileşiklerin kantitatif analizlerini hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın gerçekleştirildi. Kemometrik spektral analiz yöntemlerinin uygulamalarından sonra, TIM-BRI ve TIM-DOR kombinasyonlarını içeren göz damlası formundaki preparatlardan etkin maddelerin

analizi için yeni ters faz UPLC yöntemleri geliştirildi. Bu çalışma kapsamında TIM-BRI, TIM-DOR karışımlarını içeren oftalmik ticari preparatların kantitatif analizi için yeni geliştirilen UPLC yöntemlerinin optimal kromatografik koşullarının bulunmasında ICRF fonksiyonunu kullanan 3³ Tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarım modelleri kullanıldı.

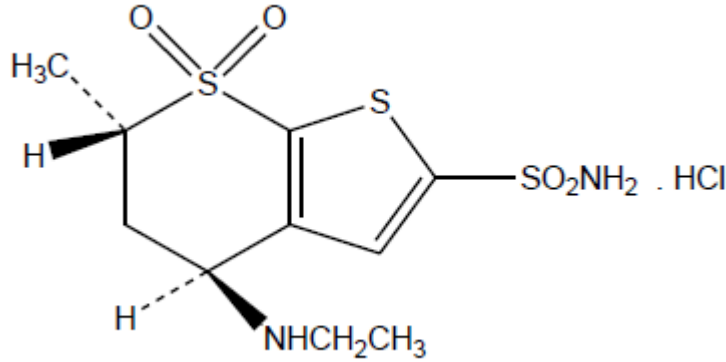
Geliştirilen yöntemler, doğruluk, gün içi ve günler arası çalışmalar, standart ekleme ve bağımsız test numunelerini analizleriyle valide edildi (Büker ve Dinç, 2016). Yöntemlerin ticari numunelere uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar varyans analizi (Analysis of variance→ANOVA) kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varıldı. Ayrıca geliştirilen yöntemler literatür yöntemleri ile de karşılaştırıldı.

Sonuç olarak iki farklı ticari oftalmik formülasyon içerisindeki aktif bileşiklerin eş zamanlı miktar tayinleri yeni, hızlı, ekonomik, güvenilir ve valide edilmiş kemometrik optimizasyona dayalı ters faz UPLC, çok değişkenli spektral PLS ve PCR kalibrasyon yöntemleri geliştirildi. Tez çalışmasında geliştirilen analitik yöntemler araştırma-geliştirme (Ar-Ge) laboratuvarlarında ve ilaç endüstrisinde TIM-BRI ve TIM-DOR preparatlarının analizleri için alternatif yöntemler olarak kullanılacaktır.

Ayrıca bu doktora tezi, TIM, BRI ve DOR bileşikleri üzerinde yapılacak çalışmalara kaynak olacaktır.

1.1 Dorzolamid Hidroklorür

1.1.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



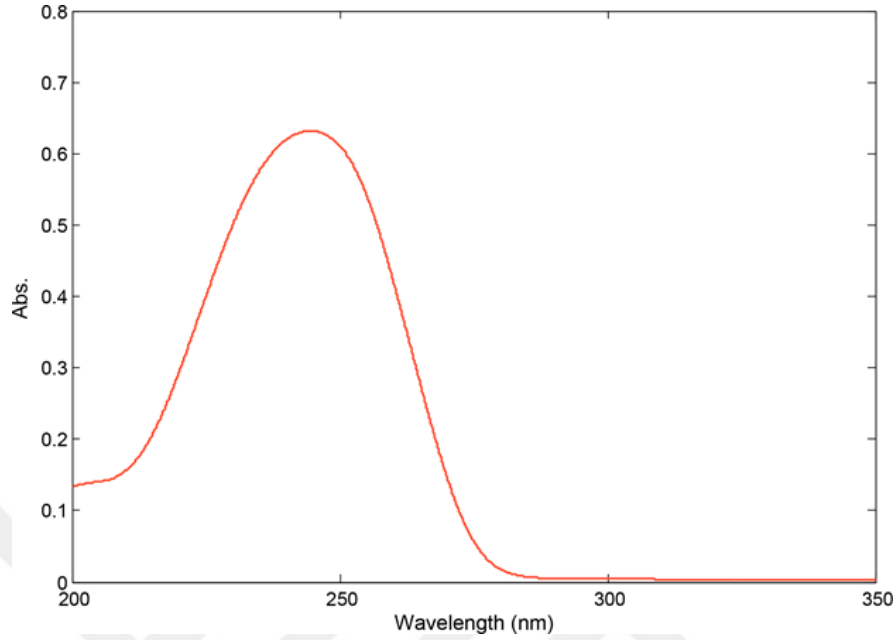
Şekil 1.1. Dorzolamid Hidroklorür'ün açık kimyasal yapısı.

$C_{10}H_{16}N_2O_4S_3 \cdot HCl$

Molekül ağırlığı: 360.91 g/mol

Kimyasal Adı: (4S-6S)-4-Etilamino-5,6-dihidro-6-metil-4H-tiyeno-[2,3-b]-
tiyopiran-2-sulfonamid 7,7 dioksit monohidroklorür

Dorzolamid Hidroklorür, beyaz/kirli beyaz renkte kristal tozdur. Suda,metanolde kolay çözünür. Eter, etil asetat, dimetilformamit vediklorometanda çözünmez. Sudaki çözünürlük profili ortamın pH'sı ile yakından ilgilidir. En uygun çözünürlük pH 5–5.8, en düşük çözünürlük pH 7-8 aralığındadır. Bu husus özellikle göze doğrudan uygulanan oftalmikçözelti formları için çok önemlidir. % 2'lik Dorzolamid Hidroklorür çözeltisinin pH 5-6 aralığında tutulmalıdır. Ortamın pH'sı 7-8 aralığında olduğunda etkin maddenin (bazın) çökmesi söz konusudur.



Şekil 1.2. Dorzolamid Hidroklorür'ün metanol içerisindeki 20 ppm'lik çözeltisinin UV Spektrumu.

1.1.2 Farmakolojik Özellikleri

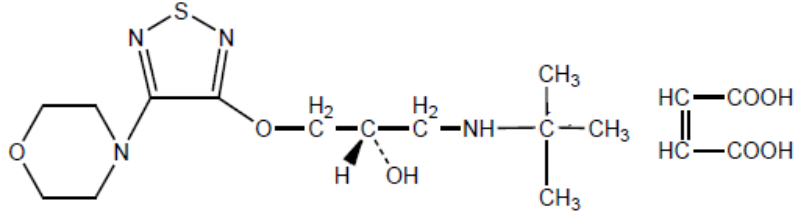
Dorzolamid Hidroklorür karbonik anhidraz enzim inhibitörüdür. Daha önceleri karbonik anhidraz inhibitörü olarak oral yoldan kullanılan ilaçlar (asetozolamid, etaksozolamid, metazolamid) intraoküler basıncı düşürmelerine rağmen enzimin ekstra oküler inhibisyonuna bağlı olarak tolere edilmeyen ciddi yan etkilere neden olmuşlardır. Bu nedenle yapılan lokal etkili yeni moleküllerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunların çoğu etkili olmakla beraber çözünürlükleri uygun değildir. 1987 yılında tedaviye giren Dorzolamid Hidroklorür hem çözünürlüğü hem de intraoküler basıncın düşmesinde gösterdiği etkinlik açısından kullanılan diğer sulfamid karbonik anhidraz enzim inhibitörlerine üstünlük sağlamıştır. Karbonik anhidraz enzimi 4 adet izoenzim içerir. Dorzolamid Hidroklorür güçlü bir izoenzim II ve IV ve zayıf izoenzim I inhibitörüdür. İzoenzim II'nin hümör aköz sekresyonunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Orzalesi ve ark.'ları tarafından 2000 yılında, glokom tedavisinde Timolol Maleat-Dorzolamid Hidroklorür kombinasyonunun topikal çözeltileri yaygın biçimde kullanılmakta olduğu ve her iki bileşiğin de aköz hümör salgılanmasını azaltarak yükselmiş olan intraoküler basıncı düşürdüğü ifade edilmiştir. Bu etki farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. Timolol Maleat belirgin intrinsik sempatomimetik etkisi ile doğrudan miyokardı deprese etmeyen non-selektif bir β -adrenerjik reseptör blokörüdür. Dorzolamid Hidroklorür daha önce de ifade edildiği gibi, insan karbonik anhidraz enziminin güçlü bir inhibitörüdür. Gözün siliyer prosesindeki karbonik anhidraz II'nin inhibisyonu, sodyum ve sıvı transportunda bir azalmaya neden olarak bikarbonat iyonu oluşmasını yavaşlatır ve aköz hümör salgılanmasını azaltır. Bu iki etkin maddenin kombine etkileri, her bileşiğin tek başına ayrı ayrı uygulandığı durumlarla karşılaştırıldığında intraoküler basınçta ek bir azalmaya neden olmaktadır (Orzalesi ve ark. 2000).

Topikal olarak uygulanan bu ikili kombinasyonda etkin maddeler sistemik olarak absorbe olabildiği, özellikle timolol maleata bağlı olarak β -blokörlerin sistemik uygulamaları sırasında olumsuzluklar yaşanabildiği ve bu nedenle kalp yetmezliği olan hastalarda dikkatli kullanılmalısı gerektiği prospektüslerde yer almaktadır. Dorzolamid Hidroklorür'de topikal uygulamada, karbonik anhidraz enzim-II'ye selektif olarak bağlanarak eritrositlerde birikirken, plazmada son derece düşük serbest ilaç konsantrasyonlarında bulunduğu bahsedilmiştir. Dorzolamid Hidroklorür'ün ana metaboliti dezetil dorzolamittir. Bu metabolit de eritrositlerde birikmekte, özellikle karbonik anhidraz-I'e bağlanmaktadır.

1.2 Timolol Maleat

1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



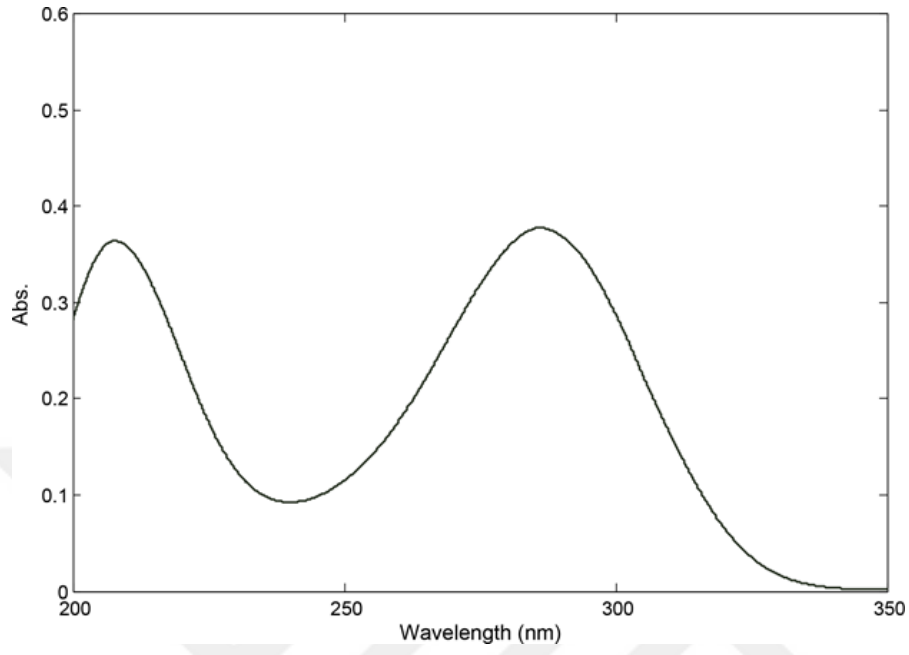
Şekil 1.3. Timolol Maleat'ın açık kimyasal yapısı.

$C_{13}H_{24}N_4O_3S.C_4H_4O_4$

Molekül ağırlığı: 432.5 g/mol

Kimyasal Adı: (-)-1-(tert-bütilamino)-3-[(4-morfolin-1,2,5-tiyadiazol-3-il)oksi]-2-propanol maleate (1:1) (tuzu)

Timolol maleat beyaz, kristal yapılı tozudur. Oda ısısında suda, etanolde ve metanolde kolay; kloroform, propilen glikolde oldukça zor çözünür. Eter ve sikloheksanda pratik olarak çözünmez. Timolol Maleat'ın sulu çözeltisinin pH'ı 4 civarındadır; sulu çözeltileri oda ısısında oldukça dayanıklıdır. Uygun koşullarda saklandığında, oda ısısında beş yıl herhangi bir bozunmaya uğramaz. Timolol maleat yüksek ısıda ve yoğun UV ışınlarına maruz bırakılırsa degradasyona uğrar. Yapısında bir asimetrik karbon içerir. Levo izomeri tedavide kullanılmaktadır.



Şekil 1.4. Timolol Maleat'ın metanol içerisindeki 24 ppm'lik çözeltisinin UV Spektrumu.

1.2.2. Farmakolojik Özellikleri

Singh ve Zimmerman'nın 1995 yılında yaptığı bir çalışmada, timolol maleat'ın selektif beta bloker olduğu, % 0.25- 0.50 arası konsantrasyonlarda kullanıldığı, etkisinin 2 saatte maksimuma ulaştığı ve 12-24 saat devam edeceği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, günde iki kez veya tek doz kullanılan formlarının bulunduğu, tedaviye başlandığında ise timolol ön kamera sıvısı yapımını % 40 azalttığına değinilmiştir. Daha sonra bu etkisinin bir miktar azalabileceği belirtilmiştir (Singh ve Zimmerman, 1995). Orzalesi ve ark.'larının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada, Timolol monoterapisi ya da 2. ilaç olarak timolol verildiğinde nokturnal GİB'ını düşürmediği, oküler ve sistemik bazı yan etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Orzalesi ve ark., 2000). Kitazawa ve ark.'nın 1996 yılında yaptığı bir çalışmada, özellikle yaşlı, kardiyovasküler problemi olan olgularda dikkatli kullanılması gerektiğinden bahsedilmiştir (Kitazawa ve ark., 1996).

Singh ve Zimmerman'nın 1995 yılında yaptığı bir çalışmada, Timolol Maleat oral yoldan kullanıldığında 1-2 saat içinde plazma konsantrasyonu en yüksek düzeye çıktığı, İlacın ortalama yarı ömrü 2.5 saat civarında olduğu, yarı ömür süresi verilen ilacın konsantrasyonu ile bağımlı değildirolmadığı, egzersizle indüklenmiş taşikardinin maksimum süpresyonu timolol maleatın plazmada 27-30 ng/mL ulaştığı düzeyde sağlandığı, ilacın besinlerle beraber oral yoldan kullanılması ilacın aktivitesini etkilemediği, timolol maleat'ın oftalmik çözelti olarak uygulandığında absorpsiyonu oldukça hızlı olduğu, uygulandıktan sonra yaklaşık 3 saat içinde intraoküler basıncı düşürdüğü belirtilmiştir. İki göze % 0.5'lik timolol maleat çözeltisinden ikişer damla tatbik edildiğinde sistemik absorpsiyon nedeni ile plazmada 0.5–1.5 saat içinde timolol konsantrasyonu 2–5 ng/ml düzeyine ulaştığı ve önemli olmayan ama istatistiksel olarak dikkate değer kardiyolojik değişikliklere neden olduğu ifade edilmiştir.

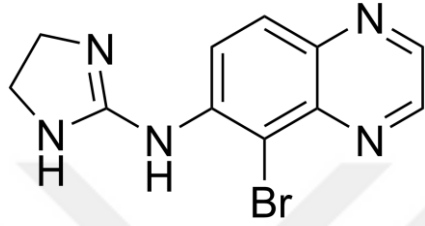
Orzalesi ve ark.'ları tarafından 2000 yılında, anlamlı intrensek semptomimetik, direkt miyokard depresan ve membran stabilizan (lokal anestezi) etkisi olmadığı, timolol maleat topikal uygulanımla glokom eşlik etsin veya etmesin hem yüksek hem de normal göz içi basıncını düşürerek, böylece görme sinirinin zedelenmesini ve dolayısıyla görme alanı kaybını önlediği belirtilmiştir. Yüksek intraoküler basınçlı hastalarda göz içi basıncı'nı yaklaşık %25-33 oranında düşürdüğü, timolol maleat'ın etkisi yarım saatte görüldüğü, doruk düzeyine 1-2 saatte ulaştığı ve 24 saat kadar devam edebildiği belirtilmiştir. Devamlı kullanımın göz içi basıncını sürekli düşük tuttuğu, Yapılan aynı çalışmada timolol maleat'ın asıl etkisini göz içi sıvısının oluşumunu azaltarak göstermekle beraber, göz içi sıvısının dışarı akışını da bir miktar kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Miyotiklerin aksine gözün akomodasyonuna ve pupillanın büyüklüğüne etkisi olmadığından, görme keskinliğinde değişiklik yapmaz, görme bulanıklığı ve gece körlüğüne neden olmadığı belirtilmiştir. Pupillayı daraltmadığından kataraktlı kişilerde, merkezinde kesifleşmiş olan göz merceğine bağlı çevresel görme alanı daralmasına neden olmadığı sürdürülen çok merkezli kontrollü çalışmalarda, Timolol maleat damlanın göz içi basıncın pilokarpin ve epinefrin çözeltilerinden daha güçlü bir şekilde düşürdüğü saptanmıştır.

Farmakokinetik

Kitazawa ve ark.'nın 1996 yılındaki çalışmasında, % 0.50 timolol maleat'ın göze günde iki kez topikal olarak uygulanmasını takiben ortalama pik plazma konsantrasyonu sabah ve öğleden sonra sırasıyla 0.46 veya 0.35 ng/mL olduğunu belirtmişlerdir.

1.3. Brimonidin Tartarat

1.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



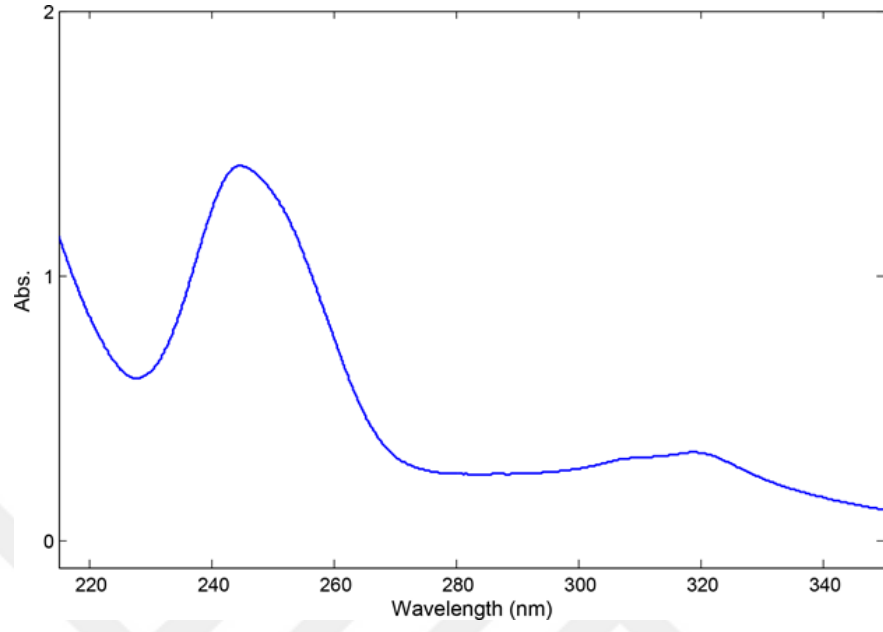
Şekil 1.5. Brimonidin Tartarat'ın açık kimyasal yapısı.

$C_{15}H_{16}BrN_5O_6$

Molekül Ağırlığı: 442.22 g/mol

Kimyasal adı: 5-bromo-6-(2-imidazolidinylideneamino) kuinoksalin L-tartrat

Brimonidin tartarat suda çözünebilen kirli beyazdan mat sarı renge doğru değişen toz yapıdadır.



Şekil 1.6. Brimonidin tartarat'ın metanol içerisindeki 15 ppm'lik çözeltisinin UV Spektrumu.

1.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Tracqui ve ark.'ları 1988 yılında, brimonidin tartarat'ın, kısmen selektif alfa-2 agonist olduğu, uzun süre kullanımda daha aztaşiflaksiye neden olduğu, açık açılı glokom veya oküler hipertansiyonu olan hastalarda artmış intraoküler basıncın düşürülmesinde endike olduğu belirtilmiştir.

Singh ve zimmerman'nın 1995 yılındaki bir çalışmasında, damlatıldıktan iki saat sonra etkisi ortaya çıktığı, vazokonstriksiyon etkisi nedeniyle iris sfinkter iskemisine neden olarak miyotik ilaçların etkisini azaltabileceğinden bahsedilmiştir. (Singh ve zimmerman, 1995). Farmakoterapötik grup: Oftalmik - glokom tedavisinde kullanılan sempatomimetikler ATC kodu: S01EA05

Etki mekanizması: Leskea ve ark.'nın 2004 yılındaki bir çalışmasında, brimonidin tartarat, uygulamadan 2 saat sonra beliren pik oküler hipotansif etkili oldukça selektif bir alfa-2 adrenerjik reseptör agonist olduğu, hayvanlarda ve insanlarda yapılan florofotometrik çalışmalarda, brimonidin tartaratın hümör aköz yapımını azaltıp, uveoskleral yoldan atılımını artırarak çift etki mekanizması olduğunu sürmekte olduğu, brimonidin tartaratın kardiyovasküler veya pulmoner parametreleri minimal şekilde etkileyerek göziçi basıncını düşürme etkisi olduğu ve Brimonidin'in insanda metabolizasyonu başlıca karaciğerde gerçekleştiği belirtilmiştir (Leskea ve ark.'nın 2004)

Eliminasyon; Leskea ve ark.'nın 2004 yılındaki bir çalışmasında, üriner boşaltım, brimonidin ve metabolitlerinin başlıca eliminasyon yolu olduğu, Oral uygulanan radyoaktif brimonidin dozunun yaklaşık % 87'si 120 saat içinde elimine edilmiştir, ve %74'ü idrarda bulunduğu belirtilmiştir (Leskea ve ark.'nın 2004)

Prospektüs bilgileri arasında brimonidinin özellikleri aşağıdaki gibi belirtilmiştir. Brimonidin, alfa-1 adrenoseptörle karşılaştırıldığında alfa-2-adrenoseptör için 1000 kat daha selektif olan bir alfa-2 adrenerjik reseptör agonisti olduğu, nu selektivite, midriazis olmamasına ve insan retinal ksenogreftler ile ilişkili olarak mikrodamarlarda vazokonstriksiyon yokluğuna neden olduğu, Brimonidin tartaratın topikal olarak uygulanması, insanda göz içi basıncını (GİB) düşürür ve kardiyovasküler veya pulmoner parametreler üzerinde etkisi minimal düzeyde olduğu ve Advers etki göstermeyen bronşiyal astımlı hastalar için sınırlı sayıda veri olduğu belirtilmektedir.

Brimonidin'in etkisi hızlı başlar ve pik oküler hipotansif etki doz uygulamasından 2 saat sonra görülür. Bir yıl süreli iki çalışmada, Brimonidin göz içi basıncını yaklaşık olarak ortalama 4-6 mmHg düşürmüştür. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan florofotometrik çalışmalar, brimonidin tartaratın ikili bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Brimonidin'in göz içi basıncını aköz humor oluşumunu azaltarak ve uveoskleral akışı kolaylaştırarak düşürebileceği düşünülmektedir.

Klinik çalışmalar, Brimonidin'in topikal beta-blokerlerle birlikte etkili olduğunu göstermektedir. Daha kısa süreli çalışmalar da Brimonidin'in travoprost (6 hafta) ve latanoprost (3 ay) ile kombine edildiğinde klinik olarak önemli bir aditif etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Farmakokinetik özellikler

Emilim:

%0.2'lik solüsyonun günde iki kere 10 gün süre ile göze uygulanmasından sonra plazma konsantrasyonları düşük saptanmıştır (ortalama C_{max} 0.06 ng/ml). Çoklu uygulama (günde 2 kere 10 gün süre ile) sonrasında kanda hafif bir birikme olmuştur. Kararlı hal plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin altında kalan alan 12 saat sonra

(EEA0-12 saat) 0.31 ng. saat/ml olarak saptanmıştır (ilk dozdan sonra 0.23 ng.saat /ml). İnsanda topikal doz uygulamasından sonra sistemik dolaşımında ortalama yarı ömür yaklaşık 3 saat olarak saptanmıştır.

Dağılım:

İnsanda topikal doz uygulamasından sonra brimonidin plazma proteinlerine yaklaşık olarak %29 oranında bağlanır. Brimonidin göz dokularında melanine reversibl olarak bağlanır (in vitro ve in vivo olarak). Göze uygulanmasından 2 hafta sonra brimonidinin iris, silier cisim ve koroid-retinadaki konsantrasyonları, tek doz sonrası ile karşılaştırıldığında 3-17 kat daha yüksek olarak bulunmuştur. Melanin yokluğunda birikme oluşmaz. İnsanda melanine bağlanmanın önemi belirsizdir. Ancak, 1 yıla kadar Brimonidin'le tedavi edilen hastalarda, gözlerin biyomikroskopik muayenesinde anlamlı oküler advers reaksiyon saptanmamıştır. Ayrıca, önerilen brimonidin tartarat dozunun yaklaşık olarak 4 katının verildiği maymunlarda yapılan 1 yıllık bir oküler güvenlik çalışmasında, anlamlı oküler toksisite saptanmamıştır.

Biyotransformasyon:

Brimonidinin insanda metabolizasyonu başlıca karaciğerde gerçekleşir.

Eliminasyon:

İnsanda oral uygulamayı takiben brimonidin iyi emilir ve hızla elimine edilir. Dozun büyük bölümü (yaklaşık olarak %75'i) 5 gün içinde idrarla metabolit olarak atılmıştır. İdrarda değişmemiş ilaç saptanmamıştır. Hayvan ve insan karaciğeri kullanan in vitro çalışmalar, metabolizmanın büyük ölçüde aldehid oksidaz ve sitokrom P450'e bağlı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, sistemik eliminasyon primer olarak karaciğer metabolizmasıdır.

Glokom ve Tedavisinde Kullanılan İlaçlar;

Leskea ve ark.'nın 2004 yılındaki bir çalışmasında, Glokom, ilerleyici görme alanı kayıplarına sebep olan, optik sinir basındailerleyici hasar ve retina gangliyon hücrelerinde dejenerasyona sebep olan kronik bir optik nöropatidir olarak tanımlanmıştır. Göz içi basınç (GİB) yüksekliği, glokom için bilinen ve kontrol edilebilen en önemli risk faktörüdür (Leskea ve ark., 2004).

Yanoff ve Duker, 2008; Bengisu, 1998; Hoskins ve Kass, 1989 çalışmalarında, Glokomun, yelpazesi çok geniş bir hastalık grubu olduğu ve bu konu hakkında pek çok farklı sınıflandırmalar bulunduğu belirtilmiştir. İridokorneal açının durumuna göre açık açılı ya da kapalı açılı, GİB yüksekliğinin sebeplerine bağlı olarak primer ya da sekonder, glokomun başlangıç zamanına göre de konjenital, çocukluk çağı ya da erişkin glokomu olarak sınıflandırılabilceği vurgulanmıştır (Yanoff ve Duker, 2008; Bengisu, 1998; Hoskins ve Kass, 1989).

Glokomda Tıbbi Tedavi;

Fechtner ve Weinreb'in 1994 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, glokom tedavisinin amacı GİB'i düşürerek, görme alanı kaybı ve optik sinir başı hasarının önüne geçmekte olduğu belirtilmiştir. Tıbbi tedavi ile ilerleyici hasar büyük oranda önlenirse de bazı olgularda görme alanı kaybı ve optik sinir başı hasarı progresyon gösterdiğinden bahsedilmiştir (Fechtner ve Weinreb, 1994).

Mao ve ark.'ları tarafından 1991 yılındaki bir çalışmada, yetersiz tedavi gören hastalarda yıllık görme alanı kaybı yüksekken, bu kayıp göz içi basıncı iyi kontrol edilen hastalarda daha düşük olduğu fark edilmiştir. Shields ve ark., GİB 16 mmHg'nin altında olan hastalarda görme alanında kötüleşme saptamadıklarını, GİB 22 mmHg'nin üzerindeki hastalarda görme alanında kötüleşme olduğunu ve GİB 17- 21 mmHg arasında olan olgularda ise %50 oranında kötüleşme olduğunu bildirmişlerdir (Gupta, 2012). Tıbbi tedaviyle oküler hipertansiyonda %20'lik, normal basınçlı glokomda %40'lık bir GİB düşüşü kabul edilebilirdir (Mao ve ark., 1991)

Glokom tedavisinde kullanılan ilaçlar:

- Parasempatomimetik ilaçlar (Kolinergik ilaçlar)
- Beta blokerler
- Adrenergik reseptör agonistleri
- Prostaglandin analogları
- Karbonik anhidraz inhibitörleri
- Hiperozmotik ilaçlar

Parasempatomimetik İlaçlar;

Gunalp'ın 1992 yılında yaptığı çalışmada, parasempatomimetik ilaçlar glokom tedavisinde kullanılan en eski ilaçlardan olduğu, asetilkolin benzeri etki gösterdikleri (kolinerjik ilaçlar), etki mekanizmasının, siliyer kastaki muskarinik reseptörleri uyarak miyozis yapmak, skleral mahmuzun arkaya çekilmesi ve trabeküler ağın açılmasını sağlayarak trabeküler dışa akım artırdıklarından bahsetmiştir. Bu ilaçlar, direkt ve indirekt etkili olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Gunalp, 1992; Nardin ve Zimmerman, 1996, s. 1399-1408).

1-Direkt etkili parasempatomimetik ilaçlar:

Muskarinik reseptörleri direkt uyarırlar. Pilokarpin, karbakol, aseklidin ve asetilkolin bu grupta yer alır. En çok kullanılan parasempatomimetik ilaç pilokarpindir. Pilokarpinin, jel, membran salınım formları ve %2-4'lük damla formları piyasada bulunmaktadır.

2-İndirekt etkili parasempatomimetikler:

Kolin esteraz enzimini inhibe ederek asetilkolin miktarını artırırılar dolayısıyla kolinerjik etkiyi artırırılar. Eserin, echotiopate bu gruba örnek ilaçlardır. Uzun etkili ve güçlü ilaçlardır. Yan etkilerinin fazla olmasından dolayı glokom tedavisinde fazla kullanılmazlar.

Beta Blokerler;

Glokom tedavisinde, 1967 yılından beri kullanılan ilaçlardır. Kayaalp, 1985 tarafından, siliyer cismin pigmentsiz epitelindeki beta-2 reseptörlerini bloke ederek etki ettikleri düşünülmektedir. Beta blokerler GİB'ını %18-35 düşürdükleri, Beta blokerlerin çocuklarda kullanılabileceği ve kesildikten 4 hafta sonraya kadar etkilerinin sürdüğü belirtilmiştir.

(Kayaalp, 1985).

1- Nonselektif Beta Blokerler:

Genellikle Beta-1 ve beta-2 reseptörlerini bloke ederler. Örnek olarak; timolol, levabunolol, metipranolol verilebilir.

2- Selektif Beta Blokerler:

Sadece beta-1 reseptörleri bloke ederler. Betaksolol örnek olarak verilebilir.

3- İntrinsik Sempatomimetik Aktiviteli Beta Blokerler:

Bu ilaçlar reseptörleri bloke ederken minimal uyarıya yol açarlar. Yan etkileri daha azdır. Carteolol bu gruba örnektir.

Adrenerjik Reseptör Agonistleri;

Fechtner ve Weinreb, 1994 yılındaki bir çalışmada, epinefrin, apraklonidin, dipivefrine gibi ilaçlar bu grupta bulunmakta olduğu, aproklonidin ve brimonidin, en çok kullanılan madeler olduğu, alfa ve beta adrenerjik reseptörleri uyararak etki ettikleri ve hem ön kamera sıvısının yapımını azaltarak hemde dışa akımı artırarak GİB'ını düşürdüklerinden bahsetmişlerdir (Fechtner ve Weinreb, 1994).

Prostaglandin Analogları;

Cracknell ve Grierson, 2009; Lindsey ve ark., 1997 yılında, prostaglandinlerin (PG), gözde konjonktiva, silier cisim, iris ve trabeküler dokuda üretilirler ve hücre dışı lokal hormonlar olarak görev yaptıkları, yüksek konsantrasyonlarda PG'ler GİB'ını yükseltebilir ve gözde inflamasyona neden olabilecekleri, tam ters etki olarak da düşük dozlarda aközün uveoskleral dışa akımını arttırdıkları ve GİB'ını düşürdüklerinden bahsetmişlerdir. Bu dışa akımın mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber, silier kas gevşemesi ve silier kas ekstrasellüler matriksindeki yeniden düzenlenme (remodelizasyon) üzerinde durulmaktadır (Cracknell ve Grierson, 2009; Lindsey ve ark., 1997).

Hylton ve Robin'nin 2003 yılındaki çalışmasında, kullanım kolaylığı ve tek doz kullanılması, yaşam kalitesini çok fazla etkilememeleri nedeniyle PG'ler monoterapide en çok kullanılan ajanlar olduğu, GİB'ında %25-35 oranında düşüş sağladıkları, diurnal GİB değerlerini daha etkin kontrol altında tuttukları ve monoterapide etkinliklerinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Prostaglandinlerle tedavide başarısızlık, GİB'nda %20'den daha az azalma olarak kabul edildiği ve bu başarısızlık da %15-20 oranında görüldüğü,

yeterli GİB düşüşü sağlanamazsa diğer gruptaki ajanlar tedaviye eklenmeden önce diğer prostaglandinler denenmesi gerektiği belirtilmiştir (Hylton ve Robin, 2003).

Turaçlı, 2003 ve Bito, 1989 yılındaki çalışmada, klinik kullanımda olan prostaglandinler arasında latanoprost (1992), unoprostone (1993), bimatoprost (1997) ve travoprost (1999) ve tafluprostun yer aldığı belirtilmiştir (Turaçlı, 2003; Bito, 1989).

Karbonik Anhidraz İnhibitörleri (KAİ);

Bito'nun 1989 yılında yaptığı çalışmada, karbonik anhidraz inhibitörlerinin GİB'ını düşürücü etkisi olduğu, bu etkinin aköz hümör yapımını azaltması yoluyla olduğu, sistemik verildiğinde yan etkilerinin fazla olması bu ilaçların kullanımını sınırladığından, KAİ'lerin lokal olarak da kullanılabileceği belirtilerek Dorzolamid ve brinzolamid lokal kullanılan KAİ'lere örnek olarak verilmiştir.

Hiperozmotikler;

Khosla ve ark.'larının 1981 yılındaki çalışmasında, hiperozmotikler, plazma ozmolaritesini yükselterek retina ve üveada damar yatağında ve vitreusta bulunan suyun sistemik dolaşıma geçmesini sağladıklarını, bu işlemin ozmotik denge sağlanana kadar devam ettiğini ayrıca hipotalamustaki ozmoreseptörlerin uyarılması ile ön kamera sıvısı yapımı da azaldığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, hiperozmotiklerin intravenöz kullanımında kan-aköz bariyerinde ve siliyercismin pigmentsiz epitelinde harabiyete neden olduğu sanılmaktadır. Gliserol % 50'lik solüsyonlar şeklinde 1,5-5 ml/kg/gün dozunda per oral kullanılacağı, otuz dakikada etkisi başlayıp, 2-3 saat kadar etkisi devam

edeceği, diabetiklerde kullanımının sakıncalı olduğu belirtilmiştir. İsosorbide % 45'lik solüsyonları 1.5-4 mg/kg dozunda per oral kullanılır. Diabetiklerde kullanılabilir. % 20'lik Mannitol, bu grup içerisinde en çok tercih edilen ilaçtır. 7,5-10 mL/kg veya 1.5-2 gr/kg dozunda intravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. Etkisi 15-30 dakikada başlar, 60 dakikada maksimuma ulaşır ve 6 saatte sona erer. Metabolize edilmeden idrarla atılır. En önemli yan etkisi dehidratasyondur (Khosla ve ark., 1981).



1.4. Timolol Maleat, Dorzolamid Hidroklorür ve Brimonidin Tartarat'ın Kantitatif Analizi için Uygulanan Analitik Yöntemler

1.4.1. Timolol Maleat Miktar Tayini için Uygulanan Analiz Yöntemleri

1.4.1.1. Spektrofotometrik Yöntem

Abdel-Hay ve ark.'ları yaptıkları çalışmada Amilorid hidroklorür (AML), hidroklorotiyazid (HCT) ve timolol maleat (TIM) içeren üçlü bileşenli bir karışımın kantitatif analizi için iki farklı spektrofotometrik yöntem uygulamışlardır. Ancak AML'in karışımdaki miktarını bulmak için 365 nm'deki doğrudan absorbans ölçümü yöntemini de kullanmışlardır. Çalışmada iki farklı spektrofotometrik yöntemler; türev spektrofotometri ve spektrum oranları türev spektrofotometridir. Farmasötik preparat içerisindeki bileşenlerin tayinleri için uygulanan türev spektrofotometri (D) ve spektrum oranları türev spektrofotometri (DD) yöntemleri ile $\Delta\lambda$ ve çalışma aralıkları değerleri aşağıdaki çizelgede yerden kazanmak için özetlenmiştir.

Analit	Yöntem	Dalga Boyu (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Çalışma Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)
AMD	D ¹	385.0	6	1-15
	DD ¹	299.4	4	
	DD ²	311.0	6	
HCT	D ¹	265.0	6	2-25
	DD ¹	264.2		
	DD ²	290.0		
TIM	D ¹	315.4	8	3-20
	DD ¹	289.8	6	1-20
	DD ²	314.8		

Çalışmada sıfır kesim türev yöntemlerinin ve spektrum oranları türev yöntemlerinin analitik validasyon u için yapay karışımların analizi ile yüzde geri kazanım ile kesinlik ve doğruluk çalışmaları yapıldığı gözlenmiştir. Yöntemler validasyon işleminden sonra ticari farmasötik preparattaki aktif bileşenlerin (AML, HCT ve TIM) analizine uygulandığında sonuçlar AML için % 99.6-100.8, HCT için % 99.3-100.5 ve TIM için % 99.8-101.3 arasında bulunmuştur. Sonuçları karşılaştırmak için ANOVA testi uygulanmıştır. Test işleminde sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı ortaya konmuştur. (Abdel-Hay ve ark., 2008).

Mohammedi ve ark.'nın 2011 yılında yaptıkları çalışmada, timolol maleatın miktar tayinini UV-spektrofotometresini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca fizikokimyasal karakterizasyonunu da yapmışlardır. Fizikokimyasal karakterizasyon çalışması sonucunda erime noktasının 197 C°, çözünürlüğünün en fazla pH 4> ultra saf su > pH 7.4 > pH 8 > metanol olduğunu bulmuşlardır. Timolol maleatın saf sudaki çözeltisinin UV-spektrofotometresindeki en yüksek absorbans değerini 295 nm'de alarak miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Timolol maleat'ın konsantrasyon aralığını 2.00-10.00 µg/mL aralığında hazırlamışlardır. Kalibrasyon denkleminde göre korelasyon katsayısı 0.9999 olarak bulunmuştu. LOQ değeri 1.00 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Yöntem günüçi, günler arası ve LOQ değerlerine göre valide edilmiştir. Timolol'ün UV spektrofotometrik analiz yöntemindekianalitık parametreler yöntemin kolay, kesin ve tekraredilebilir olduğunu göstermiştir (Mohammedi ve ark., 2011)

1.4.1.2. Kromatografik Yöntem

Mazzo'nun 1984 yılında yaptığı çalışmada, maleik asit ve timolol maleatın eş zamanlı HPLC ile tayininde her iki maddenin de tayinini ters faz kolon kullanarak ve gradient sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Kullandıkları yöntemin konsantrasyon aralığında seçici, kesin, doğrusal olduğu bilinen derişimlerdeki numunelerin kontrol edilmesiyle doğrulanmışlardır. Kullandıkları bu yöntemin timolol maleat içeren ilaç formülasyonlarının in-vivo ve in-vitro değerlendirme sonuçlarına maleik asit ve timolol maleatın miktar tayinlerine uygulanabileceğinden bahsetmişlerdir (Mazzo, 1984).

Lee ve ark.'ları, yaptıkları bir araştırmada atık sulardaki β -bloker ve β 2-agonistlerin miktar tayini için katı faz ekstraksiyon ile LC-MS/MS kullanımına dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir. İlaç maddelerinin ekstraksiyon işleminde adsorban olarak katyon reçine kullanmışlardır. Kullanmış oldukları 12 β -blokerlerin içinde timolol maleat da bulunmaktadır. Matris etkisinden kurtulabilmek için ön ayırma işlemi kullandıktan sonra elde ettikleri ekstrakttan bileşikleri LC-MS/MS ile tayin etmişlerdir. Ancak katı faz ekstraksiyonuna dayalı ön ayırma işleminden dolayı geri kazanım değerleri düşük çıkmıştır. 12 β -blokerin 500 ve 50 ng/L seviyesindeki geri kazanım değerlerinin % 85'ten iyi çıktığını, standart sapmanın % 3 ve % 7 olduğunu hesaplamışlardır. Yöntemin LOD değeri 6 ile 11 ng/L arasında değişmektedir. Timolol'ün LC-MS/MS yöntemindeki alıkonma zamanı 17.02 dak. olarak bulunmuştur. Atık numunelerdeki β -bloker ve β 2-agonistlerin miktar tayini için LC-MS/MS yönteminin hassas olduğunu belirtmişlerdir (Lee ve ark., 2007).

Rele ve ark.'ları, bir farmasötik dozaj formdaki latanoprost (LAT) ve timolol maleat (TIM)'in kantitatif analizi için metil paraben'i internal standart olarak kullanarak basit, hızlı ve kesinliği yüksek bir ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu ilaç maddelerinin kromatografik ayrımı, su içerisinde % 0.05 (v/v) trifloroasetik asit ve asetonitril içerisinde % 0.05 trifloroasetik asit'in 40:60 (v/v) karışımını içeren mobil faz ve Waters Symmetry C₁₈ kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) sabit faz olarak kullanıldığında ve 1 mL/dak. Akış hızı ve 210 nm'deki UV absorbans ölçümüyle gerçekleştirilmiştir. Yöntemin uygulanmasında çalışma aralığı TIM için 250-750 µg/mL ve LAT için 2.5-7.5 µg/mL olarak verilmiştir (Rele ve ark., 2011).

Nasir ve ark.'nın 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada, göz sıvısı örneklerinde, insan plazma örnekleri ve ticari preparatlardaki timolol maleat, rosuvastatin ve diklofenak sodyumun eş zamanlı analizini naproksen sodyum internal standart kullanılarak HPLC ile yapmışlardır. Çalışmada BDS C₁₈ (250mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon, yürütücü faz olarak % 0,2 trietil amin ve asetonitril (40:60, v/v) pH'ı 2.75'e % 85'lik fosforik asit ile ayarlayarak kullanmışlardır. Kolon sıcaklığı 45 C° ve akış hızı 1 mL/dak. Olarak ayarlanmıştır. Göz sıvısı ve insan plazma örnekleri için proteinler metanolla giderildikten sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulamışlardır. İnsan plazma örneklerindeki geri kazanım değerleri timolol, rsovastatin ve diklofenak sodyum için sırasıyla % 98.72, 96.04 ve 95.14 olarak, göz sıvısı örneklerinde ise timolol ve diklofenak sodyum için sırasıyla % 94.99 ve 98.23 olarak hesaplanmıştır. Timolol maleat, rosuvastatin ve diklofenak sodyum için LOD değerleri sırasıyla 0.800, 0.500 ve 0.250 ng/mL, LOQ değerleri yine sırasıyla 2.00, 1.50 ve 1.00 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası çalışmaları için varyasyon katsayıları sırasıyla 0.1492-1.1729 ve 1.0516-4.0104 olarak hesaplanmıştır. Analiz süresi 14 dakikada sonlanmıştır. Geliştirdikleri yöntemin yeni, dayanıklı ve kolay olduğunu insan plazmasındaki timolol maleat, rosuvastatin ve diklofenak sodyum için ve hayvan göz sıvısındaki timolol maleat ve diklofenak sodyum için miktar tayininde uygulanabilir olduğunu açıklamışlardır (Nasir ve ark., 2011).

Chiang ve ark., yaptıkları bir çalışmada HPLC ile göz ilaçlarında timolol maleat ve betaxolol'un analizini 15 dakikada yapmışlardır. Ayrıca her iki göz damlası madde için stabilite çalışmasını da yapmışlardır. İki beta bloker, nadolol internal standart olarak kullanılarak ters faz C₁₈kolonu ile HPLC sisteminde tayin edilmiştir. Bileşiklerin alıkonma zamanları nadolol, timolol ve betaxolol için sırasıyla 4.3, 6.2 ve 14.8 dakika olarak belirlenmiştir. Dahası analitik yöntemin uygulanmasında photodiode array (PDA) dedektör kullanılmıştır. HPLC analizleri, oftalmik preparatlardaki polimerler veya tamponlar gibi yardımcı maddelerden etkilenmediği ortaya konmuştur. Benzalkonyum klorür göz damlalarındaki ana antiseptik ajandır. Bu çalışmada oftalmik çözeltilerdeki Benzalkonyum klorür'ün içeriğinin tayini için de HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Antiseptik ajan, setilpridinyum klorür'ün internal standart olarak kullanımıyla CN ters faz kolonu içerisinde tayin etmişlerdir. Benzalkonyum klorür'ü 11.2 dakikada ve 16.0 dakikada iki ayrı pik olarak tayin etmişlerdir. Benzalkonyum klorüre ait ilk pik C₁₂H₂₅, ikinci pik ise C₁₄H₂₉ alkil gruplarına ait olduğu bulunmuştur. Stabilite çalışmasını sadece pH 8'de yapmışlardır bu yüzden yeterli olmadığını söylemektedirler(Chiang ve ark., 1991).

Olah ve ark.'nın 1993 yılında yaptıkları bir çalışmada, plazmadaki timolol maleatın LC-MS/MS ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Timolol Maleat'ı plazmadan ayırmak için ön ayırma işlemi olarak katı faz ekstraksiyonu kullanılmış ve daha LC-MS/MS ile analiz yapmışlardır. LC-MS/MS'de C₁₈ (50mm x 4.6 mm, 5µm) kolon kullanmışlardır. Timolol maleat'ı 2 dakikadan daha kısa sürede tayin etmişlerdir. Yöntemin LOQ değeri 0.5 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası bağıl standart sapması % 10'dan daha düşük çıkmıştır. (Olah ve ark., 1993).

Tracqui ve ark.'ları tarafından genellikle oftalmolojide reçetelere yazılan β -adrenajik reseptör antagonistlerin (betaxolol, carteolol, metil pranolol, timolol maleat)'ın insan plazması ve idrarından teşhisi ve miktar tayinleri için HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Pindolol internal standart olarak kullanılarak bir ekstraksiyon yöntemi ortaya konmuştur. RSIL 10 μ m kolon kullanılmıştır. Betaxolol, carteolol, metil pranolol, timolol maleat için en düşük yakalama sınır 4-27 ng/mL aralığında bulunmuştur. Yöntemin kolay, hızlı, duyarlı olduğu belirtilmektedir. Bu çalışma β -blokerler için son derece duyarlıdır ancak yöntem diğer 8 blokerlerin tayinine olanak sağladığı ortaya konulmuştur. (Tracqui ve ark., 1988).

Kubota ve ark.'nın 1990 yılında yaptığı bir çalışmada, insan plazmasındaki timolol maleatın HPLC ile tayini yapılmıştır. Bu çalışmada plazmadaki timolol maleat ön ayırma işlemine tabi tutulduktan sonar HPLC ile analizi yapılabilmektedir (Kubota ve ark., 1990).

Boiero ve ark.'ları, çalışmada albumin nanopartiküllerindeki insan serum albümininin ve timolol maleatın eş zamanlı miktar tayinleri için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada kromatografik ayırım, 25 °C sabit kolon sıcaklığında ters faz C₁₈ kolonunda su içerisinde % 0.05 (v/v) trifloroasetik asit / asetronitril içerisinde % 0.05 (v/v) trifloroasetik asit çözeltilerinin 40:60 (v/v) oranında karışımı ile oluşan bir mobil faz ve 1.0 mL/dak. Akış hızı ile 276 nm'deki UV dedeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. İnsan serum albümini ve timolol maleat için alıkonma zamanları sırasıyla 1.84 ve 2.67 dak. Kalibrasyon aralığı insan serum albümini için 0.2-100 mg/mL, timolol için 0.01-1 mg/mL olacak şekilde hazırlamışlardır. İnsan serum albümini ve timolol için LOQ değerleri sırasıyla 0.2 mg/mL ve 0.01 mg/mL olarak hesaplamışlardır. Gün içi ve günler arası çalışmalarının doğruluk ve kesinlik değerleri amerikan gıda ve ilaç idaresi yönetmeliğine göre kabul edilebilir limitlerde olduğu ve geliştirdikleri yöntemin albumin

nanopartiküllerinden timolol ve insan serum albümininin kesin ölçümü için uygun olduğunu belirtmişlerdir (Boiero ve ark., 2015).

Marley ve ark.'nın 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, timolol maleat ilaç maddesindeki S-timolol maleat enantiyomerik saflığının tayini için Avrupa Farmakopesi testi için enetiyo seçici süperkritik akışkan kromatografi yöntemi geliştirilmiştir ve valide edilmiştir. Geliştirilen bu yöntem Avrupa Farmakopesinde açıklanan normal faz HPLC yöntemine alternatif olarak sunulmuştur. Normal faz HPLC yönteminin uygulanmasında CO₂/MeOH içerisinde % 0.1 trietil amin (93:7, v/v) içeren bir mobil faz, OD-H kolon, 40 °C sıcaklık, 297 nm'de, 5 dakika analiz süresi ve enetiyoerler arasında 2.01'lik ayırım ile sonuçlanan şartlar optimal olarak seçilmiştir. Süperkritik akışkan kromatografisindeki ayırım şartları HPLC yönteminde 250 mm x 45mm OD-H kolon, yürütücü faz olaark hekzan, 2-propanol ve dietilamin (960:40:2) karışımını kullanarak 297 nm olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada akış hızı 1 mL/dak.'dır. Geliştirilen süperkritik akışkan kromatografisi yönteminde Marini ve ark. Tarafından açıklanan normal faz HPLC yöntemine göre 3 kat daha hızlı olduğu belirlenmiştir.(Marley ve ark., 2014).

Marini ve ark.'ları tarafından yapılan bu çalışmada sunulan LC yöntemi aynı konsantrasyonda R-timolol safsızlığını içeren S-timolol maleat'ın analizi ile ilgilidir. (R) ve (S) timolol maleat numunelerindeki R-timolol'ün kantitatif analizi için daha önce geliştirilen kiral sıvı kromatografisi yönteminin validasyon sonuçları bu çalışmada sunulmuştur. Doğruluk profillerine dayanan yeni bir validasyon stratejisini en uygun regresyon modelini seçmek için iyi tanımlanmış, kabul edilebilir limitler içerisinde yöntemin doğruluğunu değerlendirmek için kullanmışlardır. HPLC ile analizini OD kolon kullanarak, 22 °C'de, yürütücü faz sisteminde n-hekzan, 2-propanol ve dietilamin (965:35:1, v/v/v) ile 297 nm'de 20 dakikada yapmışlardır. R-timolol için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.27 ve 1.51 olarak hesaplanmıştır (Marini ve ark., 2006).

Laddha ve ark.'nın 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, timolol maleat için stabiliteyi gösteren bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik ayırım koşulları olarak C₁₈ kolonda (250 mm × 4.6 mm, 5µm), yürütücü faz sistemi olarak fosfat tamponu:metanol (60:40, v/v) pH değeri 3.5'e orto fosforik asit ile ayarlanarak varlığında belirlenmiştir. Akış hızı 1 mL/dak. Olarak ayarlanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.724 ve 2.19 µg/mL olarak hesaplamışlardır. Çalışmada kullandıkları çözeltilerin tamamını metanol içerisinde hazırlamışlardır. 295.3 nm dalga boyunda ölçümleri almışlardır. Sistem uygunluk çalışması sonucu alıkonma zamanı 8,025 dakika, teorik plaka sayısı 5669, kuyruklanma faktörü 1.00 asimetri faktörü 1.19 olarak ölçülmüştür. Timolol maleat alkali şartlar dışında tüm koşullarda stabil bulunmuştur. Alkali şartlarda 2 bozunma ürünü gözlemlenmiştir. Yöntem doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve geri kazanım çalışmaları gibi farklı parametreler için valide edilmiştir (Laddha ve ark., 2014)

Maguregui ve ark.'nın 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, β adrenoreseptör antagonistleri (β- blokerler) olan oxprenolol ve timolol maleat'ın insan idrarından katı faz ekstraksiyonu kullanılarak miktar tayinleri için UV dedeksiyonuna dayanan basit bir kapiler elektroforotik yöntem geliştirmişlerdir. Elektrolit olarak pH 9 Na₂B₄O₇-H₃BO₃ (50 mM) kullanmışlardır. Elektroforetik ayırma 78 x 75 µm I.D. silika kapiler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Numune girişi 20 saniye hidrostatik olarak ve kapilerin sonundaki enlektrota 25 kV'luk voltaj uygulanmıştır. Farmasötik formülasyonlarda ve bir tedavi dozunun alınmasından sonra yüksek göz tansiyonu hastalarından elde edilen idrar numunelerindeki her iki β-blokerin miktar tayini için geliştirilen yöntem uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar daha önce uygulanan HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır ve iyi bir uyum gözlenmiştir. Fotometrik dedeksiyonu, Oxprenolol için 229 nm timolol maleat için 280 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Bu koşullarda oxprenolol 4.76 dakika timolol maleat 4.97 dakikada tayin etmişlerdir. Katı faz ekstraksiyon yöntemleri her β-bloker için optimize edilmiştir ve elde edilen geri kazanım değerleri timolol maleat için % 72.8,

oxprenolol için % 94.52 olarak bulmuşlardır. Timolol ve oxprenolol için LOQ değerleri sırasıyla 0.19 µg/mL ve 0.20 µg/mL olarak hesaplamışlardır (Maguregui ve ark., 2002).

Kulkarni ve Amin'nin 2000 yılında yaptığı bir çalışmada, timolol maleatın miktar tayini için yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yürütücü faz olarak etil asetat-metanol-izopropil alkol-amonyak (% 25) (80:20:2:1, v/v/v/v) kullanmışlardır. İlacın kalibrasyon grafiği aralığı 100-600 ng arasında doğrusaldır. Spektrodensitometrik analiz 294 nm'de gerçekleştirilmiştir. Eğimin RSD değeri, korelasyon katsayısı ve kesim noktası değerleri sırasıyla 2487.5, 0.996 ve 90463 olarak hesaplanmıştır. Sistem ve yöntem kesinliği için bağıl standart sapma değerleri sırası ile 2.8 ve 1.004 olarak hesaplanmıştır. LOD 10 ng ve LOQ 40 ng olarak bulunmuştur. Geri kazanım değeri % 98.6 bağıl standart sapma değeri ile başarılı bulunmuştur. Timolol maleat sıcaklık, asidik ve bazik stres deneyleri ile bozunmuştur. Bozunma ürünleri, farmasötik preparatlarda ve ilaç hammaddesinde timolol maleatın miktar tayini için geliştirilen yöntem ile son derece farklı R_f değeri ile saf ilahtan iyi bir şekilde ayrılmışlardır. Konvansiyonel göz damlalarında, yeni uzun salınımlı katı polimerik mercek eklemeli ve oral preparatlardan timolol maleat'ın analizi için geliştirilen yöntem kullanılmıştır (Kulkarni ve Amin, 2000).

Maguregui ve ark.'larının 1996 yılında yaptığı bir çalışmada, timolol maleat'ın miktar tayini için amperometrik dedektör kullanarak HPLC yöntemi geliştirilmiştir. HPLC'de kromatografik ayırım, C₁₈ kolon ve yürütücü faz olarak 5 mM pH 6.5 KH₂PO₄/K₂HPO₄ içeren asetonitril, su (30:70, v/v) ile gerçekleştirilmiştir. Cam karbon elektrot ile kombine edilen amperometrik dedektör + 1000 mV düzeyinde çalışmışlardır. Çalışmada yöntem, farmasötik formülasyon ile tedavi şartları altındaki yüksek göz tansiyonu hastasından elde edilen idrar numunelerindeki timolol'ün miktar tayinine uygulanmıştır. Sıvı sıvı ekstraksiyon işlemi kullanılarak iyi bir geri kazanım ve ayırım sağlanmıştır. İyi bir tekraredilebilirlik, doğrusallık ve kesinlik elde etmişlerdir ve LOQ

değerini 10 ng/mL, geri kazanım değerini % 93.25 olarak hesaplamışlardır. Geliştirilen yöntem insan idrarındaki doping analizlerine ve farmakokinetik çalışmalara uygulanabilir olduğu ortaya konmuştur (Maguregui ve ark., 1996).

Lacroix ve ark.'larının 1994 yılında yaptığı bir çalışmada, timolol maleat'ın (R) ve (S) enantiyomerlerinin tayini için HPLC ve ¹H-NMR'da yöntem geliştirmişlerdir ve valide etmişlerdir. HPLC için OD-H (25 cm x 4.6 mm 5 µm) kolonda yürütücü faz olarak hekzan içinde % 0.2 (v/v) dietilamin ve % 4 (v/v) izopropanol kullanmışlardır. 297 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Diğer ilaç ve ilgili safsızlıklardan timolol'ün R ve S-enantiyomerlerinin ayrımını doğrulamak için sistem uygunluk testleri uygulanmıştır. NMR yönteminde 360 MHz'den büyük manyetik alanda ve kiral ajanı R-TFAE ile çalışmışlardır. HPLC ve NMR için LOQ değerleri sırası ile % 0.05 ve % 0.2 olarak hesaplamışlardır. Spesifik rotasyon için USP yöntem S-timolol maleattaki R-enantiyomerinin düşük seviyelerdeki varlığının bulunması için uygun olmadığı bulunmuştur (Lacroix ve ark., 1994)

Avrupa farmakopesine göre; sıvı kromatografisi yöntemi ile timolol maleat'ın miktar tayini için 297 nm'de, 25 cm x 4.6 mm C₁₈ kolon kullanarak yürütücü faz karışımı 2 mL dietilamin, 40 mL 2-propanol ve 960 mL hekzan'dan oluşan sistem ile öncelikle referans çözelti olarak 15.0 mg (R)-timolol 1:3 oranında metilen klorür ve 2-propanol karışımında 10 mL'de çözülerek sisteme verilir. 30 mg timolol maleat 1:3 oranında metilen klorür ve 2-propanol karışımında 10 mL'de çözülür. Bu çözeltiden 1 mL alınıp 100 mL de yine aynı çözücü sistemi ile seyreltilir. 15 mg (R)-timolol 1:3 oranında metilen klorür ve 2-propanol karışımında 10 mL'de çözülür. Bu çözeltiden 1 mL alınıp 50 mL'ye aynı çözücü sistemi ile çözüldükten sonra her iki çözeltiden de 1'er mL alınarak karıştırılır ve 5 µl'lik hacimle sisteme verilir (Avrupa farmakopesi, s:3080)

Avrupa farmakopesine göre; ince tabaka kromatografisi yöntemiyle timolol maleat'ın miktar tayini için silikajel tabaka kullanılır. Dört adet çözelti hazırlanır. Bunlardan iki tanesi referans çözelti diğer ikisi ölçümü yapılacak çözeltilerdir. Referans çözelti olarak 10 mg timolol metanol ile 10 mL'de çözülür. Diğer referans çözelti ise ölçümü yapılacak çözeltilerden 10 mL alınıp 50 mL'ye metanol ile seyreltilir. Ölçümü yapılacak çözeltilerden ilki 0.50 g timolol 10 mL'de metanol ile çözülür. Ölçümü yapılacak ikinci çözelti ise ilk hazırlanan çözeltilerden 1 mL alınıp 50 mL'ye metanolla seyreltilerek elde edilir. Hazırlanan bu dört çözeltinin her birinden 10 µl'lik çözeltiler 1 mL amonyum, 20 mL metanol ve 80 mL metilen klorür karışım ile tabaka üzerinde 2 saat yürütülürler ve 105 °C'de kurutulup 254 nm dalga boyunda ölçüm yapılır (Avrupa farmakopesi, s:3081)

Amerikan farmakopesine göre timolol maleat'ın miktar tayinini sıvı kromatografisi ile yapmak için; 5 mg timolol asetonitril ve pH 2.8 fosfat tamponu (2:1, v/v) karışımı ile 15 mL'de çözülür. Yürütücü faz olarak pH 2.8 fosfat tamponu ve metanol (65:35, v/v) karışımı kullanılır. 295 nm dalga boyunda, C₁₈ 25 cm x 4.6 mm kolonu 40 °C sıcaklıkta kullanılır. Akış hızı dakikada 1.2 mL olacak şekilde ayarlanır (Amerikan farmakopesi, s:2153)

1.5.2. Dorzolamid Hidroklorür İçin Uygulanan Analitik Yöntemler

1.5.2.1. Kromatografik Yöntem

Shamsipur ve ark.'larının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada, Dorzolamid hidroklorür (4S,6S) ve enantiyomerine(4R,6R) ait kiral ayrımı için doğrudan HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Dorzolamid (4S,6S) ve enantiyomeri,kiral- α 1-asit glikoprotein kolonunda (150 x 4.0mm, 5 μ m) 10 dakikada analizi gerçekleştirmişlerdir. Alıkonma zamanı ve enantiyo seçicideki mobil faza ait pH, sıcaklık, akış hızı, tampon konsantrasyonu ve organik değiştiricilerin etkisi değerlendirilmiştir. Mobil faz, pH 7.0 amonyum asetat tamponuyla hazırlanmıştır. Yöntem, doğrusalılık, tekrarlanabilirlik, doğruluk, LOD ve LOQ değerlerine göre valide edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, dorzolamid (4S,6S) için 0.5-10 μ g/mL aralığında, enantiyomeri (4R,6R) için 0.5-5 μ g/mL aralığında hazırlanmıştır. Tekrarlanabilirlik (n=6), %2'den az bağıl standart sapma(RSD) göstermiştir. İki enantiyomere ait LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; dorzolamid (4S,6S) için 0.2 ve 0.5, enantiyomeri(4R,6R) için 0.05 ve 0.2 olarak bulunmuştur. Önerilen metod, ham madde ve 2 farklı göz damlasında dorzolamid enantiyomerinin (4R,6R)taininde kullanılmıştır (Shamsipur ve ark., 2010).

Shamsipur ve ark.'larının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada, ticari göz damlalarındaki dorzolamid hidroklorür'ün 4S, 6S ve 4R, 6R enantiyomerlerinin ayrımı için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Ticari göz damlalarında bulunan dorzolamid hidroklorür (4S,6S) ve enantiyomerinin (4R,6R) ayrımı için kaplı (coated) selüloz fenilkarbamat kiral yatışkınlık fazı kullanarak basit, doğru, kesin ve hassas bir metod oluşturmuşlardır. Mobil faz, n-hekzan ve % 0.1 dietilamin içeren 2-propanol (50:50 v/v) karışımıyla hazırlanmıştır ve 1 mL/dakika akış hızında çalışmışlardır. Sıcaklığın, akış hızının, organik bileşenlerin tipi ve konsantrasyonları ve mobil fazdaki dietilamin

konsantrasyonun, alıkonma zamanı ve enantiyoseçicideki etkisi çalışılmıştır. Yöntem, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, hassaslık, LOD ve LOQ değerleri ile valide edildi. Dorzolamid(4S,6S) ve enantiyomerinin(4R,6R) kalibrasyon ölçüm aralığı sırasıyla; 0.5-10 µg/mL ve 0.5-5 µg/ mL olarak hazırlanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; dorzolamid hidroklorür(4S,6S) için 0.2 ve 0.5 µg/mL olarak, enantiyomeri(4R,6R) için ise 0.1 ve 0.2 µg /mL olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik (n=6), % 0.5'den az bağıl standart sapma (RSD) göstermiştir (Shamsipur ve ark., 2011).

Avrupa farmakopesine göre dorzolamid hidroklorür'ün miktar tayinini sıvı kromatografisi ile yapabilmek için 30 mg dorzolamid hidroklorür yürütücü faz A karışımı olan 65 mL asetonitril ve 935 mL potasyum dihidrojen fosfat (3.7 g/L) karışımında çözülür. İki adet referans çözelti hazırlanır bunlardan birincisi; hazırlanan bu çözeltiden 1 mL alınıp 100 mL'ye yürütücü faz A ile seyreltilir. Bu çözeltiden de tekrar 1 mL alınıp 10 mL'ye yürütücü faz A ile tekrar seyreltilir. İkinci referans çözelti için 2 mg dorzolamid hidroklorür yürütücü faz A ile 2 mL'de çözülür. C₁₈ (25 cm x 4.6 mm)'lik kolon kullanılarak kolon sıcaklığı 35 °C'de çalışılır. Yürütücü faz B ise asetonitril'den oluşur. Yürütücü faz A ve B gradient sistemi ile 0-15 dakika aralığında yürütücü faz A'dan %100 verilir. 15-30 dakika aralığında her iki yürütücü fazdan da % 50 verilir. 30-37 dakika aralığında yürütücü faz A'dan %100 verilir. 37-44 dakika aralığında yürütücü faz A'dan % 100 verilerek analiz tamamlanır (Avrupa farmakopesi, s:1752)

Amerikan farmakopesine göre dorzolamid hidroklorür'ün sıvı kromatografisi ile miktar tayinini yapmak için yürütücü faz olarak terbütil metil eter, n-heptan, asetonitril ve su (63:35:2:0.2, v/v) karışımı kullanılır. 20 mg dorzolamid hidroklorür 4 mL etil asetat ve 4 mL 0,5 N amonyum hidroksit karışımında çözülür. Bu çözelti 50 C°'de evapore edilir. Evaporasyon sonrası 3 mL asetonitril 50 °C'lik su banyosunda ilave edilir. Tekrar 50 C°'de evapore edilir. Kuruduktan sonra 10 mL ter-bütil metil eter, glasiyel asetik asit ve asetonitril (87:10:3, v/v) karışımı ilave edilir. Kromatografik koşul olarak 254 nm

dalga boyunda C₁₈ (25 cm x 4,6 mm) kolon kullanılarak hareketli faz akış hızı dakikada 2 mL olarak ayarlanır (Amerikan farmakopesi, s: 756).

1.5.2.2. Spektrofotometrik Yöntem

Noela Dias ve ark.'larının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada, asidik ortamda dorzolamid hidroklorür potasyum bromit-bromat ile aşırı reaksiyona girmektedir. Dorzolamid hidroklorür için UV-Spektrofotometresinde miktar tayinini potasyum bromit-bromat ve safranin varlığında (pembe renk) yapmışlardır. Son stok çözeltinin en yüksek absorbansı 540 nm olarak hesaplamışlardır. Doğrusallığın aralığı 10-50 µg/mL olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı 0.999 olarak hesaplamışlardır. ICH klavuzuna göre yöntemi valide etmişlerdir. Çalışmada regresyon denklemi $y=0.0192x + 0.0062$ olarak bulunmuştur (Noela Dias ve ark., 2013).

1.6.3. Timolol Maleat ve Dorzolamid Hidroklorür Karışımının Eş Zamanlı Miktar Tayini için Uygulanan Analitik Yöntemler

1.6.3.1. Kromatografik Yöntem

Shadoul ve ark.'larının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada, göz damlalarında bulunan dorzolamid hidroklorür ve timolol maleatın eş zamanlı tayini için basit bir HPLC yöntemi sunmuşlardır. HPLC ayrımı, Eurospher 100 C₁₈ (25 mm x 4.6 mm, 5µm) kolonda, asetonitril, tetrahidrofur (THF) ve % 1 fosforik asit sulu çözeltisindeki (15:3:82 v/v) mobil fazda yapılmıştır. Sistem uygunluğu, pik simetrisi, kapasite faktörü ve ayırıştırma gibi kolon verimliliğini etkileyen faktörlerin ölçülmesi kanalıyla değerlendirilmiştir. Analit konsantrasyonları, pik alanı ve pik yüksekliği kullanılarak hesaplanmıştır. Doğrusallık aralığı (r değeri < 0.99), sırasıyla timolol maleat için 120-480 µg/mL, dorzolamid hidroklorid için 360-1440 µg/mL olarak hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri, timolol maleat için 5.95 µg/mL ve 18.03 µg/mL olarak, dorzolamid hidroklorid için 25.18 µg/mL ve 76.31 µg/mL bulunmuştur (Shadoul ve ark., 2011).

Mohamed ve ark.'larının 2014 yılında yaptığı bir çalışmada, tuzla çöktürme ile desteklenmiş sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu (SALLME) ile kombine HPLC-UV kullanılarak geliştirilen göz sıvısı örnekleri (AH) içerisindeki dorzolamid hidroklorür (DOR) ve timolol maleat (TIM) isimli iki antiglokomatöz ilacın eşzamanlı ayrımı ve tayini için HPLC yöntemi kullanmışlardır. Box-Behnken deney tasarımıyla yararlanarak, bu tasarım tuz konsantrasyonu, örnek çözelti pHı ve karıştırma süresi gibi değişken koşulların optimizasyonu için kullanılmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları, 50 µL AH örneği, 100 µL fosfat tampon (100 mMol/L, pH 11.9), 90 µL asetonitril (ASN) ve 0.11g (NH₄)₂SO₄ tuzunun Eppendorf viyaline (1mL) konulması ve 1.1 dakika karıştırılması olarak bulunmuştur. SALLME sisteminin minyatürize edilmesi için; kapilarite

tübü ile adapte edilmiş 1mL enjektör, faz ayırma cihazı olarak kullanılmıştır. Faz ayrımı meydana geldiğinde; üst katman, daralarak ve pistonu ittirerek kapilarite tübünün içine girmeliydi: böylece; üst katman solventinin toplanması, basit ve kullanışlı idi. Minyatürleştirme, organik solvent tüketimini mümkün olduğu kadar azaltmıştır. Kromatografik ayırma, C₁₈ kolonunda ACN: % 0.1 trietilamin içeren 30 mMol/L potasyum dihidrojen fosfat tamponu, pH 3,5 (20:80, v/v), 1 mL/dakika akış hızındaki mobil faz, DOR için 254 nm, TIM için 295 nm UV dalga boyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mepivakain hidroklorür, internal standart olarak kullanılmıştır. Açıklanan yöntem, daha önce raporlanan yöntemlere göre artırılmış hassasiyetle daha iyi ayırma göstermiştir; LOD değeri DOR ve TIM için sırasıyla; sulu çözeltide 8.75 ve 10.32 ng/mL, AH içerisinde 15.97 ve 23.53 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Analiz 10 dakikada tamamlanmıştır. Basit, hızlı ve çevre dostu SALLME-HPLC metodu, tavşan, AH içerisindeki DOR ve TIM e ait eşzamanlı farmakokinetik çalışmalarına başarıyla uygulanmıştır (Mohamed ve ark., 2014).

Nagori ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı bir çalışmada, göz damlası numunesindeki dorzolamid hidroklorür ve timolol maleatın miktar tayini için HPLC yöntemi kullanmışlardır. Yürütücü faz sisteminde metanol ve pH'ı glasiyel asetik asit ile 3.0'e ayarlanmış tampon (60:40, v/v), C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanarak oda sıcaklığında dorzolamid hidroklorür için 254.0 nm, timolol maleat için 295.0 nm dalga boyunda ve 10 dakikadan kısa sürede tamamlamışlardır. Dorzolamid hidroklorür ve timolol maleat için konsantrasyon aralığı sırasıyla 10-30 µg/mL ve 40-120 µg/mL olarak hazırlanmıştır. Geliştirdikleri yöntemin dorzolamid hidroklorür ve timolol maleat'ın tayini için uygulanabilir olduğu belirtilmektedir (Nagori ve ark., 2011).

Díaz ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı bir çalışmada, % 2 dorzolamid ve % 0.5 timolol içeren göz damlalarının kalite kontrol ve stabilite çalışmalarına uygulanabilir analitik HPLC metodunun geliştirilmesi ve validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Dorzolamid ve timolol'ün eş zamanlı miktar tayinlerini C₁₈ (250 mm x 4 mm)'lik kolon kullanarak gradient sistemle gerçekleştirmişlerdir. Dorzolamid için 254.0 nm ve timolol için 295.0 nm dalga boylarını kullanmışlardır. Gradient sistemdeki A fazı bileşenleri; asetonitril, pH 2.5 fosfat tamponu ve metanol (5:85:10), B fazı metanolden oluşmaktadır. Doğrusallık çalışmasında; korelasyon ve bulma katsayıları sırasıyla 0.99 ve 0.98 in üzerinde olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım yüzdeleri, dorzolamid için % 99.57, timolol için % 99.93, varyasyon katsayısı ise her iki örnek için % 2 nin altında bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik çalışmasında; ortalamalar, dorzolamid için % 99.1, timolol için % 100.4 olduğu ve varyasyon katsayısı ayarlanan limitler içerisinde olduğu ortaya konmuştur. p değerleri, her çalışılan kademe için 0.05 ten fazla idi. Geliştirilen analitik yöntem, çalışılan konsantrasyon aralığında doğrusal, kesin, seçici ve hassas olarak belirtilmiştir. Bitmiş üründe kalite kontrol ve stabilite çalışması için bu amaçlar için daha önce analitik bir yöntem oluşturulmuştur (Díaz ve ark., 2013).

Sharma ve ark.'nın 2012 yılında yaptığı bir çalışmada, yeni stabilite belirten gradyan ters fazlı UPLC (RP-UPLC) yöntemi, dorzolamid hidroklorür ve timolol maleatın kirlilik bulunması, hızlandırılmış degradasyon ürünleri ve plasebo durumunda saflık tayini için geliştirilmiştir. Yöntem, Waters UPLC BEH C₁₈, (100 mm x 2.1mm, 1.7 µm) kolon, çözücü A ve çözücü B nin gradient karışımını içeren mobil faz kullanılarak geliştirilmiştir. Tampon olarak; fosfat tampon (0.04M), pH 2.6 kullanıldı. Tampon pH 2.6 Çözücü A olarak, Milli-Q su, metanol, asetonitril (200:300:600 v/v/v) karışımı çözücü B olarak kullanılmıştır. Gradyan programı olarak 0/5, 8/8, 10/15, 16/45, 20/55, 24/80, 25/5 ve 30/5 kullanılmıştır. Yürütücü faz ile birbirinden ayrılmış dorzolamid hidroklorür ve kirlilikleri 254 nm de, timolol maleat ve kirlilikleri 295 nm de ölçülmüştür. Çalışma zamanı için, dorzolamid hidroklorür ve ona ait 5 kirliliği ile timolol maleat ve ona ait 3

kirliliğin iyice ayrıştığı, kararlılığın 2.0'den yüksek olduğu 30 dakikada analiz sonuçlandırılmıştır. Dorzolamid hidroklorür ve timolol maleat, oksidatif, asit, baz, fotoliz özelliğinde ve termal stabilite şartlarına tabi tutulmuştur. Dorzolamid hidroklorür, timolol maleat ve ilgili bileşiklerine ait pik saflıklar, herhangi bir dalgalanma göstermemiştir, yöntemin stabilite belirtme gücü kanıtlanmıştır. Geliştirilen yöntem, Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'na (ICH) özellik, doğrusalık, LOD, LOQ, hassasiyet, kesinlik ve sağlamlık açısından valide edilmiştir (Sharma ve ark., 2012).



1.6.3.2. Spektrofotometrik Yöntem

Palabıyık ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı bir çalışmada, UV spektrofotometresi verilerini kullanarak göz ilacındaki DOR ve TIM karışımı için sadece kısmi en küçük kareler-1 yöntemi kullanarak eş zamanlı miktar tayini yapmışlardır. Çok değişkenli kalibrasyon tekniğini kullanarak girişimleri en aza indirgeyerek, kısa analiz süresinde, ön işlem yapmaksızın analizi gerçekleştirmişlerdir. Optimize ve valide ettikleri yöntemin literatür yöntemleri ile kıyasladıklarında belirgin bir fark gözlemlememişlerdir (Palabıyık ve ark., 2013).

Lotfy ve ark.'nın 2014 yılında yaptığı bir çalışmada, UV spektrofotometresi verilerini kullanarak DOR ve TIM'in eş zamanlı miktar tayinini benzalkonyum klorid varlığında absorbans eksiltme ve amplilüd modülasyonu ile gerçekleştirmişlerdir. Kullandıkları spektrofotometrik yöntemler; oran çıkarma (SRS), oran farkı (RD), oran çıkarma (RS) ile genişletilmiş oran çıkarma (EXRS), sürekli çarpım (CM) ve oran spektrumlarının ortalaması (MCR) gibi basit, özel, hassas ve kesin spektrofotometrik metodlar geliştirilmiştir ve valide edilmiştir. Önerilen spektrofotometrik yöntemler, herhangi bir ayırım aşaması gerektirmemektedir. Önerilen yöntemlerin hassaslık, kesinlik ve doğrusallık aralıkları ve özgüllükleri, iki ilacın sentetik çözeltilerinin analizi ile tayin edildi. Yöntemler, farmasötik formüllere uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar, raporlanan spektrofotometrik yöntem ile istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. İstatistiki karşılaştırma sonucunda; önerilen yöntem ile raporlanan yöntem arasında hassasiyet ve kesinlik açısından kayda değer, belirgin bir fark bulunamadığı gösterilmiştir (Lotfy ve ark., 2014).

1.6.4. Brimonidin Tartarat için Uygulanan Analitik Yöntemler

1.6.4.1. Spektrofotometrik Yöntem

Mathrusri ve ark.'nın 2015 yılında yaptığı bir çalışmada, brimonidin Tartarat'ın dört yeni spektrofotometrik analizini gerçekleştirmişlerdir. İlk yöntemde fosfat tamponu pH= 6.0'da 247 nm'de maksimum dalga boyu elde etmişlerdir. İkinci yöntemde borat tamponu pH=9.0'da 257 nm'de ölçüm yapmışlardır. Konsantrasyon aralığı 0.1-50 µg/mL her iki yöntem için kullanılmıştır. Üçüncü ve dördüncü yöntemlerde sırasıyla fosfat pH= 5.0 ve sodyum asetat pH= 4.0 tamponları kullanarak birinci derece türev yöntemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Üçüncü ve dördüncü yöntemlerin konsantrasyon aralıkları sırasıyla 1-40 µg/mL ve 0.2-30 µg/mL olarak hazırlanmıştır. Kullanılan spektrofotometrik yöntemler valide edilmiş ve göz damlası numunelerindeki brimonidin tartarat'ın miktar tayini için uygulanabilir olduğu belirtilmektedir (Mathrusri ve ark., 2015).

İbrahim ve ark.'nın 2015 yılında yaptığı bir çalışmada, göz damlası numunelerindeki BRI'nın miktar tayinini spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntem olmak üzere iki farklı yöntemle gerçekleştirmişlerdir. Her iki yöntemde de 70 C°'de pH 8.5 borat tamponundaki 4-kloro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol çözeltisi kullanmışlardır. Spektrofotometrik yöntemde 407 nm'de, spektroflorimetrik yöntemde ise 528 nm'nin üzerinde ve 460 nm eksitasyonda ölçüm yapmışlardır. Spektrofotometrik yöntemde kalibrasyon aralığını 1.0-16.0 µg/mL, spektroflorimetrik yöntem için kalibrasyon aralığını 0.1-4.0 µg/mL olarak hazırlamışlardır. Spektrofotometrik yöntemin LOD değeri 0.21 µg/mL, LOQ değeri 0.65 µg/mL, spektroflorimetrik yöntemin LOD değeri 0.03 µg/mL, LOQ değeri ise 0.09 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Her iki yöntemi de başarılı bir şekilde ticari göz damlası numunelerine uygulamışlardır ve spektrofotometrik yöntem

için ortalama geri kazanım değeri % 99.50, spektrofotometrik yöntem için % 100.1 olarak hesaplamışlardır. Spektrofotometrik yöntemde alkalın, asidik, oksidatif ve fotolitik türevlendirme koşullarında stabilite çalışması da yapılmıştır. Her iki yöntemin de brimonidin tartarat'ın kalite kontrol laboratuvarlarında rutin uygulamalar için pratik olduğunu belirtmektedirler (İbrahim ve ark., 2015).



1.6.4.2. Kromatografik Yöntem

Hafez ve ark.'nın 2015 yılında yaptığı bir çalışmada, Brimonidin tartarat ve timolol maleat karışımının miktar tayinini benzalkonyum klorür varlığında deneysel tasarım (DOE) yaparak UPLC ile gerçekleştirmişlerdir. C₁₈ (50×4.6 mm, 2.6 µm) kolonda yürütücü faz sistemi olarak metanol ve 1- Dekan sulfonik asit sodyum (pH 3.0, 0.01M) ile gradient sistemi uygulayarak, 50 C°'de 320 nm'de brimonidin tartaratı 1,52 dakikada timolol maleatı 2.53 dakikada tayin etmişlerdir . Deneysel tasarım tekniği kullanmalarının faydasının yeni metodun system uygunluğu için farklı faktör etkileşimleri hakkında daha fazla bilgi sağlaması olduğunu belirtmişlerdir. Deneysel tasarımın tasarım uzayı oluşturmaya vasıtasıyla sağlam bir metot bulunmasına sebep olduğunu söylemektedirler. Kalibrasyon aralığı brimonidin tartarat için 1-100 µg/mL, Timolol için 2.25-225 µg/mL ve benzalkonyum klorür için 1-10 µg/mL aralığında hazırlamışlardır.LOD değerleri brimonidin tartarat için 0.1 µg/mL, Timolol için 0.17 ve benzalkonyum klorür için 0.28 µg/mL, LOQ değerleri brimonidin tartarat için 0.3 µg/mL, timolol maleat için 0.51 µg/mL ve benzalkonyum klorür için 0.85 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada, timolol maleat ve brimonidin tartarat için stabilite çalışmasında asidik, alkalik, oksidasyon ve sıcaklık ile parçalanmaları da incelenmiştir (Hafez ve ark., 2015).

Sonanis ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı bir çalışmada, BRI'nın impürite (safsızlık) tayinini UPLC ile C₁₈ kolonu kullanarak gradient sistem ile gerçekleştirmişlerdir. Asetik asit ile pH'ı 6.0'ya ayarlanmış amonyum asetat, metanol ve asetonitril yürütücü faz sisteminde ve 247 nm'de ki dalga boyunu kullanmışlardır. Brimonidin tartarat ile impüriteleri arasındaki kromatografik ayırım 2'den fazla olarak bulunmuştur. Tüm bileşenler için korelasyon katsayısı 0.998'dan yüksek hesaplanmıştır. Brimonidin tartarat numuneleri sıcaklık, asidik, bazik ve oksidatif stres koşullarında satbilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlacın oksidatif sters altında bozunduğu diğer koşullar altında stabil kaldığını belirtmişlerdir (Sonanis ve ark., 2011).

Acheampong ve Tang-Liu'nun 1995 yılında yaptığı bir çalışmada, insan plazmasındaki BRI'nın miktar tayinini GC/MS ile yapmışlardır. 1 mL'lik plazmadan BRI'nın ekstraksiyonu sonrası elde edilen çözeltiyi GC/MS ile tayin etmişlerdir. Ekstraksiyon sırasında tetradeurated brimonidini (brimonidin-d₄) ve klonidini birlikte ekstrakte etmişlerdir. tetradeurated brimonidini internal standart olarak kullanmışlardır. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra 3,5-bis(triflorometil)benzoil ile türevlendirildikten sonra numuneyi GC/MS'e enjekte etmişlerdir. Kalibrasyon aralığını 2-1000 pg/mL aralığında hazırlamışlardır. Günler arası bağıl standart sapma % 12 veya daha az hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğu ve kesinliği iyi çıkmıştır ve minimum ölçülebilen konsantrasyon değeri 2 pg/mL olarak hesaplanmıştır (Acheampong ve Tang-Liu, 1995).

Madhavi ve ark.'nın 2008 yılında yaptığı bir çalışmada, brimonidin tartaratın impürite tayinini C₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanarak HPLC'de tayin etmişlerdir. 27 °C, 248.0 nm dalga boyu ve gradient sistemle 40 dakikada analizi tamamlamışlardır. Gradient sistemde A fazında pH'ı 3.0'e fosforik asitle ayarlanmış 0.02 M n-hekzan sulfonik asit sodyum tuzu ve 0,01 M sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (50:50, v/v), B fazında asetonyitril ve metanol (50:50, v/v) kullanmışlardır. Brimonidin tartarat ve üç impüritesi arasındaki ayrılması 3.0'ten büyük çıkmıştır. Regresyon analizi sonuçlarında korelasyon katsayısı 0.999'dan büyük çıkmıştır. Kullanılan yöntemle brimonidin tartarat'ın test konsantrasyonu olan 1.0 mg/mL derişiminde brimonidin tartaratın tüm üç impüriteleri 0.07 µg'ın altında hesaplanmıştır. Asetonyitril, su (2:8, v/v) çözücüsündeki brimonidin tartarat 48 saat bozunmadan kalabilmiştir. Brimonidin tartarat'ın stabilite çalışması için oksidatif, sulu, asidik, bazik, fotolitik ve sıcaklık altındaki bozunmasına bakmışlardır. Sonuçta brimonidin tartarat'ın oksidatif stres altında bozunduğu ancak diğer koşullarda stabil kaldığı görülmüştür (Madhavi ve ark., 2008).

Ali ve ark.'nın 2009 yılında yaptığı bir çalışmada, Brimonidin tartarat'ın miktar tayinini hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi ile 20 dakikada 254 nm'de

gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada brimonidin tartarat'ın farklı stres koşulları altındaki davranışı incelenmiştir. Bu stres koşulları oksidatif, hidrolitik, fotolitik ve sıcaklık olarak belirlenmiştir. Hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisinde miktar tayini yapılırken yürütücü faz olarak asetonitril-tampon (92:8, v/v) pH 7.1 karışımı ve silika kolon (250 x 4.6 mm, 5 µm) kullanmışlardır. Geri kazanım değeri % 100.1 olarak hesaplanmıştır. Valide edilen yöntemin LOD değeri 0.005 µg/mL ve LOQ değeri 0.02 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Ali ve ark., 2009).

Narendra ve ark.'nın 2012 yılında yaptığı bir çalışmada, Brimonidin tartarat'ın göz damlasındaki miktar tayinini HPLC ile 4.636 dakikada C₁₈ kolon kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Yürütücü faz olarak 0.02 M oktan 1- sülfonik asit sodyum tuzu (pH 3.5) ve asetonitril (64:36, v/v) kullanmışlardır. 254.0 nm'deki dalga boyuna göre tayin yapmışlardır. Konsantrasyon aralığı 0,4-72 µg/mL olarak hazırlanmıştır. Yöntemin LOD değeri 0.0561 µg/mL ve LOQ değeri 0.1848 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tüm çözeltileri asetonitrilde hazırlamışlardır. Alphagan (2 mg/mL, 5mL) ve Brimopress (% 0.2, 5mL) olmak üzere iki farklı ticari preparatta yöntem denenmiştir. Alphagan için geri kazanım değeri % 99.48, brimopress için geri kazanım değeri % 99.85 olarak bulunmuştur (Narendra ve ark., 2012)

Karamanos ve ark.'nın 1999 yılında yaptığı bir çalışmada, Brimonidin tartarat'ın kan serumunda ve sıvı göz salgısındaki miktar tayinini HPLC ile C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanarak 10 dakikada gerçekleştirmişlerdir. Yürütücü faz olarak 10 mM trietilamin tamponuna % 10 asetonitril ilave ederek kullanmışlardır. Yapılan analizi 248.0 nm dalga boyunda ve oda sıcaklığında gerçekleştirmişlerdir. Kalibrasyon aralığı 30.0 pg/mL-100.0 µg/mL olarak ayarlanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.9997 olarak hesaplanmıştır. LOD değeri 30 pg/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanım değeri % 98 olarak bulunmuştur (Karamanos ve ark., 1999)

Jain ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı bir çalışmada, Brimonidin tartart'ın miktar tayinini yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi ile yapmışlardır. 60 F₂₅₄ tabaka varlığında ve yürütücü faz sistemi olarak metanol-toluen-trietilamin (1:3.5:0.2, v/v) karışımı ile 247 nm'de gerçekleştirmişlerdir. Konsantrasyon aralığını 100-600 ng/mL aralığında hazırlamışlardır. Korelasyon katsayısını 0,9965, LOD ve LOQ değerlerini 9.40 ve 28.51 ng/mL olarak hesaplamışlardır. Eğimin ve kesim noktasının standart sapmasını sırasıyla 9.047 ve 553.0 olarak bulmuşlardır. Ayrıca asitte, alkalide ve doğal çözücüde hidrolizine, oksidasyonuna ve foto degradasyonunada bakmışlardır. Yöntemin istatistiksel sonuçlarına göre brimonidin tartarat'ın miktar tayininde seçiciliği, kesinliği ve doğruluğu tespit edilmiştir (Jain ve ark., 2011)

Mohit ve Ravi'nin 2011 yılında yaptığı bir çalışmada, Brimonidin tartarat'ın miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde C₁₈ kolon kullanarak gradien sistemle analizi gerçekleştirmişlerdir. Yürütücü faz olarak methanol ve 10 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 3.0) kullanmışlardır. Akış hızı 1 mL/dak., dalga boyu 246 nm olarak ayarlanmıştır. Brimonidin tartarat'ın alıkonma zamanı 10.51 dakika olarak tespit edilmiştir. Geliştirdikleri yöntemi doğrusalılık, kesinlik, system uygunluk parametreleri, LOD ve LOQ değerlerine göre valide etmişlerdir (Mohit ve Ravi, 2011).

Shirke ve Pai'nin 2002 yılında yaptığı bir çalışmada, Brimonidin tartarat içeren göz damlası numunelerindeki brimonidin tartarat miktarını HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Yöntemde C₁₈ (25 cm x 4.0 mm, 5µ) kolonu, yürütücü faz olarak asetonitril, tampon (10:90, v/v) ve akış hızı olarak 1.0 mL/dak. kullanmışlardır. Brimonidin tartart'ı 254 nm dalga boyunda tayin etmişlerdir. Bu şartlardaki yöntemle brimonidin tartarat'ın alıkonma zamanı 6.61 dakika olarak tespit edilmiştir. Çalışmada geliştirilen bu yöntem valide edilmiştir (Shirke ve Pai, 2002)

1.6.4.3. Florimetrik Yöntem

Sunitha ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı çalışmada, göz damlasındaki brimonidin tartarat'ın miktar tayinin spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirmişlerdir. Çözücü olarak dimetil formamit kullanmışlardır. Konsantrasyon aralığı 20.0-80 ng/mL olarak hazırlamışlardır. Emisyon dalga boyunu 530 nm'de eksitasyon dalga boyunu ise 389 nm'de ölçmüşlerdir. Korelasyon katsayısı 0.998 olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri 22.0 ve 72.0 ng/mL olarak hesaplamışlardır. Yöntemi ICH klavuzuna göre valide etmişlerdir. Yöntemin yüzde geri kazanım değeri 98.8-102.4, % bağıl standart sapma değeri 2'den küçük olarak bulunmuştur. Brimonidin tartarat'ın rutin kalite kontrol analizlerinde ve miktar tayininde uygulanabilir olduğu belirtilmektedir. (Sunitha ve ark., 2013)

1.6.5. Timolol Maleat ve Brimonidin Tartarat Karışımının Eş Zamanlı Miktar Tayini için Uygulanan Analitik Yöntemler

1.6.5.1. Spektrofotometrik Yöntem

Mohamed ve ark.'nın 2014 yılında yaptığı bir çalışmada, COMBIGAN göz damlasındaki BRI ve TIM'in eş zamanlı miktar tayini için UV spektrofotometresini ve HPLC kullanarak yapmışlardır. UV spektrofotometresinde BRI-TIM karışımını birinci türev yöntemiyle, BRI-TIM karışımını benzalkonyum klorür varlığında gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntem için timolol 313 nm'de brimonidin tartarat 386 nm'de ölçülmüştür. İkinci yöntem olarak oran spektrumlarının birinci türevi ile tayin yapmışlardır. Bu yöntemde timolol maleat 313 nm'de brimonidin tartarat 391 nm'de, tayin edilmiştir. Timolol için konsantrasyon aralığı 5-85 µg/mL, brimonidin tartarat konsantrasyonu 2-35 µg/mL ve benzalkonyum klorür'ün konsantrasyonu 0.25 µg/mL olarak hazırlanmıştır. Üçüncü yöntem olarak HPLC'de fenil kolon (150 mm x 1.0 mm, 5µm), 0.035 M orto fosforik asit içerisinde 0.1 M SDS, % 10 1-propanol ve % 0.1 TEA karışımından oluşan yürütücü faz sistemi, TIM için 298 nm ve BRI için 250 nm dalga boyunda 4.08 dakikada BRI ve 5.8 dakikada TIM piki elde ederek gerçekleştirmişlerdir. Her üç metodun da yüzde geri kazanım değerleri, doğruluğu ve kesinliği yüksek çıkmıştır (Mohamed ve ark., 2014)

1.6.5.2. Kromatografik Yöntem

Büker ve Dinç'in 2016 yılında yaptığı bir çalışmada, göz damlası numunesindeki BRI ve TIM'in kantitatif tayini için deneysel tasarım ve optimizasyon tekniği kullanılarak yeni bir UPLC yöntemi geliştirmişlerdir. UPLC yönteminin geliştirilmesindeki deneysel koşulların optimizasyonu için kromatografik cevap fonksiyonundaki seçilen faktörler ve etkileşimlerinin etkisi için 3^3 tam faktöriyel tasarım kullanmışlardır. Sonuç olarak iyi ayırım ve kısa analiz süresi sağlayan optimal kromatografik koşul olarak 49.2 °C kolon sıcaklığı; 0.38 mL/dakakış hızı ve % 56.7 0.1 M CH₃COOH mobil faz olarak bulundu. 1.5 dakikalık analiz süresinde BRI 0.508 dakikada TIM 0.652 dakikada ayırımı gerçekleştirildi. BRI ve TIM için kalibrasyon grafikleri BRI için 246.0 nm ve TIM için 298.0 nm'deki pik alanları ile konsantrasyon arasındaki regresyonu ile elde edildi. Geliştirilen yöntemin validasyonu, sentetik karışım, gün içi ve günler arası ve standart ilave tekniği ile hazırlanan numuneler ile gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bu çalışma, göz damlası formülasyonlarındaki BRI ve TIM'in kantitatif tayini için optimize ve valide edilen UPLC yönteminin ucuzi kolay uygulanabilir ve güvenilir olduğu ortaya konmuştur (Büker ve Dinç, 2016).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu doktora tez çalışmasında yeni kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi için optimal kromatografik şartların belirlenmesinde kemometrik deneysel tasarım ve optimizasyon teknikleri kullanıldı. Bu optimizasyon tekniğinin kullanılması Matlab programında özel olarak yazılan algoritma ve Microsoft Excell programları kullanılarak gerçekleştirildi. Optimal kromatografik şartlar altında aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile tez konusu aktif bileşiklerin (etken maddelerin) analizleri gerçekleştirildi.

Ayrıca doktora tez kapsamında DOR-TIM ve BRI-TIM kombinasyonları, UV-VIS spektrofotometrik verilerin kullanımına dayalı olarak kısmi en küçük kareler (partial least square→PLS) ve temel bileşen regresyon (principal component regression → PCR) yöntemleri ve sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) analizleri gerçekleştirildi. Bu doktora tezi çalışmalarının başarılmasında aşağıda listesi verilen kimyasallar, preparatlar, gereçler, cihazlar, malzemeler, bilgisayar programları ve özel yazılan algoritmalar kullanılmıştır.

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- Waters Acquity Series UPLC Sistemi (Waters Corporation 34 Maple Street Milford, MA 01757 USA) (PDA sistemi ile birlikte).
- Waters BEH® C₁₈ (2.1 x 50 mm, 1.7 µ) UPLC Kolonu.
- Waters BEH® C₁₈ (2.1 x 100 mm, 1.7 µ) UPLC Kolonu
- Waters BEH® Fenil (2.1 x 50 mm, 1.7 µ) UPLC Kolonu
- Empower UPLC Software programı.
- Waters Vial
- Spektrofotometre (UV/ VIS): Shimadzu UV- 2550
- pH-metre (WTW Model)
- Kuvartz küvet
- Hassas terazi: Sartorius Entris 224-1S
- Manyetik karıştırıcı: Ikamak RH Jonke & Kunkel IKA (Labortechnik)
- Magnet
- Pipet (1-10 mL)
- Sartorius Minisart membran filtre (Gözenek çapı = 0,20 µm)
- Balon joje (5-250 mL)
- Beher

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol (Sigma)

CH₃COOH (Sigma)

CCl₃COOH (Sigma)

Asetonitril (Sigma)

Ultra Saf su (Millipore)

Timolol Maleat (MSD)

Dorzolamid Hidroklorür (MSD)

Brimonidin Tartarat (MSD)

2.1.3. Analiz Edilen Bileşikleri İçeren Ticari Preparatlar

TOMEC® (Göz Damlası) MSD:

Timolol Maleat:..... 5 mg/mL

Dorzolamid Hidroklorür:..... 20 mg/mL

COMBIGAN® (Göz Damlası) MSD:

Timolol Maleat: 5 mg/mL

Brimonidin Tartarat: 2 mg/mL

2.2. Analitik Yöntemler ve Teorik Esasları

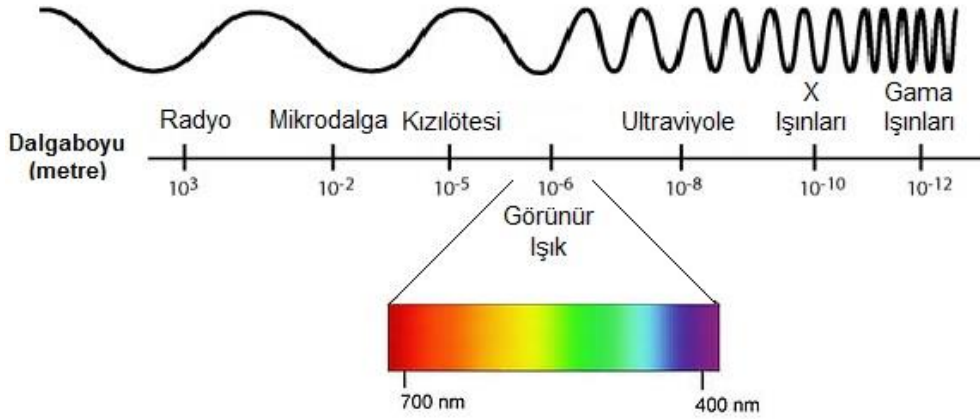
Bu bölümde bu doktora tez çalışmasında kullanılan teknik ve yöntemler ve teorik esasları hakkında temel bilgiler anlatılmaktadır.

Bu doktora çalışması kapsamında çalışmaların yürütülmesinde UV-VIS spektrofotometrik verilerin kullanımına dayanan PCR ve PLS yöntemleri uygulanmıştır. Bu nedenle UV-VIS spektrofotometri hakkında bilgi sunulmaktadır.

Doktora tezinin konusu olan ilaçların kromatografik analizinde optimal kromatografik koşulların bulunmasında deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanıldı. Bu bölümde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve kemometrik optimizasyon teknikleri hakkında da ayrıntılı teorik bilgiler ve uygulamaya yönelik geniş bilgiler sunulmaktadır.

2.2.1 UV-VIS Spektrofotometri

Spektroskopik yöntemler ışığın kullanıldığı ve ışığın kullanılmadığı yöntemler olarak ikiye ayrılır. Bu ışığın kullanıldığı yöntemler ise atomik ve moleküler spektrofotometri olarak sınıflandırmak mümkündür. Çalışmalarında ışığın kullanıldığı moleküler spektrofotometrik yani UV-VIS spektrofotometrik ölçümler için UV_VIS spektrofotometreden faydalandım. Dolayısıyla bu bölümde UV-VIS spektrofotometri ve esaslarından bahsedeceğim.



Şekil 2.1. Elektromanyetik spektrum.

$$E = h \gamma$$

Spektroskopi, bir numunedeki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğer enerji düzeyine geçişleri esnasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımanın ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Elektromanyetik ışıma, uzayda büyük hızla hareket eden bir enerji türüdür. Gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared ışınlar, elektromanyetik ışımanın en çok karşılaşılan türleridir.

Elektromanyetik ışıma, hem dalga hem tanecik özelliğinin her ikisine de sahiptir. Elektromanyetik ışımanın interferans (girişim) ve difraksiyon (kırınım) davranışları dalga özelliği gereğidir. Işımanın tanecik özelliği (foton) ile, metal yüzeyinden yansıma ile elektronların koparılması (fotoelektrik olay), ışıma enerjisinin bir madde tarafından absorpsiyonu (soğurulması) ve emisyonu (yayılması) olayları açıklanır.

Ultraviyole ve görünür absorpsiyon spektroskopisinde molar absorbtiviteler genellikle 0-105 aralığında değişir. Herhangi bir pikin ϵ değerinin büyüklüğü, taneciklerin yakalama kesitine ve bir enerji absorpsiyon geçişi olasılığı ile ilgilidir. ϵ ve bu parametreler arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\epsilon = 8.7 \times 10^{19} \text{ PA} \quad (1)$$

P geçiş olasılığını, A kesit hedef alanını (cm^2 olarak) gösterir. Tipik organik moleküller için alan elektron saçılması ve X-ışını çalışmaları ile yaklaşık olarak bulunabilir; yaklaşık değeri 10^{-15} cm^2 civarındadır. Geçiş olasılığı değeri ise sıfır ile bir arasındadır. Kuantum mekaniğinin izin verdiği geçişler de P değeri 0.1-1 arasındadır ve kuvvetli absorpsiyon bandları elde edilir. Molar absorbtiviteleri 10^3 'den küçük olan pikler düşük şiddetli pikler olarak sınıflandırılır. Bunlar, oluşum olasılıkları 0.01'den daha küçük olan yasaklanmış geçişlerden kaynaklanır.

Ultraviyole veya görünür ışının absorpsiyonu, genellikle bağ elektronlarının uyarılmasıyla gerçekleşir; bunun sonucu olarak da, analiz edilen maddede bulunan bağların türleri ile ilişkili dalga boylarında absorpsiyon pikleri elde edilir. Absorpsiyon spektroskopisi bu yönüyle bir moleküldeki fonksiyonel grupların teşhisinde ve absorpsiyon bandları bilinen bileşiklerin kantitatif analizlerinde de yaygın bir şekilde kullanılır.

Elektronik geçişleri üç grupta sınıflayabilir ve analiz edilecek maddenin durumunu bu temele göre incelemek uygun olabilir. Üç elektronik geçiş;

- 1. π , σ , ve n elektronları,
- 2. d ve f elektronları,
- 3. yük-transfer elektronları olarak sınıflandırılabilir.

π (pi) elektronlar: Pi elektronları çift bağlarda veya üçlü bağlarda bulunur; σ (sigma) bağlardan daha zayıftır.

σ (sigma) elektronlar: Bu elektronlar tek veya σ bağlarda ve çoklu bağlarda (çift veya üçlü bağlar) bulunur, bir çoklu bağın en kuvvetli elemanıdır.

n (non-bonding, bağlanmamış) elektronlar: Bu türdeki elektronlar bağ oluşturmaya meyilli değildir; bu yüzden bunlara serbest elektronlar denir.

Daha yüksek enerji seviyesine uyarılabilen valens (değerlik) elektronlar içeren bütün organik bileşikler elektromagnetik ışını absorblarlar. Tek bağ yapan elektronların uyarılma enerjileri oldukça yüksektir bu nedenle elektronların ışını absorblaması, atmosferdeki bileşiklerin de kuvvetli absorbsiyon yaptıkları $\lambda < 185$ nm'nin altındaki vakum ultraviyole bölgede gerçekleşir. Vakum ultraviyole bölgede çalışmaların gerçekleştirilmesi oldukça çok zordur; bu sebeple, organik bileşiklerin spektrofotometrik analizlerinin çoğu 185 nm'den yüksek dalga boylarında yapılır. Yüksek dalga boylarındaki ultraviyole ve görünür ışınla çalışmalar, "kromoforlar" denilen, ve uyarılma enerjileri oldukça düşük olan fonksiyonel gruplarla sınırlandırılmıştır.

Organik moleküllerdeki kromoforların elektronik spektrumları genellikle karmaşıktır. Bu gibi durumlarda titreşim geçişleri elektronik geçişlere göre daha baskındır ve bazı bandların üst üste düşmesine neden olurlar; böylece, geniş ve sürekli absorbsiyon bandları elde edilir.

Bir organik moleküldeki ışını absorblayabilmesine olanak sağlayan elektronlar iki grupta sınıflandırılabilir:

- 1. Atomlar arasında bağ oluşturan ve bu nedenle birden fazla atoma bağlı olan elektronlar.
- 2. Oksijen, halojenler, S ve N gibi atomlar etrafında yerleşmiş (lokalize) ve başka bir atomla paylaşılmamış veya bağ yapmamış olan elektronlar.

Kovalent bağ oluşturan elektronlar, iki atomik merkezin bulunduğu bir alanda hareket ederler ve bu merkezler arasındaki coulomb itme kuvvetini düşük düzeye düşürürler; bunu sonucu kovalent bağ oluşur. Bağ elektronlu atomların arasında bulunan (non-lokalize) alana "moleküler orbitaller" denir ve bu orbitaller atomik orbitallerin üst üste gelmeleriyle oluştuğu kabul edilir. İki atomik orbitalin birleşmesiyle düşük-enerjili bir "bağ moleküler orbitali" veya yüksekenerjili bir "anti-bağ moleküler orbitali" meydana gelir.

Organik moleküllerdeki çift bağ bölgeleri çift bağlı elektronu gösteren bir sigma (σ) orbitali ve diğer bir çifti gösteren bir pi (π) orbitali olmak üzere iki tip moleküler orbital içerir: Pi orbitalleri atomik p orbitallerinin paralel olarak üst üste gelmesiyle oluşurlar. Bu orbitallerin yük dağılımları, bağın bulunduğu eksenenden geçen "hareketsiz

düzlem (düşük-yük yoğunluğu bölgesi) ile bu düzlemin üstünde ve altındaki bölgelerdeki maksimum yoğunlukla açıklanır.

σ ve π elektronlarından farklı olarak birçok organik bileşik serbest elektronlar içerirler. Bu bağ yapmamış elektronlar n sembolü ile gösterilir.

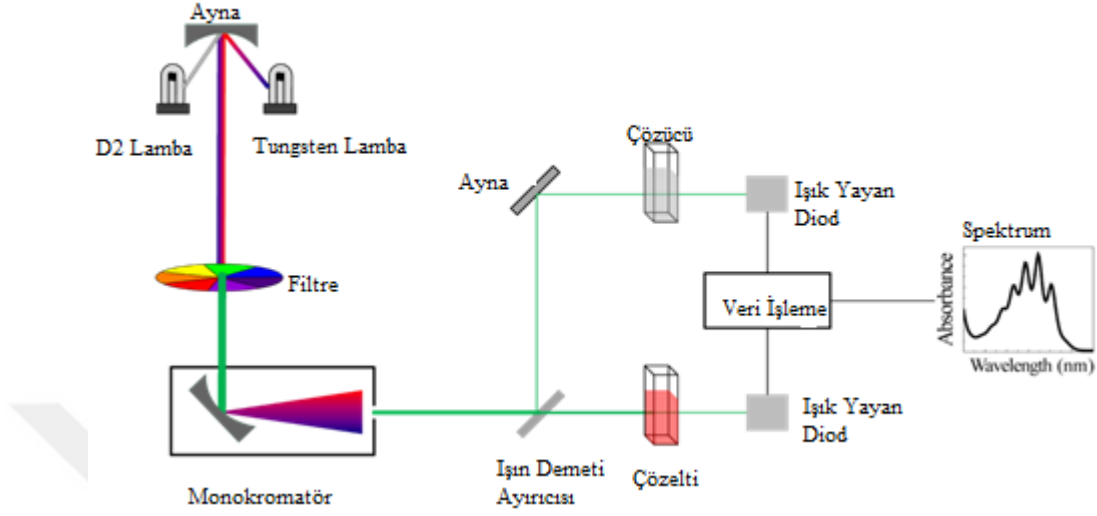
Bazı moleküler orbital tipleri için gerekli olan enerjileri birbirinden önemli derecede farklıdır. Serbest bir elektronun enerji seviyesi, bağ ve anti-bağ π ve σ orbitalleri arasındadır.

Bazı $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow \pi^*$ enerji seviyeleri arasındaki elektronik geçişler, ışının absorpsiyonu ile gerçekleşir.

Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler spektrofotometre olarak adlandırılırlar. Bir spektrofotometre düzeneği, genel olarak ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi (monokromatör), dedektörden oluşur; dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür. Bu ana kısımlara ek olarak bir spektrofotometrede ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek, ve örnek

üzerine belli bir şiddette gönderebilmek için mercekler, aynalar, ışık bölücüleri, giriş ve çıkış aralıkları kullanılır. Analiz edilecek çözelti, kullanılan dalga boyu bölgesinin özelliğine göre ışığı geçirebilecek maddeden yapılan örnek kaplarına (küvet) konularak ışık yoluna yerleştirilir. UV-görünür bölgede yapılan bir analiz için D₂, W, H₂, Xe, civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde (Şekil 2.2), monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünür ve biri örneğe diğeri ise içinde sadece çözücünün bulunduğu numune küvetine gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle aynı zamanda algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyaller bir biriyle oranlanır. Bu oran sonucu örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. Buradaki önemli nokta, her iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali dedekte edebilmesi gerekir.

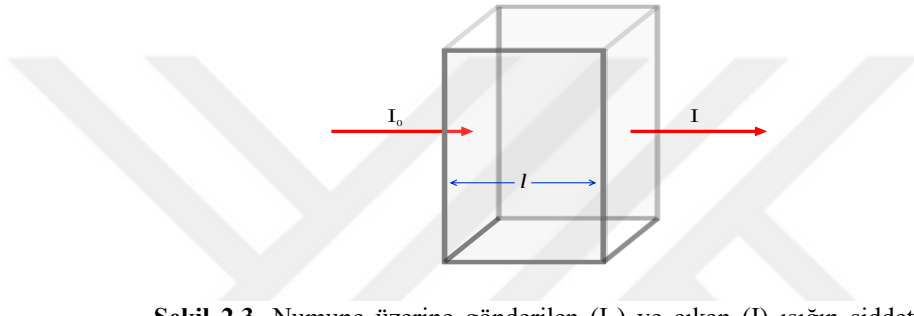


Şekil 2.2. Çift ışın yollu spektrofotometrenin şematik gösterimi.

Spektrofotometre ile bir maddenin nicel analizinin yapılacağı dalga boyuna karar verebilmek için, örneğin absorpsiyon spektrumu bilinmesi gerekir. Bunun için, maddenin 1 molar çözeltisinin belirli bir dalga boyu aralığındaki spektrumu çizdirilir. Çözücünün ve çözeltide bulunan başka türlerin ışığı absorplamadığı, Lambert-Beer eşitliğine uyulduğu ve nicel analizin en duyarlı bir biçimde yapılabileceği dalga boyu değeri saptandıktan sonra analizi yapılacak maddeyi içeren ve derişimleri bilinen standart çözeltiler ile bu dalga boyundaki absorbans (A) değerleri ölçülür. A değerlerine karşı, standart çözeltilerin bilinen derişimleri grafiğe geçirilir. Elde edilen bu doğruya kalibrasyon eğrisi denir. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu bölgede nicel analiz hesabı yapılır. Derişimi hesaplanamk istenen örneğin A değeri ölçülür ve kalibrasyon eğrisinde bu değere karşılık gelen derişim interpolasyonla saptanır. Lambert-Beer eşitliğinin analizde doğrudan kullanılması molar absorpsiyon katsayısının değerinin bilindiği durumlarda mümkündür.

$$\text{Absorbans (A)} = \epsilon \times C \times l \quad (2)$$

Bu eşitliğe göre, bir ortamdan geçen ışığın absorpsiyonu, konsantrasyon ve ışığın geçtiği yol ile doğru orantılıdır. Lambert Beer Kanunu'na uyan maddeler için spektrofotometride ölçüm yapılabilir. Bir çözeltiden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içinde kat ettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı iken absorplanan ışık miktarı ile de doğru orantılıdır.



Şekil 2.3. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti (l =ışığın numune içinde aldığı yol)

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

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

2.2.2. Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (AYBSK) bir kromatografik yöntemdir. Kromatografinin temeli genel bir tanımla, karışımında bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması olarak ifade edilebilir.

Kromatografi, ilk kez Rus botanikçi Mikhail Tsvet (1903) tarafından geliştirilen bir ayırma yöntemidir. Tsvet bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanmıştır. Kullandığı kolonda renkli bandlar oluştuğundan, bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermiştir. Analiz edilecek maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, molekül ağırlığı veya polaritesinin farklı olması sebebiyle değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır.

Kromatografi üç sınıfa ayrılabilir. Bunlar;

- Ayrılma Mekanizmalarına Göre
- Uygulama Biçimine Göre
- Faz Tiplerine Göre

Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografik Yöntemler:

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Partisyon kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Boyut eleme kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

Uygulama Biçimine Göre Kromatografik Yöntemler:

- Düzlemsel kromatografi
Kağıt kromatografisi
İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
Gaz kromatografisi (GC)
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Faz Tiplerine Göre Kromatografik Yöntemler:

- Sıvı kromatografisi
Sıvı-Katı kromatografisi
Sıvı-Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
Gaz-Katı kromatografisi
Gaz-Sıvı kromatografisi

Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografi :

Adsorpsiyon Kromatografisi

Analiz işleminde ayrımı yapılacak bileşenlerin sabit katı faz üzerinde tersinir olarak adsorblanmaları esasına dayanır. Burada hareketli faz, sabit faz olan adsorban üzerinde sıvı olarak hareket eder. Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan farklı derecede ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti büyük olan bileşen yüzeyde daha uzun kalırken, küçük olan daha kısa sürede kalmakta, hiç adsorplanmayan bileşen ise doğrudan kolondan hareketli faz ile taşınarak dışarı çıkmaktadır. Yüzeye adsorplanan bileşenler ise yüzeye etkileşmelerine bağlı olarak farklı alıkonma sürelerinde kolonu terk ederek detektöre ulaşırlar.

Adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz olarak adsorplama yapabilecek bir katı kullanılır. En çok kullanılan yüzeyleri polar sabit fazlar alümina ve silikajeldir.

İyi bir sabit faz;

1. Ayrılması gereken maddeleri parçalamamalı,
2. Ayrılması beklenen maddeler ile kimyasal reaksiyon vermemeli,
3. Adsorpsiyon kapasitesi yüksek olmalı,
4. Adsorpladıkları maddeleri kolaylıkla geri vermelidir.

Adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz olarak genellikle polar katılar kullanıldığından, hareketli faz olarak apolar veya çok az polar sıvılar kullanılır; benzen, oktan, kloroform gibi. Ayrılacak bileşenin sabit fazla etkileşmesi dipol-dipol etkileşimleri, Van Der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları sonucunda gerçekleşir. Adsorpsiyon kromatografisi, polaritesi farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında son derece iyi sonuç verir.

İyi bir hareketli faz;

1. Sabit fazın özelliklerini değiştirmemeli,
2. Örnekteki bileşenlerin hepsini çözmeli,
3. Düşük viskozitede olmalı,
4. Ekonomik ve istenen saflıkta kolayca bulunabilir olmalıdır.

Partisyon (Dağılma) Kromatografisi

Kromatografinin bu türünde ayrılacak bileşenin, katı üzerindeki durgun sıvı ile çözücü arasındaki dağılma oranı ayrılmanın miktarını belirler. Bu durumdan dolayı dağılma kromatografisi olarak da adlandırılır. Destek katısı üzerine kaplanan bir sıvı sabit fazı oluştururken, diğer sıvı da hareketli fazı oluşturur: Bu Kromatografi, bu iki sıvı fazda çözünürlüğü farklı olan tüm bileşenlerin ayrımı gerçekleştirilir. Kromatografik ayırma, bileşenin iki fazdaki dağılma oranına göre gerçekleşir. Burada sabit faz ve hareketli faz karışmamalı ve birbirlerini çözmemelidir. Durgun fazda yani sabit fazda çözünürlüğü yüksek olan bileşenler kolonda uzun süre alıkonulurken, çözünürlüğü düşük olanlar daha kısa süre alıkonulur. Sabit faz, ayrılacak bileşen için iyi bir çözücü, fakat hareketli faz için kötü bir çözücüdür; yani iki fazın polarlıkları farklı olmalıdır. Hareketli fazın durgun fazdan daha az polar olduğu sistemlere normal faz kromatografisi; tersi duruma ters faz kromatografisi olarak adlandırılır.

Fiziksel olarak destek katısı üzerine tutturulmuş durgun sıvı, taşıyıcı sıvı tarafından kolayca sürüklenip götürülebilir (kolon kanaması) ve destek katısı üzerindeki durgun fazın miktarı zamanla değişir. Bunun sonucu olarak kolonlarla yapılan ayırmaların, tekrarlanabilirliği az olmakta, kolon kısa zamanda kullanılamaz duruma gelmektedir. Bunu önlemek için sabit faz katı destek üzerine kimyasal olarak bağlanmaktadır. Böylece kolonların ömrü uzun olmakta ve tekrarlanabilir ayırmalar gerçekleşmektedir.

İyon Değiştirme Kromatografisi

Numunedeki bileşenlerin ayrımı, maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricideki iyonik grupların eşdeğer miktarlarının karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır.

Bu kromatografi türü, çözeltide bulunan iyonların, ters yüklü destek katısı iyonları ile etkileşimlerini baz alan bir ayırmaya dayanır. Durgun fazın özelliği zayıf ya da kuvvetli, katyon ya da anyon değiştirici bir reçine olmasıdır. Reçinenin sabit yükü (-) olduğu durumlarda ‘katyon değiştirici reçine’, (+) olduğu durumlarda ise ‘anyon değiştirici reçine’ adı verilir. Reçinenin analiz sırasında tamamen iyonlaşmış olması gerekmektedir. Hareketli faz ise genellikle tamponlanmış: istenen iyonların oluşmasına olanak sağlayan belli bir pH değerinde olan ve yükü katının sabit yükünün tersi olan ‘zıt iyonu’ içeren sulu çözeltilerdir. Yükü, hareketli fazın zıt iyonları ile aynı olan iyonik yapıdaki örnek bileşenleri katıya bağlanmak için hareketli faz ile yarışır. Zıt iyonu yerinden ederek katıya kuvvetle bağlanan –uygun yükteki- bileşenler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıfça bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler ise kolonu çabuk terk eder.

İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır.

Boyut Eleme Kromatografisi

Kromatografinin bu türünde, molekül ağırlıklarına göre proteinleri birbirinden ayırmada en yaygın kullanılan ve en etkili yöntem, jel filtrasyon kromatografisidir. Bu kromatografinin temelinde duran faz, polimer yuvalarına su emdirilip oluşturan bir jel, yürüyen faz sıvıdır. Bu yöntemde bir kolona kuvvetli hidratize olmuş polimer materyal konulur. Bu materyal polisakkarit veya poliakrilamid türevi olabilir. Bu jel partikülleri değişik büyüklükte gözeneklere sahip olacak şekilde hazırlanabilir.

Polimer materyal yıkanır, tamponla dengelenir ve sonra aynı tampon içinde çözünmüş olan protein karışımı kolondan geçirilir. Büyük moleküllü proteinler jel partiküllerinin porlarına giremeyecekleri için hızlıca yürürler. Küçük moleküllü proteinler, porlara girerler ve akışları engellenir. Böylece toplama kabında önce büyük moleküllü proteinler, daha sonra da küçülen molekül büyüklüğüne göre proteinler toplanırlar.

Bu işlem süzme işleminin tersidir. Elde edilen ayrılmış maddeler küçük fraksiyonlar halinde toplanarak, gerekli analizler yapılır.

Katı faz, kimyasal olarak inert olması gerekir ve bir jel ya da gözenekli bir organik bileşiktir. Hareketli faz ile katı gözenekleri doldurulmuştur. Ayırma, örnek bileşenlerinin molekül ağırlıklarına göre olur. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleküllü bileşenler, kolonda uzun süre kalırken, büyük moleküllüler ise daha kısa süre kalırlar.

Afinite Kromatografisi

Bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisi saflaştırılması istenen molekülün matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligant) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Diğer tekniklerle, saflaştırılması birçok basamak ile mümkün olan, daha fazla uğraş gerektiren hatta ayrılması mümkün olmayan birçok materyal, afinite kromatografisi tekniği ile tek bir basamakta daha yüksek bir saflaştırma kat sayısı ile saflaştırılabilecek güçtedir.

Afinite kromatografisinde başarılı bir ayırım yapabilmek için, öncelikle biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç duyulmakta ve bu işlem için immobilize edilen ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalı ve safsızlıklardan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir metot bulunması başta gelen gerekliliklerdir.

Afinite kromatografisinin gücü spesifik etkileşmelere bağlı olmasından dolayı kullanılan jelin (matriks) oldukça yüksek ve spesifik bir adsorbsiyon göstermesi gerekir. Ayrıca jelin; yüksek ve düşük pH gibi değişik şartlara dayanıklı olması gerekmektedir. Afinite kromatografisi için seçilecek ligandın iki önemli özelliğe sahip olması beklenir. Birincisi, ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi ise, ligandın bağlama afinitesini bozmadan matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Afinite kromatografisi için kullanılacak ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahip ise bu ligandın matrikse bağlandığı bölgede önemlidir. Bu bağlanma ligandın saflaştırılacak molekülle en düşük

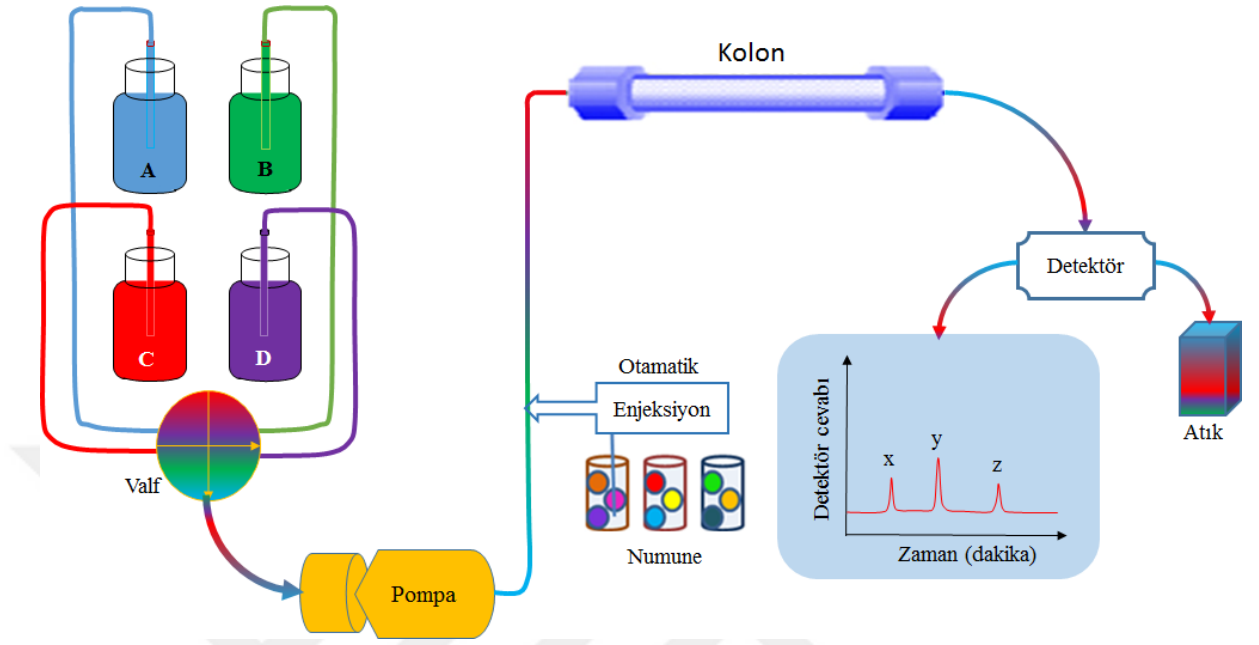
ihhtimalle spesifik etkileşme verecek grup ile matriks arasında yapılmalıdır (Cuatrecasas ve ark., 1968).

AYBSK sabit fazın polaritesine göre iki'ye ayrılır;

- 1- Normal Faz Sıvı Kromatografisi: Polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli faz.
- 2- Ters Faz Sıvı Kromatografisi: Sabit fazın apolar, hareketli fazın ise polar olduğu kromatografidir.

Ters faz kromatografisinin avantajları;

- 1- Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir.
- 2- Dengeye ulaşma normal faz kromatografide daha yavaştır.
- 3- Normal faz kromatografide polar maddelerin ayrımı çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.
- 4- Apolar çözücülerin maliyeti yüksektir, ayrıca nemden uzak tutmak zordur.



Şekil 2.4. Aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) cihazının şematik gösterimi.

Şematik olarak gösterilen bir UPLC cihazı temel olarak, hareketli faz haznesi, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur.

2.2.3. Kromatografide Temel Parametreler

Alıkonma zamanı ve Kapasite Faktörü

Numune enjeksiyonundan sonra analitin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı (t_R) denir. Alıkonma zamanı terimi yerine alıkonma hacmi de (V_R) kullanılmaktadır. Bir maddenin alıkonma hacmi, alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızından (F) hesaplanabilir. Alıkonma hacminin genel tanımı bir bileşenin sabit fazdan ayrılması için gerekli olan hareketli faz hacmi olarak yapılabilir (3).

$$V_R = t_R F \quad (3)$$

Alıkonma hacmi, temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı K ile doğru orantılı olup aşağıdaki gibi formülize edilir;

$$V_R = V_M + K V_S \quad (4)$$

Bu eşitlikte kolondaki hareketli faz hacmi V_M , kolondaki sabit faz hacmi ise V_S 'dir. Çözünün sabit fazdaki molar derişiminin (C_S), hareketli fazdaki molar derişimine (C_M) oranlanı dağılım katsayısı (K) 'yı verir (5).

$$K = C_S / C_M \quad (5)$$

Kapasite faktörü (k') olarak da tanımlanabilen bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim (V_0) terimini içerecek biçimde tanımlanabilir. ve kapasite faktörü eşitlik (6)'da verilmiştir.

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (6)$$

Elüsyon sırasında hacimsel akış hızı (F) sabitse formül;

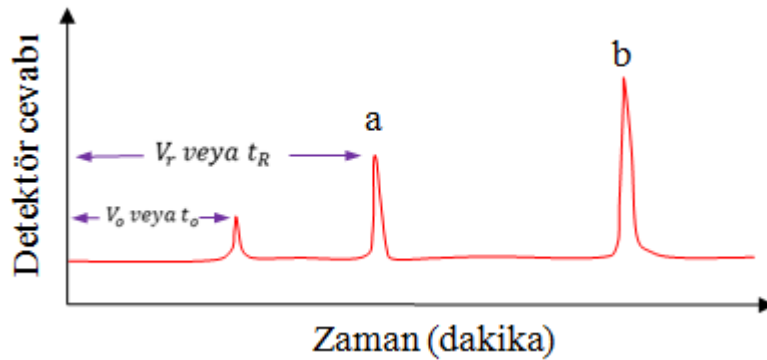
$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (7)$$

biçiminde yazılabilir. Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler ölü hacim veya boş hacimde (V_0) elüe edilirler. Eşitlik(6) ve (7)'de V_0 ve t_0 sırasıyla ölü hacim ve ölü zaman olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.5).

Kapasite faktörü, maddenin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım katsayısına bağlıdır.

$$k' = K V_s / V_m \quad (8)$$

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Bir kromatografik ayırimda hesaplanan kapasite faktörü değerinden faydalanarak ayırım hakkında bilgi sahibi olunabilir. İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1 ile 10 arasında olması gerekmektedir.



Şekil 2.5. Kromatogram üzerinden kapasite faktörünün hesaplanması.

Seçicilik

Bir karışımdaki iki maddenin ayırımını değerlendirmek için kullanılır. A ve B bileşenli bir karışımda seçicilik faktörü (α), her iki bileşenin kapasite faktörü oranına eşittir.

$$\alpha = k'B / k'A \quad (9)$$

$k'B$: Alıkonma zamanı uzun olan maddenin kapasite faktörü

$k'A$: Alıkonma zamanı kısa olan maddenin kapasite faktörü

Bu tanıma göre, α daima 1'den büyüktür. Seçiciliği etkileyen ana faktör sabit fazdır. Hareketli fazın bileşimi ve az da olsa sıcaklık da seçiciliği etkiler.

Kolon Etkinliği

Kolon etkinliğinin tanımlanmasında, teorik tabaka yüksekliği H ve teorik tabaka sayısı N terimleri kullanılmaktadır. Bu iki terim arasındaki ilişki aşağıdaki (10) numaralı eşitlikte verilmiştir

$$N = L / H \quad (10)$$

L : Kolon dolgu uzunluğu

Teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça kromatografik kolonun etkinliği artar. Kolon etkinliği; kolon tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve

akış hızına bağlı olarak değişmektedir. Teorik tabaka sayısını elde edebilmek için aşağıdaki formül kullanılabilir:

$$N = 16 (t_R/W)^2 \quad (11)$$

t_R : Alıkonma zamanı

W : Pik zemininin genişliği

Eğer pik genişliğinin ölçülmesinde $W_{1/2}$, yani yarı yükseklikteki pik genişliği kullanılırsa N değeri hesabında oluşabilecek hatalar en aza indirilmiş olur. Bu durumdaki teorik tabaka sayısı aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$N = 5.54 (t_R/ W_{1/2})^2 \quad (12)$$

1950’li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi olan Van Deemter’in kromatografik kolondaki ayırma prensibine matematiksel yaklaşım için aşağıdaki eşitliği bulması ile başlamıştır eşitlik (13).

$$H = A + B/u + Cu \quad (13)$$

H : Teorik tabaka yüksekliği (cm)

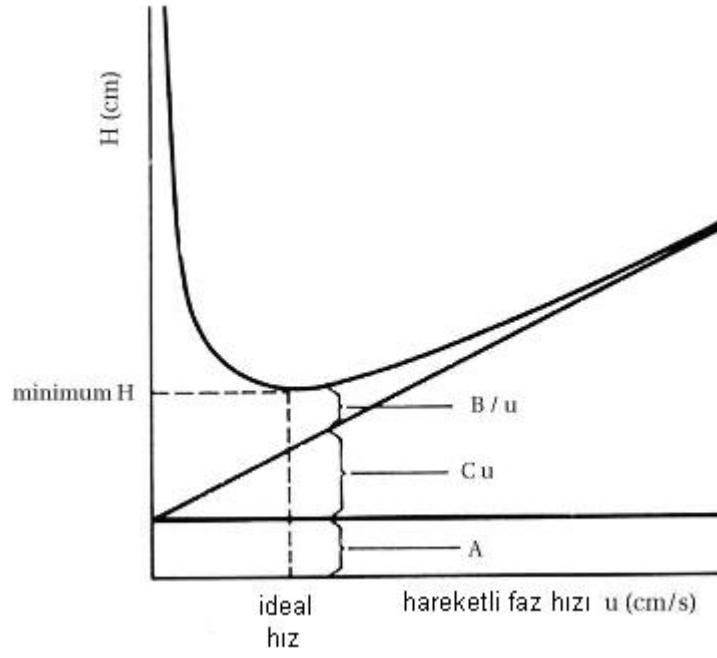
A : Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B : Boyuna difüzyon

C : Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u : Çizgisel hız

Bir kromatografi kolonunun verimli çalışması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının belirlenmesi gereklidir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği arttırılabilir. Eşitlik 13'teki akış hızından bağımsız olan A değeri, madde moleküllerinin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeniyle artar. Madde moleküllerinin farklı uzunluktaki yolları izlemeleri kolondaki ilerleme hızlarının farklılaşmalarına neden olur. Bütün moleküllerin kolonun sonuna ulaşması sonucu bantta genişleme meydana gelir ve eddy difüzyonu olarak adlandırılır. Kolon dolgu maddesi tanecik çapı azaldıkça A'nın değerinde küçülme gözlenir. Formüldeki boyuna difüzyon terimi (B), genellikle düşük akış hızlarında önem kazanır. Bu terimin önemi, bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri arttıkça artar. Kolon sıcaklığının azaldıkça B'nin değeri de küçülür. B'nin değeri, kolona basınç uygulayarak da azaltılabilir. Formülün üçüncü terimi yüksek akış hızlarında önemli olan kütle aktarımı terimidir. Akış hızı arttıkça bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengelerine ulaşabilmeleri için gereken süre azalır ve dolayısı ile dağılma dengesine tam olarak ulaşamaz. Bu terimdeki C değerinin hareketli sıvı fazın viskozitesi ile doğru, kolon sıcaklığının ile ters orantılıdır. C değeri, sabit faz ince bir sıvı film ile kaplıysa bu filmin kalınlığı ile de ters orantılıdır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Van Deemter eğrisi.

Ayırıcılık

Kromatografide amaç karışım içindeki maddeleri ayırmaktır. Ayırıcılık terimi (R_s) bu amacın ne derecede gerçekleştiğinin bir ölçütüdür. Ayırıcılık teorik tanım olarak, alıkonma zamanları arasındaki farkın ortalama pik genişliğine oranıdır (14).

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2) \quad (14)$$

$R_s = 1.5$ olması halinde iki pik birbirinden tamamen ayrılmış sayılır. Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın 1.5’den büyük ($R_s \geq 1.5$) olması önerilir.

Eşitlik 15'e göre ayırıcılığı etkileyen üç faktör; seçicilik (α), tabaka sayısı (N) ve kapasite faktörü (k')'dür.

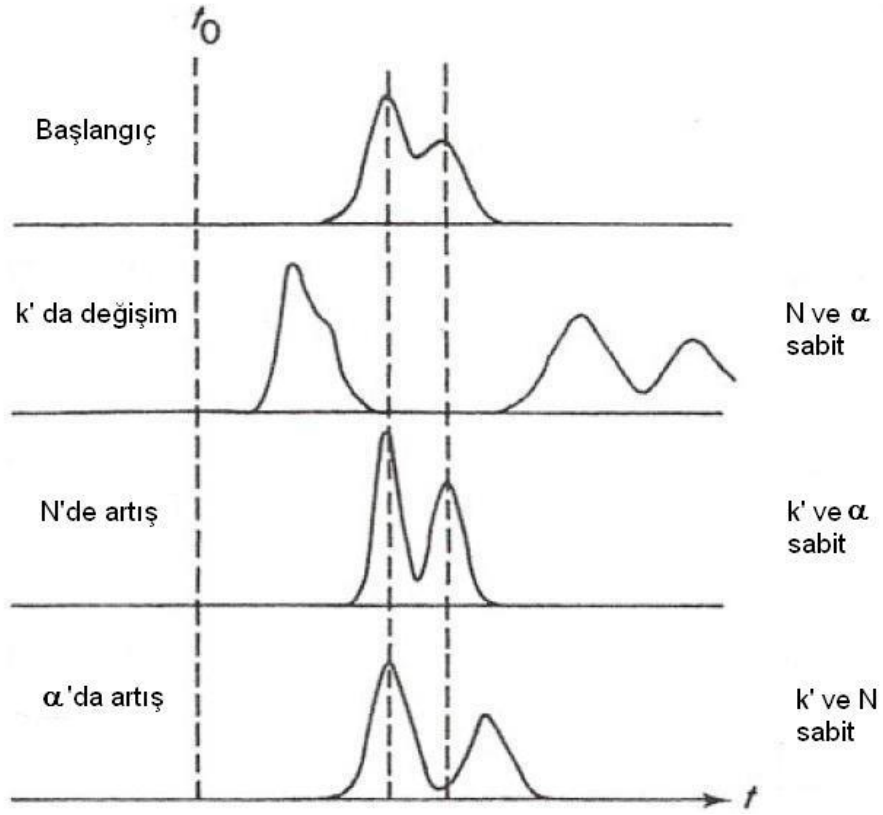
$$R_s = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad (15)$$

Seçiciliğin Ayırıcılık Üzerine Etkisi: Eşitlik 15'e göre, seçicilik arttıkça ayırıcılığın artması beklenir. Ancak seçiciliğin belli bir değerden sonra artması ayırıcılıkta çok fazla bir değişme yaratmaz (Şekil 2.7). Seçicilik 1'e eşit olduğu zaman iki madde arasında termodinamik olarak bir fark yoktur ($K_1 = K_2$) ve dolayısıyla ayırım da gerçekleşmez. Bu nedenle kromatografik bir ayırımın başarılabilmesi için seçiciliğin 1'den büyük olması gerekir.

Kapasite Faktörünün Ayırıcılık Üzerine Etkisi: Kapasite faktörünün (k'), ayırıcılığa etkisi Şekil 2.5'te verilmiştir. Grafikten de anlaşılabacağı gibi $k' = 0$ olduğunda ayırım yoktur, ayrıca k' değeri arttıkça $k' / (k'+1) \rightarrow 1$ 'e yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın ayırıcılığa etkisi kalmaz. k' değerini daha fazla arttırmak sadece alıkonma zamanını arttırır. Optimum k' değerleri 1-10 arasındadır.

Etkinliğin Ayırıcılık Üzerine Etkisi: Etkinlik faktörü; akış hızı, kolon uzunluğu veya dolgu maddesinin tanecik boyutu ile değişir. Ayırıcılık, N'nin karekökünün bir fonksiyonu olduğu için N'deki büyük artışlar ayırıcılıkta küçük değişiklikler meydana getirir. Etkinlik arttıkça ayırıcılık artar ve dar pikler elde edilir.

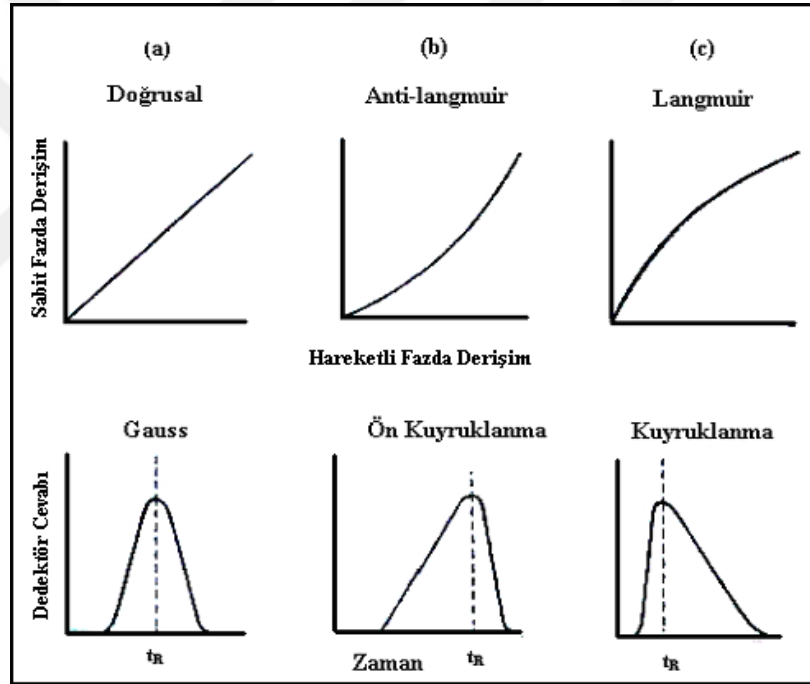
Şekil 2.7, kapasite faktörü, etkinlik ve seçiciliğin değiştirilmesinin kromatograma etkilerini göstermektedir.



Şekil 2.7. Kapasite faktörünün, etkinliğin ve seçiciliğin kromatogramüzerine etkisi.

Pik Simetri Oranı

Analiz edilen maddenin sabit fazdaki denge derişimi (C_s), hareketli fazdaki denge derişimine (C_m) karşı grafiğe geçirilirse izoterm eğrileri elde edilir. Şekil 2.8 a'daki izoterm doğrusal olup eğimi dağılım katsayısını (K) verir. Bütün C_m değerlerinde K sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir.



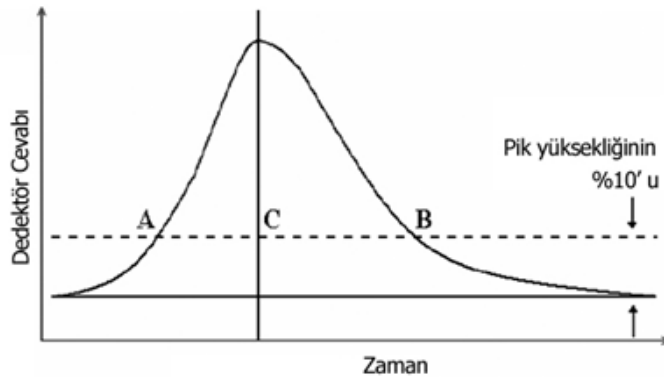
Şekil 2.8. Temel üç izoterm şekilleri ile alıkonma zamanı ve pik şekline etkileri.

Dışbükey izoterm (Şekil 2.8 b), kolonda fazla miktarda madde olduğunu gösterir. Bu durumda sabit fazdaki madde-madde etkileşimleri madde-çözücü etkileşimlerinden daha baskındır. Bu durum K değerinin artmasına ve doğrusal olmayan izoterm elde edilmesine neden olur. Elüsyon eğrisinin önünde bir alan oluşur. Bu duruma ön kuyruklanma denir ve ayrılan maddenin alıkonma süresi derişimle artar.

Eğer moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz yüzeyinde bir katman oluşturacak biçimde tutuyorsa izoterm içbükey olur (Şekil 2.8 c) ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması görülür, böylece artan madde derişimiyle alıkonma zamanı azalır. Doğrusallıktan sapma nicel analizi güçleştirdiği ve alıkonma sürelerinin nitel analizde kullanımını engellediği için kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenir. Pik simetrisinin belirlenmesi için pik asimetri oranının hesaplanması, madde elüsyon pikinin çan (Gauss) eğrisi olup olmadığının denetlenmesi açısından önemlidir. Pik asimetri oranı (As);

$$As = (CB / AC) \quad (16)$$

olarak verilir. CB ve AC uzunlukları Şekil 2.9’de tanımlanmıştır. Tam simetrik bir pik için $As = 1$ ’dir. Pratikte 0.9-1.4 arasında As değerleri kabul edilmektedir (Hamilton ve Sewell, 1982; Snyder ve ark., 1988; Krstulovic ve Brown, 1982).



Şekil 2.9. Pik asimetri oranının hesaplanması.

Genel olarak bir kromatogramda geç gelen pikler önce gelen piklere göre daha yayvan ve geniş olurlar. Alıkonma zamanının artması pik şeklinin bozulmasına neden olabileceğinden, bir pikin geç gelmesi istenen bir durum değildir. Böyle durumlarda pik şeklinde kuyruklanma da gözlenebilir. Alıkonma zamanının ne alınmasında hareketli faz bileşimi ve akış hızı değiştirilebilir ya da gradient elüsyon işlemi uygulanabilir.



2.2.4. Temel Bileşen Regresyonu (Principal Component Regression, PCR)

Temel bileşen regresyon kalibrasyonu, temel bileşen analizine (principal component analysis→PCR) dayanan çok değişkenli kalibrasyon yöntemidir. Temel bileşen regresyonu, ölçülen “X” değişkeninden seçilen temel bileşenler üzerinden “Y”nin regresyonu ile elde edilir.

PCR kalibrasyonu birden fazla bileşenin bulunduğu çok bileşenli karışımların analizinde gürültünün ve diğer belirsiz hataların etkilerini elimine ederek başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle son derece etkili bir yöntemdir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

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

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

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

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

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_0 \quad (19)$$

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

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

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

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

Herbir aşamada elde edilen değerler

$$C_{\text{sample}} = P_{k \times p} . A_{p \times q} \quad (22)$$

denklemden yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

2.2.5. Kısmi En Küçük Kareler (Partial Least Squares, PLS)

Kemometrik kalibrasyonlardan en yaygın ve popüler olanı kısmi en küçük kareler (Partial Least Squares → PLS) yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonalized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-orthogonalized PLS algorithm) gibi şekilleri vardır. Ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS algoritması arasındaki temel fark X den faktörlerin çıkarılmasındadır. PLS kalibrasyonunun PLS1 ve PLS2 şeklinde iki tipi söz konusudur. PLS1 de 1 bileşik model içerisinde iken; PLS2 de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir.

Wold ve Martens tarafından verilen PLS algoritması en genel olanlardandır. PLS1 regresyon, tek y-değişkeni için uygulanması farklı yazarlar tarafından değişik eşdeğer yollarla ifade edilmektedir. Bu PLS1 kalibrasyon algoritması, iki veya daha fazla y-değişken için doğrusal olmayan durumlarda düzleştirilmiş ilave gereksinimler ile modifiye edilmektedir. Eğer PLS sayı vektörlerinin ortogonal olması istenirse, bu durumda PLS için PCR ile karşılaştırılmasını yorumlamak son derece zordur. Ayrıca PLS kalibrasyon algoritmasında ilave ile gösterilen ağırlık yükleme vektörlerinin kullanımını içermektedir.

PCR algoritmasında olduğu gibi PLS algoritmasında da X' den işlemiyle ve y 'den işlemiyle elde edilmesiyle PLS kalibrasyonunun hesaplanmasına başlanır.

PLS kalibrasyon algoritması, ilk defa Svante Wold tarafından geliştirildi ve çalışma arkadaşları tarafından bilim dünyasına sunuldu. PLS algoritmasında faktör sayıları ortogonal olması nedeniyle ortogonal PLS olarak adlandırılmaktadır. Diğer taraftan

alternatif PLS algoritma Harald Martens tarafından geliştirildi (Martens ve Naes, 1989).Bu algoritma Martens ve Næs tarafından açıklandı. Bu yeni ortogonalize olmayan PLS algoritmasında hemen hemen yakın formüller kullanılsa da, matrisi kalibrasyon için kullanılmamıştır. Bu iki PLS algoritması arasındaki temel farklardan birisi de faktörlerin elde edilmesinden kaynaklanmaktadır. Ortogonalize PLS’ de $\hat{\mathbf{e}} = \mathbf{y}_{a-1} - \hat{\mathbf{t}}_a \hat{\mathbf{p}}_a$ iken ortogonalize olmayan PLS’de $\hat{\mathbf{e}} = \mathbf{x}_{a-1} - \hat{\mathbf{t}}_a \hat{\mathbf{w}}_a$ şeklinde faktör çıkarma işlemleridir.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (23)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \mathbf{Q}^T + \mathbf{F} \quad (24)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X} \mathbf{B} + \mathbf{F} \quad (25)$$

$$\mathbf{B} = \mathbf{W} (\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{Q}^T \quad (26)$$

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

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorpsiyon değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanır .

2.2.6. Deneysel Tasarım ve Optimizasyon

Deneysel tasarımlar, bilimsel bir araştırmaya yada endüstriyel incelemeye eşlik eden daha iyi deneylerin organize edilmesine olanak sağlar. Deneysel tasarımlar, bağımsız (x) ve bağımlı (y) değişkenler arasında büyük bir ilişki olduğu durumlarda birçok disiplin ve bütün endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Aşağıdaki biçimde bir fonksiyon dikkate alınırsa deneysel tasarımları düşünmek gerekir.

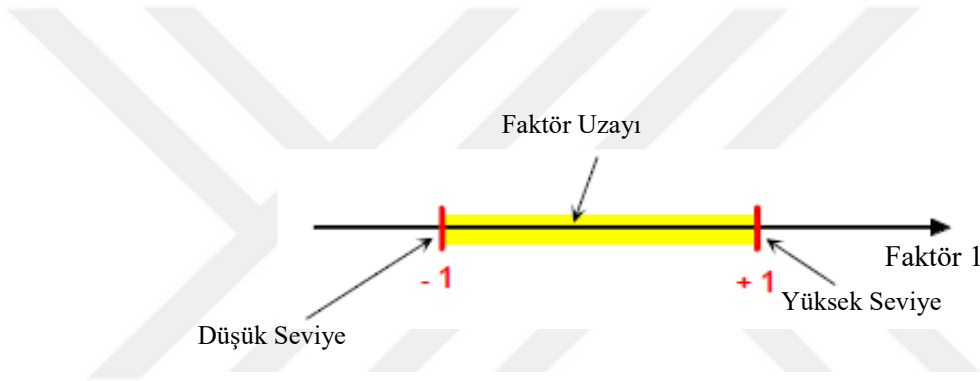
$$y = f(x_i) \quad (27)$$

Deneysel tasarımların kullanımıyla maksimum bilgi minimum deneylerle elde edilir. Bunun için matematiksel kuralları izlemek gerekir ve titiz bir yaklaşımı benimsemek gerekir. Bir araştırmacı tarafından karşılaşılan bütün durumlar için uygun tam faktöriyel tasarım, Box-Behnken, merkezi bileşenli tasarım ve kesirli tasarım gibi birçok deneysel tasarım vardır.

Deneysel tasarım planlarının yöntemlerinin uygulaması iki temel esasa dayanılır. Bunlardan birisi deneysel uzayın belirlenmesi ikinci ise incelenen değişkenlerin matematiksel modellemesidir.

2.2.6.1. Deneysel Uzak Kavramı

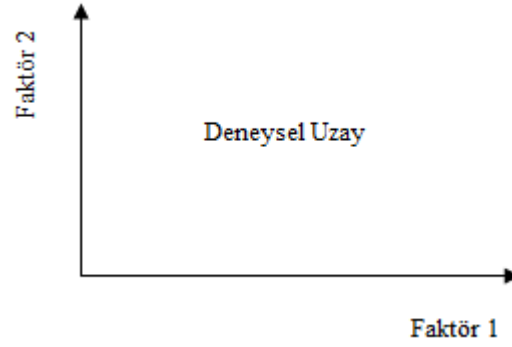
Bir araştımayı gerçekleştiren araştırmacı her deneyi ölçen bir değişkenle ilgilenir. Bu değişken (büyüklük) cevap olarak adlandırılır. Bu cevabın değeri bir çok değişkene bağlıdır. Deneysel tasarım ve optimizasyon terminolojisinde, değişken terimi yerine faktör kelimesi kullanılır. Bu cevap değişkeni, bir veya bir çok faktöre bağlı olacaktır. Bir faktör ölçülü bir eksen ile temsil edilebilir (şekil 2.10).



şekil 2.10. Faktörün alt seviyesi -1 ile st seviyesi +1 ile gösterilir. Faktörün değişim alanı düşük ve yüksek seviyeler arasını kapsayan bütün değerlerden oluşur.

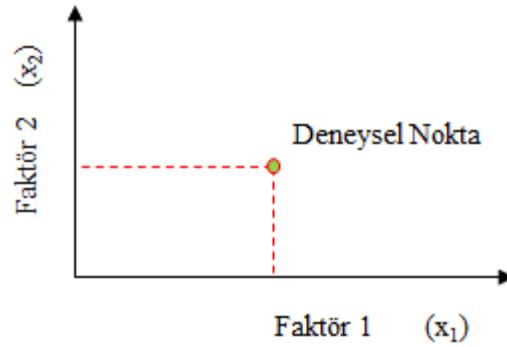
Düşük seviye ve yüksek seviye arasındaki faktörü kapsayabilen bütün faktörlerin hepsi faktörün değişim alanı veya basit olarak faktör alanı olarak adlandırılır. Sonra her zaman düşük seviye -1 ile yüksek seviye +1 ile gösterilir.

Eğer ikinci bir faktör varsa o da ölçülü ve yönlendirilmiş bir eksen ile temsil edilebilir. Birinci faktörde olduğu gibi ikinci faktörün de düşük seviyesi, yüksek seviyesi ve onun değişim alanı aynı şekilde tarif edilir. İkinci eksen birinci eksene dik olarak düzenlenmiştir. Böylece iki boyutlu klidyen “euclidean” uzayı olarak tarif edilen koordinat sistemi elde edilir. Bu uzay, deneysel uzak (alan) olarak adlandırılır (şekil 2.11)



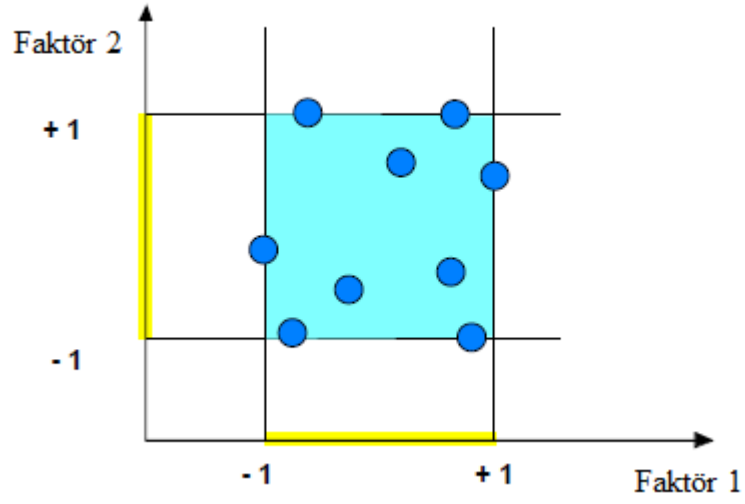
Şekil 2.11. Her faktör ölçülü ve yönlendirilmiş bir eksenle temsil edilir. Bu faktörlerin eksenleri kendi aralarında birbirine diktir.

Faktör 1'in seviyesi x_1 ve faktör 2'nin seviyesi x_2 , deneyisel uzayın bir noktasının koordinatları gibi dikkate alınır (Şekil 2.11). Öyleyse verilen deney eksenleri bu sistem içinde bir noktayla temsil edilebilir. Ayrıca deneylerin bir planı veri noktalarının kümesiyle temsil edilebilir.



Şekil 2.12 Deneyisel uzayda faktörlerin seviyeleri deneyisel noktalar ile tarif edilir.

Faktörlerin alanlarının gruplandırılması çalışma alanı ile tanımlanır. Bu çalışma alanı, deneyleri gerçekleştirmek için araştırmacı tarafından seçilen deneyisel uzayın bölgesidir. Bir araştırma, deneyisel alanındaki hareket noktaları ile temsil edilir (Şekil 2.12). Uzaklık koordinat sisteminde noktalar ile bir deneyin temsili, deneyin geometrik gösterimidir. Araştırmanın diğer bir gösterimi sonraki bölümde açıklanmaktadır.



Şekil 2.13. Deneysel noktalar bir araştırmacı tarafından tanımlanan inceleme alanında düzenlenir.

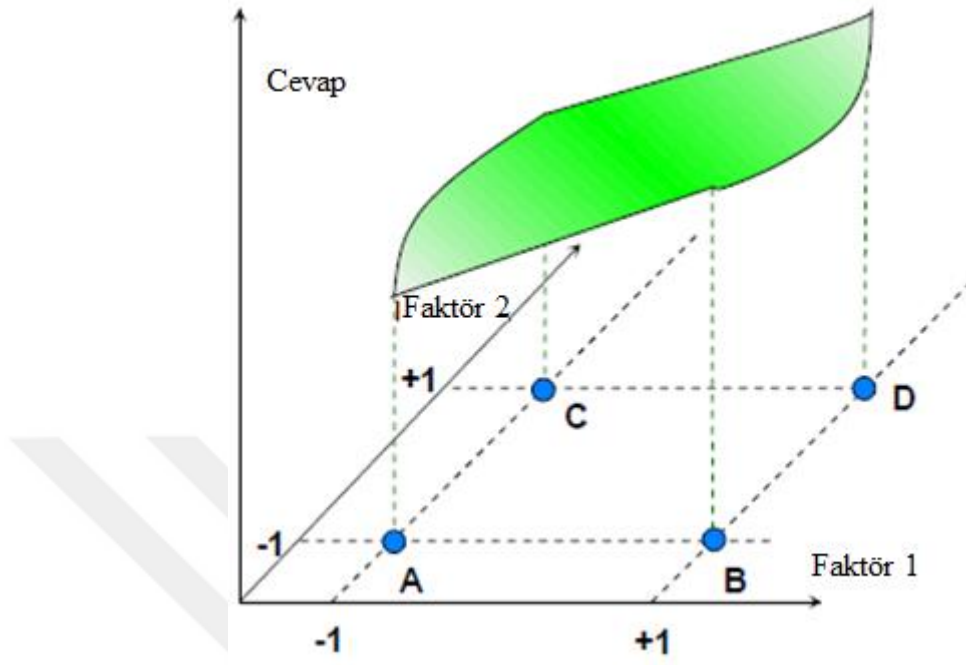
Daha önce yapılan tanımlar sürekli değişkenlere de uygulanabilir. Fakat değişkenlerin diğer çeşitleri de mevcuttur.

2.2.6.2. Cevap Yüzeyi Kavramı

Deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisinde, X_i seviyeleri deneysel bir noktanın koordinatları ile temsil edilir ve y değeri bu noktadaki cevabın değeridir. Bu nokta, deneysel uzaya dik olan bir eksen ile tanımlanır ve cevapla ilişkilidir. Deneysel tasarım ve cevabın geometrik sunumu deneysel uzaydan ziyade birden fazla boyuta sahip olan bir uzay gerektirir. İki faktörlü bir deneysel tasarım üç boyutlu bir uzayı kullanır. Şöyleki, cevap için bir boyut, iki faktör için de iki boyut kullanılır.

Çalışma alanının tüm noktalarının bir dizisi cevap yüzeyi adı verilen bir yüzey üzerinde lokalize olan cevapların tamamıdır (Şekil 2.14).

Deneysel noktaların sayısı ve konumu deneysel tasarımın temelini oluşturmaktadır. Deneylerin sayısının sınırlandırılması ise cevap yüzeyinin en iyi doğrulukla elde edilmek isteniyor olmasıdır.



Şekil 2.14. Çalışma alanının noktaları ile ilgili cevaplar cevap yüzeyini oluşturur.

Deneyisel tasarımın noktalarında ölçülen bazı cevaplar, yüzey cevabının denkleminin hesaplanmasına olanak tanır.

2.2.6.3. Matematiksel Modelleme Kavramı

Önce, faktörlerin cevabı ile ilgili bir matematiksel fonksiyon seçilir. Örneğin ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon aşağıdaki gibi sunulabilir.

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \dots + \sum b_{ii} x_i^2 + b_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z \quad (28)$$

Bu denklemden y , cevap veya ilgili büyüklüktür. Bu y değeri deney esnasında ölçülür ve belirli bir doğruluk ile elde edilir. x_i , bir deneyi gerçekleştirmek için araştırmacı tarafından bir i faktörü ile ilgili seviyeyi temsil eder. Bu değer tamamen bilinen bir değerdir. Aynı şekilde bu seviyenin hatasız bir şekilde tayin edildiği kabul edilir. b_0 , b_i , b_{ij} , b_{ii} bunlar katsayılarıdır. Önceden kabul edilen matematiksel modelin katsayılarıdır. Bunların değeri bilinmez ve deney sonuçlarından hareketle değerleri hesaplanır.

Bir tasarım ve optimizasyon işleminde faktörler ile cevabı modellemenin faydası, deneyleri yapmak zorunda kalmadan çalışmanın bütün cevaplarını hesaplayabilmektir.

2.2.6.4. Modelleme

Yukarıda açıklanan modele iki ekleme yapmak gerekir. Bunlardan birincisi uyum eksikliğidir. Bu ifadenin anlamı, incelenen olaya etki eden gerçek modelin daha önce önerilen bir modelden farklı olduğu gerçeğini yansıtmasıdır. Bu iki model arasında bir fark vardır. Bu fark uyum eksikliğidir. İkinci ekleme, cevabın rastgele yapısının dikkate alınmasıdır. Gerçekte aynı deneysel noktada cevabın birçok kez ölçülmesinde tamamıyla aynı sonuçlar elde edilememektedir. Sonuçlar bir değere etrafında saçılır. Bu saçılmalar deneysel hatalar olarak adlandırılır.

Bu iki gözlenen fark yani uyum eksikliği ve deneysel hata, çoğu zaman e ile ifade edilen model hatası içerisinde birleştirilir.

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \dots + \sum b_{ii} x_i^2 + b_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e \quad (29)$$

2.2.6.5. Denklemlerin Sistemi

Her bir deneysel nokta, bir cevap değerinin elde edilmesine imkan tanır. Bu cevap, katsayılarının bilinmediği ancak tayin edilmesi gereken bir polinom ile modellenir.

Deneysel tasarımın sonunda p bilinmeyenli n sayıda denklem sistemi elde edilir. Burada n deney sayısı, p modeldeki katsayıları gösterir. Bu sistem matris notasyonunda basit bir biçimde aşığıdaki gibi yazılır;

$$y = x_b + e \quad (30)$$

y cevap vektörü, x ise tasarımı ve ön modeli için seçilen deneysel noktalara bağlı matris, b katsayıların vektörü, e ise hataların vektörüdür.

Bu sistem denklem sayısından daha çok bilinmeyen sayısına sahiptir. Yani n denklem sayısı iken p+n kadar bilinmeyen söz konusudur. Bu denlem sistemini çözmek için en küçük karelere dayanan regresyon yöntemi kullanılır. Böylece katsayıların değerlendirilmesi yapılır. Bu hesabın sonucu;

$$b = (x'x)^{-1} x'y \quad (31)$$

x' matrisi x'in traspozudur. Birçok yazılım bu hesaplamayı gerçekleştirmede kullanılabilir ve katsayıların değerleri doğrudan bulunur. Aşığıdaki iki matris deneysel tasarım teorisine sürekli olarak katılır;

bilgi matrisi $x'x$

saçılma matrisi $(x'x)^{-1}$

Daha önce klasik deneysel tasarımlardaki notasyon ve özellikleri şimdi uygulayabiliriz.



2.2.6.6. İki Seviyeli Tam Faktöriyel Tasarım

Bu planlar (tasarımlar) her bir faktör için iki seviye ile sınırlıdır. Seviyelerin bütün kombinasyonları deney sırasında gerçekleştirilir. Bu tasarımlar sürekli değişkenler ve ayrık değişkenler için birbirinin yerine kullanılabilir.

İki Faktörlü Tasarım

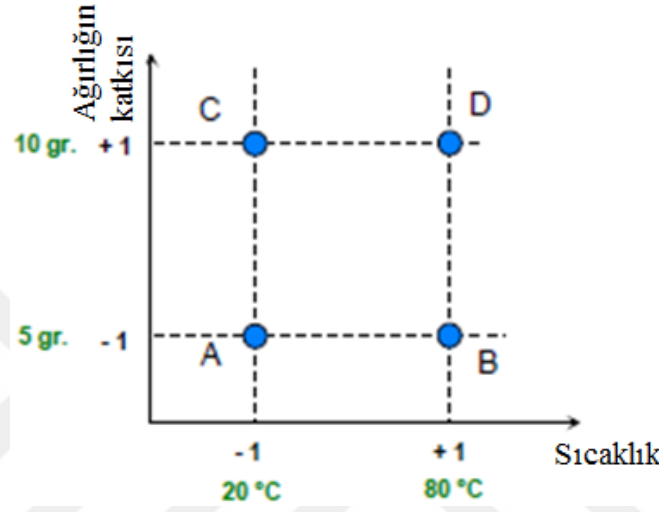
Bu tasarımlar her faktör için iki seviye ile sınırlıdır. Seviyelerin bütün kombinasyonları deney esnasında gerçekleştirilir. Yukarıda da ifade edildiği gibi bu tasarımlar, sürekli değişkenler ve kesikli ayrışık değişkenler için birbirlerinin yerine kullanılabilirler.

İki faktörlü tasarımlar için çalışma alanı bir karedir. Örneğin Şekil 2.15'te iki seviyeli bir tasarım sunulmaktadır. Uygulanan matematiksel model her faktöre göre birinci dereceden bir modeldir.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + e \quad (32)$$

Bu denklemde y cevap, x_1 ve x_2 faktörler, b_0 çalışma alanının merkezindeki cevabın değeri, b_1 faktör 1'in etkisi (yada temel etkisi), b_2 faktör 2'nin etkisi (yada temel etkisi), b_{12} faktör 1 ve 2'ler arasındaki etkileşim ve "e" ise model hatasını göstermektedir.

Deney noktalarının en iyi bölgeleri, çalışma alanının doruklarında yer aldığı görülmektedir.



Şekil 2.15. Uygulanan model birinci dereceden olduğu zaman deneysel noktaların en iyi olduğu bölgeler (yerler) çalışma alanının doruklarıdır.

Çizelge Şeklinde Bir Çalışmanın Sunulması

Geometrik sunumlar, son derece uygun ve kullanışlıdır. Ancak faktör sayısı 3'ten fazla olduğu durumlarda kullanışlı değildir. Çok boyutlu uzay için çizelge şeklindeki bir sunum kabul edilebilir. Geometrik ve çizelge şeklindeki iki sunum arasındaki ilişkiyi göstermek için Şekil 2.14'te iki seviyeli iki faktörlü bir tasarımın çizelgesinin oluşturulması sunulmaktadır. Bu çizelge iki kolondan oluşmaktadır. Bu kolonlardan birincisi deneyi tanımlamakta, ikincisi ve üçüncüsü deney noktalarının koordinatlarını göstermektedir. Birinci deney incelenen iki faktörün 20 °C (yada kodlama ile -1) ve 5 gram (yada kodlama ile -1) ile düşük seviyeleridir. Bu birinci deney Şekil 2.14'teki A noktasına karşılık gelir. Deney 2 ise birinci faktör 80 °C (yada kodlama ile +1) yüksek seviye ve ikinci faktör 5 gram (yada kodlama ile -1) düşük seviyedir. İkinci deney B noktasına karşılık gelir. Eğer alışılmış fiziksel birimler ile oluşturuluyor ise (Çizelge 2.1) bu çizelgeye deney çizelgesi adı verilir ve eğer kodlamasında birimler kullanılıyorsa (Çizelge 2.2) deneysel tasarım adı verilir. Bu durumda, çizelgenin en altında alışılmış fiziksel birimlerde her faktör için kodlanmış birimlerin anlamı hatırlatılır.

Çizelge 2.1. Deney çizelgesi (genel birimlerde).

Deney No	Sıcaklık (1) (°C)	Ağırlık (2) (g)
1 (A)	20	5
2 (B)	80	5
3 (C)	20	10
4 (D)	80	10

Kodlanmış birimleri kullanan sunum, alışılmış fiziksel birimleri kullanan sunumdan daha geneldir. Bu kodlanmış çizelge aşağıdaki biçimdedir.

Çizelge 2.2. Deneysel tasarım (kodlanmış birimlerle).

Deney No	Faktör 1	Faktör 2
1 (A)	-1	-1
2 (B)	+1	-1
3 (C)	-1	+1
4 (D)	+1	+1
Seviye -1	20	5 gr
Seviye +1	80	10 gr

Geometrik sunumlar ve Çizelge ile sunumlar birbirine eşdeğerdir. Çizelgeler (yada matrisler), faktörlerin sayısı ne olursa olsun yani deneysel uzayın boyutlarının sayısı ne olursa olsun kullanılabilme avantajı sunarlar.

Deneysel tasarımların sonuçlarını iyi yorumlayabilmek için bir sunumdan diğerine geçişi iyi bilmek faydalıdır.

Deney Sonuçlarının Sunumu

Her deneyde araştırmacı, seçilen cevabı ölçer. Örneğin, birinci deneyin cevabı y_1 ’dir. İkinci deneyin cevabı y_2 ve böyle devam eder. Bu cevaplar her deneyin karşısında gösterilir ve sonuç sütununda toplanır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Deneysel tasarım ve deneyel sonuçlar.

Deney No	Faktör 1	Faktör 2	Cevap
1	-1	-1	y_1
2	+1	-1	y_2
3	-1	+1	y_3
4	+1	+1	y_4
Seviye -1	20	5 gr	
Seviye +1	80	10 gr	

Katsayıların Hesaplanması

Dört noktalı bir deney dört denklem gerektirir.

$$y_1 = b_0 + b_1x_{1,-1} + b_2x_{2,-1} + b_{12}x_{1,-1}x_{2,-1} + e_1 \quad (33)$$

$$y_2 = b_0 + b_1x_{1,-1} + b_2x_{2,-1} + b_{12}x_{1,-1}x_{2,-1} + e_2 \quad (34)$$

$$y_3 = b_0 + b_1x_{1,-1} + b_2x_{2,-1} + b_{12}x_{1,-1}x_{2,-1} + e_3 \quad (35)$$

$$y_4 = b_0 + b_1x_{1,-1} + b_2x_{2,-1} + b_{12}x_{1,-1}x_{2,-1} + e_4 \quad (36)$$

Bu sistemin çözümü katsayıların değerlerini verir.

$$\hat{b}_{(0)} = \frac{1}{4}[+y_1 + y_2 + y_3 + y_4] \quad (36a)$$

$$\hat{b}_{(1)} = \frac{1}{4}[-y_1 + y_2 - y_3 + y_4] \quad (36b)$$

$$\hat{b}_{(2)} = \frac{1}{4}[-y_1 - y_2 + y_3 + y_4] \quad (36c)$$

$$\hat{b}_{(12)} = \frac{1}{4}[+y_1 - y_2 - y_3 + y_4] \quad (36d)$$

Katsayıların bilinmesi ile tahminler yapabilen regresyon modeli yazılabilir.

$$\hat{y} = \hat{b}_{(0)} + \hat{b}_{(1)}x_1 + \hat{b}_{(2)}x_2 + \hat{b}_{(12)}x_1x_2 \quad (37)$$

$\hat{b}(0)$ 'ın Anlamı

Eğer x_1 ve x_2 'ye sıfır değeri verilirse, çalışma alanının merkezi tanımlanır. Böylece 6 numaralı denklem aşağıdaki gibi olur;

$$\hat{y} = +\hat{b}(0) \quad (38)$$

$\hat{b}(0)$ katsayısı çalışma alanının merkezindeki cevabın hesaplanan değeridir.

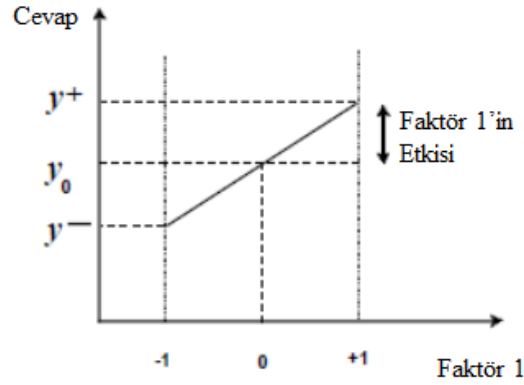
$\hat{b}(1)$ 'in Anlamı

Şimdi ikinci faktörün ortalama seviyesini ele alalım, bunun için x_2 'ye sıfır değeri verelim ve 26 numaralı denklem aşağıdaki şekle dönüşür;

$$\hat{y} = +\hat{b}(0) + \hat{b}(1)x_1 \quad (39)$$

Bu bağıntı $x_2 = 0$ 'ın kesme düzleminde tahmin edilen cevabın değişimini izlemeye olanak tanır (Şekil 2.16).

Faktör 1'in etkisi, Faktör 1 sıfır seviyesinden yüksek seviyesine geçtiği zaman cevabın değişimi gibi görünür.



Şekil 2.16. Faktör 2'nin ortalama düzleminde, Faktör 1'in etkisi çalışma alanının merkezi ve faktör 1'in yüksek seviyesi arasındaki cevabın değişimidir.

$\hat{b}(12)$ 'nin Anlamı

6d'de ki denklem aşağıdaki biçimde yazılabilir;

$$\hat{b}(12) = \frac{1}{2} \left[\frac{1}{2} (y_4 - y_3) - \frac{1}{2} (y_2 - y_1) \right] = \frac{1}{2} [+ef^+ - ef^-] \quad (40)$$

Faktör etkileşimi, faktör 2'nin yüksek seviyesinde (ef^+ ile gösterilen etki), faktör 1'in etkisi ve faktör 2'nin düşük seviyesinde (ef^- ile gösterilen etki) faktör 1'in etkisi arasındaki yarı fark olarak gerçekleşir.

Bir faktörün etkisinin değişimi diğer bir faktörün fonksiyonunu yansıtır. 1 ve 2 faktörler arasındaki $\hat{b}(12)$ etkileşimi 2. dereceden bir etkileşimdir.

Örnek 1: Performans İyileştirme

Çalışmanın Açıklanması

Üretimin verimliliğini artırmak isteyen bir üretici, doğal bitkilerden hareket ederek bir ilaç hazırlamakta ve aktif bileşiğin ekstraksiyon verimini artırmaya çalışmaktadır. Ekstraksiyon konsantrasyonu 50 g/L olan NaCl varlığında ve 70 °C sıcaklıkta gerçekleştirilir. Çalışmada, normal çalışmalar civarında seviyelerde bu iki faktörün incelenmesine karar verilir.

Faktör 1: 40 ve 50 g arasında NaCl konsantrasyonu

Faktör 2: 60 ve 80 °C arasında sıcaklık

Çalışmada, cevap faktörü, fabrikada üretilen ürünün kalitesidir. Üretici 2² olan bir faktöriyel tasarım gerçekleştirir. Bu tasarım Çizelge 2.4'te verilmektedir.

Çizelge 2.4. Deneysel tasarım ve deneysel sonuçlar.

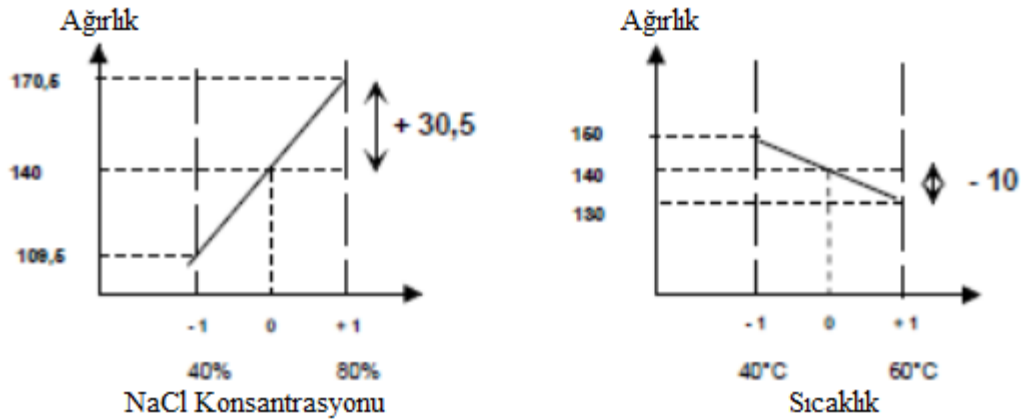
Deney No	Faktör 1	Faktör 2	Cevap (gram)
1	-1	-1	y= 115
2	1	-1	y= 185
3	-1	1	y= 104
4	1	1	y= 156
Seviye -1	40	60	
Seviye +1	60	80	

Hesaplar, 4 nolu denklem kullanılarak gerçekleştirilir.

Çizelge 2.5. Etkilerin çizelgesi.

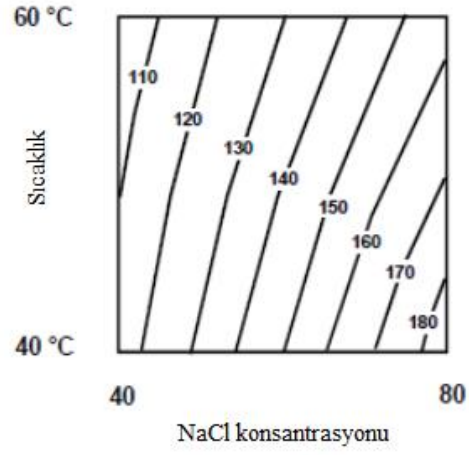
Ortalama	140 g
Faktör 1'in etkisi	30.5 g
Faktör 2'nin etkisi	-10 g
Etkileşim	-4.5 g

Bu deneyin yorumunda, konsantrasyonun etkisi, NaCl de 10 gramlık bir değişim için 30.5 gramdır (Şekil 2.17). Böylece NaCl'nin konsantrasyonunu artırarak üretim arttırılabilir. Sıcaklığın etkisi, sıcaklıktaki 10 ⁰C'lık bir değişim için -10 dur. Bunun sonucu şudur ki üretimi arttırmak için sıcaklığı düşürmek gerekir.



Şekil 2.17. Etkin ürün verimi üzerine NaCl ve sıcaklığın etkileri.

Sonuçların genel görünümünü elde etmek için çalışma alanındaki izoverimlilik eğrileri çizilir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Ürünün verimi üzerine NaCl konsantrasyonu ve sıcaklığın etkilerini gösteren izocevap eğrileri.

İki Seviyeli k Faktörlü Faktöriyel Tasarımlar

Faktörlerin sayısı arttırılabilir. Deneysel uzay, faktörlerin boyutları kadardır ve matematiksel model 2 numaralı bağıntıya karşılık gelir.

İki seviyeli k faktörü kapsayan bir tasarım 2^k ile gösterilir.

k, faktörlerin sayısını gösterir

2 ise faktörün seviyesini gösterir

Bu notasyon aynı zamanda gerçekleştirilecek deneyin sayısını da belirtmektedir. Bu sayı son derece önemlidir. 2 seviyeli bir tasarımda 7 faktörlü bir deney için 2^7 olduğundan 128 deney gerçekleştirmek gerekir. Deney sayısını düşürmek için kesirli faktöriyel tasarımlar kullanmak gerekir.

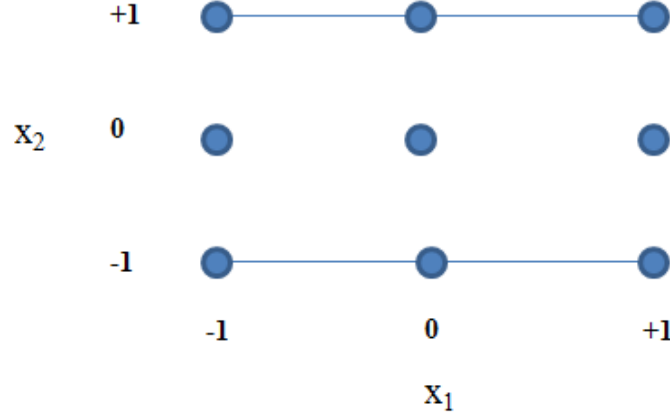
Üç Seviyeli Tasarımlar: Cevap Yüzey Tasarımları

Cevaplar ve faktörler arasındaki ilişkiyi kantitatif olarak açıklayabilmek için aşağıda mekanik (fizikokimyasal) yada deneysel modeller örneğin polinomiyal modelleri kullanacağız.

Bu matematiksel modeller hem doğrusal ve hem kavisli cevap yüzeyleri tanımlamak için eşit olmalıdır. Eğer faktör seviyeleri en az üç seviyede olursa, kavisli bağımlılık modellenabilir.

Üç seviyeli faktöriyel tasarımlar “cevap yüzey tasarımlar”ı olarak bilinir. Tam faktöriyel üç seviyeli tasarımlar, iki seviyeli tasarımlarda olduğu gibi formalize edilebilir,

örneğin bir 3^k tasarımı, üç faktör seviyeli k faktörlü bir tasarım anlamına gelir. Şekil 2.19’de bir 3^2 tasarımına örnek verilmektedir.



Şekil 2.19. İki faktör için tam faktör için tam faktöriyel 3^2 tasarım.

Tam faktöriyel üç seviyeli tasarımların, parametrelerin değerlendirilmesindeki istatistiksel özellikleri iki seviyeli tasarımlarınkinden daha az tercih edilmesine rağmen, bu tam faktöriyel üç seviyeli tasarımlar bazen iki, bazen de üç faktörü araştırmak için kullanılmaktadır. Aynı sorun iki faktörlü tasarımlarda da olabilir. Örneğin, deneylerin sayısının fazla olmasıdır. Bu tasarımların dezavantajları çok önemli olan “merkezi bileşenli tasarım” ve “Box-Behnken” tasarımı olarak adlandırılan optimal tasarımların geliştirilmesine neden olmuştur.

2.2.6.7. Merkezi Bileşenli Tasarım

Bileşenli tasarımlar, tam veya kesirli faktöriyel tasarımlar ve bir yıldız tasarım adı verilen bir ilave tasarımın kombinasyonundan oluşmaktadır. Her iki tasarımın merkezleri üst üste çakışırsa, bu çeşit tasarımlar “merkezi bileşenli tasarım”lar olarak adlandırılırlar. Bir yıldız tasarım ile birleştirilmiş bir tam faktöriyel iki seviyeli tasarımdan ibaret olan bir tasarım dikkate alınır, deney sayısı (r) aşağıdaki eşitlikten hesaplanır;

$$r = 2^{k-p} - 2k + n_0 \quad (41)$$

Bu eşitlikte;

k = faktör sayısı,

p = tam tasarımın indirgenme sayısı,

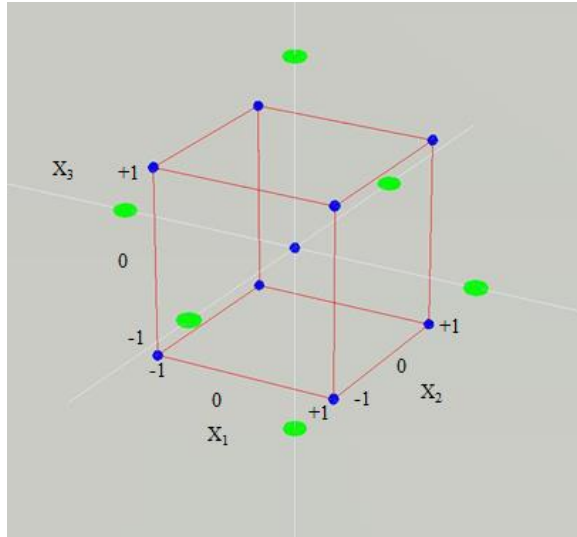
n_0 = tasarımın merkezindeki deneylerin sayısı.

Örnek: Bir merkezi bileşenli tasarımdaki deney sayısı üç faktörlü bir tasarım için deneylerin sayısı (r) eşitlik (10)’a göre elde edilir.

$$r = 2^3 - 2 \times 3 + 1 = 1 \quad (42)$$

Çizelge 2.6. Tam faktöriyel iki seviyeli tasarım ve bir yıldız tasarımdan ibaret üç faktör için merkezi bileşenli tasarım.

Deney No	Faktör			Cevap
	X ₁	X ₂	X ₃	
23-kernel tasarım				
1	-1	-1	-1	y ₁
2	+1	-1	-1	y ₂
3	+1	+1	-1	y ₃
4	-1	+1	-1	y ₄
5	-1	-1	+1	y ₅
6	+1	-1	+1	y ₆
7	+1	+1	+1	y ₇
8	-1	+1	+1	y ₈
2k-yıldız noktalar				
9	-α	0	0	y ₉
10	+α	0	0	y ₁₀
11	0	-α	0	y ₁₁
12	0	+α	0	y ₁₂
13	0	0	-α	y ₁₃
14	0	0	+α	
merkez noktalar				
15, 16, 17	0	0	0	y ₁₄ , y ₁₅ , y ₁₆



Şekil 2.20. Üç faktör için merkezi bileşenli tasarım.

Bir üç faktörlü merkezi bileşenli tasarım çizelge 2.6 ve Şekil 2.20’de görülmektedir. Merkezden yıldız noktaların (α) uzaklığı farklı olabilir.

Homojen dönebilen her tasarım için;

$$\alpha = 2^{(k-p)/4} \quad (43)$$

Örneğin 3 faktör için;

$$\alpha = 2^{(3-0)/4} = 1,682 \quad \text{olur.}$$

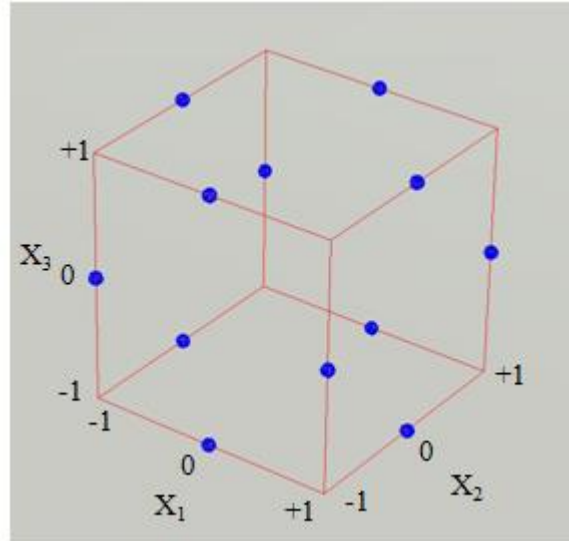
DeneySEL hataları değerlendirmek için faktör kombinasyonlarının tekrarları gereklidir. Genellikle merkez noktası üç kez tekrar edilir. Üç faktörlü bir merkezi bileşenli tasarımdaki deneylerin sayısı 17’dir. Merkezi bileşenli tasarımın iyi istatistiksel özelliklerinden bir kısmı bir deneyselavantaj oluşturabilir. Yıldız noktaları hiperküp dışında olduğu için her faktörün ayarlanması gereken seviyelerin sayısı, klasik üç seviyeli tasarımlardaki 3 yerine 5’tir. Eğer seviyeleri ayarlamak zor olacak ise, bir alternatif cevap yüzey tasarımı Box ve Behnken tarafından önerilen tasarım olacaktır.

2.2.6.8. Box-Behnken Tasarım

Bir box-behnken tasarımında, Şekil 2.21 ve Çizelge 2.7’de bir üç faktörlü tasarım için verilen örnekte olduğu gibi deneysel noktalar merkez noktasından eşit uzaklıkta hiperküp boyunca uzanır. Merkezi bileşenli tasarımın aksine, faktör seviyeleri yalnızca 3 seviyede ayarlanmış olması gerekir. İlave olarak, eğer iki tekrarlı deneysel nokta deneyleri üç faktörlü tasarımın merkezinde gerçekleştirilirse, deneylerin toplam sayısı 15’tir. Merkezi bileşenli tasarımla bu sayı 17’dir. Box-Behnken tasarımında, deneysel noktaları bir küreden ziyade bir küp üzerinde yer alır. Genellikle Box-Behnken tasarımları Çizelge 2.8’de verildiği gibi birkaç faktörün kombinasyonunu gerektirir.

Çizelge 2.7. Üç faktör için box-behnken tasarımı.

Deney No	Faktör			Cevap
	X_1	X_2	X_3	
1	+1	+1	0	y_1
2	+1	-1	0	y_2
3	-1	+1	0	y_3
4	-1	-1	0	y_4
5	+1	-1	+1	y_5
6	-1	0	+1	y_6
7	-1	0	-1	y_7
8	-1	0	-1	y_8
9	0	+1	+1	y_9
10	0	+1	-1	y_{10}
11	0	-1	+1	y_{11}
12	0	-1	-1	y_{12}
13, 14, 15	0	0	0	y_{13}, y_{14}, y_{15}



Şekil 2.21. Üç faktör için merkezi kompozit tasarım.

Çizelge 2.8. Her tasarımın merkezinde üç tekrarlı Box-Behnken tasarımı için faktör sayıları ve deneysel noktalar.

Faktör Sayısı	Deneylerin sayısı
3	15
4	27
5	46
6	54
7	62

Bu tasarımın kullanımı cevap yüzey yöntemleri bölümünde ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

Box-Behnken tasarımlarının bir dezavantajı tek bir faktöre bağlı olarak cevapların bağımlılığının temsil edilebilmesidir. Bu küpün köşe noktalarının ölçülememesi nedeniyledir. Ancak bu köşe noktalar uygun bir cevap yüzey modeli kullanılarak hesaplanabilir.

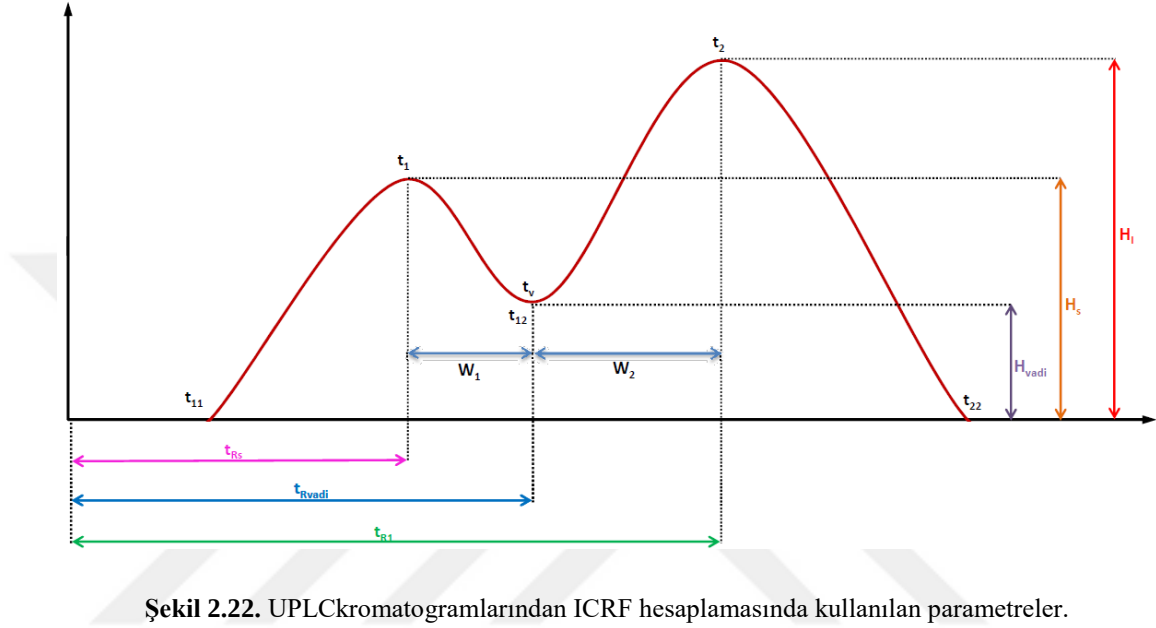
2.2.7. Cevap Faktörünün hesaplanması

İlaç analizinde, aktif bileşiklerin kromatografik ayrımı, analiz edilen bileşiklerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinin benzerliği ve diğer kromatografik operasyonel koşullar nedeniyle zayıf kromatografik performans ve bir kromatogramda piklerin “koelüsyonu” ile sonuçlanabilir. Bu durumda araştırma ve geliştirme çalışmalarında kullanılabilir kromatografik performans veren deneysel operasyonel şartların optimizasyonu için kemometrik optimizasyon metodolojilerinin kullanımı gerekebilir.

Analitik kimyada kromatografik yöntem geliştirilmesinde deneysel şartların optimizasyonu için tam faktöriyel tasarımlar, kesirli faktöriyel tasarımlar, Doehlert tasarım, Box-Behnken tasarımı gibi tasarım çeşitleri kullanılırken, kromatografik cevap olarak ayırma faktörü (R), alıkonma faktörü, seçicilik faktörü ve pik simetrisi gibi cevaplar kullanılmakla birlikte, bazı özel kromatografik faktörler de kullanılmaktadır. Bunlar genellikle kromatografik cevap fonksiyonu olarak adlandırılırlar. Bu özel kromatografik cevap faktöründe matematiksel denklemlere dayanan kromatografik cevap fonksiyonları en kısa alıkonma süresinde maksimum (ya da istenen) kromatografik ayrımı (ya da elüsyonu) sağlayan koşulları verebilecek ikinci dereceden kuadratik polinimiyal model fonksiyonların modellenmesinde kullanılır.

Optimizasyon sürecinde günümüze kadar kullanılan birçok farklı cevap fonksiyonları vardır. Bunlar; Beridge tarafından kromatografik cevap fonksiyonu, Schlabach ve Excoffier tarafından kromatografik ayırım istatistiği, Morris ve ark. tarafından kromatografik üstel fonksiyon gibi daha birçok kromatografik cevap fonksiyonu önerilmiştir. Değişik cevap fonksiyonlarının geliştirilmesinin başlıca nedeni her birinin istenen cevabı vermekte yetersiz olması ve optimizasyon sürecine uygulanamamasıdır. Farklı optimizasyon prosedürlerinde uygun kromatografik

koşulların sağlanmasında ve önceki fonksiyonlardaki eksiklikleri gidermek için geliştirilmiş kromatografik cevap fonksiyonu (improved chromatographic response function → ICRF) kullanılır.



Şekil 2.22. UPLC kromatogramlarından ICRF hesaplamasında kullanılan parametreler.

Deneyisel tasarım ve optimizasyonun uygulamasında ICRF (improved chromatographic response function) değerleri UPLC kromatogramlarından hesaplanmıştır (Tijanave ark. 2012). ICRF kromatografik cevap fonksiyonu aşağıdaki denklem ile verilir;

$$ICRF = \left(a \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^{N-1} \theta_{s,l}}{N-1} \right) + 1 \right) \left(1 + \left(\frac{t_f}{t_{opt}} \right)^b \right) \left(1 + \frac{\sum w_l}{N} \right)^c \quad (44)$$

Bu eşitlikte; N, beklenen pik sayısı, t_f son pikin ayrılma zamanı, t_{opt} seçilen optimal ayrılma zamanı, a katsayı, w_l baselineda ki pik genişliği, $\theta_{s,l}$ örtüşen pikin fonksiyonu olarak Carle tarafından aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Carle, 1972).

$$\theta = 1 - \frac{H_v |t_{R,l} - t_{R,s}|}{|t_{R,v} - t_{R,s}| (H_l - H_s) + H_s (t_{R,l} - t_{R,s})} \quad (45)$$

H_s ve H_l pik yükseklikleri, H_v piklerin birleştiği noktanın (vadinin) yüksekliği, $t_{R,s}$ ve $t_{R,l}$ piklerin alıkonma zamanları, $t_{R,v}$ vadinin zamanı. ICRF fonksiyonunun hesaplanmasında kullanılan kromatogram üzerindeki parametrelerin ölçümü Şekil 2.22’de verilmektedir.



2.2.8. Sürekli dalgacık dönüşümü (SDD) (wavelet transform)

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

$$SDD_{a,b}(x) = \frac{1}{\sqrt{|a|}} \Psi\left(\frac{x-b}{a}\right), \quad a, b \in \mathbf{R}, \quad a \neq 0 \quad (46)$$

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

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

$$SDD\{f(x); a, b\} = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \psi_{ab}^*(x) dx = \langle f(x), \psi_{ab} \rangle \quad (47)$$

Vektörlerin dönüşümünde, vektörlerin 2^n sayıda ölçüm verisini içermesi şart olup, analitik uygulamalarda bu gözetilmeyebilir. (Dinç, 2009; Dinç ve ark., 2007).

Wavelets (dalgacıklar) dönüşüm yöntemleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Çizelge 2.9. Wavelets (dalgacıklar) dönüşüm yöntemleri.

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

3. BULGULAR

3.1. BRI ve TIM Karışımının Analizi

3.1.1. UPLC yönteminin geliştirilmesinde kemometrik optimizasyon

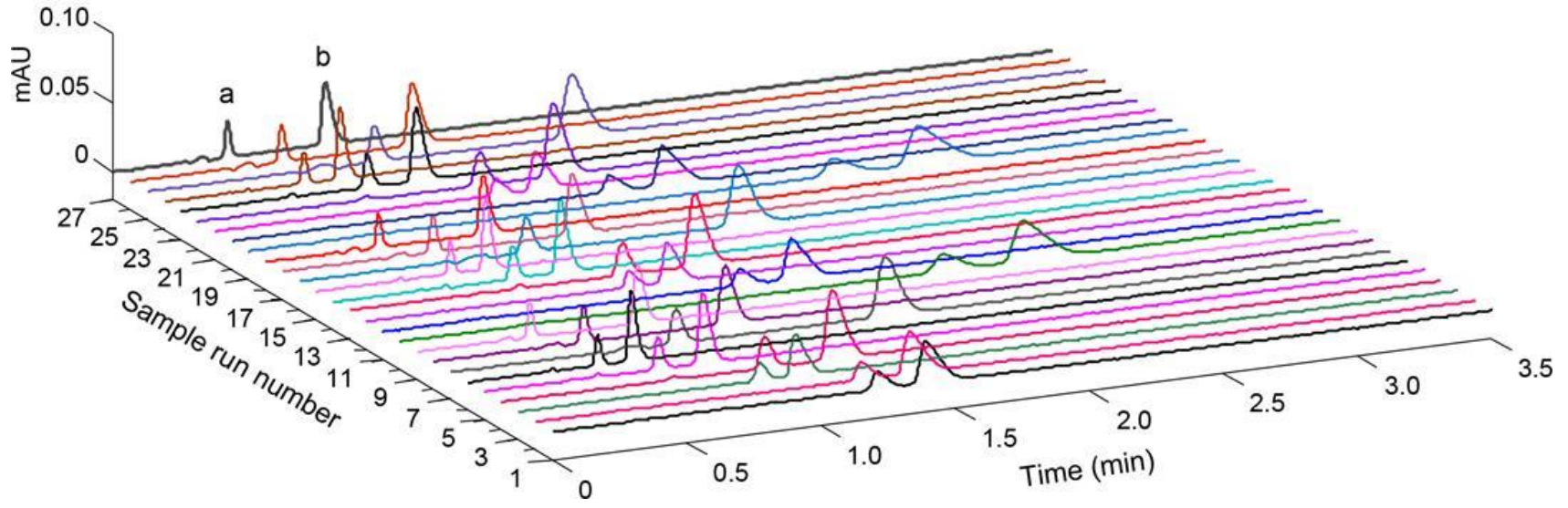
Bu tez çalışmasında Timolol Maleat (TIM)-Brimonidin Tartarat (BRI) karışımının aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Ultra Pressure Liquid Chromatography → UPLC) yöntemi ile analizi işleminde kromatografik cevap üzerine etki eden faktörlerin optimizasyonu gerçekleştirildi. Deneysel tasarım ve optimizasyon tekniği ile saptanan kromatografik koşullarda UPLC yöntemi geliştirildi, valide edildi ve ticari formülasyonun analizine uygulandı. UPLC yönteminin geliştirilmesinde kullanılan kemometrik optimizasyon yaklaşımı, kısa alıkonma zamanı ve en iyi kromatografik ayrımı sağlayan deneysel şartların bulunmasında doğru karar verilmesine imkan sağladı.

Doktora tez çalışmasında TIM-BRI karışımının analizi için yeni bir UPLC yönteminin geliştirilmesinde deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanıldı. Kromatografik optimizasyon işleminde, yapılan ön deneylerden sonra cevap faktörü üzerine etkili faktörlerin, kolon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$), akış hızı (mL/dak) ve hareketli fazdaki 0.1 M CH_3COOH yüzdesi (%) olduğu saptandı. Optimizasyon işleminde bağımlı değişkenler olarak % 0.1 M CH_3COOH , akış hızı ve kolon sıcaklığı sırasıyla X_1 , X_2 ve X_3 ile gösterildi. Bu faktörlerin düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+1) olmak üzere üç farklı seviyeleri kapsayan tasarım uzayı oluşturuldu. Faktörler ve karşılık gelen seviyeler Çizelge 3.1’de verildi. UPLC yönteminin optimizasyonunda 3^3 tam faktöriyel tasarımı Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi 27 farklı seviye kombinasyonda 20 $\mu\text{g/mL}$ TIM ve 20 $\mu\text{g/mL}$ BRI içeren numune UPLC sistemine enjekte edilerek 298.0 nm de PDA dedeksiyonu ile kromatogramları alındı. Optimizasyon işlemindeki 3^3 tam faktöriyel tasarımın 27 adet kromatogramları Şekil 3.1’de sunulmaktadır. Bu kromatogramlar üzerinden Bölüm 2.2.7’de açıklanan ICRF ölçüm parametreleri ve denklemi kullanılarak ICRF değerleri hesaplanarak Çizelge 3.2’de tasarım matrisinde ölçülen kolonu olarak verildi.

Bu ICRF’nin özelliği minimum alıkonma süresinde analiz edilen etken maddelerin maksimum ayrımını sağlayan matematiksel bir fonksiyondur (Carle, 1972). Bu fonksiyonla ilgili gerekli açıklamalar bölüm 2.2.7 de yapıldı.

Çizelge 3.1. Tam Faktöriyel tasarımda kullanılan faktörlerin çalışma aralığı ve seviyeleri.

Seviye	0.1 M CH ₃ COOH (% v/v, x ₁)	Akış Hızı (mL/dak., x ₂)	Kolon Sıcaklığı (°C, x ₃)
-1	35	0.2	35
0	55	0.3	50
1	75	0.4	65



Şekil 3.1. BRI (a) ve TIM (b)'ın Tam faktöriyel tasarımı için 298.0 nm dalga boyundaki UPLC kromatogramları.

Çizelge 3.2. Tam faktöriyel tasarım ve ICRF değerleri.

Deney No	0,1 M CH ₃ COOH	Hareketli Faz Akış Hızı	Kolon Sıcaklığı	ICRF	
	X ₁	X ₂	X ₃	Ölçülen	Tahmin Edilen
1	-1	-1	-1	7.7910	7.2499
2	-1	0	-1	2.9334	3.3233
3	-1	1	-1	1.8358	1.8725
4	0	-1	-1	2.3727	3.1460
5	0	0	-1	1.3733	0.9279
6	0	1	-1	1.2341	0.5767
7	1	-1	-1	3.8838	3.3996
8	1	0	-1	1.8646	1.8658
9	1	1	-1	1.4223	2.3493
10	-1	-1	0	7.4782	7.7706
11	-1	0	0	3.4176	3.7958
12	-1	1	0	1.9860	2.0593
13	0	-1	0	2.4452	3.4080
14	0	0	0	1.4662	0.9787
15	0	1	0	1.2398	0.3937
16	1	-1	0	3.7727	3.2835
17	1	0	0	1.8633	1.5572
18	1	1	0	1.3982	1.8204
19	-1	-1	1	11.4599	9.5580
20	-1	0	1	3.7880	4.6094
21	-1	1	1	2.1663	2.6175
22	0	-1	1	2.5348	4.0386
23	0	0	1	1.5072	1.3836
24	0	1	1	1.2583	0.5783
25	1	-1	1	3.6448	3.5289
26	1	0	1	1.8361	1.6082
27	1	1	1	1.3861	1.6591

Kemometrik yöntem optimizasyonu ile kromatografik yöntem için optimal deneysel koşulların bulunması için bağımsız değişkenler; hareketli faz içerisindeki 0.1 M CH₃COOH yüzdesi (X₁), hareketli faz akış hızı (X₂), kolon sıcaklığı (X₃) ve faktör etkileşimleri ile bağımlı değişken ICRF arasındaki matematiksel ilişkiden doğrusal regresyon analizi ile ikinci dereceden polinomial bir fonksiyon (ya da model) aşağıdaki biçimde elde edildi.

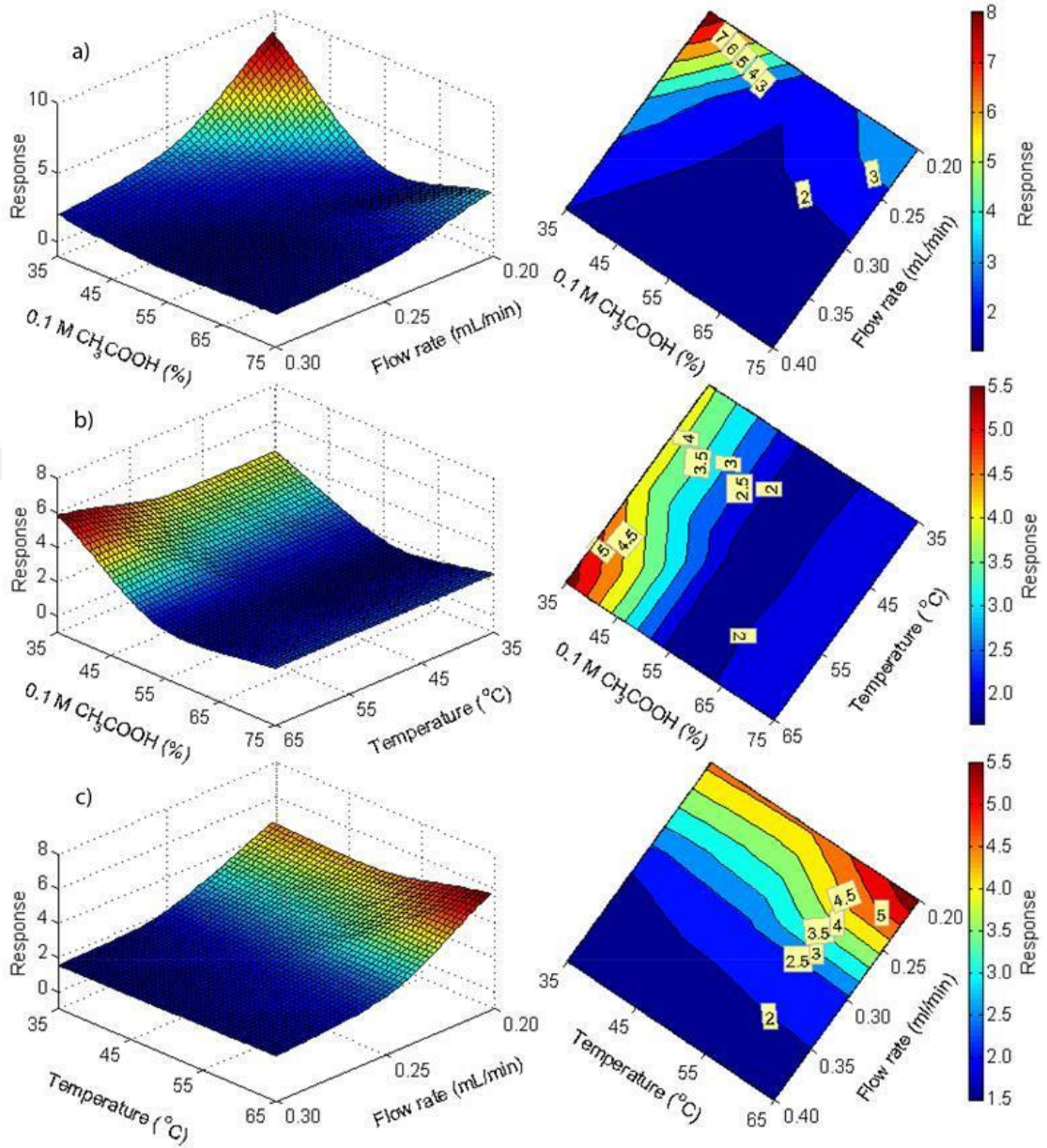
$$y = 0.8491 - 1.2102x_1 - 1.7476x_2 + 0.2706x_3 + 1.8369x_1^2 + 1.0672x_2^2 + 0.2310x_3^2 - 1.1372x_1x_2 - 0.4298x_1x_3 - 0.2728x_2x_3 \quad (1)$$

Bu model fonksiyonda X₁, X₂ ve X₃ faktörler, y ise ICRF'dir. X₁X₂, X₁X₃ ve X₂X₃ faktör etkileşimlerini gösterir, X₁², X₂² ve X₃² ise faktörlerin karesidir. Fonksiyondaki sayılar, kesim ve model katsayılarını göstermektedir. Yukarıdaki eşitlikte verilen fonksiyonun katsayılarının anlamlı olup olmadığını ortaya koymak için istatistiksel test yapıldı. Test sonuçlarından elde edilen % 95 olasılık düzeyinde t- ve F- değerleri Çizelge 3.3'te özetlendi. Büyük t- ve p- değeri < 0.05 olduğu için seçilen faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin cevap üzerinde etkin olduğu sonucuna varıldı.

Çizelge 3.3. İkinci dereceden polinomial model için istatistik t- ve F- testlerinin sonuçları.

	Katsayılar	t testi	P-değeri
Kesim noktası	0.8491	7.2388	0.0000
x_1	-1.2102	-22.2881	0.0000
x_2	-1.7476	-32.1842	0.0000
x_3	0.2706	4.9832	0.0001
x_1^2	1.8369	19.5318	0.0000
x_2^2	1.0672	11.3478	0.0000
x_3^2	0.2310	2.4562	0.0251
x_1*x_2	1.1372	17.0997	0.0000
x_1*x_3	-0.4298	-6.4631	0.0000
x_2*x_3	-0.2728	-4.1021	0.0007

UPLC yönteminin geliştirilmesinde kromatografik koşulların optimizasyonunda faktörlerin etkileşimini ve ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey grafikleri çizdirildi ve bu cevap yüzey grafikleri Şekil 3.2’de sunuldu.



Şekil 3.2. a) Hareketli faz akış hızı-% 0.1 M CH₃COOH ile ICRF, b) kolon sıcaklığı-% 0.1 M CH₃COOH ile ICRF, c) Hareketli faz akış hızı-kolon sıcaklığı ile ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey cevap grafikleri ve eş yükselti eğri haritaları

Hareketli faz akış hızı-% 0.1 M CH₃COOH ile ICRF, kolon sıcaklığı-% 0.1 M CH₃COOH ile ICRF, akış hızı-kolon sıcaklığı ile ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey cevap grafikleri Şekil 3.2a-c’de verildi. Bu yüzey-cevap grafiklerinden seçilen faktörlerin faktör etkileşimlerinin kromatografik cevap (ICRF) üzerine etkilerinin olduğu görülmektedir. Şekil 3.2a’da hareketli faz akış hızı düştükçe ve % 0.1 M CH₃COOH yüzdesi azaldıkça ICRF değerinin arttığı görülmekle birlikte tersi durumda da azda olsa ICRF değerinde bir artış gözlenmektedir. Aynı sonuçlar yandaki eş yükselti eğrileri haritasından da görülebilir. Şekil 3.2b’de kolon sıcaklığı arttıkça ve % 0.1 M CH₃COOH yüzdesi azaldıkça ICRF değerinin arttığı görülmekle birlikte kolon sıcaklığının azaldığı durumda da azda olsa ICRF değerinde bir artış gözlenmektedir. Şekil 3.2c’de hareketli faz akış hızı düştükçe ve kolon sıcaklığı arttıkça ICRF değerinin arttığı görülmekle birlikte kolon sıcaklığı düştükçe de ICRF değerinde az da olsa ICRF değerinde bir artış olduğu gözlenmektedir.

Bu deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi ile BRI ve TIM karışımının analizi için optimal kromatografik şartlar; kolon sıcaklığı 49.2 °C, hareketli faz akış hızı 0.38 mL/dak. ve hareketli fazda % 56.7 0.1 M CH₃COOH ve % 43.3 asetonitril olarak bulundu.

3.1.2. BRI ve TIM karışımının optimize edilen UPLC yöntemiyle kantitatif Analizi

3.1.2.1. Standart Çözeltiler

- a) Metanol içinde TIM'ın, BRI'nın 10 mg/100 mL olan stok çözeltileri hazırlandı.
- b) BRI için 5.0-25.0 µg/mL konsantrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyonda 25 adet çözeltisinden oluşan kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. TIM için 8.0-72.0 µg/mL konsantrasyon aralığındaki 5 farklı konsantrasyonda 25 adet çözelti ile kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler aynı balon jojeler içerisinde hazırlandı.
- c) BRI için 5.0-25.0 µg/mL ve TIM için 8.0-72.0 µg/mL çalışma aralığında bu iki bileşiği içeren 11 değişik konsantrasyonlarda olacak şekilde validasyon test çözeltileri hazırlandı.
- d) Standart ekleme tekniği; Ticari formülasyon (göz damlası) çözeltisi varlığında BRI için 6.0-16.0 µg/mL ve TIM için 8.0-40.0 µg/mL çalışma aralığında üç farklı konsantrasyon; BRI için düşük: 6.0 µg/mL, orta: 12.0 µg/mL ve yüksek 16.0 µg/mL, TIM için düşük: 8.0 µg/mL, orta: 30.0 µg/mL ve 40.0 µg/mL olarak standart ekleme çözümleri hazırlandı.
- e) BRI için 6.0-24.0 µg/mL ve TIM için 10.0-70.0 µg/mL çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 3 farklı konsantrasyonda BRI için düşük: 6.0 µg/mL, orta: 15.0 µg/mL ve yüksek: 24.0 µg/mL ve TIM için düşük: 10.0 µg/mL, orta: 40.0 µg/mL ve yüksek: 70.0 µg/mL gün içi ve günler arası çözeltileri hazırlandı.

3.1.2.2. UPLC Yönteminde Kromatografik Şartlar

- **Hareketli Faz :** Analiz işleminde, BRI ve TIM'ın kromatografik ayırımı için 0.1 M CH₃COOH ve asetonitril (56.7:43.3, h/h) sisteminden oluşan bir çözelti kullanıldı.
- **Kolon Cinsi :** Waters Acquity[®] BEH C₁₈ kolonu (50mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm) kullanıldı.
- **Kolon Sıcaklığı :** Kolon içerisinde BRI ve TIM ayırımı (49.2°C)'de gerçekleştirildi.
- **Basınç :** Kolon basıncı analiz sırasında yaklaşık 310 bar civarındadır.
- **Akış Hızı :** Deneyde akış hızı 0.38 mL/dak. olarak ayarlandı.
- **Enjeksiyon Hacmi :** Her vial'den 1 µL alınacak şekilde enjeksiyon hacmi ayarlandı.
- **Dedeksiyon Dalga Boyu :** BRI ve TIM analizi için dalga boyu sırası ile 246.0 nm ve 298.0 nm olarak seçildi.

3.1.2.3. Doğrusal Regresyon Denkleminin Hesaplanması

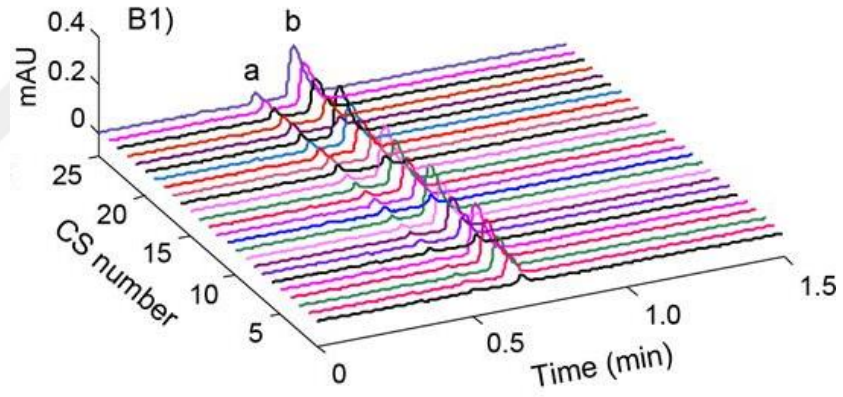
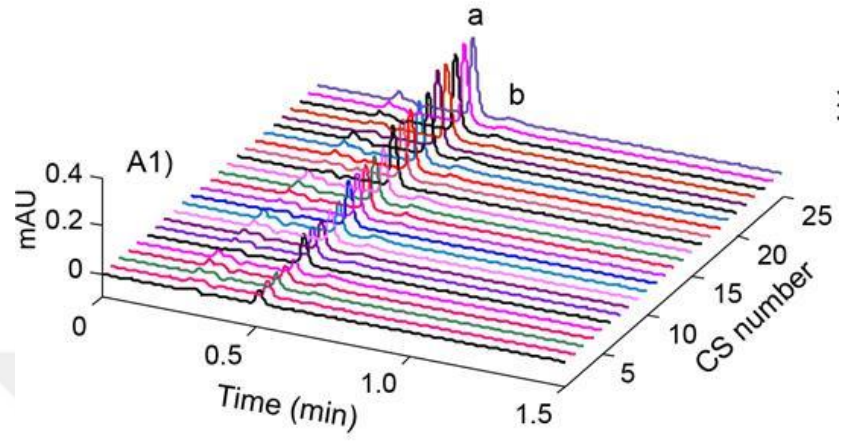
UPLC yönteminde kalibrasyon için 5.0-25.0 µg/mL konsantrasyon aralığında BRI ve 8.0-72.0 µg/mL konsantrasyon aralığında TIM karışımını içeren 25 adet çözelti hazırlandı. Bu kalibrasyon çözeltilerinin BRI için 246.0 nm’de ve TIM için 298.0 nm’de PDA dedeksiyonu ile UPLC kromatogramları kaydı yapılarak bilgisayar hafızasına alındı. Bu UPLC kromatogramlarından BRI ve TIM için sırasıyla alıkonma zamanları 0.508 dakika ve 0.652 dakika olarak tespit edildi. Kromatografik analizde BRI ve TIM bileşiklerinin kromatogramlarından integrasyonla bulunan doğru denklemi elde edildi. Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.4. te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Doğrusal regresyon analizi ve istatistik sonuçları.

	BRI	TİM
m	0.8096	0.3591
n	-0.6122	-0.3440
r	0.9993	0.9993
SD(m)	0.0065	0.0029
SD(n)	0.1073	0.1333
SD(r)	0.0017	0.0017
LOD	0.3976	1.1138
LOQ	1.3254	3.7125
m = Doğrusal regresyon eşitliğinin eğimi		
n = Doğrusal regresyon eşitliğinin kesim noktası		
r = Doğrusal regresyon eşitliğinin korelasyon katsayısı		
SD (m) = Eğimin standart sapması		
SD (n) = Kesim noktasının standart sapması		
SD(r) = Korelasyon katsayısının standart sapması		
LOD = Yakalama sınırı (µg/mL)		
LOQ = Tayin sınırı (µg/mL)		

Kalibrasyon set çözeltilerindeki BRI ve TIM analizi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde deneysel tasarım ve optimizasyon yönteminden faydalanılarak bulunan optimal kromatografik şartlara göre çizdirilen kalibrasyon numunelerine ait kromatogramlar Şekil 3.3 te ve Şekil 3.4 te gösterildi.

Kalibrasyon setinde BRI ve TIM bileşiklerini içeren çözeltilerin kromatogramlarının verileri UPLC-H-Class Empower2 programı vasıtasıyla Microsoft Excell olarak transferi gerçekleştirildi. Sonra Matlab 7.0 programında “m-file” yazılımı kullanılarak BRI için 246.0 nm’de TIM için 298.0 nm’de pik alanları ile konsantrasyon arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı doğrusal regresyon analizi ile doğrunun eğimi, kesimi, korelasyon katsayıları ve istatistiksel sonuçları hesaplandı ve Çizelge 3.4 te sunuldu.



Şekil 3.3. BRI (a) ve TIM (b) bileşikleri için kalibrasyon numunelerine (CS number) optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar A1 (246 nm) ve B1 (298 nm).

3.1.2.4. UPLC analitik yöntem validasyonu

Bu doktora tez çalışmasında kemometrik optimizasyon tekniği ile geliştirilen UPLC yönteminin analitik validasyonu için metanol içerisinde BRI için 5.0-25.0 µg/mL ve TIM için 8.0-72.0 µg/mL çalışma aralığında farklı konsantrasyonlar içeren 11 adet karışım çözeltisini içeren validasyon seti hazırlandı. UPLC yönteminin kesinlik ve doğruluğunu test etmek için bu validasyon setindeki kullanıldı. Geri kazanım değerleri BRI için % 99.9, TIM için % 99.5 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri BRI için % 2.50 ve TIM için % 2.15 olarak bulundu. Validasyon set çözeltilerinin analizi için optimize edilen UPLC yönteminin validasyon setine uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5'te verildi.

Deneyisel tasarım ve optimizasyon metodolojisiyle geliştirilen UPLC yönteminin kesinliği ve doğruluğunu kontrol etmek için diğer bir validasyon işlemi olarak gün içi ve günler arası ölçümler için BRI için üç farklı konsantrasyonda (6.0, 15.0 ve 24.0µg/mL) ve TIM için üç farklı konsantrasyonda (10.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL) Çizelge 3.6'da gösterildiği biçimde çözeltiler hazırlandı. Gün içi ve günler arası numunelerin aynı gün 1'er saat aralıklar ile ve günler arasında birbirini izleyen 6 günde olmak üzere 3'er tekrarlı kromatogramları alınarak yapılan alan okumaları kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçları yüzde geri kazanım (%), bağlı standart sapma (%) ve bağlı standart hata (%) Çizelge 3.6'da sunuldu.

Çizelge 3.5. BRI ve TIM yapay karışım çözeltilerinin optimize ve valide edilen UPLC yönteminden elde edilen analiz sonuçları.

Deney No.	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
1	5.0	40.0	5.1	40.4	101.5	101.1
2	10.0	40.0	10.4	40.0	103.7	100.1
3	15.0	40.0	14.9	39.2	99.2	98.0
4	20.0	40.0	19.7	40.1	98.7	100.2
5	25.0	40.0	25.0	38.7	100.0	96.7
6	16.0	8.0	15.2	8.0	95.3	99.7
7	16.0	24.0	16.6	24.9	104.0	103.9
8	16.0	40.0	15.7	39.2	98.1	97.9
9	16.0	56.0	15.9	55.1	99.4	98.3
10	16.0	72.0	16.0	73.0	99.8	101.3
11	20.0	50.0	19.7	48.5	98.7	97.0
				$\bar{X}$	99.9	99.5
				SS	2.50	2.14
				BSS	2.50	2.15

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS = Standart sapma

BSS = Bağıl standart sapma

Çizelge 3.6. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.

	Konulan ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)		BSS (%)		BSH (%)	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
Gün içi	6	10	5.7	9.5	95.1	94.7	6.42	9.68	-4.86	-5.34
	15	40	14.8	40.1	98.9	100.2	0.93	0.88	-1.13	0.24
	24	70	24.1	71.5	100.6	102.1	0.57	1.24	0.56	2.11
Günler arası	6	10	5.8	10.5	96.8	105.1	6.38	8.05	-3.17	5.11
	15	40	14.5	39.9	97.0	99.7	0.95	0.44	-3.02	-0.34
	24	70	24.1	71.4	100.4	101.9	0.72	0.85	0.39	1.94

BSS = Bağıl standart sapma
BSH = Bağıl standart hata
n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Kemometrik optimizasyon ile bulunan kromatografik koşullarda BRI ve TIM bileşiklerini içeren ticari farmasötik göz damlasında yardımcı maddelerin aktif bileşiklerin analizi üzerine etkisini değerlendirmek için standart eklemeye tekniği uygulandı. Bu deneysel işlemde mL'sinde 2 mg BRI ve 5.0 mg TIM içeren ticari göz damlasından 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye transfer edildi ve hacim metanol ile tamamlandı. Üç farklı konsantrasyon için bu çözeltilerden 2.mL'lik kısım 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve numune içeriğinin üzerine 6.0, 12.0 ve 16.0µg/mL BRI ve 8.0, 30.0 ve 40.0µg/mL TIM olacak şekilde stok çözeltilerden ilave edilerek standart eklemeli çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin kemometrik optimizasyon koşullarında BRI için 246.0 nm'de ve TIM için 298.0 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlardan okunan pik alanları kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak numune içeriğindeki BRI ve TIM içerikleri hesaplandı. Standart eklemeli numuneleri içeren çözeltilerin analiz sonuçları Çizelge 3.7'de gösterildi.

Standart eklemeli çözeltilerden bulunan toplam BRI ve TIM miktarlarından formülasyon ilavesi çıkarılarak eklenen BRI ve TIM miktarları hesaplandı. Buna göre ilave edilen standart miktarlar için BRI ve TIM için bulunan ortalama % geri kazanım ve bağlı standart sapma değerleri hesaplanarak sunuldu (Çizelge 3.7). Bu standart eklemeli deneylerde üç farklı konsantrasyon seviyesi için üç tekrar yapılarak ortalama sonuçlara ulaşıldı.

Çizelge 3.7. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.

	Konulan ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)		BSS (%)	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
Formülasyon	6	8	6.2	7.7	103.0	95.8	0.17	1.30
Formülasyon	12	30	11.7	29.0	97.5	96.8	0.15	0.74
Formülasyon	16	40	16.3	41.2	101.7	103.0	0.24	1.12
BSS =Bağıl standart sapma								

3.1.2.5. UPLC Analizinde Sistem Uygunluk Parametreleri

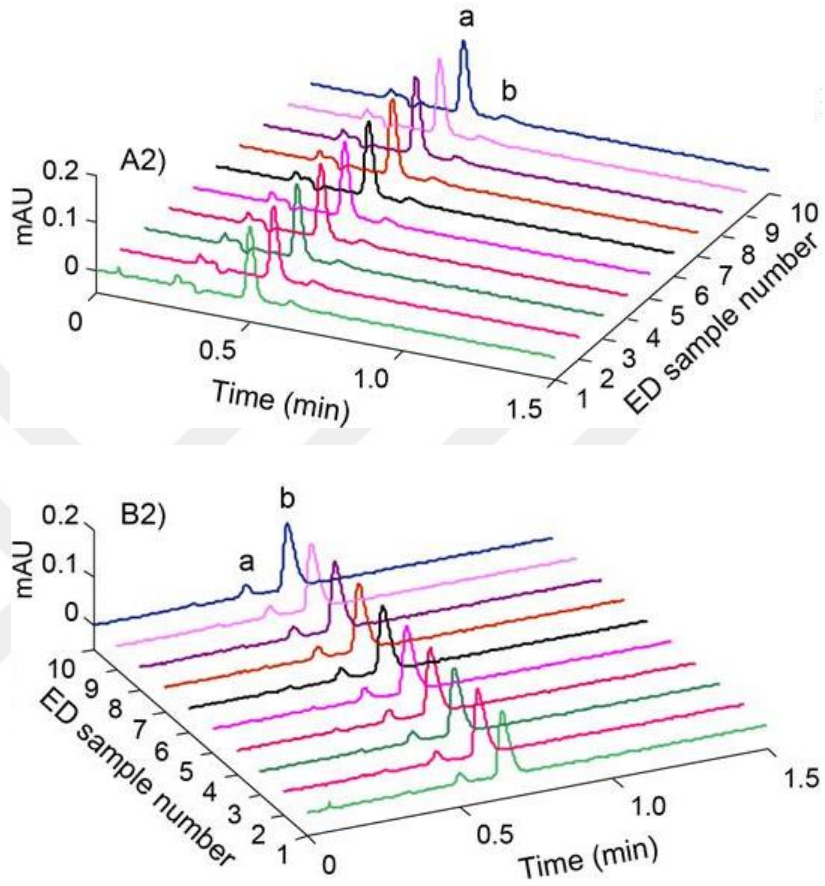
Analiz işlemlerinde kromatografik sistemin, dedeksiyon duyarlılığı, ayırma faktörü, seçicilik, teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü gibi parametrelerin sayısal değerlerine dayalı olarak doğrulanması kromatografik analizin gereklerindendir. Bu doktora tez çalışmasında seçicilik, rezolüsyon, pik asimetri, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı parametrelerinin BRI ve TIM bileşiklerini içeren bir numunenin UPLC kromatogramında hesaplanan değerleri Çizelge 3.8’de listelendi. BRI ve TIM karışımının UPLC yöntemiyle analizinde bu değerlerin istenen limitler içerisinde olduğu gözlemlendi.

Çizelge 3.8. Sistem uygunluk parametreleri.

Sistem Uygunluk parametresi	Bulunan Değer	Referans Değer
Seçicilik	2,04	>2
Rezolüsyon	2,85	>2
Pik asimetri	1,37	0.9-1.4
Kuyruklanma Faktörü	1,64	<2
Teorik Tabaka Sayısı	2145	>2000

3.1.2.6. UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Optimize edilen UPLC yönteminin ticari oftalmik preparatlara uygulanmasında, 1 mL COMBIGAN göz damlası 50 mL'lik balonjojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanolle tamamlandı. Balonjojede hazırlanan stok karışım manyetik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$)'den süzüldü. Bu stok çözeltiden 4 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanolle tamamlandı. Hazırlanan göz damlası çözeltileri vial'lere konuldu ve optimal kromatografik şartlardaki kromatogramları elde edildi. BRI ve TIM kromatogramlarından hesaplanarak elde edilen kalibrasyon grafikleri ile göz damlası numunesinin içerisindeki BRI ve TIM miktarları hesaplandı. Elde edilen kromatogram Şekil 3.4 te sunulmuştur.



Şekil 3.4. BRI (a) ve TIM (b) bileşikleri için ticari göz damlası numularine optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar A2 (246 nm) ve B2 (298 nm).

Yukarıda açıklanan kromatografik göz damlası analiz işlemi **COMBIGAN[®]** göz damlası preparatına uygulanmıştır. **COMBIGAN[®]** göz damlası sonuçları Çizelge 3.9. da sunuldu.

Çizelge 3.9. Ticari göz damlasındaki BRI ve TIM'in UPLC ile yapılan deney sonuçları (Etiket değeri: BRI 2.0 mg/mL ve TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL	
	BRI	TIM
1	1.94	5.06
2	1.94	5.01
3	1.98	4.97
4	1.94	4.93
5	2.00	5.15
6	2.03	5.08
7	2.05	5.29
8	2.06	5.17
9	1.99	5.01
10	1.96	4.96
$\bar{X}$	1.99	5.06
SS	0.05	0.11
BSS	2.37	2.23
GA	$\bar{X} \pm 0.04$ (1.95-2.03)	$\bar{X} \pm 0.08$ (4.98-5.14)

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama
SS = Standart sapma
BSS =Bağıl standart sapma
GA= Güven aralığı (p= 0.05 için)

3.1.3. BRI-TIM karışımının PCR yöntemi ile kantitatif analizi

Doktora tez çalışmasının bu bölümünde UV-Spektrofotometrik ölçümlere dayalı olarak BRI-TIM karışımının temel bileşen regresyon (principal component analysis regression→ PCR) yöntemi kullanılarak kantitatif analizleri ve deneysel sonuçları açıklanmaktadır.

Bölüm 2.2.4'te teorik esasları açıklanan PCR yöntemi; bağımlı değişkenlerin maksimum varyansına dayanan bu yöntem, kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden en popüler olanlarından biridir. Girişim yapan spektral bandların varlığında karışım analizlerinde hiç bir ayırma işlemi yapılmaksızın son derece başarılı sonuçlar veren bir yöntemdir. Yöntemin uygulaması izleyen başlıklarda sunulmaktadır.

3.1.3.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri

- a) Analiz işlemleri için metanol içerisinde 100 mL'lik hacim içerisinde 10 mg BRI ve 10 mg TIM çözülerek her iki bileşiğin stok çözeltileri hazırlandı.
- b) BRI bileşiğini 5.0-25.0 µg/mL ve TIM bileşiğini 8.0-72.0 µg/mL konsantrasyon aralığında iki bileşik için 5 farklı konsantrasyon seviyesinde 25 adet farklı kombinasyonda kalibrasyon çözeltileri konsantrasyon (derişim) seti olarak hazırlandı.
- c) Analiz edilen bileşiklerin kalibrasyon konsantrasyon aralıkları içerisinde olacak şekilde BRI ve TIM bileşiklerini içeren yapay karışımlardan oluşan validasyon test çözeltileri hazırlandı.
- d) Gün içi ve günler arası deneylerde n=6 deneme için üç farklı konsantrasyon seviyesinde BRI (düşük= 6.0 µg/mL, orta= 15.0 µg/mL ve yüksek= 24.0 µg/mL) ve TIM (düşük= 10.0 µg/mL, orta= 40.0 µg/mL ve yüksek= 70.0 µg/mL) içeren çözeltiler taze ve günlük hazırlandı.
- e) Standart ekleme tekniğinde ticari formülasyondan 0.04 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılarak üzerine bileşiklerin standart çözeltilerinden üç farklı konsantrasyon seviyesinde (BRI için düşük= 6.0 µg/mL, orta= 12.0 µg/mL ve yüksek= 16.0 µg/mL ve TIM için düşük= 8.0 µg/mL, orta= 30.0 µg/mL ve yüksek= 40.0 µg/mL) ilaveler ile standart ekleme çözeltileri hazırlandı.

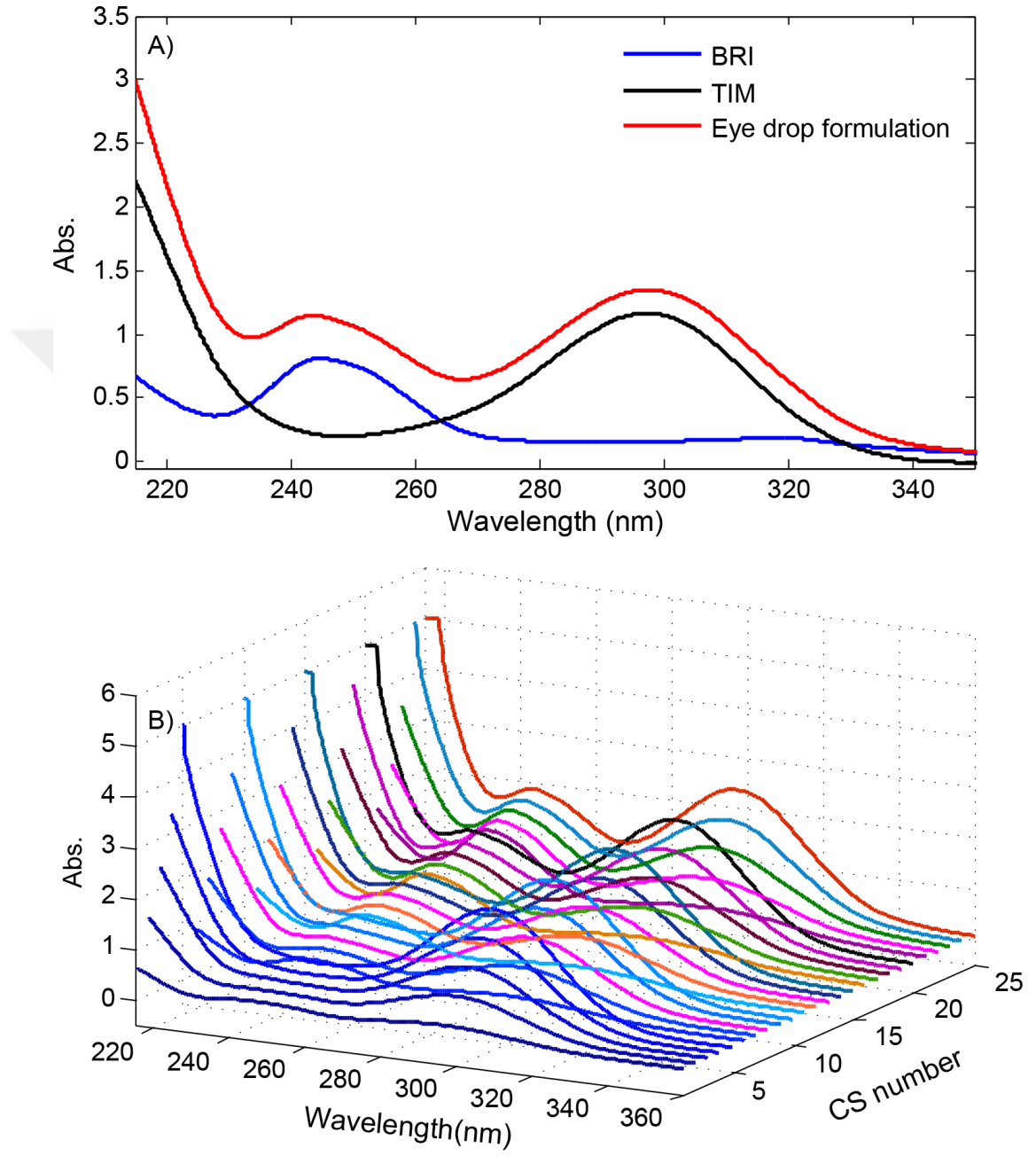
3.1.3.2. Kemometrik PCR kalibrasyonu

Bu PCR yönteminin uygulanmasında, beş seviyeli ve 2 faktörlü (5^2) olan bir kalibrasyon seti Çizelge 3.10'da gösterildiği gibi metanol içerisindeki BRI ve TIM stok çözeltilerinden hareket ederek hazırlandı. Kalibrasyon setinin her bir numunesinin 220.0-340.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklar ile UV spektrumları çizdirildi ve bilgisayara kodlanarak kaydedildi. Şekil 3.5.B'de kalibrasyon set çözeltilerinin UV spektrumları sunuldu. Şekil 3.5.A'dan da görüleceği gibi BRI ve TIM aynı spektral dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır ve aynı şekil üzerinde BRI ve TIM karışımının UV spektrumu sunulmaktadır. Sonuç olarak spektral girişimden dolayı klasik spektrofotometrik yöntemler ile BRI-TIM karışımının doğrudan kantitatif analizleri mümkün değildir. Bu bakımdan BRI-TIM karışımının analizi için hiçbir ön ayırma işlemi gerektirmediği için PCR yöntemi uygulanmıştır.

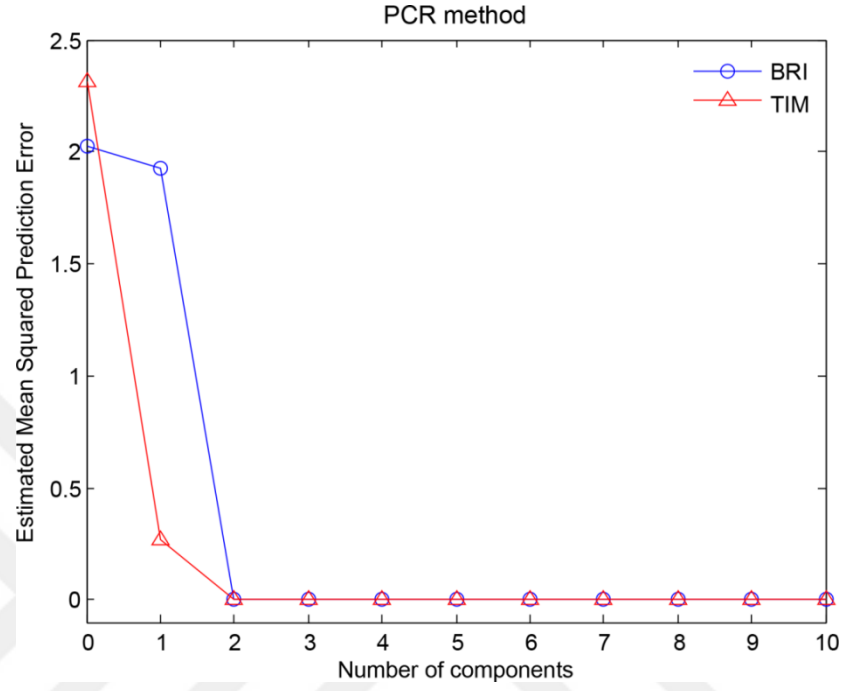
PCR kalibrasyonunun matematiksel inşası için 25 x 2 y-blok (konsantrasyon set, bağımsız değişken) ve bilgisayar hafızasından çağırılan 1151 x 25 x-blok (absorbans set, bağımsız değişken) arasındaki doğrusal ilişkiye PCR kalibrasyon algoritması uygulandı. Kemometrik PCR kalibrasyon işlemlerinde bu işlem 10 faktör için test edildi. Ancak PCR kalibrasyonunda model için minimum hata faktörü ilk iki faktör kalibrasyona alındığında gözlemlendi. Şekil 3.6'da PCR kalibrasyon modelinde ilk iki faktör kullanıldığında minimal hata ile kalibrasyon gerçekleştirilebileceği görülmektedir. PCR kalibrasyonuna ait üç boyutlu projeksiyon Şekil 3.7 'de görülmektedir.

Çizelge 3.10. BRI ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.

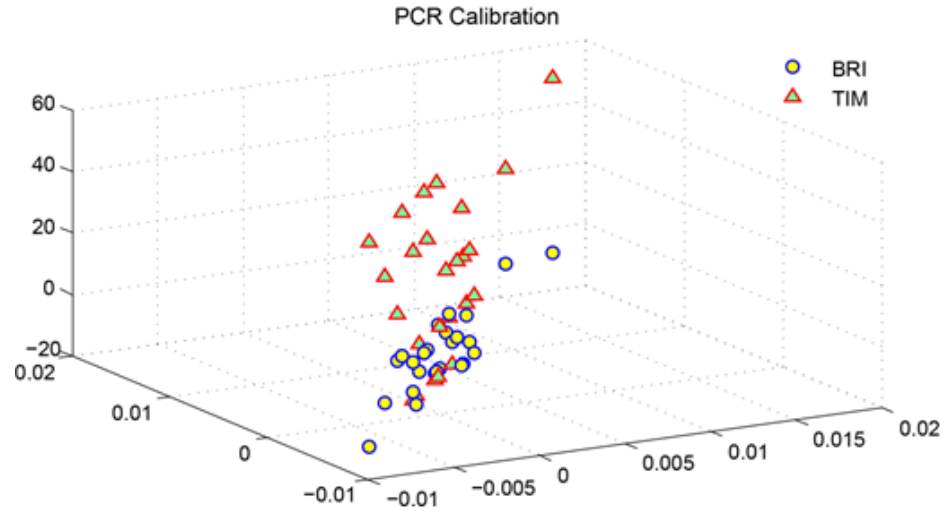
$\mu\text{g/mL}$			$\mu\text{g/mL}$		
Deney No	BRI	TIM	Deney No	BRI	TIM
1	5	72	15	25	56
2	10	56	16	5	24
3	15	40	17	20	56
4	20	24	18	5	40
5	25	8	19	10	72
6	5	56	20	15	56
7	10	40	21	20	40
8	5	8	22	25	24
9	15	24	23	10	8
10	25	72	24	15	72
11	20	8	25	25	40
12	10	24			
13	20	72			
14	15	8			



Şekil 3.5. A) BRI (20.0 µg/mL), TIM (40.0 µg/mL) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.



Şekil 3.6. BRI ve TIM için PCR kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).



Şekil 3.7. PCR kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonu.

3.1.3.3. PCR yönteminin analitik validasyonu

Çalışmada PCR yönteminin validasyonu için metanol içerisinde BRI için 5.0-25.0 µg/mL ve TIM için 8.0-72.0 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 11 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak hesaplanan PCR yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi. PCR yönteminin validasyon seti olarak hazırlanan yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11. de sunuldu. Geri kazanım değerleri, BRI için % 100.0, TIM için % 100.9 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri, BRI için 0.93 ve TIM için 0.27 olarak hesaplandı (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. BRI ve TIM sentetik karışım çözeltilerinin analiz sonuçları.

Deney No	Konulan($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
1	5	40.0	5.0	40.4	100.4	100.9
2	10	40.0	10.1	40.4	100.9	101.1
3	15	40.0	14.9	40.2	99.5	100.5
4	20	40.0	19.8	40.1	99.2	100.3
5	25	40.0	24.7	40.4	98.9	100.9
6	16	8	16.3	8.1	101.8	100.8
7	16	24	16.1	24.3	100.6	101.2
8	16	40	16.1	40.5	100.4	101.2
9	16	56	15.8	56.6	98.9	101.0
10	16	72	16.0	72.8	100.0	101.1
11	20	50	19.8	50.4	99.1	100.8
				$\bar{X}$	100.0	100.9
				SS	0.93	0.28
				BSS	0.93	0.27

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

Geri kazanım çalışmasının ardından, PCR yönteminin tekrar edilebilirliğini kontrol etmek için gün içi ve günler arası analizleri yapıldı. Bu analizin çözeltileri, BRI ve TIM'ın kalibrasyon aralığı içinde üç farklı konsantrasyonda (BRI için 6.0, 15.0 ve 24.0 ve TIM için 10.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL) her derişim için 6 farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında taze olarak hazırlandı. Bu çözeltilerin analizinden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.12'de verildi.



Çizelge 3.12. Gün içi ve günler arası numuneleri için analiz sonuçları.

		Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)	
		BRI	TIM	BRI	TIM
Gün içi		6	10	6.07	10.04
		15	40	14.99	40.56
		24	70	23.30	70.92
Günler arası		6	10	5.65	10.61
		15	40	15.07	40.98
		24	70	23.44	71.62
Geri kazanım (%)					
				BRI	TIM
Gün içi				101.2	100.4
				100.0	101.4
				97.1	101.3
Günler arası				94.2	106.1
				100.5	102.5
				97.6	102.3
BSS (%)					
				BRI	TIM
Gün içi				2.13	2.34
				0.14	0.41
				0.15	0.34
Günler arası				4.55	0.54
				0.16	0.28
				0.20	0.30
BSH (%)					
				BRI	TIM
Gün içi				1.23	0.35
				-0.04	1.41
				-2.91	1.31
Günler arası				-5.83	6.13
				0.46	2.46
				-2.35	2.32

BSS= Bağlı standart sapma, BSH= Bağlı standart hata n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Analiz işleminde PCR yöntemini gerçek ticari göz damlası preparatların analizinden önce, BRI ve TIM içeren farmasötik preparattaki diğer bileşenlerin analiz üzerine bir etkisi olup olmadığı test edildi. Bu test için de standart ilave yöntemi uygulandı. Ticari farmasötik göz damlası preparatından 1 mL numune 50 mL metanol içinde çözüldü. Bu stok çözeltisinden gerekli seyreltmelerin yapılmasıyla preparatta belirtilen etiket miktarlarına göre numune içeriğinin üzerine standart ilavesi sonuçta 6.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL BRI ve 8.0, 30.0 ve 40.0 µg/mL TIM olacak şekilde stok çözeltilerden ilave edildi. Hazırlanan bu çözeltilerin % geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.13 de sunuldu.

Çizelge 3.13. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)	
	BRI	TIM	BRI	TIM
Formülasyon	6	8	6.14	8.15
Formülasyon	12	30	11.86	31.13
Formülasyon	16	40	16.24	40.79
Geri kazanım (%)				
			BRI	TIM
			102.30	101.82
			98.86	103.76
			101.50	101.99
BSS (%)				
			BRI	TIM
			0.17	0.06
			0.18	0.26
			0.10	0.19

BSS= Bağlı standart sapma

3.1.3.4. PCR yönteminin farmasötik preparata uygulanması

PCR yönteminin ticari preparata uygulanmasında 1 mL göz damlası numunesi 50 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve hacmi metanolle tamamlandı. Balon joje manyetik karıştırıcı ile 40 dakika karıştırıldı sonrasında membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) ile süzüldü. Bu stok çözeltiden 4.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi metanolle tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 220.0-340.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlarından göz damlası içeriğindeki BRI ve TIM miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **COMBIGAN®** göz damlası preparatına uygulandı. **COMBIGAN®** göz damlası sonuçları Çizelge 3.14. te sunuldu.

Çizelge 3.14. PCR yönteminin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçları. (Etiket değeri BRI 2.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL	
	BRI	TIM
1	2.07	4.95
2	2.09	4.95
3	2.07	5.02
4	2.05	4.98
5	2.06	4.98
6	2.05	4.98
7	2.02	5.01
8	2.02	4.98
9	2.01	4.97
10	2.00	4.97
$\bar{X}$	2.04	4.98
SS	0.03	0.02
BSS	1.47	0.42
GA	$\bar{X} \pm 0.02(2.02-2.06)$	$\bar{X} \pm 0.01(4.97-4.99)$

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama
 SS= Standart sapma
 BSS= Bağıl standart sapma
 GA= Güven aralığı

3.1.4. BRI ve TIM karışımının kemometrik PLS yöntemi ile kantitatif analizi

Doktora tez çalışmasının bu bölümünde UV-Spektrofotometrik ölçümlere dayalı olarak BRI-TIM karışımının kısmi en küçük kareler (partial least squares → PLS) yöntemi kullanılarak kantitatif analizleri ve deneysel sonuçları açıklanmaktadır.

Doktora tezinin bu kısmında bölüm 2.2.5'te teorik temeli anlatılan PLS yöntemi; bağımlı değişken ile bağımsız değişkenin maksimum ko-varyansına dayanan çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri arasında yaygın olarak kullanılanlarından birisidir. PLS yöntemi kompleks karışımların kantitatif analizlerinde son derece başarılı sonuçlar verdiği literatürlerde belirtilmektedir. Bu kapsamda PLS yöntemi BRI-TIM kombinasyonunun analizine uygulandı.

3.1.4.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri

- a) Analiz işlemleri için metanol içerisinde 100 mL'lik hacim içerisinde 10 mg BRI ve 10 mg TIM çözülerek her iki bileşiğin stok çözeltileri hazırlandı.
- b) BRI bileşiğini 5.0-25.0 µg/mL ve TIM bileşiğini 8.0-72.0 µg/mL konsantrasyon aralığında iki bileşik için 5 farklı konsantrasyon seviyesinde 25 adet farklı kombinasyonda kalibrasyon çözeltileri konsantrasyon (derişim) seti olarak hazırlandı.
- c) Analiz edilen bileşiklerin kalibrasyon konsantrasyon aralıkları içerisinde olacak şekilde BRI ve TIM bileşiklerini içeren yapay karışımlardan oluşan validasyon test çözeltileri hazırlandı.
- d) Gün içi ve günler arası deneylerde n=6 deneme için üç farklı konsantrasyon seviyesinde BRI (düşük= 6.0 µg/mL, orta= 15.0 µg/mL ve yüksek= 24.0 µg/mL) ve TIM (düşük= 10.0 µg/mL, orta= 40.0 µg/mL ve yüksek= 70.0 µg/mL) içeren çözeltiler taze ve günlük hazırlandı.
- e) Standart ekleme tekniğinde ticari formülasyondan 0.04 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılaraq üzerine bileşiklerin standart çözeltilerinden üç farklı konsantrasyon seviyesinde (BRI için düşük= 6.0 µg/mL, orta= 12.0 µg/mL ve yüksek= 16.0 µg/mL ve TIM için düşük= 8.0 µg/mL, orta= 30.0 µg/mL ve yüksek= 40.0 µg/mL) ilaveler ile standart ekleme çözeltileri hazırlandı.

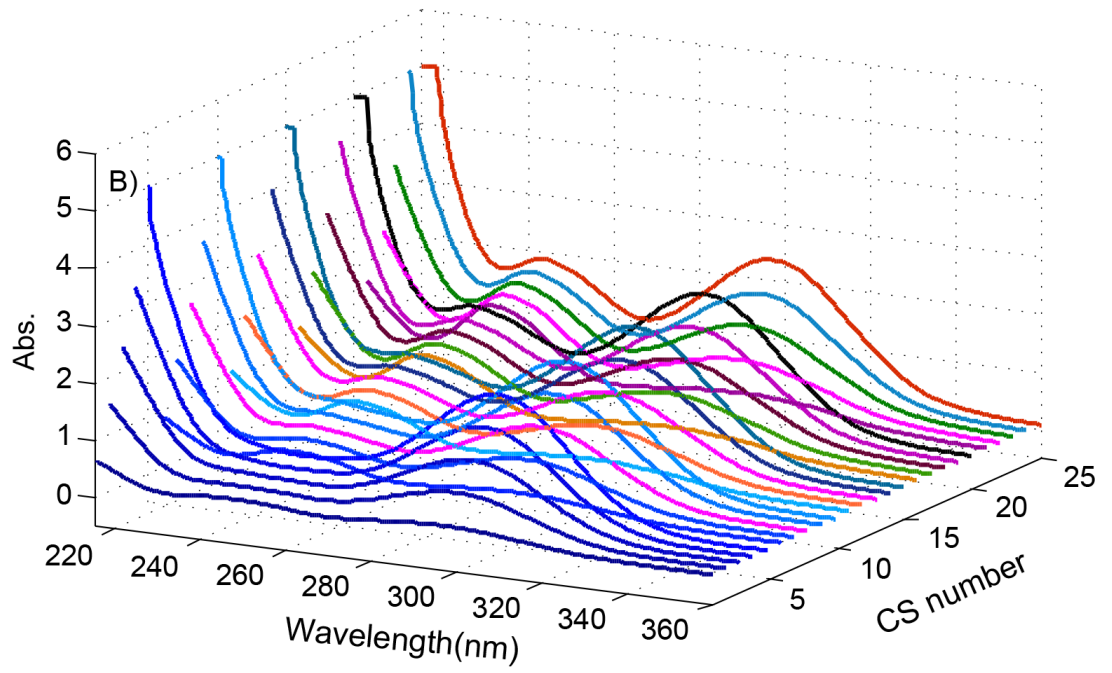
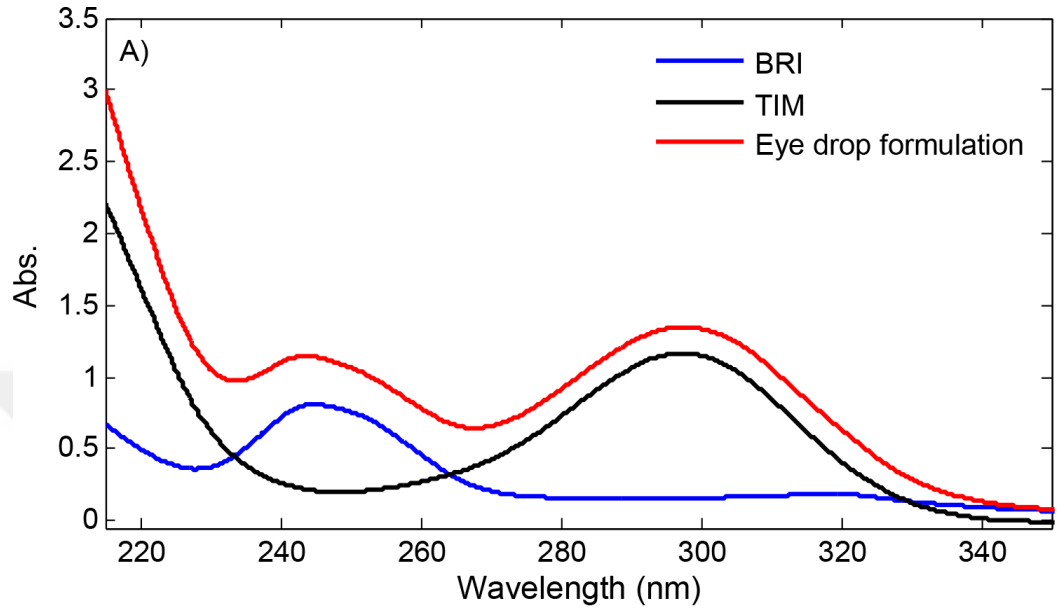
3.1.4.2. Kemometrik PLS Kalibrasyonu

PLS yönteminin uygulanmasında metanol içerisindeki BRI ve TIM stok çözeltileri kullanılarak beş seviyeli ve iki faktörlü (5^2) olan kalibrasyon seti Çizelge 3.15'te sunulduğu gibi hazırlandı. Kalibrasyon setindeki herbir çözeltinin 220.0-340.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve kodlanarak bilgisayar hafızasına kaydedildi. Şekil 3.8.B'de kalibrasyon set çözeltilerinin UV spektrumları yer almaktadır. Şekil 3.8.A'dan da anlaşılacağı gibi BRI ve TIM aynı spektral dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır ve aynı şekil üzerinde BRI ve TIM karışımının UV spektrumu da sunulmaktadır. Spektral girişim yapmaları sebebiyle klasik spektrofotometrik yöntemler ile BRI-TIM karışımının doğrudan kantitatif analizleri mümkün değildir. Bu açıdan BRI-TIM karışımının analizi için herhangi bir ön ayırma işlemine ihtiyaç duyulmadığı için PLS yöntemi uygulanmıştır.

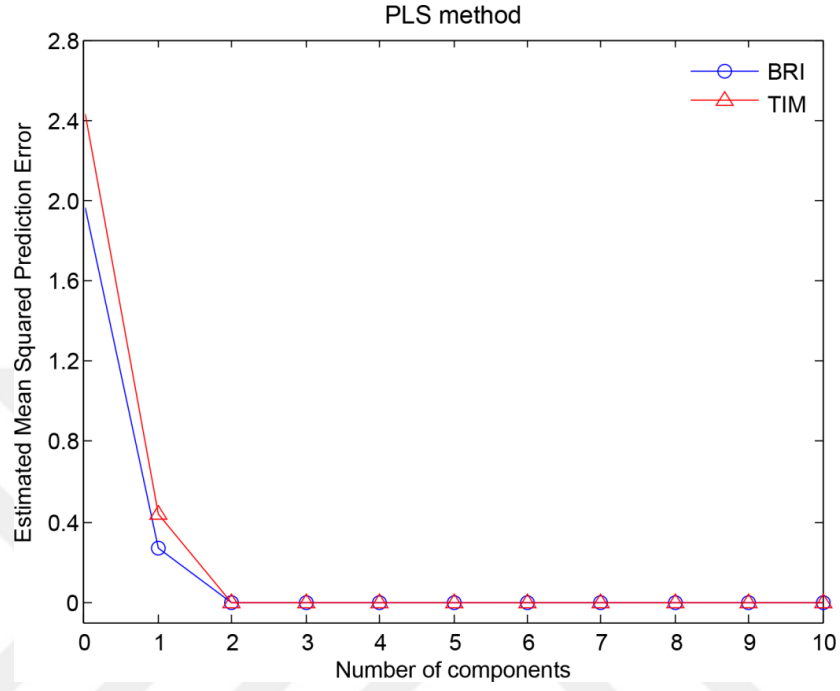
PLS kalibrasyonunun matematiksel inşası için 25 x 2 y-blok (konsantrasyon set, bağımsız değişken) ve 1151 x 25 x-blok (absorbans set, bağımlı değişken) arasındaki doğrusal ilişkiye PLS kalibrasyon algoritması uygulandı. Kemometrik PLS kalibrasyon işlemlerinde bu işlem 10 faktör için test edildi. Ancak PLS kalibrasyonunda model için minimum hata faktörü ilk iki faktör kalibrasyona alındığında gözlemlendi. Şekil 3.9'dan PLS kalibrasyon modelinde ilk iki faktör kullanıldığında minimal hata ile kalibrasyonu gerçekleştirebileceği anlaşılmaktadır. PLS kalibrasyonuna ait üç boyutlu projeksiyon Şekil 3.10'da sunulmuştur.

Çizelge 3.15. BRI ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.

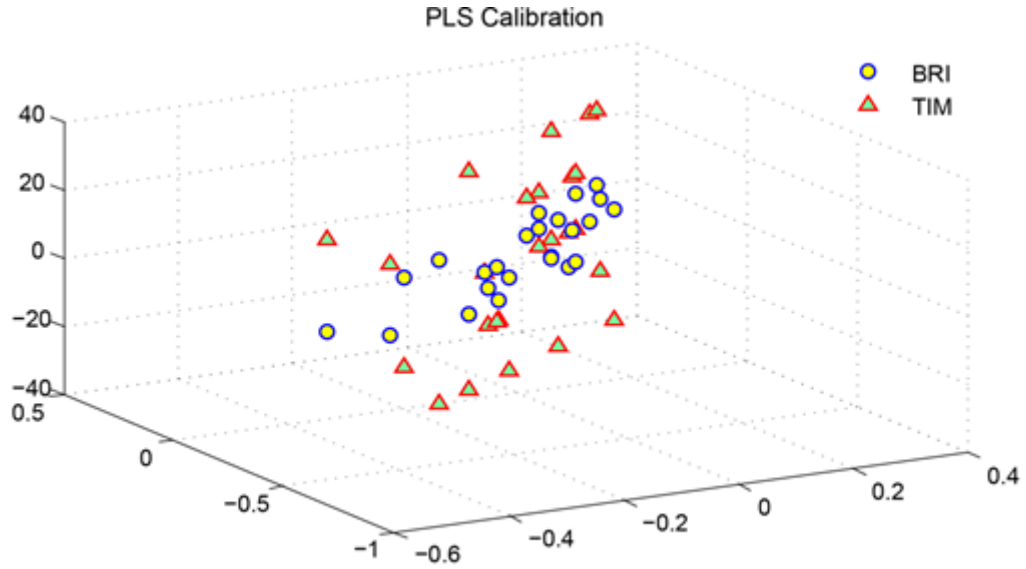
$\mu\text{g/mL}$			$\mu\text{g/mL}$		
Deney No	BRI	TIM	Deney No	BRI	TIM
1	5	72	15	25	56
2	10	56	16	5	24
3	15	40	17	20	56
4	20	24	18	5	40
5	25	8	19	10	72
6	5	56	20	15	56
7	10	40	21	20	40
8	5	8	22	25	24
9	15	24	23	10	8
10	25	72	24	15	72
11	20	8	25	25	40
12	10	24			
13	20	72			
14	15	8			



Şekil 3.8. A) BRI (20.0 $\mu\text{g/mL}$), TIM (40.0 $\mu\text{g/mL}$) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.



Şekil 3.9. BRI ve TIM için PLS kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).



Şekil 3.10. PLS kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonları.

3.1.4.3. PLS yönteminin analitik validasyonu

Çalışmada PLS yönteminin validasyonu için metanol içerisinde BRI için 5.0-25.0 $\mu\text{g/mL}$ ve TIM için 8.0-72.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 11 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak hesaplanan PLS yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi. PLS yönteminin validasyon seti olarak hazırlanan yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.16. da sunuldu. Geri kazanım değerleri, BRI için % 99.9, TIM için % 101.1 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri, BRI için 0.71 ve TIM için 0.42 olarak hesaplandı (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16. BRI ve TIM sentetik karışım çözeltilerinin analiz sonuçları.

Deney No	Konulan($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
1	5	40.0	5.0	40.5	100.9	101.2
2	10	40.0	10.0	40.5	100.2	101.2
3	15	40.0	15.0	40.2	99.8	100.6
4	20	40.0	19.9	40.2	99.4	100.6
5	25	40.0	24.7	40.4	98.9	101.0
6	16	8	16.1	8.2	100.9	102.1
7	16	24	15.9	24.3	99.5	101.4
8	16	40	16.0	40.5	99.9	101.3
9	16	56	15.9	56.5	99.5	100.8
10	16	72	16.2	72.7	101.0	101.0
11	20	50	19.8	50.5	99.2	101.0
				$\bar{X}$	99.9	101.1
				SS	0.71	0.42
				BSS	0.71	0.42

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağıl standart sapma

Geri kazanım çalışmasının ardından, PLS yönteminin tekrar edilebilirliğini test etmek için gün içi ve günler arası çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar, aynı gün içinde ve günler arasında taze hazırlanan, kalibrasyon konsantrasyon aralığı içinde üç farklı konsantrasyonda (BRI için 6.0, 15.0 ve 24.0 ve TIM için 10.0, 40.0 ve 70.0 $\mu\text{g/mL}$) her derişim için 6 farklı çözelti kullanılarak gerçekleştirildi. Hesaplanan sonuçlar Çizelge 3.17’de verilmektedir.



Çizelge 3.17. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.

Konulan (µg/mL)			Bulunan (µg/mL)	
	BRI	TİM	BRI	TİM
Gün içi	6	10	5.86	9.97
	15	40	15.03	40.56
	24	70	24.09	70.74
Günler arası	6	10	5.85	10.33
	15	40	15.13	40.91
	24	70	24.24	71.38
Geri kazanım (%)				
			BRI	TİM
Gün içi			97.7	99.7
			100.2	101.4
			100.4	101.1
Günler arası			97.6	103.3
			100.9	102.3
			101.0	102.0
BSS (%)				
			BRI	TİM
Gün içi			1.54	2.77
			0.15	0.33
			0.11	0.31
Günler arası			0.83	0.80
			0.27	0.25
			0.26	0.26
BSH (%)				
			BRI	TİM
Gün içi			-2.35	-0.27
			0.17	1.39
			0.36	1.06
Günler arası			-2.42	3.34
			0.88	2.28
			0.98	1.97

BSS= Bağıl standart sapma, BSH= Bağıl standart hata n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Analiz işleminde PLS yöntemini gerçek ticari oftalmik preparatların analizinden önce, BRI ve TIM içeren farmasötik preparattaki diğer bileşenlerin analiz üzerine bir etkisi olup olmadığı test edildi. Bu test için de standart ilavesi tekniğinden faydalanıldı. Farmasötik preparatlardaki 1 mL göz damlasının 50 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisinden gerekli seyreltmelerin yapılmasıyla preparatın içeriğindeki etiket miktarlarına göre stok çözeltilerden numune içeriğinin üzerine 6.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL BRI ve 8.0, 30.0 ve 40.0 µg/mL TIM olacak şekilde standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COMBIGAN®** göz damlasına uygulandı. Analiz sonunda hesaplamalarda ticari göz damlasından gelen BRI ve TIM miktarları düşülerek ilave edilen standartlar içindeki BRI ve TIM için geri kazanım ve diğer hesaplamalar yapıldı. Üç farklı konsantrasyon seviyesinde beş tekrar ile bu analizler gerçekleştirildi. PLS yönteminin uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.18 de sunulmuştur.

Çizelge 3.18. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)	
	BRI	TIM	BRI	TIM
Formülasyon	6	8	6.21	7.93
Formülasyon	12	30	12.05	30.32
Fprmülasyon	16	40	15.82	40.66
Geri kazanım (%)				
			BRI	TIM
			103.5	99.1
			100.4	101.1
			98.8	101.7
BSS (%)				
			BRI	TIM
			0.15	0.28
			0.11	0.71
			0.22	0.31

BSS= Bağlı standart sapma

3.1.4.4. PLS yönteminin farmasötik preparata uygulanması

Çalışmada PLS yönteminin ticari preparata uygulanmasında 1 mL göz damlası numunesi 50 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve hacmi metanolle tamamlandı. Manyetik karıştırıcı ile balon joje içeriği 40 dakika karıştırıldıktan sonra şırınga ucu membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 220.0-340.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlarından göz damlası içeriğindeki BRI ve TIM miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan göz damlası analiz işlemi **COMBIGAN®** göz damlası preparatına uygulandı. **COMBIGAN®** göz damlası sonuçları Çizelge 3.19. da sunuldu.

Çizelge 3.19. PLS yöntemlerinin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: BRI 2.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL	
	BRI	TIM
1	1.99	5.06
2	1.99	5.05
3	2.01	5.12
4	2.06	5.11
5	2.06	5.13
6	1.99	5.10
7	1.96	5.09
8	2.05	5.09
9	2.05	5.06
10	2.05	5.05
$\bar{X}$	2.02	5.09
SS	0.04	0.03
BSS	1.87	0.59
GA	$\bar{X} \pm 0.03(1.99-2.05)$	$\bar{X} \pm 0.02(5.07-6.01)$

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

GA= Güven aralığı

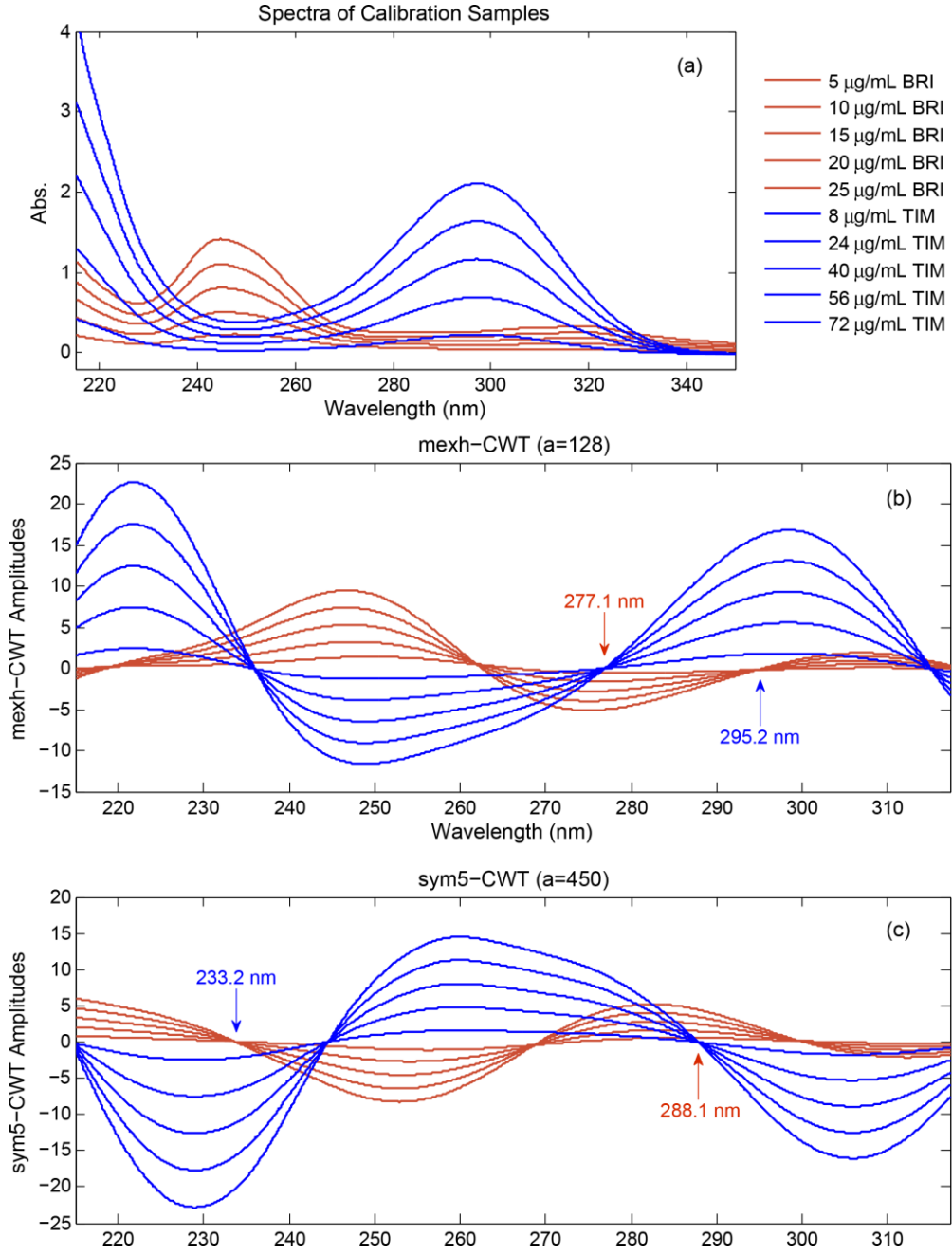
3.1.5. BRI-TIM Karışımının Mexh-SDD ve Sym5-SDD Sinyal İşleme Yöntemleri ile Kantitatif Analizi

Sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) (countinuous wavelets transform $\rightarrow$ CWT) sinyal işleme yöntemleri karışım analizlerine algoritmaları gereği sinyal/gürültü oranını düşürmeleri ve girişim yapan spektral bantları başarıyla ayırdığı için karışım analizlerinde yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Dolayısıyla SDD yaklaşımı spektrofotometrik yöntemler ile birlikte kullanıldığında, spektrofotometrik yöntemlerin kompleks karışımların analizlerindeki gücü artmaktadır.

Doktora tez çalışmasının bu bölümünde SDD yöntemlerinden olan Symlet5 (Sym5)-SDD ve Mexican Hat (mexh)-SDD yöntemleri BRI ve TIM'ın kantitatif analizi için 220.0-340.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorbsiyon spektrumlarına uygulandı.

3.1.5.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri

- a) Analiz işlemleri için metanol içerisinde 100 mL'lik hacim içerisinde 10 mg BRI ve 10 mg TIM çözülerek her iki bileşiğin stok çözeltileri hazırlandı.
- b) BRI bileşiğini 5.0-25.0 µg/mL ve TIM bileşiğini 8.0-72.0 µg/mL konsantrasyon aralığında iki bileşik için 5 farklı konsantrasyon seviyesinde 25 adet farklı kombinasyonda kalibrasyon çözeltileri konsantrasyon (derişim) seti olarak hazırlandı.
- c) Analiz edilen bileşiklerin kalibrasyon konsantrasyon aralıkları içerisinde olacak şekilde BRI ve TIM bileşiklerini içeren yapay karışımlardan oluşan validasyon test çözeltileri hazırlandı.
- d) Gün içi ve günler arası deneylerde n=6 deneme için üç farklı konsantrasyon seviyesinde BRI (düşük= 6.0 µg/mL, orta= 15.0 µg/mL ve yüksek= 24.0 µg/mL) ve TIM (düşük= 10.0 µg/mL, orta= 40.0 µg/mL ve yüksek= 70.0 µg/mL) içeren çözeltiler taze ve günlük hazırlandı.
- e) Standart ekleme tekniğinde ticari formülasyondan 0.04 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılaraq üzerine bileşiklerin standart çözeltilerinden üç farklı konsantrasyon seviyesinde (BRI için düşük= 6.0 µg/mL, orta= 12.0 µg/mL ve yüksek= 16.0 µg/mL ve TIM için düşük= 8.0 µg/mL, orta= 30.0 µg/mL ve yüksek= 40.0 µg/mL) ilaveler ile standart ekleme çözeltileri hazırlandı.



Şekil. 3.11. a) BRI ve TIM'in kalibrasyon setinin spektrumu, b) mexh-SDD yöntemi ve c) sym5-SDD yönteminin kalibrasyon setinin UV spektrumlarına uygulanması

Mexh-SDD ile sym5-SDD 220.0-340.0 nm dalga boyu bölgesinde kalibrasyon UV spektrumlarına uygulandı ve elde edilen spektrumları, genliklerine karşı dalga boyu grafiğe geçirilerek elde edildi (Şekil 3.11). Mexh-SDD yönteminde kalibrasyon grafiği; BRI kalibrasyon çözeltileri için 277.1 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon çözeltileri için için 295.2 nm dalga boyundaki genlikleri ölçülerek hesaplandı. Sym5-SDD yönteminde kalibrasyon grafiği; BRI kalibrasyon çözeltileri için 233.2 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon çözeltileri için için 288.1 nm dalga boyundaki genlikleri ölçülerek hesaplandı.

Bu iki dalga boyundaki doğrusal regresyon analizi ile elde edilen sonuçlar, Çizelge 3.20 de görülmektedir.

Çizelge 3.20. BRI ve TIM kalibrasyonu için mexh-CWT ve sym5-CWT yöntemlerinin regresyon analizi sonuçları

	mexh-CWT		sym5-CWT	
	BRI	TIM	BRI	TIM
m	0.2228	0.2231	0.1924	0.2815
n	0.5745	-0.0348	-0.4097	0.1067
r	0.9997	1.0000	0.9998	1.0000
SD (m)	3.35×10^{-3}	3.50×10^{-4}	2.23×10^{-3}	4.23×10^{-4}
SD (n)	5.56×10^{-2}	5.56×10^{-2}	3.69×10^{-2}	3.69×10^{-2}
SD (r)	5.30×10^{-2}	1.77×10^{-2}	3.52×10^{-2}	2.14×10^{-2}
LOD	0.29	1.39	0.27	0.55
LOQ	0.97	4.62	0.90	1.82
m = Doğrusal regresyon eşitliğinin eğimi				
n = Doğrusal regresyon eşitliğinin kesim noktası				
r = Doğrusal regresyon eşitliğinin korelasyon katsayısı				
SD (m) = Eğimin standart sapması				
SD (n) = Kesim noktasının standart sapması				
SD(r) = Korelasyon katsayısının standart sapması				
LOD = Yakalama sınırı ($\mu\text{g/mL}$)				
LOQ = Tayin sınırı ($\mu\text{g/mL}$)				

Çizelge 3.20. deki lineer regresyon analizine göre kalibrasyon denklemleri kullanılarak numunelerin içindeki BRI ve TIM miktarları hesaplandı.

3.1.5.2. Sinyal işleme yöntemlerinin validasyonu

Bu bölümdeki validasyon çalışmasında geliştirilen yöntemlerin geçerliliğini doğrulamak için % geri kazanım çalışması, gün içi ve günler arası analiz işlemi ve standart ilave tekniği analizleri yapıldı.

Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin validasyonu için metanol içerisindeki stok çözeltilerden BRI için 5.0-25.0 µg/mL ve TIM için 8.0-72.0 µg/mL çalışma aralığında içinde olacak şekilde her biri farklı konsantrasyonlarda BRI ve TIM içeren 11 adet farklı karışım çözeltilisini içeren validasyon seti hazırlandı ve Çizelge 3.21’de sunuldu. Mexh-SDD yöntemi için yüzde geri kazanım ile bağlı standart sapma değerleri BRI için sırasıyla % 102.5 ve 1.73, TIM için %98.9 ve 0.65 olarak, Sym5-SDD yöntemi için yüzde geri kazanım ile bağlı standart sapma değerleri BRI için sırasıyla % 99.8 ve 1.77, TIM için % 100.6 ve 1.05 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.21. Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin BRI-TIM ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları

Mexh-SDD							Sym5-SDD				
	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)		Bulunan (µg/µL)		Geri Kazanım (%)		
Kod	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	
M1	5	40.0	5.1	39.7	101.9	99.2	4.9	39.8	97.9	99.4	
M2	10	40.0	10.6	39.5	105.6	98.8	10.1	39.9	101.4	99.8	
M3	15	40.0	15.4	39.4	102.5	98.5	14.9	39.8	99.6	99.5	
M4	20	40.0	20.4	39.6	101.9	99.0	19.9	40.1	99.5	100.2	
M5	25	40.0	24.9	39.7	99.7	99.3	24.5	40.5	98.1	101.1	
M6	16	8	16.7	7.8	104.3	97.3	16.6	8.2	103.5	102.4	
M7	16	24	16.4	23.6	102.4	98.5	16.1	24.4	100.9	101.8	
M8	16	40	16.4	39.6	102.6	99.1	16.0	40.2	100.1	100.4	
M9	16	56	16.0	55.3	100.0	98.8	15.6	55.8	97.4	99.7	
M10	16	72	16.7	71.8	104.5	99.7	16.1	73.5	100.8	102.0	
M11	20	50	20.4	49.8	102.2	99.6	19.8	50.3	99.2	100.6	
				$\bar{X}$	102.5	98.9			$\bar{X}$	99.8	100.6
				SS	1.78	0.64			SS	1.76	1.06
				BSS	1.73	0.65			BSS	1.77	1.05

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama
 SS = Standart sapma
 BSS = Bağıl standart sapma

Diğer validasyon işleminde Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin tekrar edilebilirliğini ölçmek için gün içi ve günler arası ölçümleri yapıldıktan sonra sonuçları validasyon parametreleri ile değerlendirildi. Bu işlem, kalibrasyon konsantrasyon aralığı içinde üç farklı konsantrasyonda BRI için düşük 6.0 µg/mL, orta 15.0 µg/mL ve yüksek 24.0 µg/mL ve TIM için düşük 10.0 µg/mL, orta 40.0 µg/mL ve yüksek 70.0 µg/mL olmak üzere 6 farklı çözelti günlük hazırlanarak aynı gün içinde ve günler arasında ölçümleri gerçekleştirildi. Alınan ölçümlere Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemleri uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.22 de sunuldu.

Çizelge 3.22. Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin gün içi ve günler arası analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulumam (µg/mL)			
			mexh-CWT		sym5-CWT	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
Günler arası	6	10	6.10	9.55	6.06	10.46
	15	40	15.26	39.60	14.91	40.06
	24	70	24.12	70.20	23.53	71.95
Gün içi	6	10	5.56	9.55	5.94	10.44
	15	40	15.12	39.82	14.87	40.30
	24	70	24.10	70.72	23.57	72.52
			Geri Kazanım (%)			
			mexh-CWT		sym5-CWT	
			BRI	TIM	BRI	TIM
Günler arası			101.6	95.5	101.1	104.6
			101.7	99.0	99.4	100.2
			100.5	100.3	98.0	102.8
Gün içi			92.6	95.5	99.0	104.4
			100.8	99.5	99.1	100.8
			100.4	101.0	98.2	103.6
			BSS (%)			
			mexh-CWT		sym5-CWT	
			BRI	TIM	BRI	TIM
Günler arası			0.96	0.21	0.68	0.30
			0.68	0.13	0.36	0.20
			0.24	0.21	0.10	0.32
Gün içi			5.52	0.11	0.21	0.07
			0.09	0.20	0.04	0.20
			0.11	0.26	0.23	0.41
			BSH (%)			
			mexh-CWT		sym5-CWT	
			BRI	TIM	BRI	TIM
Günler arası			1.63	-4.51	1.06	4.61
			1.72	-1.00	-0.57	0.15
			0.52	0.28	-1.97	2.79
Gün içi			-7.36	-4.47	-0.98	4.39
			0.82	-0.46	-0.87	0.75
			0.42	1.03	-1.78	3.60

BSS= Bağlı standart sapma, BSH= Bağlı standart hata n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Standart ilave tekniği kullanılarak BRI ve TIM bileşiklerini içeren farmasötik göz damlası preparatındaki yardımcı maddelerin Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin analiz üzerine bir etkisi olup olmadığı incelendi. Ticari göz damlası numunesinden 1 mL alınıp 50 mL’lik balon jojede metanolle stok çözeltisi hazırlandı. Preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre bu stok çözeltisinden gerekli seyreltmelerin yapılmasıyla numune içeriğinin üzerine stok çözeltiilerden 6.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL BRI ve 8.0, 30.0 ve 40.0 µg/mL TIM olacak şekilde standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COMBIGAN®** göz damlasına uygulandı. Analiz sonuçlarında ticari göz damalsından gelen BRI ve TIM miktarları düşölerek ilave edilen standartlar içindeki BRI ve TIM için geri kazanım ve diğler hesaplamalar yapıldı ve Çizelge 3.23’te sunuldu. Üç farklı konsantrasyon seviyesinde bu denemeler beş tekrar ile gerçekleştirildi.

Çizelge 3.23. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)			
	BRI	TIM	mexh-CWT		sym5-CWT	
			BRI	TIM	BRI	TIM
Formülasyon	6	8	5.87	8.03	5.95	8.17
Formülasyon	12	30	12.04	30.16	12.12	30.76
Formülasyon	16	40	16.07	41.03	16.41	41.63
Geri Kazanım(%)						
	BRI	TIM	mexh-CWT		sym5-CWT	
			BRI	TIM	BRI	TIM
			97.9	100.4	99.2	102.1
			100.3	100.5	101.0	102.5
			100.4	102.6	102.6	104.1
BSS (%)						
	BRI	TIM	mexh-CWT		sym5-CWT	
			BRI	TIM	BRI	TIM
			0.18	0.23	0.15	0.20
			0.23	0.83	0.10	1.60
			0.21	0.28	0.68	0.90

BSS= Bağıl Standart Sapma

3.1.5.3. Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin farmasötik preparata uygulanması

Çalışmada Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin ticari preparata uygulanmasında 1 mL göz damlası numunesi 50 mL'lik balonjojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanol tamamlandı. Balon joje manyetik karıştırıcıda 40 dakika karıştırıldıktan sonra şırınga ucu Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$ 'lik membran filtre ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 220.0-340.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlarından göz damlası içeriğindeki BRI ve TIM miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan göz damlası analiz işlemi **COMBIGAN®** göz damlası preparatına uygulandı. **COMBIGAN®** göz damlası sonuçları Çizelge 3.24' te sunuldu.

Çizelge 3.24. Mexh-CWT ve Sym5-CWT yöntemlerinin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: BRI 2.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL			
	mexh-CWT		sym5-CWT	
	BRI	TIM	BRI	TIM
1	2.01	4.98	1.99	5.02
2	1.99	5.02	2.02	5.01
3	1.94	5.06	1.94	5.08
4	2.01	5.04	1.96	4.98
5	1.97	5.12	2.03	4.99
6	2.00	5.03	2.01	4.97
7	2.04	5.05	2.04	4.98
8	1.95	5.03	1.98	4.96
9	1.96	4.92	1.97	4.95
10	1.98	5.01	1.98	4.91
$\bar{X}$	1.98	5.03	1.99	4.99
SS	0.03	0.05	0.03	0.05
BSS	1.51	1.05	1.71	0.91
GA	$\bar{X} \pm 0.02(1.96-2.00)$	$\bar{X} \pm 0.04(4.99-5.07)$	$\bar{X} \pm 0.02(1.97-2.01)$	$\bar{X} \pm 0.04(4.95-5.03)$

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama
 SS= Standart sapma
 BSS= Bağlı standart sapma
 GA= Güven aralığı

3.1.6. BRI-TIM Karışımı için uygulanan yöntemlerin istatistiksel karşılaştırılması

Doktora tezinin BRI-TIM karışımındaki miktar tayini için geliştirilen yöntemlerin ticari preparatlara uygulamasıyla elde edilen sonuçları karşılaştırmak için $p=0.05$ olasılık düzeyinde $n_1=4$ ve $n_2=45$ serbestlik derecesinde ANOVA (Analysis of Variance) testi uygulandı. Bu istatistiksel test işleminde, BRI-TIM karışımını içeren formülasyondan yöntemler ile BRI ve TIM etken maddelerinin kantitatif analiz sonuçlarına ANOVA testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 3.25 te listelendi. ANOVA testi sonuçlarındaki F ve p değerlerine göre UPLC, PCR, PLS, Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin analiz sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Çizelge 3.25. Geliştirilen yöntemlerin BRI-TIM karışımını içeren ticart preparatlar uygulamasıyla elde edilen kantitatif analizi sonuçlarına istatistiksel analizi için ANOVA test sonuçları

Yöntemler	Deney Sayısı		Toplam		Ortalama		Varyans	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
UPLC	10	10	19.89	50.63	1.99	5.06	0.0021	0.0126
PLS	10	10	20.1	50.58	2.01	5.06	0.0016	0.0060
PCR	10	10	20.31	49.91	2.03	4.99	0.0024	0.0020
Mexh-SDD	10	10	19.9	50.03	1.99	5.00	0.0014	0.0078
Sym5-SDD	10	10	19.92	49.85	1.99	4.99	0.0010	0.0021

Varyasyon	KT		SD		KO		F-hesap		P-değeri		F-tablo	
	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM	BRI	TIM
Yöntemler Arası	0.0132	0.0565	4	4	0.0033	0.0141	1.93	2.32	0.12	0.07	2.58	2.58
Yöntemler İçi	0.0767	0.2737	45	45	0.0017	0.0061						
Toplam	0.0899	0.3302	49	49								

KT = karelerin toplamı
SD = serbestlik derecesi
KO = karelerin ortalaması

3.2. DOR ve TIM Karışımının Analizi

3.2.1. UPLC yönteminin geliştirilmesinde kemometrik optimizasyon

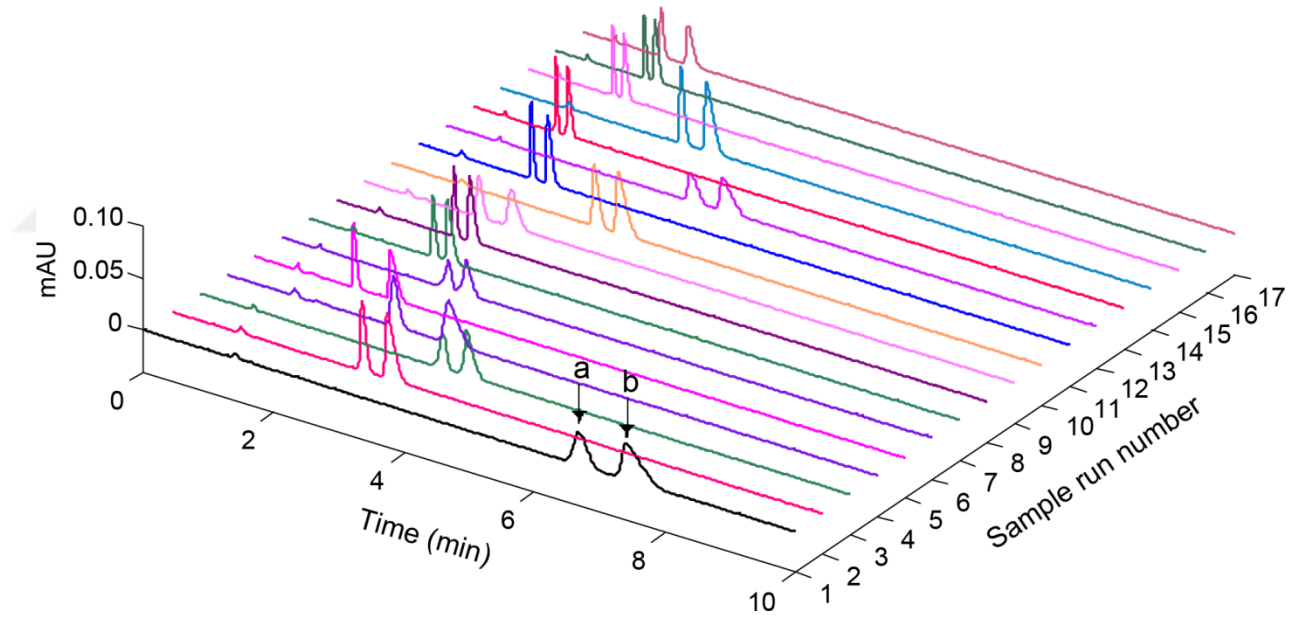
Bu tez çalışmasında Timolol Maleat (TIM)-Dorzolamid Hidroklorür (DOR) karışımının aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Ultra Pressure Liquid Chromatography → UPLC) yöntemi ile analizi işleminde kromatografik cevap üzerine etki eden faktörlerin optimizasyonu gerçekleştirildi. Deneysel tasarım ve optimizasyon tekniği ile saptanan kromatografik koşullarda UPLC yöntemi geliştirildi, valide edildi ve ticari formülasyonun analizine uygulandı. UPLC yönteminin geliştirilmesinde kemometrik optimizasyon yaklaşımı, kısa alıkonma zamanı ve istenen en iyi kromatografik ayrımı sağlayan deneysel şartların bulunmasında doğru karar verilmesini sağladı.

Doktora tez çalışmasında TIM-DOR karışımının analizi için yeni bir UPLC yönteminin geliştirilmesinde deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanıldı. Kromatografik optimizasyon işleminde, yapılan ön çalışmalardan sonra cevap faktörü üzerine etkili faktörlerin, kolon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$), akış hızı (mL/dak) ve hareketli fazdaki 4.0×10^{-4} M Cl_3CCOOH yüzdesi (%) olduğu saptandı. Optimizasyon işleminde bağımlı değişkenler olarak % 4.0×10^{-4} M Cl_3CCOOH , kolon sıcaklığı ve akış hızı sırasıyla X_1 , X_2 ve X_3 olarak gösterildi. Etkili bu faktörlerin düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+1) olmak üzere üç farklı seviyesini kapsayan tasarım uzayı oluşturuldu. Faktörler ve karşılık gelen seviyeler Çizelge 3.26’da sunuldu. UPLC yönteminin optimizasyonunda Box-Behnken tasarımı Çizelge 3.27’de gösterildiği gibi planlanarak 17 farklı seviye kombinasyonunda 20 $\mu\text{g/mL}$ TIM ve 20 $\mu\text{g/mL}$ DOR içeren numunelerin otomatik enjeksiyon işlemiyle UPLC sisteminde 275 nm dalga boyunda kromatogramları çizdirildi ve kromatogramlar Şekil 3.12’de sunuldu. Elde edilen bu kromatogramlar üzerinden Bölüm 2.2.7’de açıklanan ICRF ölçüm parametreleri ve denklemi kullanılarak ICRF değerleri hesaplandı ve Çizelge 3.27’de tasarım uzayında ölçülen kolonu olarak verildi.

Bölüm 2.2.7 de teorik açıklaması yapılan ICRF’nin özelliği, minimum alıkonma süresinde analiz edilen etken maddelerin maksimum ayrımını sağlayan matematiksel bir fonksiyondur (Carle, 1972).

Çizelge 3.26. Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörlerin çalışma aralığı ve seviyeleri.

Seviye	4.0x10 ⁻⁴ M Cl ₃ CCOOH	Kolon Sıcaklığı	Akış Hızı
	% v/v (x ₁)	°C (x ₂)	mL/dak (x ₃)
-1	12.0	30.0	0.20
0	38.0	45.0	0.30
1	64.0	60.0	0.40



Şekil 3.12. DOR (a) ve TIM (b) için 275.0 nm’de Box-Behnken Tasarımı için UPLC kromatogramı.

Çizelge 3.27. Box-Behnken tasarım ve ICRF değerleri.

	4.0x10 ⁻⁴ M Cl ₃ CCOOH	Kolon Sıcaklığı	Akış Hızı	ICRF	
Deney No.	X ₁	X ₂	X ₃	R	R _{tahmin}
1	-1	0	-1	11.6165	11.5095
2	0	0	0	1.5560	1.5547
3	1	-1	0	1.5874	1.5707
4	0	-1	-1	4.1937	4.2310
5	-1	-1	0	5.3232	5.3719
6	1	0	-1	2.5443	2.5028
7	0	0	-1	4.5346	4.6020
8	0	1	0	0.9576	0.9362
9	-1	1	0	5.5375	5.5779
10	0	1	1	0.2173	0.1793
11	1	1	0	1.1277	1.1028
12	-1	0	1	2.7023	2.7201
13	0	1	-1	3.8233	3.8671
14	0	0	1	0.6999	0.6812
15	0	-1	1	0.1216	0.0772
16	0	-1	0	1.0920	1.0672
17	1	0	1	3.3672	3.4505

Kromatografik yöntemin kemometrik yöntem optimizasyonu ile optimize kromatografik deney koşullarının bulunması için bağımsız değişkenler; olarak % 4.0×10^{-4} M Cl_3CCOOH (X_1), kolon sıcaklığı (X_2) ve akış hızı sırasıyla (X_3) ve faktör etkileşimleri ile bağımlı değişken olan ICRF arasındaki matematiksel bağıntıdan doğrusal regresyon analizi ile ikinci dereceden polinomial bir fonksiyon (model) bulundu. Bu model için karşılık gelen matematiksel ifade aşağıda sunulmaktadır.

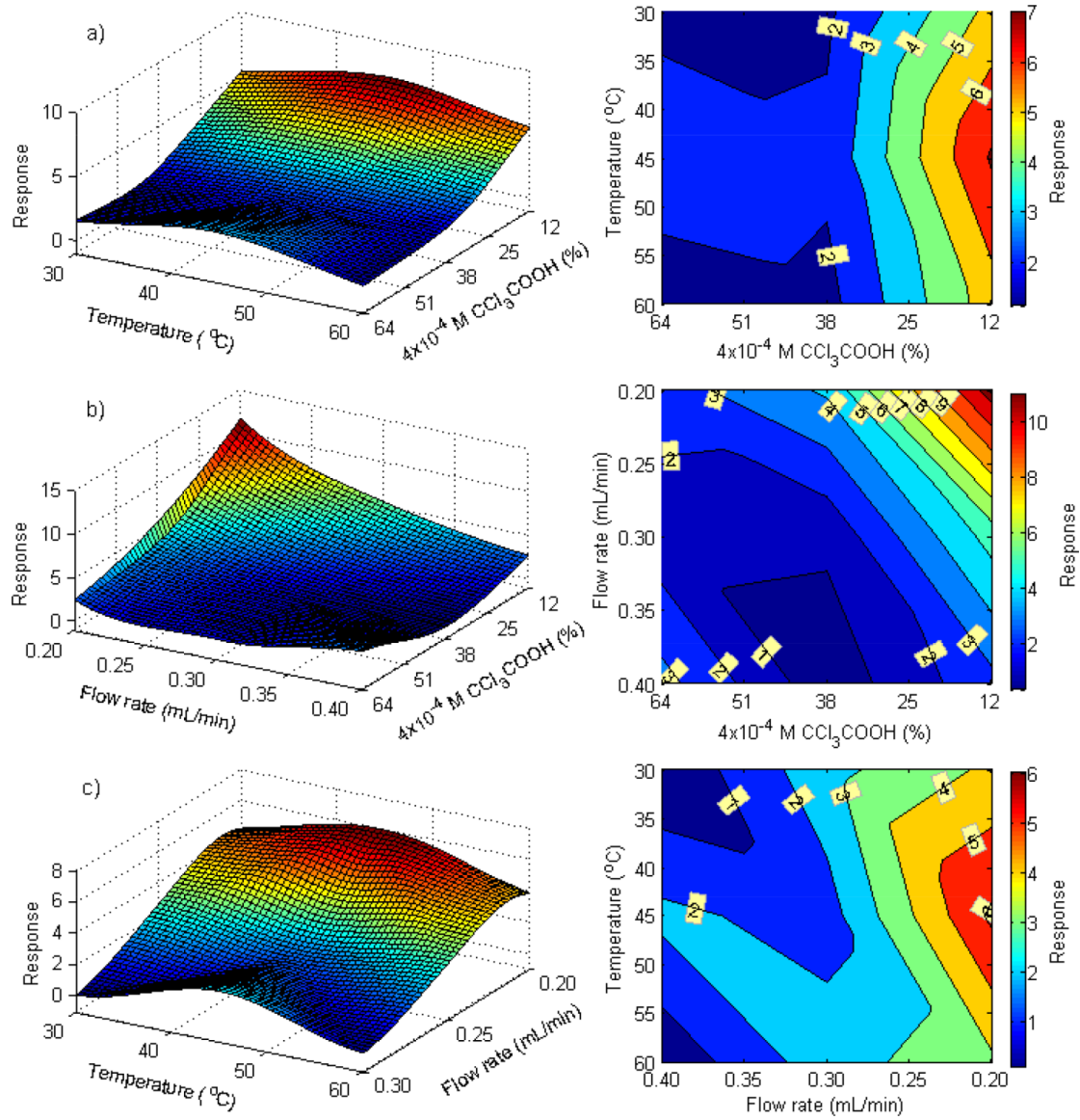
$$y = 1.5547 - 2.0691x_1 - 0.0655x_2 - 1.9604x_3 + 2.4041x_1^2 - 0.5529x_2^2 + 1.0869x_3^2 - 0.1685x_1x_2 + 2.4343x_1x_3 + 0.1165x_2x_3 \quad (2)$$

Bu model fonksiyonda X_1 , X_2 ve X_3 faktörler, y ise ICRF'dir. X_1X_2 , X_1X_3 ve X_2X_3 faktör etkileşimlerini gösterir, X_1^2 , X_2^2 ve X_3^2 ise faktörlerin karesidir. Fonksiyondaki sayılar, kesim ve model katsayılarını göstermektedir. Yukarıdaki eşitlikte verilen fonksiyonun katsayılarının anlamlı olup olmadığını ortaya koymak için istatistiksel test yapıldı. Test sonuçlarından elde edilen % 95 olasılık düzeyinde t- ve F- değerleri Çizelge 3.28'de özetlendi. Büyük t- ve p- değeri < 0.05 olduğu için seçilen faktörlerin cevap üzerinde etkin olduğu sonucuna varıldı.

Çizelge 3.28. İkinci dereceden polinomiyal model için istatistik t- ve F- testlerinin sonuçları.

	<i>Katsayı</i>	t- değeri	P-değeri
Kesim noktası	1.5547	28.30	0.0000
X_1	-2.0691	-79.41	0.0000
X_2	-0.0655	-2.81	0.0262
X_3	-1.9604	-84.12	0.0000
x_1^2	2.4041	63.50	0.0000
X_2^2	-0.5529	-13.00	0.0000
X_3^2	1.0869	25.54	0.0000
$X_1 * X_2$	-0.1685	-4.57	0.0026
$X_1 * X_3$	2.4343	66.06	0.0000
$X_2 * X_3$	0.1165	3.16	0.0159

UPLC yönteminin optimizasyonunda faktörlerin etkileşimini ve ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey grafikleri çizdirildi ve Şekil 3.13’de sunuldu.



Şekil 3.13. a) Kolon sıcaklığı-% 4.0×10^{-4} M CCl_3COOH ile ICRF, b)akış hızı-% 4×10^{-4} M CCl_3COOH ile ICRF, c) kolon sıcaklığı–akış hızı ile ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey grafikleri ve eş yükselti eğri haritaları (countour plots). (Response: Cevap → ICRF)

Kolon sıcaklığı-% 4.0×10^{-4} M CCl_3COOH ile ICRF, b) akış hızı-% 4.0×10^{-4} M CCl_3COOH ile ICRF, c) kolon sıcaklığı–akış hızı ile ICRF arasındaki ilişkiyi gösteren üç boyutlu yüzey grafikleri Şekil 3.13a-c’de verildi. Bu yüzey-cevap grafiklerine göre seçilen faktörlerin faktör etkileşimlerinin kromatografik cevap (ICRF) üzerine etkilerinin olduğu görülmektedir.

Şekil 3.13a’da kolon sıcaklığı orta seviyede iken ve 4.0×10^{-4} M CCl_3COOH yüzdesi azaldıkça ICRF değerinin arttığı gözlenmektedir. Aynı sonuçlar yandaki eş yükselti eri haritasından da görülebilir. Şekil 3.13b’de akış hızı azaldıkça ve 4.0×10^{-4} M CCl_3COOH yüzdesi azaldıkça ICRF değerinin arttığı gözlenmektedir. Şekil 3.13c’de kolon sıcaklığı orta seviyede iken ve akış hızı azaldıkça ICRF değerinin arttığı gözlenmektedir.

Bu deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi ile BRI ve TIM karışımının analizi için optimal kromatografik şart olarak; kolon sıcaklığı $45.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, akış hızı 0.32 mL/min ve yürütücü faz olarak % 60asetonitril ve % 40 4.0×10^{-4} M CCl_3COOH olarak tespit edildi

3.2.2. DOR ve TIM karışımının optimize edilen UPLC yöntemiyle kalitatif Analizi

3.2.2.1. Standart çözeltiler

- a) Metanol içinde TIM'in, DOR'un 10.0 mg/100 mL olan stok çözeltileri hazırlandı.
- b) DOR ve TIM i. için 5.0-40.0 µg/mL konsantrasyon aralığında 25 adet çözeltilerinden oluşan kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) Validasyon test çözeltileri DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL çalışma aralığında bu iki bileşiği içeren 10 farklı konsantrasyonda hazırlandı.
- d) Standart ekleme tekniği; Ticari formülasyon (göz damlası) çözeltisi varlığında DOR ve TIM için 5.0-32.0 µg/mL çalışma aralıkları içinde üç farklı konsantrasyon; DOR ve TIM için düşük: 5.0 µg/mL, orta: 20.0 µg/mL ve yüksek 32.0 µg/mL, olarak standart ekleme çözümleri hazırlandı.
- e) DOR ve TIM için 5.0-35.0 µg/mL çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 3 farklı konsantrasyon DOR ve TIM için düşük: 5.0 µg/mL, orta: 20.0 µg/mL ve yüksek: 35.0 µg/mL gün içi içeren gün içi ve günler arası çözeltileri hazırlandı.

3.2.2.2. UPLC yönteminin kromatografik şartları

- a) **Hareketli Faz** : Analiz işleminde, DOR ve TIM'ın kromatografik ayırımı için asetonitril ve 4.0×10^{-4} M CCl_3COOH (60:40, h/h) sisteminden oluşan bir çözelti kullanıldı.
- b) **Kolon Cinsi** : Waters Acquity[®] BEH C₁₈ kolonu (100mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm) kullanıldı.
- c) **Kolon Sıcaklığı** : Kolon içerisinde DOR ve TIM ayırımı (45°C)'de gerçekleştirildi.
- d) **Basınç** : Kolon basıncı analiz sırasında yaklaşık 340 bar civarındadır.
- e) **Akış Hızı** : 1 dakikada 0.32 mL akış hızı ile analiz gerçekleştirildi.
- f) **Enjeksiyon Hacmi** : Her vial'den 1 µL alınacak şekilde enjeksiyon hacmi ayarlandı.
- g) **Dedeksiyon Dalga Boyu** : DOR ve TIM analizi için dalga boyu 275.0 nm olarak seçildi.

3.2.2.3. Doğrusal regresyon denklemlerinin hesaplanması

UPLC yönteminin kalibrasyonu için, DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL çalışma aralığında hazırlanan 25 adet kalibrasyon çözeltilerinin DOR ve TIM için 275.0 nm’de PDA dedektörü kullanılarak kromatogramların kayıtları bilgisayar hafızasına alındı. Elde edilen bu kromatogramlarda DOR’un alıkonma zamanı 1.62 dakika, TIM’ın alıkonma zamanı 1.86 olarak rapor edildi (Şekil 3.14). Kromatografik analizde DOR ve TIM bileşiklerinin kromatogramlarından integrasyonla bulunan bir doğru denklemi elde edildi. Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.29. da sunulmuştur.

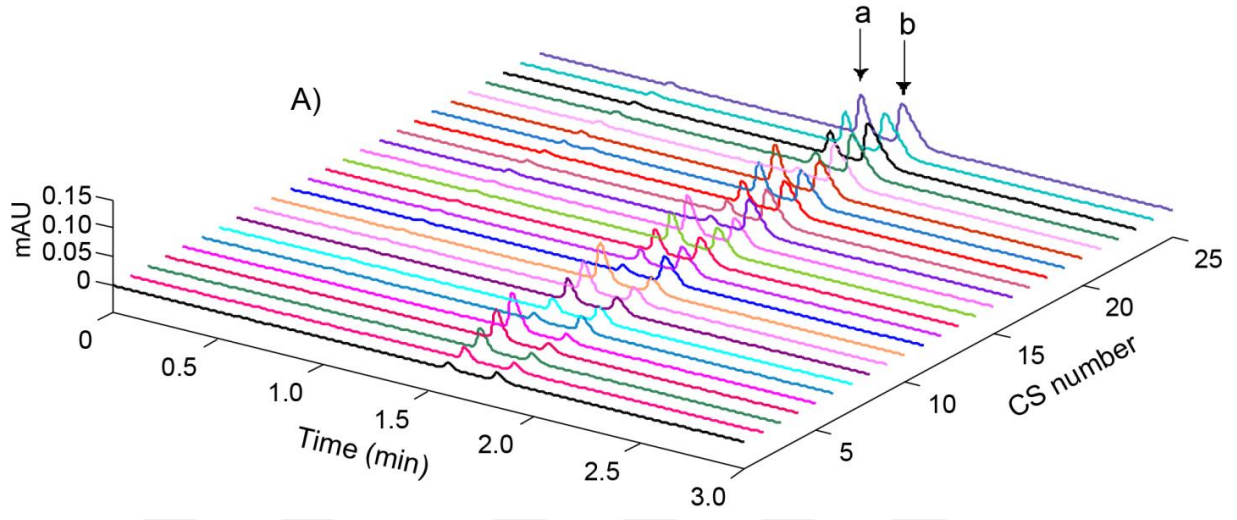
Çizelge 3.29. Doğrusal regresyon analizi ve istatistik sonuçları.

	DOR	TIM
m	1.0619	1.7773
n	0.1681	0.9884
r	0.9994	0.9992
SD(m)	7.35×10^{-03}	1.46×10^{-02}
SD(n)	1.81×10^{-01}	3.60×10^{-01}
SD (r)	1.44×10^{-03}	1.72×10^{-03}
LOD	0.51	0.61
LOQ	1.70	2.02

m = Doğrusal regresyon eşitliğinin eğimi
n = Doğrusal regresyon eşitliğinin kesim noktası
r = Doğrusal regresyon eşitliğinin korelasyon katsayısı
SD (m) = Eğimin standart sapması
SD (n) = Kesim noktasının standart sapması
SD(r) = Korelasyon katsayısının standart sapması
LOD = Yakalama sınırı ($\mu\text{g/mL}$)
LOQ = Tayin sınırı ($\mu\text{g/mL}$)

DOR ve TIM analizi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde deneysel tasarım ve optimizasyon yönteminden faydalanılarak bulunan optimal kromatografik şartlara göre çizdirilen kalibrasyon numunelerine ait kromatogramlar Şekil 3.14'te gösterildi.

Kalibrasyon setinde DOR ve TIM bileşiklerini içeren çözeltilerin kromatogramlarının verileri UPLC-H-Class Empower2 programı vasıtasıyla Microsoft Excel'e transferi gerçekleştirildi. Daha sonra Matlab 7.0 programında "m-file" yazılımı kullanılarak DOR ve TIM için 275.0 nm'de pik alanları ile konsantrasyon arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı doğrusal regresyon analizi ile doğrunun eğimi, kesimi, korelasyon katsayıları ve istatistiksel sonuçları hesaplandı ve Çizelge 3.29 da sunuldu.



Şekil 3.14. Kalibrasyon numuneleri için 275.0 nm’de elde edilen kromatogramlar. Kromatogramlar üzerindeki (a) ve (b), sırasıyla DOR ve TIM bileşiklerinin alıkonma zamanlarını göstermektedir.

3.2.2.4. UPLC analitik yöntem validasyonu

Bu tez kapsamında metanol içerisinde DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL çalışma aralığında kalacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 10 adet karışım çözeltisini içeren bir validasyon seti, geliştirilen UPLC yönteminin analitik validasyonunu test etmek üzere hazırlandı. Bu validasyon setinin analizi ile UPLC yönteminin kesinlik ve doğruluğu kontrol edildi, Geri kazanım değerleri DOR için % 99.9, TIM için % 99.5 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri DOR için % 2.50 ve TIM için % 2.15 olarak hesaplandı. UPLC yönteminin hazırlanan bu karışımlara uygulanması ile elde edilen geri kazanım çalışmasındaki sonuçlar Çizelge 3.30'da gösterildi.

DOR ve TIM karışımının analizi için Deneysel tasarım ve optimizasyon yöntemiyle geliştirilen UPLC yönteminin kesinliği ve doğruluğunu çek etmek amacıyla gün içi ve günler arası analizleri için üç farklı konsantrasyonda DOR ve TIM içeren (5.0, 20.0 ve 35.0 µg/mL) çözelti hazırlandı. Gün içi ve günler arası numunelerin aynı gün 1'er saat aralıklar ile ve günler arasında birbirini izleyen 6 günde olmak üzere 3'er tekrarlı kromatogramları alınarak yapılan alan okumaları kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçları yüzde geri kazanım (%), bağlı standart sapma (%) ve bağlı standart hata (%) ile Çizelge 3.31. de verildi.

Çizelge 3.30. DOR ve TIM yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları.

Geri kazanım						
KarışımNo.	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
1	32.0	5.0	32.80	4.96	102.5	99.1
2	32.0	10.0	32.95	10.20	103.0	102.0
3	32.0	20.0	32.93	20.65	102.9	103.3
4	32.0	30.0	32.40	30.53	101.3	101.8
5	32.0	40.0	32.40	40.35	101.2	100.9
6	5.0	8.0	4.94	8.01	98.7	100.1
7	10.0	8.0	10.16	7.89	101.6	98.6
8	20.0	8.0	20.73	8.06	103.6	100.7
9	30.0	8.0	30.30	7.85	101.0	98.1
10	40.0	8.0	40.56	7.77	101.4	97.1
				$\bar{X}$	99.9	99.5
				SS	2.50	2.14
				BSS	2.50	2.15

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

Çizelge 3.31. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)		BSS (%)		BSH (%)	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
Gün içi	5.0	5.0	5.10	5.05	101.9	101.1	2.33	1.62	1.95	1.08
	20.0	20.0	20.49	20.73	102.5	103.7	0.71	4.93	2.47	3.65
	35.0	35.0	35.15	36.03	100.4	102.9	1.37	2.19	0.44	2.94
Günler arası	5.0	5.0	5.12	5.12	102.4	102.4	3.91	2.36	2.36	2.42
	20.0	20.0	20.45	20.03	102.3	100.1	1.45	1.50	2.27	0.13
	35.0	35.0	34.89	34.81	99.7	99.4	0.60	0.63	-0.33	-0.56

BSS = Bağlı standart sapma

BSH = Bağlı standart hata

n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Standart ilavesi tekniği ile, DOR ve TIM analizi için optimal kromatografik Şartları bulunan UPLC yönteminde ticari farmasötik göz damlasında bulunan yardımcı maddelerin analiz üzerine girişiminin olup olmadığı test edildi. Bu test işleminde, farmasötik göz damlasından 1.2 mL alınarak 100 mL’lik balon jodede hacmi metanol ile tamamlandı. Bu preparat zeltisinden 1.0 mL alınıp 10 mL’lik balon jodede hacmi metanol ile tamamlandı. Preparatın zerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla numune içeriğinin üzerine 5.0, 20.0 ve 32.0 $\mu\text{g/mL}$ DOR ve TIM stok zeltilerinden standart ilavesi yapılarak hazırlandı. Bu zeltilerin kemometrik optimizasyon koşullarında DOR ve TIM için 275.0 nm’de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlardan okunan pik alanları kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak numune içeriğindeki DOR ve TIM içerikleri hesaplandı. Standart eklemeli numuneleri içeren zeltilerin analiz sınıları izelge 3.32’de sunuldu.

Standart eklemeli zeltilerden bulunan toplam DOR ve TIM miktarlarından formülasyon ilavesi çıkarılarak eklenen DOR ve TIM miktarları hesaplandı. Buna göre ilave edilen standart miktalar için DOR ve TIM için bulunan ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanarak sunuldu (izelge 3.32). Bu standart eklemeli deneylerde üç farklı konsantrasyon seviyesi için üç tekrar yapılarak ortalama sonuçlar hesaplandı.

Çizelge 3.32. Standart ekleme numunelerinin analiz sonuçları.

	Konulan ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)		BSS (%)	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
Formülasyon	5	5	5.12	5.05	102.4	101.0	0.12	0.05
Formülasyon	20	20	19.86	20.68	99.3	103.4	0.78	0.23
Formülasyon	32	32	32.19	32.93	100.6	102.9	0.60	0.52

BSS =Bağıl standart sapma

3.2.2.5. UPLC analizinde sistem uygunluk parametreleri

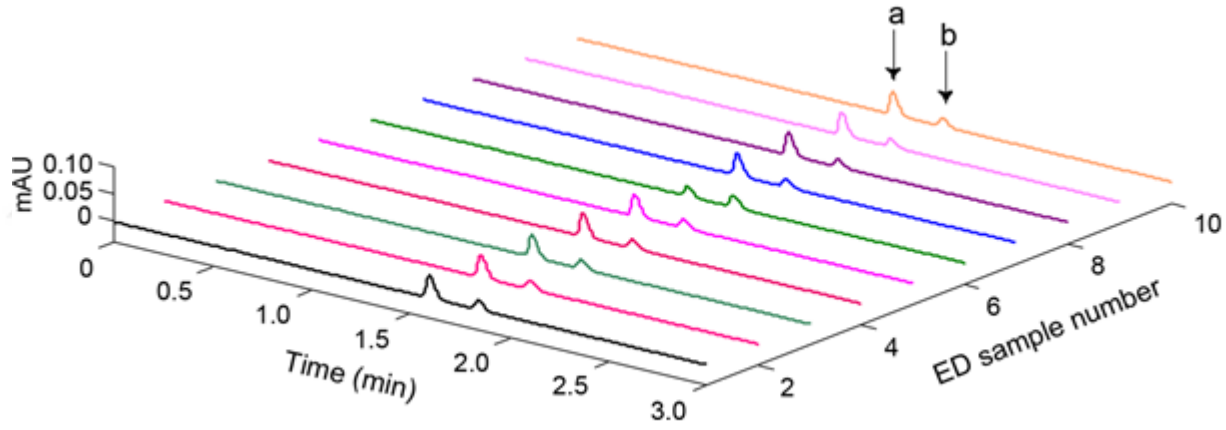
Analiz işlemlerinde kromatografik sistemin, dedeksiyon duyarlılığı, ayırma faktörü, seçicilik, teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü gibi parametrelerin sayısal değerlerine dayalı olarak doğrulanması kromatografik analizin gereklerindendir. Bu doktora tez çalışmasında seçicilik, rezolüsyon, pik asimetri, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı parametrelerinin DOR ve TIM bileşiklerini içeren bir numunenin UPLC kromatogramında hesaplanan değerleri Çizelge 3.33’de listelendi. DOR ve TIM karışımının UPLC yöntemiyle analizinde bu değerlerin istenen limitler içerisinde olduğu gözlemlendi.

Çizelge 3.33. Sistem uygunluk parametreleri.

Sistem Uygunluk parametresi	Bulunan Değer	Referans Değer
Seçicilik	2,12	>2
Rezolüsyon	3,17	>2
Pik asimetri	1,26	0.9-1.4
Kuyruklanma Faktörü	1,66	<2
Teorik Tabaka Sayısı	7755	>2000

3.2.2.6. UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulaması

Optimize edilen UPLC yönteminin ticari oftalmik göz damlasına uygulanmasında, 1.2 mL TOMEK göz damlası 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve hacmi metanolle tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti manyetik karıştırıcı ile 40 dakika karıştırıldıktan sonra şırınga ucu Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$ membran filtre ile süzöldü. Bu çözeltiden tekrar 1.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jodede hacmi metanolle tamamlandı. Hazırlanan göz damlası çözeltilerinin optimal kromatografik şartlar altında kromatogramları çizdirildi. Kalibrasyon grafiğinde yerine konarak göz damlası numunesinin içerisindeki DOR ve TIM miktarları hesaplandı. Elde edilen kromatogram Şekil 3.15'te sunuldu.



Şekil 3.15. DOR (a) ve TIM (b) bileşikleri için ticari göz damlası numularine optimal kromatografik şartın uygulanması ile 275.0 nm’de elde edilen kromatogramlar.

Yukarıda açıklanan kromatografik göz damlası analiz işlemi **TOMECE[®]** göz damlası preparatına uygulanmıştır. **TOMECE[®]** göz damlası sonuçları Çizelge 3.34.'te sunuldu.

Çizelge 3.34. Ticari göz damlasındaki DOR ve TIM'in UPLC ile yapılan deney sonuçları. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL	
	DOR	TIM
1	19.84	5.20
2	20.43	5.24
3	20.50	5.09
4	20.26	5.00
5	19.66	4.96
6	19.48	5.22
7	19.64	4.93
8	20.60	5.31
9	20.28	5.06
10	20.62	5.12
$\bar{X}$	20.13	5.11
SS	0.43	0.13
BSS	2.15	2.49
GA	$\bar{X} \pm 0.31(19.82-20.44)$	$\bar{X} \pm 0.09(5.02-5.20)$

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS=Bağıl standart sapma

GA= Güven aralığı

3.2.3. DOR-TIM Karışımının PCR yöntemi ile kantitatif analizi

Doktora tez çalışmasının bu aşamasında temel bileşen regresyon (principal component analysis regression→ PCR) yönteminin DOR-TIM karışımının UV-Spektrofotometrik verilerine uygulanması ile elde edilen deneysel sonuçlar açıklanmaktadır.

Bağımlı değişkenlerin maksimum varyansına dayanan PCR yöntemi, kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden en popüler olanlarından biridir. Bölüm 2.2.4'te teorik temeli açıklanan PCR yöntemi, karışım analizlerinde girişim yapan spektral bandların varlığında hiç bir ayırma işlemi uygulanmaksızın son derece başarılı sonuçlar veren bir yöntemdir. Yöntemin uygulaması aşağıdaki başlıklarda sunulmaktadır.

3.2.3.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri

- a) Analiz işlemlerinde kullanmak için DOR ve TIM stok çözeltileri, metanol içerisinde 100 mL'lik hacimde 10.0 mg DOR ve 10.0 mg TIM bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL konsantrasyon aralığında iki bileşik için 5 farklı konsantrasyon seviyesinde 25 adet farklı kombinasyonda kalibrasyon çözeltileri konsantrasyon (derişim) seti olarak hazırlandı. konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) Validasyon test çözeltileri; kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında DOR ve TIM bileşiklerini içeren yapay karışımlar için 10 farklı konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon seti hazırlandı.
- d) Gün içi ve günler arası deneylerde n=6 deneme için üç farklı konsantrasyon seviyesinde DOR ve TIM için (düşük= 5.0 µg/mL, orta= 20.0 µg/mL ve yüksek= 35.0 µg/mL) içeren çözeltiler taze ve günlük hazırlandı.
- e) Standart ekleme tekniğinde ticari formülasyondan 1.2 mL alınarak 100 mL'lik balon jöjeye aktarılarak üzerine bileşiklerin standart çözeltilerinden üç farklı konsantrasyon seviyesinde (DOR ve TIM için düşük= 5.0 µg/mL, orta= 20.0 µg/mL ve yüksek= 32.0 µg/mL) ilaveler ile standart ekleme çözeltileri hazırlandı.

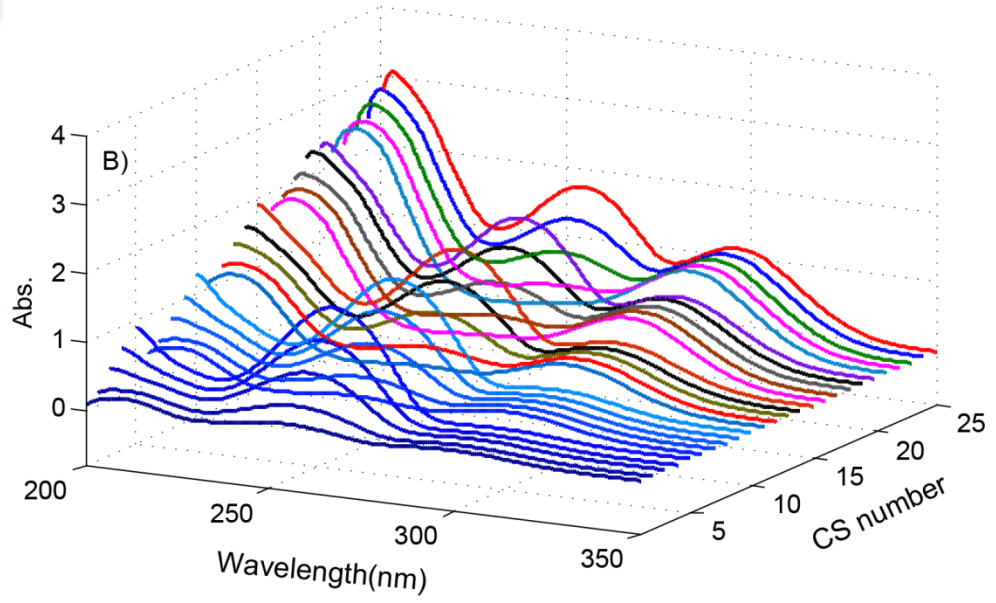
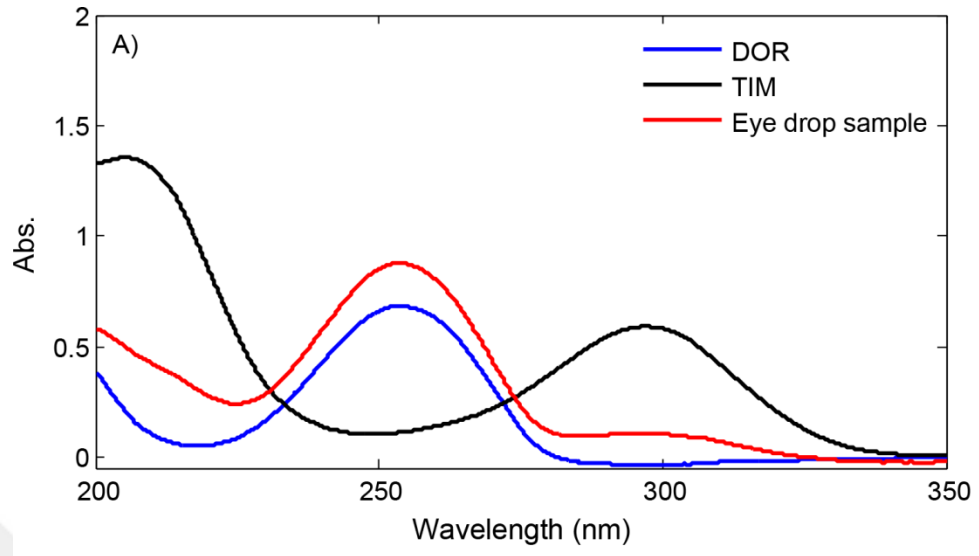
3.2.3.2. Kemometrik PCR Kalibrasyonu

Doktora tez çalışmasındaki DOR-TIM karışımının PCR yönteminin UV-spektrofotometrik verilerine uygulanarak kantitatif analizi gerçekleştirilmesinde, beş seviyeli ve 2 faktörlü (5^2) olan bir kalibrasyon seti Çizelge 3.35'te gösterildiği gibi metanol içerisindeki DOR ve TIM stok çözeltilerinden hareket ederek hazırlandı. Kalibrasyon setinin her bir numunesinin 200.0-350.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklar ile UV spektrumları çizdirildi ve bilgisayara kodlanarak kaydedildi. Şekil 3.16.B'de kalibrasyon set çözeltilerinin UV spektrumları sunuldu. Şekil 3.16.A'dan da görüleceği gibi DOR ve TIM aynı spektral dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır ve aynı şekil üzerinde DOR ve TIM karışımının UV spektrumu sunulmaktadır. Sonuç olarak spektral girişimden dolayı klasik spektrofotometrik yöntemler ile DOR-TIM karışımının doğrudan kantitatif analizleri mümkün değildir. Bu bakımdan DOR-TIM karışımının analizi için hiçbir ön ayırma işlemi gerektirmediği için PCR yöntemi uygulanmıştır.

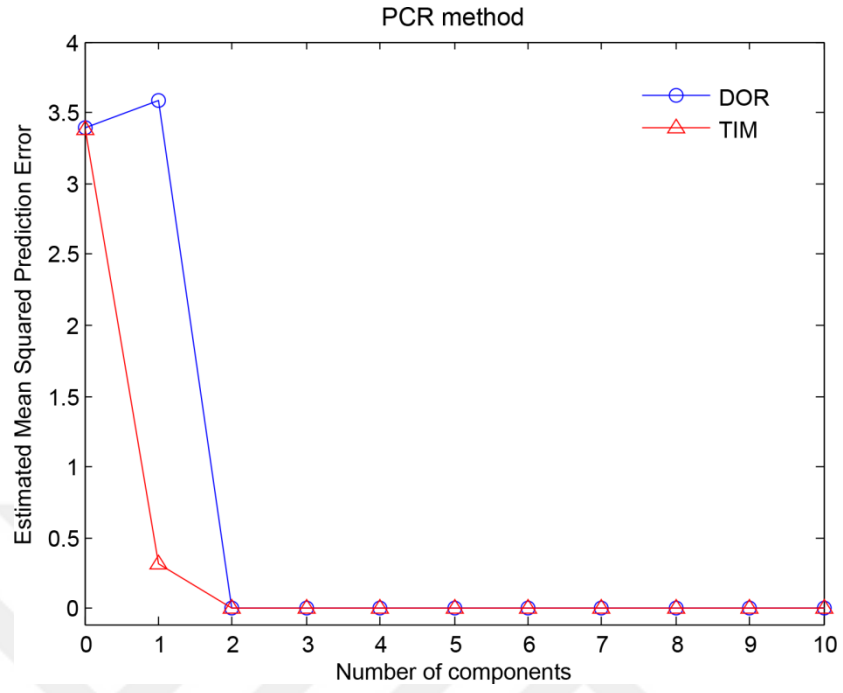
PCR kalibrasyonunun matematiksel modeli için 25 x 2 y-blok (konsantrasyon set, bağımsız değişken) ve bilgisayar hafızasından çağırılan 1151 x 25 x-blok (absorbans set, bağımsız değişken) arasındaki doğrusal ilişkiye PCR kalibrasyon algoritması uygulandı. Kemometrik PCR kalibrasyon işlemlerinde bu işlem 10 faktör için test edildi. Ancak PCR kalibrasyonunda model için minimum hata faktörü ilk iki faktör kalibrasyona alındığında gözlemlendi. Şekil 3.17'ye göre, PCR kalibrasyon modelinde ilk iki faktör kullanıldığında minimal hata ile kalibrasyon gerçekleştirilebileceği anlaşılmaktadır. PCR kalibrasyonuna ait üç boyutlu projeksiyon Şekil 3.18'de görülmektedir.

Çizelge 3.35. DOR ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.

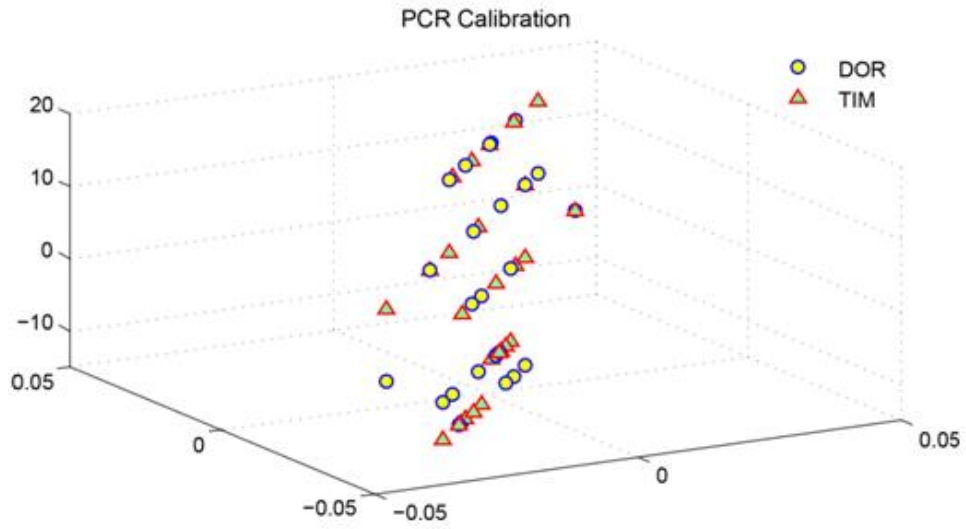
$\mu\text{g/mL}$			$\mu\text{g/mL}$		
Deney No	DOR	TIM	Deney No	DOR	TIM
1	5	5	15	40	20
2	10	5	16	5	30
3	20	5	17	10	30
4	30	5	18	20	30
5	40	5	19	30	30
6	5	10	20	40	30
7	10	10	21	5	40
8	20	10	22	10	40
9	30	10	23	20	40
10	40	10	24	30	40
11	5	20	25	40	40
12	10	20			
13	20	20			
14	30	20			



Şekil 3.16. A) DOR (20 µg/mL), TIM (20 µg/mL) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.



Şekil 3.17. DOR ve TIM için PCR kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).



Şekil 3.18. PCR kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonları.

3.2.3.3 PCR yönteminin analitik validasyonu

Çalışmada PCR yönteminin validasyonu için metanol içerisinde DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 11 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak PCR yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi. PCR yönteminin validasyon seti olarak hazırlanan yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.36. da sunuldu. Geri kazanım değerleri, DOR için % 101.8, TIM için % 103.2 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri, DOR için 1.76 ve TIM için 1.55 olarak hesaplandı (Çizelge 3.36).

Çizelge 3.36. DOR ve TIM sentetik karışım çözeltilerinin analiz sonuçları.

Deney No	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
1	32	5	33.0	5.2	103.1	103.4
2	32	10	32.5	10.5	101.7	104.8
3	32	20	33.0	20.8	103.0	104.1
4	32	30	32.4	31.0	101.4	103.2
5	32	40	31.5	40.0	98.3	100.0
6	5	8	5.0	8.3	99.9	103.6
7	10	8	10.2	8.2	101.5	102.4
8	20	8	20.9	8.0	104.4	100.5
9	30	8	31.2	8.3	104.0	104.2
10	40	8	40.2	8.4	100.6	104.8
11	32	8	32.7	8.3	102.3	103.8
			$\bar{X}$		101.8	103.2
			SS		1.80	1.60
			BSS		1.76	1.55

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

Geri kazanım çalışmasının ardından, PCR yönteminin tekrar edilebilirliğini kontrol etmek için gün içi ve günler arası çalışmaları, kalibrasyon konsantrasyon aralığı içinde DOR ve TIM için (düşük: 5.0 µg/mL, orta:20.0 µg/mL ve yüksek: 35.0 µg/mL) üç farklı konsantrasyonda aynı gün içinde ve günler arasında taze hazırlanan çözeltiler ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.37’de verilmektedir



Çizelge 3.37. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.

Konulan (µg/mL)			Bulunan (µg/mL)	
	DOR	TIM	DOR	TIM
Gün içi	5	5	5.12	5.04
	20	20	19.98	20.28
	35	35	35.31	34.98
Günler arası	5	5	5.11	5.10
	20	20	19.89	20.23
	35	35	35.22	35.02
Geri kazanım (%)				
			DOR	TIM
Gün içi			102.3	100.9
			99.9	101.4
			100.9	99.9
Günler arası			102.1	101.9
			99.4	101.1
			100.6	100.1
BSS (%)				
			DOR	TIM
Gün içi			1.95	2.78
			2.89	4.52
			1.56	1.63
Günler arası			0.00	0.69
			2.66	0.51
			1.34	0.63
BSH (%)				
			DOR	TIM
Gün içi			2.31	0.85
			-0.08	1.39
			0.89	-0.05
Günler arası			2.14	1.90
			-0.56	1.13
			0.62	0.06

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Standart ilavesi tekniği ile DOR ve TIM içeren ticari farmasötik göz preparatındaki yardımcı maddelerin UV-Spektrofotometrik verilere PCR yönteminin uygulanması analizinde etkisinin olup olmadığı test edildi. Farmasötik ticari göz damlasından 1.2 mL göz damlası numunesinin 100 mL’lik balonjojede metanolle çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisinden 0.4 mL alınıp 10 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre numune içeriğinin üzerine 5.0, 20.0 ve 32.0 $\mu\text{g/mL}$ DOR ve TIM olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Elde edilen % geri kazanım değerleri ve % bağıl standart sapma değerleri izelge 3.38’de sunuldu.



Çizelge 3.38. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)	
	DOR	TIM	DOR	TIM
Formülasyon	5	5	4.99	5.13
Formülasyon	20	20	19.54	20.91
Formülasyon	32	32	32.63	32.43
Geri kazanım (%)				
			DOR	TIM
			99.8	102.6
			97.7	104.6
			102.0	101.3
BSS (%)				
			DOR	TIM
			0.05	0.29
			0.55	0.12
			0.82	0.47

BSS= Bağlı standart sapma

3.2.3.4. PCR yönteminin farmasötik preparata uygulanması

PCR yönteminin ticari preparata uygulanması kısmında 1.2 mL göz damlası numunesi 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve hacmi metanolle tamamlandı. Balon joje manyetik karıştırıcı ile 40 dakika karıştırıldıktan sonra Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$ şırınga ucu membran filtre ile süzüldü. Bu çözeltiden 1.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi metanolle tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 200.0-350.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlarından tablet içeriğindeki DORve TIM miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan ticari farmasötik göz damlası analiz işlemi **TOMEC®** göz damlası preparatına uygulandı. **TOMEC®** göz damlası sonuçları Çizelge 3.39'da sunuldu.

Çizelge 3.39. PCR yönteminin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL	
	DOR	TIM
1	20.64	5.17
2	20.36	5.01
3	20.88	5.24
4	20.83	4.95
5	20.80	4.84
6	21.13	5.04
7	20.32	5.04
8	20.19	4.94
9	20.36	4.93
10	20.80	4.99
$\bar{X}$	20.63	5.02
SS	0.31	0.12
BSS	1.49	2.34
GA	$\bar{X} \pm 0.22(20.41-20.85)$	$\bar{X} \pm 0.09(4.93-5.11)$

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

GA = Güven aralığı

3.2.4. DOR ve TIM karışımının kemometrik PLS yöntemi ile kantitatif analizi

Doktora tez çalışmasının bu aşamasında kısmi en küçük kareler (partial least squares → PLS) yönteminin DOR-TIM karışımının UV-Spektrofotometrik verilerine uygulanması ile elde edilen deneysel sonuçlar açıklanmaktadır.

PLS yönteminin kompleks karışımların kantitatif analizlerinde son derece başarılı sonuçlar verdiği literatürlerde belirtilmektedir. Daha önce bölüm 2.2.5'te teorik temeli anlatılan bu yöntem; bağımlı değişken ile bağımsız değişkenin maksimum ko-varyansına dayanan çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri arasında yaygın olarak kullanılanlarından birisidir. Doktora tezinin bu bölümü PLS yönteminin DOR-TIM karışımı analizine uygulanmasını içermektedir.

3.2.4.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri

- a) Analiz işlemlerinde kullanmak için DOR ve TIM stok çözeltileri, metanol içerisinde 100 mL'lik hacimde 10.0 mg DOR ve 10.0 mg TIM bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL konsantrasyon aralığında iki bileşik için 5 farklı konsantrasyon seviyesinde 25 adet farklı kombinasyonda kalibrasyon çözeltileri konsantrasyon (derişim) seti olarak hazırlandı. konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) Validasyon test çözeltileri; kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında DOR ve TIM bileşiklerini içeren yapay karışımlar için 10 farklı konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon seti hazırlandı.
- d) Gün içi ve günler arası deneylerde n=6 deneme için üç farklı konsantrasyon seviyesinde DOR ve TIM için (düşük= 5.0 µg/mL, orta= 20.0 µg/mL ve yüksek= 35.0 µg/mL) içeren çözeltiler taze ve günlük hazırlandı.
- e) Standart ekleme tekniğinde ticari formülasyondan 1.2 mL alınarak 100 mL'lik balon jojeye aktarılarak üzerine bileşiklerin standart çözeltilerinden üç farklı konsantrasyon seviyesinde (DOR ve TIM için düşük= 5.0 µg/mL, orta= 20.0 µg/mL ve yüksek= 32.0 µg/mL) ilaveler ile standart ekleme çözeltileri hazırlandı.

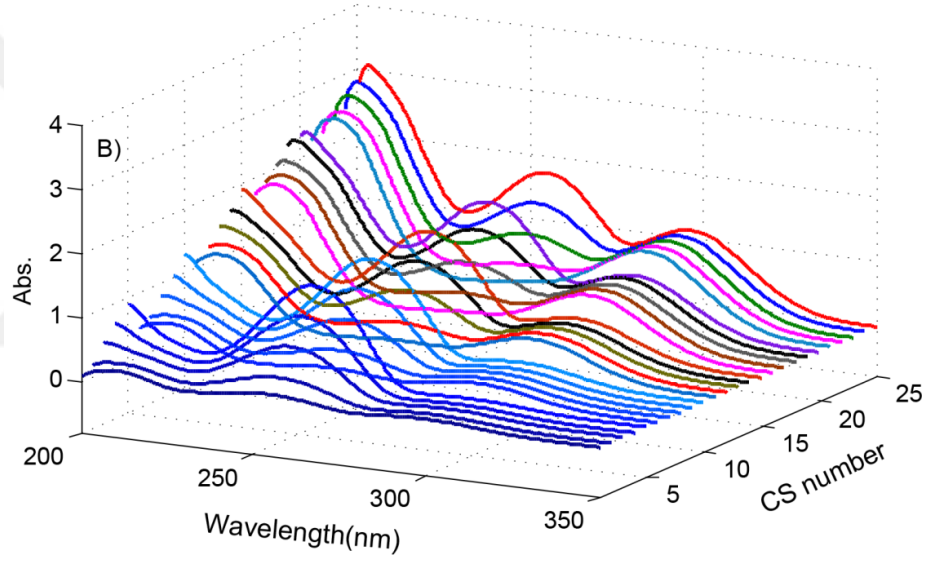
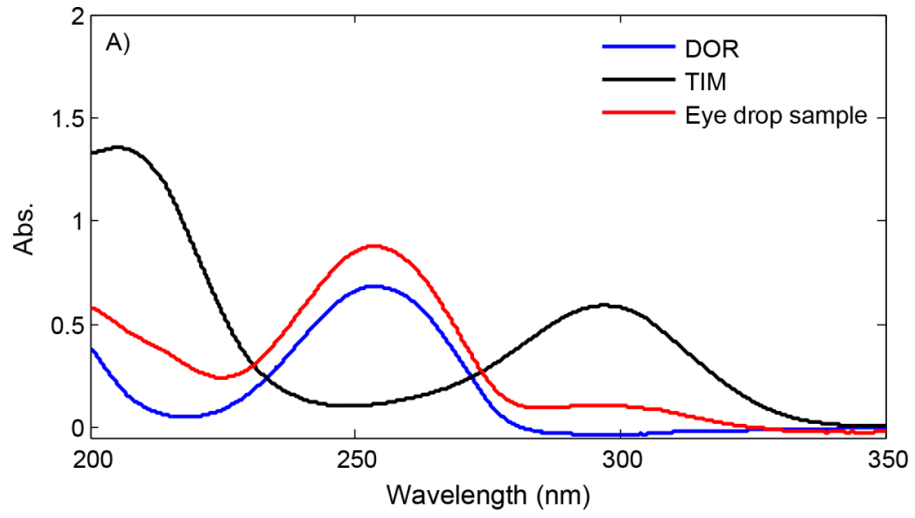
3.2.4.2. Kemometrik PLS kalibrasyonu

PLS yönteminin uygulanmasında metanol içerisindeki DOR ve TIM stok çözeltileri kullanılarak beş seviyeli ve iki faktörlü (5^2) olan kalibrasyon seti Çizelge 3.40'da sunulduğu gibi hazırlandı. Kalibrasyon setindeki herbir çözeltinin 200.0-350.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve kodlanarak bilgisayar hafızasına kaydedildi. Şekil 3.19.B'de kalibrasyon set çözeltilerinin UV spektrumları yer almaktadır. Şekil 3.19.A'dan da anlaşılabacağı gibi DOR ve TIM aynı spektral dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır ve aynı şekil üzerinde DOR ve TIM karışımının UV spektrumu da sunulmaktadır. Spektral girişim yapmaları sebebiyle klasik spektrofotometrik yöntemler ile DOR-TIM karışımının doğrudan kantitatif analizleri mümkün değildir. Bu açıdan DOR-TIM karışımının analizi için herhangi bir ön ayırma işlemine ihtiyaç duyulmadığı için PLS yöntemi uygulanmıştır.

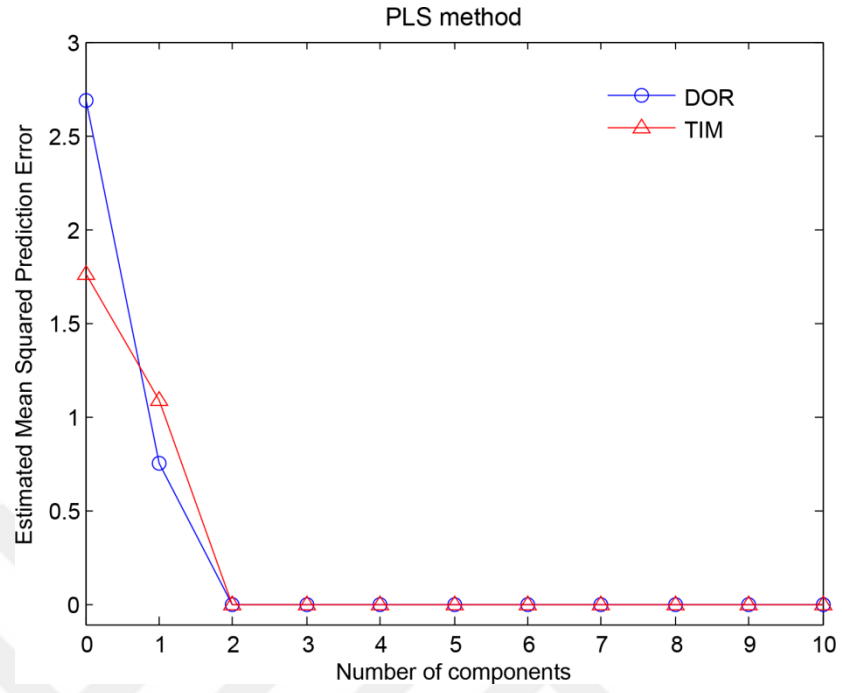
PLS kalibrasyonunun matematiksel inşası için 25 x 2 y-blok (konsantrasyon set, bağımsız değişken) ve 1151 x 25 x-blok (absorbans set, bağımlı değişken) arasındaki doğrusal ilişkiye PLS kalibrasyon algoritması uygulandı. Kemometrik PLS kalibrasyon işlemlerinde bu işlem 10 faktör için test edildi. Ancak PLS kalibrasyonunda model için minimum hata faktörü ilk iki faktör kalibrasyona alındığında gözlendi. Şekil 3.20'den PLS kalibrasyon modelinde ilk iki faktör kullanıldığında minimal hata ile kalibrasyonu gerçekleştirebileceği anlaşılmaktadır. PLS kalibrasyonuna ait üç boyutlu projeksiyon Şekil 3.21'de sunulmuştur.

Çizelge 3.40. DOR ve TIM karışımını içeren kemometrik kalibrasyon seti.

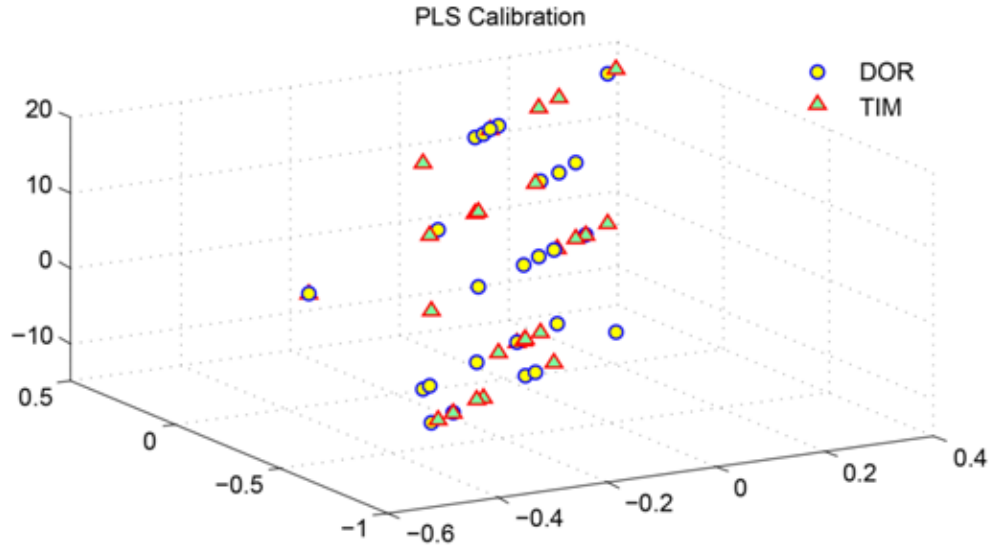
$\mu\text{g/mL}$			$\mu\text{g/mL}$		
Deney No	DOR	TIM	Deney No	DOR	TIM
1	5	5	15	40	20
2	10	5	16	5	30
3	20	5	17	10	30
4	30	5	18	20	30
5	40	5	19	30	30
6	5	10	20	40	30
7	10	10	21	5	40
8	20	10	22	10	40
9	30	10	23	20	40
10	40	10	24	30	40
11	5	20	25	40	40
12	10	20			
13	20	20			
14	30	20			



Şekil 3.19. A) DOR (20 µg/mL), TIM (20 µg/mL) ve ticari göz damlasının UV spektrumları, B) Kalibrasyon numunelerinin UV spektrumları.



Şekil 3.20. DOR ve TIM için PLS kalibrasyonunda kalibrasyonunda tahmin edilen hataların karesinin ortalaması (estimated mean squared prediction error).



Şekil 3.21. PLS kalibrasyonunun kalibrasyonunun üç boyutlu projeksiyonu.

3.2.4.3. PLS yönteminin analitik validasyonu

Doktora tezinin bu çalışmasında metanol içerisinde DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL aralık içerisinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlardan 11 adet karışım çözeltisinden oluşan validasyon seti, PLS yönteminin validasyonu için hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak hesaplanan PLS yönteminin kesinlik ve doğruluğu test edildi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.41’de sunuldu. Geri kazanım değerleri, DOR için % 101.3, TIM için % 100.8 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri, DOR için 1.79 ve TIM için 0.89 olarak hesaplandı (Çizelge 3.41).

Çizelge 3.41. DOR ve TIM yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları.

Deney No	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
1	32	5	32.9	5.1	102.7	101.9
2	32	10	32.4	10.2	101.3	102.1
3	32	20	32.8	20.3	102.6	101.7
4	32	30	32.1	30.4	100.4	101.4
5	32	40	31.5	40.4	98.4	100.9
6	5	8	4.9	8.0	98.4	100.5
7	10	8	10.0	8.0	100.4	99.6
8	20	8	20.6	8.0	103.1	99.9
9	30	8	31.1	8.0	103.8	99.6
10	40	8	40.2	8.1	100.6	101.4
11	32	8	32.7	8.0	102.3	100.4
				$\bar{X}$	101.3	100.8
				SS	1.81	0.90
				BSS	1.79	0.89

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağıl standart sapma

PLS yönteminin tekrar edilebilirliğini kontrol etmek için gün içi ve günler arası çözeltilerinin analizi yapıldı. Bu deney seti DOR'un ve TIM'in kalibrasyon konsantrasyon aralığı içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (5.0, 20.0 ve 35.0 µg/mL) aynı gün içinde ve günler arasında hazırlandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.42'de sunuldu.



Çizelge 3.42. Gün içi ve günler arası numunelerinin analiz sonuçları.

Konulan (µg/mL)			Bulunan (µg/mL)	
	DOR	TIM	DOR	TIM
Gün içi	5	5	4.93	4.99
	20	20	20.46	20.01
	35	35	35.11	35.27
Günler arası	5	5	5.10	4.89
	20	20	19.81	20.61
	35	35	34.86	36.02
Geri kazanım (%)				
			DOR	TIM
Gün içi			98.5	99.7
			102.3	100.0
			100.3	100.8
Günler arası			102.1	97.9
			99.1	103.1
			99.6	102.9
BSS (%)				
			DOR	TIM
Gün içi			2.03	2.09
			1.23	2.50
			1.15	2.84
Günler arası			2.83	0.00
			3.54	3.85
			1.87	2.94
BSH (%)				
			DOR	TIM
Gün içi			-1.49	-0.29
			2.32	0.04
			0.32	0.76
Günler arası			2.07	-2.12
			-0.93	3.06
			-0.40	2.92

BSS= Bağlı standart sapma, BSH= Bağlı standart hata n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Standart ilavesi tekniği ile DOR ve TIM içeren ticari farmasötik preparattaki yardımcı maddelerin analiz üzerine bir etkisi olup olmadığı test edildi. Farmasötik preparattaki 1.2 mL göz damlasına 100 mL metanol içinde zltisi hazırlandı. Bu stok zltiden 0.4 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve üzerine 5.0, 20.0 ve 32.0 $\mu\text{g/mL}$ DOR ve TIM stok zltilerden standart ilavesi yapıldı. Hazırlanan bu zltilerin analiz sonuçlarındaki % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri izelge 3.43'de verildi.



Çizelge 3.43. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)	
	DOR	TIM	DOR	TIM
Formülasyon	5	5	5.12	5.08
Formülasyon	20	20	19.54	20.48
Formülasyon	32	32	33.22	33.42
Geri kazanım (%)				
			DOR	TIM
			102.34	101.53
			97.68	102.38
			103.83	104.45
BSS (%)				
			DOR	TIM
			0.08	0.24
			0.42	0.30
			0.35	0.44

BSS= Bağıl standart sapma

3.2.4.4. PLS yönteminin farmasötik preparata uygulanması

Çalışmada PLS yönteminin ticari preparata uygulanmasında 1.2 mL göz damlası numunesi 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve hacmi metanolle tamamlandı. Balon joje manyetik karıştırıcı ile 40 dakika karıştırıldıktan sonra Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$ şırınga ucu membran filtre ile süzüldü. Bu stok çözeltiden 1.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jode hacmi metanolle tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 200.0-350.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlarından tablet içeriğindeki DORve TIM miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **TOMEC®** göz damlası preparatına uygulandı. **TOMEC®** göz damlası sonuçları Çizelge 3.44'te sunuldu.

Çizelge 3.44. PLS yönteminin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL	
	DOR	TIM
1	20.31	5.01
2	20.19	4.92
3	20.55	5.00
4	20.44	5.04
5	20.53	5.08
6	20.71	5.03
7	20.02	5.01
8	19.99	4.91
9	20.19	4.84
10	20.53	5.08
$\bar{X}$	20.35	4.99
SS	0.24	0.08
BSS	1.20	1.54
GA	$\bar{X} \pm 0.17(20.18-20.52)$	$\bar{X} \pm 0.06(4.93-5.05)$

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

GA= Güven aralığı

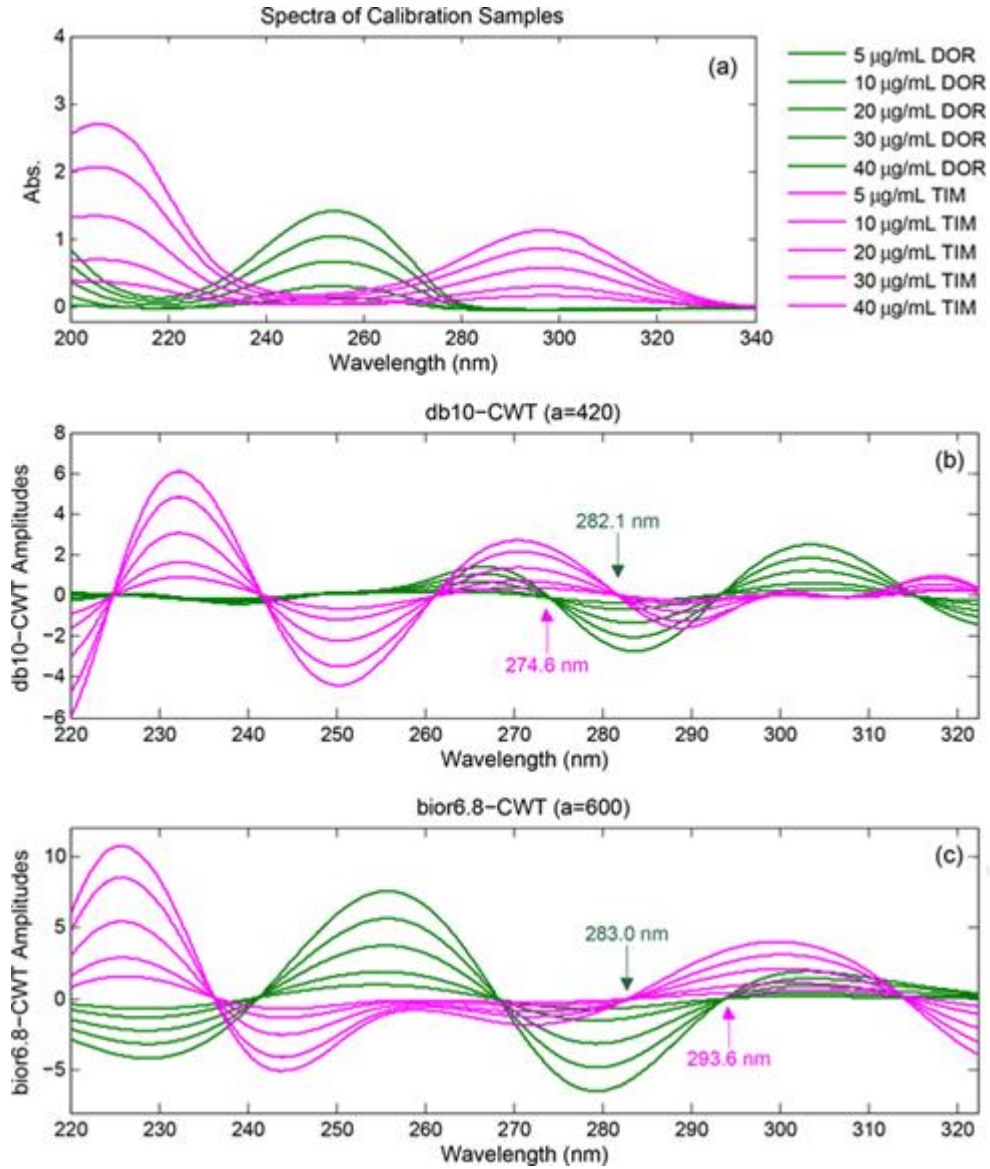
3.2.5. DOR-TIM karışımının db10-SDD ve bior6.8-SDD Sinyal İşleme Yöntemleri ile kantitatif analizi

Sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) (countinuous wavelets transform → CWT) sinyal işleme yöntemleri karışım analizlerine algoritmaları gereği sinyal/gürültü oranını düşürmeleri ve girişim yapan spektral bantları başarıyla ayırdığı için karışım analizlerinde yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Dolayısıyla SDD yaklaşımı spektrofotometrik yöntemler ile birlikte kullanıldığında, spektrofotometrik yöntemlerin kompleks karışımların analizlerindeki gücü artmaktadır.

Doktora tez çalışmasının bu bölümünde SDD yöntemlerinden olan Daubechies10 (db10)-SDD ve bior6.8-SDD yöntemleri DOR ve TIM'in kantitatif analizi için 200.0-340.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorbsiyon spektrumlarına uygulandı.

3.2.5.1. Stok, standart ve validasyon çözeltileri

- a) Analiz işlemlerinde kullanmak için DOR ve TIM stok çözeltileri, metanol içerisinde 100 mL'lik hacimde 10.0 mg DOR ve 10.0 mg TIM bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL konsantrasyon aralığında iki bileşik için 5 farklı konsantrasyon seviyesinde 25 adet farklı kombinasyonda kalibrasyon çözeltileri konsantrasyon (derişim) seti olarak hazırlandı. konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) Validasyon test çözeltileri; kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında DOR ve TIM bileşiklerini içeren yapay karışımlar için 10 farklı konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon seti hazırlandı.
- d) Gün içi ve günler arası deneylerde n=6 deneme için üç farklı konsantrasyon seviyesinde DOR ve TIM için (düşük= 5.0 µg/mL, orta= 20.0 µg/mL ve yüksek= 35.0 µg/mL) içeren çözeltiler taze ve günlük hazırlandı.
- e) Standart ekleme tekniğinde ticari formülasyondan 1.2 mL alınarak 100 mL'lik balon jøjeye aktarılarak üzerine bileşiklerin standart çözeltilerinden üç farklı konsantrasyon seviyesinde (DOR ve TIM için düşük= 5.0 µg/mL, orta= 20.0 µg/mL ve yüksek= 32.0 µg/mL) ilaveler ile standart ekleme çözeltileri hazırlandı.



Şekil. 3.22. DOR ve TIM'in kalibrasyon setinin UV spektrumu (a), db10-SDD spektrumu (b) ve bior6.8-SDD spektrumu (c).

Db10-SDD ile bior6.8-SDD 200.0-340.0 nm dalga boyu bölgesinde kalibrasyon UV spektrumlarına uygulandı ve elde edilen spektrumları, genliklerine karşı dalga boyu grafiğe geçirilerek elde edildi (Şekil 3.22). Db10-SDD yönteminde kalibrasyon grafiği; DOR kalibrasyon çözeltileri için 282.1 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon çözeltileri için için 274.6 nm dalga boyundaki genlikleri ölçülerek hesaplandı. Bior6.8-SDD yönteminde

kalibrasyon grafiği; DOR kalibrasyon özelteleri için 283.0 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon özelteleri için için 293.6 nm dalga boyundaki genlikleri ölçölerek hesaplandı.

Bu iki dalga boyundaki doğrusal regresyon analizi ile elde edilen sonuçlar, Çizelge 3.45'te görölmemtedir.



Çizelge 3.45. DOR ve TIM kalibrasyonu için db10-CWT ve bior6.8-CWT yöntemlerinin regresyon analizi sonuçları

Parametre	db10-CWT		bior6.8-CWT	
	DOR	TIM	DOR	TIM
λ	282.1	274.6	283.0	293.6
m	6.54×10^{-2}	1.01×10^{-1}	1.47×10^{-1}	8.25×10^{-2}
n	-1.25×10^{-2}	-6.47×10^{-2}	1.07×10^{-1}	-3.20×10^{-2}
r	0.9999	0.9990	0.9999	0.9999
SD (m)	3.47×10^{-4}	2.72×10^{-3}	6.64×10^{-4}	8.95×10^{-4}
SD (n)	8.53×10^{-3}	4.81×10^{-2}	1.63×10^{-2}	1.59×10^{-2}
SD (r)	9.93×10^{-3}	7.78×10^{-2}	1.90×10^{-2}	2.56×10^{-2}
LOD	0.39	1.42	0.33	0.58
LOQ	1.30	4.75	1.11	1.92
m = Doğrusal regresyon eşitliğinin eğimi n = Doğrusal regresyon eşitliğinin kesim noktası r = Doğrusal regresyon eşitliğinin korelasyon katsayısı SD (m) = Eğimin standart sapması SD (n) = Kesim noktasının standart sapması SD(r) = Korelasyon katsayısının standart sapması LOD = Yakalama sınırı ($\mu\text{g/mL}$) LOQ = Tayin sınırı($\mu\text{g/mL}$)				

Çizelge 3.45'deki lineer regresyon analizine göre kalibrasyon denklemleri kullanılarak numunelerin içindeki DOR ve TIM miktarları hesaplandı.

3.2.5.2. Sinyal İşleme Yöntemlerinin Validasyonu

Bu bölümdeki validasyon çalışmasında geliştirilen yöntemlerin geçerliliğini doğrulamak için % geri kazanım çalışması, gün içi ve günler arası analiz işlemi ve standart ilave tekniği uygulandı.

Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin validasyonu için metanol içerisindeki stok çözeltilerden DOR ve TIM için 5.0-40.0 µg/mL çalışma aralığında içinde olacak şekilde her biri farklı konsantrasyonlarda DOR ve TIM içeren 10 adet karışım çözeltisi hazırlandı ve Çizelge 3.46'da sunuldu. Db10-SDD yöntemi için yüzde geri kazanım ile bağlı standart sapma değerleri DOR için sırasıyla % 99.8 ve 1.46, TIM için % 100.3 ve 1.82 olarak, bior6.8-SDD yöntemi için yüzde geri kazanım ile bağlı standart sapma değerleri DOR için sırasıyla % 101.5 ve 1.55, TIM için % 99.6 ve 2.34 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.46. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin DOR-TIM ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları

Kod	db10-CWT						bior6.8-CWT			
	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)		Bulunan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
M1	32	5	32.16	5.1	100.5	102.1	32.1	4.9	100.3	98.7
M2	32	10	31.61	10.05	98.8	100.5	31.5	10.1	98.4	101.1
M3	32	20	31.1	20.35	97.2	101.8	33.2	20.4	103.6	101.9
M4	32	30	31.2	30.25	97.5	100.8	32.7	31.4	102.3	104.5
M5	32	40	32.22	39.21	100.7	98	32.8	40.5	102.4	101.3
M6	5	8	5.05	8.1	101	101.3	5	7.82	101	97.7
M7	10	8	10.19	8.15	101.9	101.9	10.2	7.91	102.3	98.9
M8	20	8	20.26	7.73	99.3	96.6	20.7	7.77	103.4	97.2
M9	30	8	30.48	7.89	99.6	98.6	30.6	7.86	102.1	98.2
M10	40	8	40.16	8.14	100.4	101.8	40.1	7.78	100.3	97.2
M11	32	8	32.16	7.96	100.5	99.5	32.1	7.88	100.4	98.5
				$\bar{X}$	99.8	100.3				
				SS	1.46	1.82				
				BSS	1.46	1.82				

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama
 SS = Standart sapma
 BSS = Bağlı standart sapma

Diğer validasyon işleminde Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin tekrar edilebilirliğini ölçmek için gün içi ve günler arası ölçümleri yapıldı ve sonuçları validasyon parametreleri ile değerlendirildi. Bu işlem, kalibrasyon konsantrasyon aralığı içinde üç farklı konsantrasyonda DOR ve TIM için düşük 5.0 µg/mL, orta 20.0 µg/mL ve yüksek 35.0 µg/mL olmak üzere 6 farklı çözelti günlük hazırlanarak aynı gün içinde ve günler arasında ölçümleri gerçekleştirildi. Alınan ölçümlere Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemleri uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.47’de sunuldu.



Çizelge 3.47. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin gün içi ve günler arası analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)			
			db10-SDD		bior6.8-SDD	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
Günler arası	5	5	5.04	4.98	4.98	4.90
	20	20	19.74	19.72	20.39	20.50
	35	35	34.94	34.76	35.06	35.59
Gün içi	5	5	5.16	5.05	4.87	4.95
	20	20	21.03	19.32	20.71	20.78
	35	35	34.60	35.04	34.77	35.22
			Geri Kazanım (%)			
			db10-SDD		bior6.8-SDD	
			DOR	TIM	DOR	TIM
Günler arası			100.8	99.5	99.6	98.0
			98.7	98.6	102.0	102.5
			99.8	99.3	100.2	101.7
Gün içi			103.2	101.0	97.5	99.1
			105.1	96.6	103.6	103.9
			98.9	100.1	99.3	100.6
			BSS (%)			
			db10-SDD		bior6.8-SDD	
			DOR	TIM	DOR	TIM
Günler arası			0.52	1.00	1.98	2.47
			1.74	2.11	2.26	1.22
			0.33	3.28	1.43	2.21
Gün içi			4.88	1.49	2.58	3.73
			7.61	0.00	2.41	5.00
			1.44	0.82	2.20	2.99
			BSH (%)			
			db10-SDD		bior6.8-SDD	
			DOR	TIM	DOR	TIM
Günler arası			0.82	-0.50	-0.43	-1.98
			-1.30	-1.40	1.97	2.48
			-0.16	-0.68	0.16	1.68
Gün içi			3.17	0.97	-2.51	-0.93
			5.15	-3.42	3.55	3.92
			-1.14	0.12	-0.66	0.63

BSS= Bağlı standart sapma,
BSH= Bağlı standart hata
n= 3 (her bir konsantrasyon seviyesi için)

Standart ilave tekniği kullanılarak DOR ve TIM bileşiklerini içeren farmasötik göz damlası preparatındaki yardımcı maddelerin Db10-SDD ve Bior6.8-SDD yöntemlerinin analiz üzerine bir etkisi olup olmadığı incelendi. Ticari farmasötik göz preparatından 1 mL göz damlasının 100 mL metanol içinde zltisi hazırlandı. Bu stok zltisinden seyreltmeler yapılarak preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre numune içeriğinin üzerine 5.0, 20.0 ve 35.0 $\mu\text{g/mL}$ DOR ve TIM olacak şekilde stok zltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **COMBIGAN[®]** göz damlasına uygulandı. Analiz sonuçları hesaplanırken preparattan gelen DOR ve TIM miktarları dşlerek ilave edilen standartlar içindeki DOR ve TIM için geri kazanım ve diğer hesaplamalar yapıldı ve izelge 3.48’de sunuldu. Üç farklı konsantrasyon seviyesinde bu denemeler beş tekrar ile gerçekleştirildi.

Çizelge 3.48. Standart ekleme numunelerinden elde edilen analiz sonuçları.

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)			
	DOR	TIM	db10-SDD		bior6.8- SDD	
			DOR	TIM	DOR	TIM
Formülasyon	5	5	5.08	5.01	5.04	5.11
Formülasyon	20	20	20.56	20.23	20.38	19.70
Formülasyon	32	32	33.10	31.06	33.16	31.36
	Geri Kazanım (%)					
	db10- SDD		bior6.8- SDD			
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
	101.5	100.1	100.8	102.1		
	102.8	101.2	101.9	98.5		
	103.5	97.1	103.6	98.0		
	BSS (%)					
	db10- SDD		bior6.8- SDD			
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
	0.12	0.26	0.17	0.06		
	0.29	0.24	0.17	0.93		
	0.70	0.70	0.42	0.10		

BSS= Bağıl Standart Sapma

3.2.5.3. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin farmasötik preparata uygulanması

Çalışmada db19-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin ticari preparata uygulanmasında 1 mL göz damlası numunesi 100 mL'lik balonjojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanolle tamamlandı. Balon joje manyetik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldıktan sonra membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,20 \mu\text{m}$) ile süzüldü. Bu çözeltiden 1.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye transfer edilip hacmi metanolle tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 200.0-340.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen spektrumlarından göz damlası içeriğindeki DOR ve TIM miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan göz damlası analiz işlemi **TOMECE®** göz damlası preparatına uygulandı. **TOMECE®** göz damlası sonuçları Çizelge 3.49' da sunuldu.

Çizelge 3.49. Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin ticari göz damlasına uygulanması ile elde edilen sonuçlar. (Etiket değeri: DOR 20.0 mg/mL TIM 5.0 mg/mL).

Deney No.	mg/mL			
	db10-SDD		bior6.8-SDD	
	DOR	TIM	DOR	TIM
1.0	20.30	5.10	19.68	5.07
2.0	20.31	4.78	19.81	5.11
3.0	20.38	5.08	19.80	5.28
4.0	20.22	5.12	19.67	5.09
5.0	20.51	4.98	19.87	4.97
6.0	18.84	4.98	20.05	5.21
7.0	20.00	4.99	19.40	4.97
8.0	20.17	5.08	20.06	5.23
9.0	20.31	4.88	19.54	5.04
10.0	20.93	5.08	20.11	5.19
$\bar{X}$	20.20	5.01	19.80	5.14
SS	0.54	0.11	0.23	0.11
BSS	2.66	2.20	1.19	2.17
GA	$\bar{X} \pm 0.39(19.81-20.59)$	$\bar{X} \pm 0.08(4.93-5.09)$	$\bar{X} \pm 0.16(19.64-19.96)$	$\bar{X} \pm 0.08(5.06-5.22)$

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama

SS= Standart sapma

BSS= Bağlı standart sapma

GA= Güven aralığı

3.2.6. DOR-TIM karışımı için uygulanan yöntemlerin istatistiksel karşılaştırılması

Doktora tezinin DOR-TIM karışımındaki miktar tayini için geliştirilen yöntemlerin ticari preparatlara uygulamasıyla elde edilen sonuçları karşılaştırmak için $p=0.05$ olasılık düzeyinde $n_1=4$ ve $n_2= 45$ serbestlik derecesinde ANOVA (Analysis of Variance) testi uygulandı. Bu istatistiksel test işleminde, DOR-TIM karışımını içeren formülasyondan yöntemler ile DOR ve TIM etken maddelerinin kantitatif analiz sonuçlarına ANOVA testi uygulamasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 3.25 te listelendi. ANOVA testi sonuçlarındaki F ve p değerlerine göre UPLC, PCR, PLS, Db10-SDD ve Bior6.8-SDD yöntemlerinin analiz sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Çizelge 3.50. Geliştirilen yöntemlerin DOR-TIM karışımını içere ticaret preparatlar uygulamasıyla elde edilen kantitatif analizi sonuçlarına istatistiksel analizi için ANOVA test sonuçları

Yöntemler	Deney Sayısı		Toplam		Ortalama		Varyans	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
UPLC	10	10	201.31	51.13	20.13	5.11	0.1883	0.0163
PLS	10	10	202.77	50.04	20.28	5.00	0.1615	0.0099
PCR	10	10	205.31	50.15	20.53	5.02	0.2920	0.0138
Db10-SDD	10	10	202.33	50.31	20.23	5.03	0.1918	0.0162
Bior6.8-SDD	10	10	199.79	51.16	19.98	5.12	0.3309	0.0117

Varyasyon	KT		SD		KO		F-hesap		P-değeri		F-tablo	
	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM	DOR	TIM
Yöntemler Arası	1.6562	0.1186	4	4	0.4141	0.0296	1.78	2.18	0.15	0.09	2.58	2.58
Yöntemler İçi	10.4799	0.6114	45	45	0.2329	0.0136						
Toplam	12.1361	0.7300	49	49								

KT = karelerin toplamı
SD = serbestlik derecesi
KO = karelerin ortalaması

4. TARTIŞMA

Bu doktora tez çalışmasının temel amacı BRI-TIM ve DOR-TIM karışımlarını içeren ticari farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin miktar tayinleri ile kalite kontrol ve rutin analizleri için yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanmasıdır. Bu amaçla, BRI-TIM ve DOR-TIM kombinasyonlarının analizleri için kemometrik optimizasyon dayalı yeni UPLC yöntemleri geliştirildi ve UV spektrofotometrik ölçümlere dayalı PCR, PLS ve SDD kalibrasyon algoritmalarını yeni uygulamaları gerçekleştirildi.

BRI-TIM ve DOR-TIM içeren preparatlardaki etken maddelerin kantitasyonu ile ilgili bugüne kadar uygulanan analitik yöntemler hakkında yapılan literatür araştırmalarında, doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen yeni analitik yöntemlerin uygulanmadığını (veya kullanılmadığını) saptadık.

Bu nedenle, BRI-TIM ve DOR-TIM kombinasyonlarını içeren iki farklı ticari farmasötik preparat doktora tezinin konusu olarak seçildi.

Çalışmalarımızda, deneysel tasarım ve optimizasyona dayalı yeni iki UPLC yöntemi geliştirilmesi ile ve spektral olarak farklı yeni kemometrik PCR ve PLS kalibrasyon yönteminin kullanılması ile ve spektral sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) yönteminin dört farklı yeni uygulaması ile BRI-TIM ve DOR-TIM içeren ticari göz preparatlarının kalite kontrol rutin analizleri için hızlı, daha kolay, daha ucuz, daha doğru daha kesin ve daha güvenilir analiz sonuçları elde edildi ve bu sonuçlar bu doktora tezi kapsamında çizelgelerde sunuldu.

BRI-TIM ve DOR-TIM karışımlarının kantitasyonu için bu geliştirilen ve uygulanan yöntemler sırasıyla; kemometrik optimizasyon ile geliştirilen UPLC, spektral çok dğişkenli PCR ve PLS kalibrasyon, mexh-SDD ve Sym5-SDD ile db10-SDD ve bior6.8-SDD'dır.

Uygulanan yöntemler ile ticari preparatların kantitatif analiz sonuçları ANOVA testi ile değerlendirildiğinde, yöntemlerin sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Doktora tezi kapsamında geliştirilen yöntemler (UPLC, spektral çok dğişkenli PCR ve PLS kalibrasyon, mexh-SDD ve Sym5-SDD ile db10-SDD ve bior6.8-SDD) BRI-TIM ve DOR-TIM kombinasyonlarının analizleri için yeni optimize ve valide edilmiş analitik yöntemlerdir.

4.1. UPLC Yöntemi ile BRI-TIM ve DOR-TIM Karışımlarının Analizi

Doktora tez çalışması çerçevesinde BRI-TIM ve DOR-TIM karışımlarının kantitatif analizleri için deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanılarak yeni UPLC yöntemleri geliştirildi. BRI-TIM kombinasyonunun analizini gerçekleştirmek için geliştirilen UPLC yönteminde optimal kromatografik koşulları saptamak için 3^3 tam faktöriyel tasarım ve DOR-TIM kombinasyonunun analizi için geliştirilen UPLC yönteminde ise Box-Behnken tasarım uygulandı. Her iki tasarımda da Bölüm 2.2.7.'de teorik ayrıntıları açıklanan kromatografik cevap faktörü (improved chromatographic response function → ICRF, Carle 1972) optimizasyon işlemlerindeki modellemeler için kullanıldı.

Deneysel tasarım ve optimizasyon tekniklerine dayalı olarak yeni kromatografik yöntem geliştirilmesinde, bu ICRF fonksiyonunun özelliği minimum alıkonma zaman aralığında maksimum kromatografik ayırma (R) sağlayan optimal kromatografik deneysel şartların bulunmasında etkin bir cevaptır.

BRI-TIM karışımının analizi için geliştirilen UPLC yönteminin kemometrik optimizasyon koşulları; akış hızı= 0.38 mL/dak., kolon sıcaklığı= 49.2 °C ve hareketli faz bileşimindeki 0.1 M CH₃COOH yüzdesi= 56.7 olarak bulundu. Bu şartlarda kalibrasyon seti ve numunelerin 246.0 (BRI için) ve 298.0 (TIM için) dalga boyunda dedeksiyonu ile kromatogramlar çizdirildi. Bölüm 3.1.1.3'te Çizelge 3.4'te doğrusal regresyon analiz sonuçları sunuldu. Çizelgeden de görüleceği gibi çalışma aralığında her iki bileşik için yüksek korelasyon katsayısı ve uygun LOD ve LOQ değerleri elde edildi.

BRI-TIM analizinde yöntem validasyonu için yapay karışımların analizi ile % geri kazanım çalışmaları ile yöntemin doğruluğu ve kesinliği değerlendirildi. Sonuçlar Çizelge 3.5'te verildi. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları Çizelge 3.6'da özetlendi. Yöntemin seçiciliğini değerlendirmek için standart ekleme deneyleri yapıldı. Çizelge 3.7'den görüldüğü üzere ticari göz damlasındaki yardımcı maddelerin analiz üzerine bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Çalışmada, BRI ve TIM kombinasyonunu içeren ticari formülasyonun analizi için geliştirilen UPLC uygulamasından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9'da sunuldu. Bu sonuçlar, geliştirilen UPLC yönteminin ticari formülasyondan aktif bileşiklerin rutin analiz ve kalite kontrolü için kullanılabileceğini gösterdi.

4.2. PCR ve PLS Yöntemleri ile BRI-TIM ve DOR-TIM Karışımının Analizi

Doktora tezinin bu çalışmasında BRI-TIM ve DOR-TIM karışımlarının miktar tayinleri, UV-Spektrofotometre verilerine, Bölüm 2.2.4'te teorik bilgisi sunulan temel bileşen regresyon (principal component analysis regression → PCR) ve Bölüm 2.2.5'te teorik temeli sunulan kısmi en küçük kareler (partial least squares → PLS) yöntemlerinin uygulanması ile gerçekleştirildi.

PCR yöntemi uygulanmasında BRI-TIM karışımı için 220.0-340.0 nm ve DOR-TIM.karışımı için 200.0-350.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla çizdirilen orjinal absorpsiyon spektrum verileri kullanıldı. Yöntemin analitik validasyonu için hazırlanan yapay karışım çözeltilerine PCR yönteminin uygulanması ile % Geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı, BRI-TIM karışımı için Çizelge 3.11'de ve DOR-TIM karışımı için Çizelge 3.36'da sunuldu. Yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini kontrol etmek için gün içi ve günler arası analizleri yapıldı , BRI-TIM karışımı için Çizelge 3.12'de ve DOR-TIM karışımı için Çizelge 3.37'de gösterildi. PCR yönteminin ticari farmasötik göz damlası numunelerine uygulamadan önce formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin analiz üzerinde etkisinin olup olmadığı standart ekleme tekniği ile kontrol edildi. Standart ekleme tekniğinin sonuçları BRI-TIM karışımı için Çizelge 3.13'te ve DOR-TIM karışımı için Çizelge 3.38'de verildi. Sonuçlar incelendiğinde her iki ticari göz damlası numunesi içerisindeki yardımcı maddelerin herhangi bir etkisi olmadığı anlaşıldı. Geliştirilen ve valide edilen PCR yönteminin COMBİGAN ve TOMEK göz damlası numunelerine uygulanması ile elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 3.14'te ve Çizelge 3.39'da sunuldu.

PLS yöntemi uygulanmasında BRI-TIM karışımı için 220.0-340.0 nm ve DOR-TIM.karışımı için 200.0-350.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla çizdirilen orjinal absorpsiyon spektrum verileri kullanıldı. Yöntemin analitik validasyonu için

hazırlanan yapay karışım çözeltilerine PLS yönteminin uygulanması ile % Geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı, BRI-TIM karışımı için Çizelge 3.16'da ve DOR-TIM karışımı için Çizelge 3.41'de sunuldu. Yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini kontrol etmek için gün içi ve günler arası analizleri yapıldı , BRI-TIM karışımı için Çizelge 3.17'de ve DOR-TIM karışımı için Çizelge 3.42'de gösterildi. PLS yönteminin ticari farmasötik göz damlası numunelerine uygulamadan önce formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin analiz üzerinde etkisinin olup olmadığı standart ekleme tekniği ile kontrol edildi. Standart ekleme tekniğinin sonuçları BRI-TIM karışımı için Çizelge 3.18'de ve DOR-TIM karışımı için Çizelge 3.43'de verildi. Sonuçlar incelendiğinde her iki ticari göz damlası numunesi içerisindeki yardımcı maddelerin herhangi bir etkisi olmadığı anlaşıldı. Geliştirilen ve valide edilen PCR yönteminin COMBİGAN ve TOMEK göz damlası numunelerine uygulanması ile elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 3.19'da ve Çizelge 3.44'te sunuldu.

BRI-TIM ve DOR-TIM karışımlarının ticari göz damlası sonuçlarından, geliştirilen ve valide edilen PCR ve PLS yöntemlerinin kalite kontrol ve rutin analizi için basit, ucuz, uygulanabilir bir yöntem olduğu sonucuna varıldı.

4.3 SDD Yöntemleri ile BRI-TIM ve DOR-TIM Karışımının Analizi

Doktora tez çalışmasının BRI-TIM ve DOR-TIM karışımlarının miktar tayini için UV-Spektrofotometre verilerine sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) yöntemlerinin uygulandı. BRI-TIM karışımı için dalgacıklar ailesinden Mexh-SDD ve Sym5-SDD sinyal işleme yöntemi kullanıldı. DOR-TIM karışımı için dalgacıklar ailesinden db10-SDD ve bior6.8-SDD sinyal işleme yöntemi kullanıldı.

Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemleri BRI-TIM karışımı için 220.0-340.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorbsiyon spektrumlarına uygulandı. Mexh-SDD yönteminde kalibrasyon grafiği; BRI kalibrasyon çözeltileri için 277.1 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon çözeltileri için 295.2 nm dalga boyundaki genlikleri ölçülerek hesaplandı. Sym5-SDD yönteminde kalibrasyon grafiği; BRI kalibrasyon çözeltileri için 233.2 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon çözeltileri için 288.1 nm dalga boyundaki genlikleri ölçülerek hesaplandı. Her iki yönteme ait regresyon analiz sonuçları Çizelge 3.20’de sunuldu. Her iki yöntemin de korelasyon katsayılarının yüksek çıktığı ve LOD ve LOQ değerlerinin istenilen aralıkta olduğu Çizelge 3.20’de yer almaktadır.

Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin validasyonu için, BRI-TIM içeren farklı konsantrasyondaki yapay karışımların % geri kazanım ve bağıl standart sapma sonuçları Çizelge 3.21’de sunuldu. Yöntemin doğruluk ve kesinliğini test etmek için gün içi ve günler arası hazırlanan çözeltilerle analizler yapıldı ve Çizelge 3.22’de % geri kazanım sonuçları verildi. Standart ilave tekniği ile ticari farmasötik göz damlası içerisindeki yardımcı maddelerin Mexh-SDD ve Sym5-SDD yöntemlerinin analiz üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırıldı. Çizelge 3.23’te ki sonuçlara bakıldığında yardımcı maddelerin her iki

yöntem üzerinde bir etkisinin olmadığı görüldü. Her iki yöntemin BRI-Tım karışımı içeren ticari göz damlası preparatına uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.24'te verildi.

Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemleri DOR ve TIM'in kantitatif analizi için 200.0-340.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumlarına uygulandı. Db10-SDD yönteminde kalibrasyon grafiği; DOR kalibrasyon çözeltileri için 282.1 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon çözeltileri için 274.6 nm dalga boyundaki genlikleri ölçülerek hesaplandı. Bior6.8-SDD yönteminde kalibrasyon grafiği; DOR kalibrasyon çözeltileri için 283.0 nm dalga boyunda ve TIM kalibrasyon çözeltileri için 293.6 nm dalga boyundaki genlikleri ölçülerek hesaplandı.

Her iki yönteme ait regresyon analiz sonuçları Çizelge 3.45'te sunuldu. Her iki yöntemin de korelasyon katsayılarının yüksek çıktığı ve LOD ve LOQ değerlerinin istenilen aralıkta olduğu Çizelge 3.45'te yer almaktadır.

Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin validasyonu için, DOR-TIM içeren farklı konsantrasyondaki yapay karışımların % geri kazanım ve bağıl standart sapma sonuçları Çizelge 3.46'da sunuldu. Yöntemin doğruluk ve kesinliğini test etmek için gün içi ve günler arası hazırlanan çözeltilerle analizler yapıldı ve Çizelge 3.47'de % geri kazanım sonuçları verildi. Standart ilave tekniği ile ticari farmasötik göz damlası içerisindeki yardımcı maddelerin Db10-SDD ve bior6.8-SDD yöntemlerinin analiz üzerine bir etkisi olup olmadığı araştırıldı. Çizelge 3.48'de ki sonuçlara bakıldığında yardımcı maddelerin her iki yöntem üzerinde bir etkisinin olmadığı görüldü. Her iki yöntemin DOR-TIM karışımı içeren ticari göz damlası preparatına uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.49'da verildi.

BRI-TIM ve DOR-TIM karışımlarının miktar tayinleri için geliştirilen ve valide edilen bu SDD yöntemlerinin kalite kontrol ve rutin analizi için basit, kolay ve uygulanabilir olduğu anlaşıldı.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu doktora tezindeki “Timolol Maleat İçeren Ticari Farmasötik Preparatlardaki Etkin Maddelerin Spektrofotometrik ve Kromatografik Ölçümlere Dayalı Kemometrik Yöntemlerle Miktar Tayinleri” başlıklı çalışmada elde edilen sonuçlar istenen amaçlara başarıyla ulaşıldığını göstermektedir. Bu kapsamda TIM-BRI ve TIM-DOR kombinasyonlarını içeren ticari farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin miktar tayinleri için yeni UV spektral verilerin kullanımına dayanan PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri, sürekli dalgacık dönüşüm yöntemleri ve kemometrik 3³ tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımları kullanılarak yeni UPLC yöntemleri geliştirildi.

Spektrofotometrik olarak kemometrik PCR ve PLS yöntemleri ve SDD yöntemleri ile TIM-BRI ve TIM-DOR şeklindeki iki farklı karışım sisteminin analizinde aktif bileşikler aynı spektral dalga boyu aralığında girişim yapmalarına rağmen her iki kemometrik kalibrasyon yöntemi uygulanmasında son derece başarılı sonuçlar elde edildi. Ayrıca PCR, PLS ve SDD yöntemleri TIM-BRI ve TIM-DOR kombinasyonlarını içeren karışımların analizinde herhangi bir kimyasal ön ayırma gerekmeksizin bileşiklerin eşzamanlı hızlı, kolay ve ucuz analizine olanak sağlamıştır.

Çalışmalarda, TIM-BRI ve TIM-DOR ikili karışımlarını içeren ticari göz preparatlarının analizi için UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde kemometrik optimizasyon yöntemleriyle kısa analiz süresinde en uygun kromatografik koşullar bulundu. Optimal kromatografik koşullardaki UPLC yöntemleri valide edildikten sonra ticari farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin (TIM, BRI ve DOR) analizine başarıyla uygulandı.

Sonuç olarak doktora tezi kapsamında TIM-BRI ve TIM-DOR şeklindeki her bir karışımın analizi için iki yeni UV spektral PCR, PLS ve SDD yöntemiyle yeni optimize ve valide edilen birer UPLC yöntem geliştirildi. Bu doktora tezi kapsamında yeni geliştirilen yöntemler, literatür yöntemleriyle karşılaştırıldığında son derece hızlı, kolay, daha kesin, daha doğru ve daha güvenilir sonuçlar verdiği ortaya koymuştur.

İlaç endüstrisinde ve Ar-Ge çalışmalarında yeni önerilen kemometrik PCR ve PLS kalibrasyon teknikleri, SDD yöntemleri ve yeni geliştirilen UPLC yöntemleri TIM-BRI ve TIM-DOR kombinasyonlarını içeren farmasötik göz preparatlarının kantitatif analizinde ve kalite kontrol ile rutin analizlerde başarıyla uygulanabileceklerdir.

Ayrıca doktora tezi çalışmasının konusu ikili karışımlar (TIM-BRI ve TIM-DOR) üzerinde herhangi bir analiz çalışması yapılması durumunda bu doktora tez çalışmasının sonuçları kaynak olacaktır.

ÖZET

Timolol Maleat İçeren Ticari Farmasötik Preparatlardaki Etkin Maddelerin Spektrofotometrik ve Kromatografik Ölçümlere Dayalı Kemometrik Yöntemlerle Miktar Tayinleri

Bu doktora tezinde, Timolol Maleat içeren ticari farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin miktar tayinleri için spektrofotometrik ve kromatografik ölçümlere dayanan yeni metotlar geliştirildi.

Bu bağlamda, Timolol maleat (TIM)-Brimonidin tartarat (BRI) ve TIM-Dorzolamid hidroklorür (DOR) içeren iki farklı ticari ürün (göz damlası) yeni önerilen analitik yöntemlerin uygulaması için dikkate alındı.

İlk olarak, TIM-BRI ve TIM-DOR karışımlarını içeren kalibrasyon seti ve sentetik karışım numuneleri için 210.0-360.0 ve 200.0-350.0 nm, sırasıyla, spektral bölgesindeki UV absorbanslarının ölçümü ile spektrofotometrik veriler elde edildi ve bu verilere temel bileşen regresyon (principal component regression→PCR) ve kısmi en küçük kareler regresyonu (partial least squares regression→PLS) algoritmaları uygulandı.

Yöntem validasyon işlemlerinde, spektral PLS ve PCR yöntemlerinin geçerlilik ve uygulanabilirlikleri sentetik karışımlar, gün içi ve günler arası deneyleri ve standart ilave numuneleri kullanılarak gerçekleştirildi. Validasyon numunelerinin analiz sonuçları istenilen aralıkta çıktığı belirlendi.

Örneğin; TIM-BRI karışımının analizinde, % ortalama geri kazanım ve standart sapma değerleri PCR modelde TIM için % 100.9 ve % 0.28, BRI için % 100.0 ve % 0.93, PLS modelde TIM için %101.1 ve % 0.42, BRI için % 99.9 ve % 0.71 olarak bulundu. Aynı şekilde, TIM-DOR kombinasyonlarının analizi için % ortalama geri kazanım ve bağlı standart sapma değerleri PCR modelde TIM için % 103.2 ve % 1.60, DOR için % 101.8 ve % 1.80, PLS modelde TIM için % 100.8 ve % 0.90, DOR için % 101.3 ve % 1.81 olarak elde edildi.

İkinci olarak, TIM-BRI ve TIM-DOR kombinasyonlarının ticari farmasötik dozaj formlarının eş zamanlı miktar analizleri için yeni UPLC (Ultra performance Liquid Chromatography→UPLC) yöntemleri geliştirildi. UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde 3³ tam faktöriyel tasarım ve Box-Behnken tasarımı optimal kromatografik koşulların bulunması için kullanıldı.

TIM-BRI karışımının analizi için UPLC yöntem optimizasyonunda 3³ tam faktöriyel tasarımın uygulanmasında mobil fazdaki 0.1 M CH₃COOH (% , x₁), kolon

sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$, x_2), akış hızı (mL/dakika, x_3) faktör değişkenleri olarak seçildi. Seçilen faktörlerin seviyeleri; x_1 : 35(-1), 55(0) ve 75(+1), x_2 : 35(-1), 50 (0) ve 65 (+1) ve x_3 : 0.2 (-1), 0.3 (0) olarak belirlendi. Bu UPLC optimizasyon prosedüründe, optimal kromatografik koşullar; akış hızı 0.38 mL/dakika, kolon sıcaklığı 49.2°C ve mobil fazdaki % 0.1 M CH_3COOH değeri 56.70 olarak hesaplandı. Bu optimal UPLC koşulları altında, TIM ve BRI için kalibrasyon eğrisi, sırasıyla 8.0 – 72.0 $\mu\text{g/mL}$ ve 5.0 – 25.0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında 298.0 nm ve 246.0 nm’de pik alanlarında konsantrasyon regresyonu ile hesaplandı. BRI ve TIM’in analizi için optimize edilen UPLC yöntemi sentetik karışım, gün içi ve günler arası numuneleri ve standart ekleme çözeltileri ile valide edildi. Optimize ve valide edilen bu UPLC yöntemi TIM ve BRI içeren göz damlası numunelerinin kantitatif analizine başarı ile uygulandı. Analiz sonuçları BRI için 2 mg/mL ve TIM için 5 mg/mL olarak bulundu. Bu sonuçlar yeni optimize ve valide edilen UPLC yönteminin TIM-BRI ticari numunelerinin rutin analizi için çok uygun olduğunu gösterdi.

TIM-DOR karışımının analizi için UPLC yöntemi optimizasyonunda Box-Behnken tasarımı uygulanmasında, mobil fazdaki 4×10^{-4} M CCl_3COOH bileşeni (% , x_1), kolon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$, x_2) ve akış hızı (mL/min, x_3) faktör değişkenleri olarak seçildi. Seçilen faktörlerin seviyeleri sırasıyla; x_1 : 12 (-1), 38 (0) ve 64 (+1), x_2 : 30(-1), 45 (0) ve 60 (+1), x_3 : 0.2(-1), 0.3(0) ve 0.4 (+1) olarak belirlendi. Bu UPLC optimizasyon prosedüründe optimal kromatografik koşul olarak akış hızı 0.32 mL/dakika, kolon sıcaklığı 45.0°C ve mobil fazdaki 4×10^{-4} M CCl_3COOH bileşeni % 40.0 olarak bulundu. Bu optimal UPLC koşulları altında, TIM ve DOR için kalibrasyon eğrileri 5.0 – 40.0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında 275.0 nm’de pik alanlarındaki konsantrasyonun regresyonu ile hesaplandı. DOR ve TIM’in analizi için optimize edilen UPLC yöntemi sentetik karışımlar, gün içi ve günler arası numuneleri ve standart ekleme çözeltilerinin analizi ile valide edildi. Optimize ve valide edilen bu UPLC yöntemi TIM ve DOR maddelerini içeren göz damlası numunelerinin miktar tayininde başarı ile uygulandı. Analiz sonuçları DOR için 20 mg/mL ve TIM için 5 mg/mL olarak bulundu. Bu sonuçlar yeni optimize ve valide edilen UPLC yönteminin TIM-DOR ticari numunelerinin rutin analizi için çok uygun olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak, bahsedilen PCR ve PLS yöntemleri UV-spektral verilerine ilk karışımda TIM ve BRI ve ikinci karışımda TIM ve DOR karışımlarının miktar tayini için uygulandı. Bu spektral kemometrik analizde, Ar-Ge çalışmaları ve ilaç endüstrisi açısından başarılı ve faydalı sonuçlar elde edildi.

Günümüzde ilaç maddelerinin analizi için UPLC yöntemi en yaygın kullanılan tekniktir. Bu yaklaşıma göre bu doktora tezinde iki farklı ticari göz damlası olan TIM-BRI ve TIM-DOR kombinasyonlarının miktarsal değerlendirmeleri için optimize edilen ve geliştirilen yeni bir UPLC yöntemi elde edildi.

Anahtar kelimeler: Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (AYBSK), Brimonidin Tartarat, Deneysel Tasarım ve Optimizasyon, Dorzolamid Hidroklorür, Timolol Maleat.

SUMMARY

Quantitative Analysis of Timolol Maleate and Active Compounds in Commercial Pharmaceutical Preparations Based on Spectrophotometric and Chromatographic Measurements with Chemometric Methods

In this doctorate thesis, new methods based on the spectrophotometric and chromatographic measurements were developed for the quantitative analysis of active compounds in commercial pharmaceutical preparations containing timolol maleate.

In this context, two different commercial products (eye drops) containing Timolol Maleate (TIM)-Brimonidine Tartrate (BRI) and TIM-Dorzolamide hydrochloride (DOR) combinations were considered for the application of the newly proposed analytical methods.

Firstly, the spectrophotometric data obtained by measuring the UV absorbances in the spectral region of 210-360 nm and 200-350 nm for the calibration set and samples containing TIM-BRI and TIM-DOR mixtures were processed by the principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLS) algorithms, respectively.

In the method validation treatments, the validity and applicability of the spectral PLS and PCR methods were performed by using the synthetic mixtures, inter-day and intra-day experiments and standard addition samples. A good agreement was reported for the analysis results of the validation samples.

For example; in the analysis of the TIM-BRI mixture percent mean recovery results and standard deviations were found as 100.9 % and 0.28 % for TIM and 100.0 % and 0.93 % for BRI using PCR model and as 101.1 % and 0.42 % for TIM and 99.9 % and 0.71 % for BRI using PLS model for the analysis. In the same way, mean recoveries and corresponding relative standard deviations for the analysis of TIM-DOR combinations were obtained as 103.2 % and 1.60 % for TIM and 101.8 % and 1.80 % for DOR using PCR model and as 100.8 % and 0.90 % for TIM and 101.3 % and 1.81 % for DOR using PLS model for the analysis.

Secondly, new UPLC methods were developed for the simultaneous quantitative analysis of the combined pharmaceutical dosage forms of TIM-BRI and TIM-DOR combinations. In the development of new UPLC methods, 3^3 full factorial design and Box-Behnken design were used to find the optimal chromatographic conditions.

In the application of a 3^3 full factorial design to the UPLC method optimization for the analysis of TIM-BRI, flow rate (mL/min, x_1), column temperature ($^{\circ}\text{C}$, x_2) and 0.1 M

CH₃COOH (% , x_3) in mobile phase were selected as factor variables with three levels; x_1 : 0.2 (-1), 0.3 (0) and 0.4 (+1), x_2 : 35(-1), 50 (0) and 65 (+1), x_3 : 35(-1), 55(0) and 75 (+1), respectively. In this UPLC optimization procedure, optimal chromatographic conditions were found to be 0.38 mL/min for the flow rate, 49.2 °C for column temperature and 56.70 % for 0.1 M CH₃COOH in mobile phase. Under this optimal UPLC conditions, calibration curves for TIM and BRI in the concentration range of 8.0 – 72.0 µg/mL and 5.0 – 25.0 µg/mL were computed by regressing the concentration on the peak areas measured at 298.0 nm and 246.0 nm, respectively. The optimized UPLC method for the analysis of BRI and TIM were validated by analysing various synthetic mixture, intra-day and inter-day samples and standard addition solutions. This optimized and validated UPLC approach was successfully applied the quantitative analysis of eye drop samples containing TIM and BRI substances. Assay results were found to be 2 mg/mL for BRI and 5 mg/mL for TIM. This results indicated that the newly optimized and validated UPLC method was very suitable for the routine analysis of TIM-BRI commercial samples.

In the application of a Box-Behnken design to the UPLC method optimization for the analysis of TIM-DOR, 4×10^{-4} M CCl₃COOH(% , x_1) in mobile phase column temperature (°C, x_2) and flow rate (mL/min, x_3) were selected as factor variables with three levels; x_1 : 12 (-1), 38 (0) and 64 (+1), x_2 : 30(-1), 45 (0) and 60 (+1), x_3 : 0.2(-1), 0.3(0) and 0.4 (+1), respectively. In this UPLC optimization procedure, optimal chromatographic conditions were found to be 0.32 mL/min for the flow rate, 45.0 °C for column temperature and 40.0 % for 4×10^{-4} M CCl₃COOH in mobile phase. Under this optimal UPLC conditions, calibration curves for TIM and DOR in the concentration range of 5.0 – 40.0 µg/mL were computed by regressing the concentration on the peak areas measured at 275.0 nm. The optimized UPLC method for the analysis of DOR and TIM were validated by analysing various synthetic mixture, intra-day and inter-day samples and standard addition solutions. This optimized and validated UPLC approach was successfully applied the quantitative analysis of eye drop samples containing TIM and DOR substances. Assay results were found to be 20 mg/mL for DOR and 5 mg/mL for TIM. This results indicated that the newly optimized and validated UPLC method was very suitable for the routine analysis of TIM-DOR commercial samples.

As a consequence, the newly proposed PCR and PLS were applied to the UV-spectral data for the quantitations of TIM and BRI in first mixture and TIM and DOR in second mixture. In this spectral chemometric analysis, successful and useful results were obtained in terms of pharmaceutical industry and R&D studies.

Nowadays UPLC method is the most commonly used technique for the analysis of drug substances. According to this approach, this doctorate thesis was gained newly optimized and developed UPLC methods for the quantitative estimation of TIM-BRI and TIM-DOR combinations which were two different commercial eye drops.

Keywords: Brimonidine Tartrate, Dorzolamide Hydrochloride, Experimental Design and Optimization, Timolol Maleate, Ultra Pressure Liquid Chromatography (UPLC).

KAYNAKLAR

- ACHEAMPONG A, TANG-LIUDDS, (1995). Measurement of brimonidine concentrations in human plasma by a highly sensitive gas chromatography/mass spectrometric assay. *J Pharm Biomed Anal*, **13**:995-1002.
- ABDEL-HAY MH, GAZY AA, HASSAN EM, BELAL TS, (2008). Derivative and derivative ratio spectrophotometric analysis of antihypertensive ternary mixture of amiloride hydrochloride, hydrochlorothiazide and timolol maleate. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **55**:971-978.
- ALİ MS, KHATRIAR, MUNIR MI, GHORIM, (2009). A Stability-Indicating Assay of Brimonidine Tartrate Ophthalmic Solution and Stress Testing Using HILIC. *Chromatographia*, **70**: 539-544.
- BENGİSU U, (1998). Göz Hastalıkları. 4. Baskı, Glokom 9. Bölüm s.: 139-158.
- BITO LZA, (1989). Physiologic approach to the development of new drugs for glaucoma. *Ophthalmology Clinics of North America*, **2**: 65-76.
- BÜKER E, DİNÇ E, (2016). A New UPLC method with chemometric design-optimization approach for the simultaneous quantitation of brimonidine tartrate and timolol maleate in an eye drop preparation. *Journal of Chromatographic Science*, doi: 10.1093/chromsci/bmw160, **1-8**.
- BOIERO C, ALLEMANDID, LONGHI M, LLABOT JM, (2015). RP-HPLC method development for the simultaneous determination of timolol maleate and human serum albumin in albumin nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **111**:186–189.
- CARLE GC; (1972). Determination of chromatographic resolution for peaks of vast concentration differences. *Analytical Chemistry*, **44**:1905-1906.

- CHIANG CH, CHEN JL, TUE CT, (1991). High Pressure Liquid Chromatographic Analysis of Timolol and Betaxolol in Eye Drops. *J Med Sci*, **12**: 86-95.
- CRACKNELL KP, GRIERSON I, (2009). Prostaglandin analogues in the anterior eye: their pressure lowering action and side effects. *Exp Eye Res.*, **88**: 786-91.
- CUATRECASAS P, FUCHS S, ANFÏNSEN CB, (1968). The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, **159**: 417-419.
- DÍAZ JAR, DAVID M, MONTE Agdel, (2013). Simultaneous determination of Dorzolamide Chlorhydrate and Timolol Maleate. *Revista Cubana de Farmacia*, **47**: 436-445.
- DÎNÇ E, BALEANU D, (2009). Spectral Continuous Wavelet Transform for the Simultaneous Spectrophotometric Analysis of a Combined Pharmaceutical Formulation, *Revista de Chimie*, **60**:741-744.
- DÎNÇ E, BALEANU D,(2012). Fractional-continuous wavelet transforms and ultra-performance liquid chromatography for the multicomponent analysis of a ternary mixture containing thiamine, pyridoxine, and lidocaine in ampules. *Journal of AOAC International*, **95**:903-912.
- DÎNÇ E, BALEANU D, KUCUKBAGRIACIK E, (2012c). Ultra performance liquid chromatography for the quantitative analysis of ampicillin sodium and sulbactam sodium in a pharmaceutical preparation. *Revista de Chimie*, **63**:451-454.
- DÎNÇ E, BALEANU D, SOLAK AO, EKŞİ H, GÜZEL R, (2012d). A new approach to the characterization of the nano-surface structure by using factor analysis. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, **17**: 1012 -1020.
- DÎNÇ E, BÜKER E, BALEANU D, (2011a). Fractional and continuous wavelet transforms for the simultaneous spectral analysis of a binary mixture system. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, **16**:4602-4609.

- DÎNÇ E, BÜKER E, BALEANU D, (2011b). Ultra performance liquid chromatography for the rapid determination of allura red in a commercial liquid drink. *Revista de Chimie*, **62**: 459-461.
- DÎNÇ E, BÜKER E, (2012a). A new application of continuous wavelet transform to overlapping chromatograms for the quantitative analysis of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by ultra-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, **95**:751-756.
- DÎNÇ E, BÜKER E, BALEANU D, (2012b). Simultaneous determination of hydrochlorotiazide and olmesartan modoxomil in a binary mixture by the calibrations of the spectral linear regression equations. *Revista de Chimie*, **63**: 656-659.
- DÎNÇ E, KOKTAŞ NS, BALEANU D, (2009b). An application of principal component analysis-artificial neural network for the simultaneous quantitative analysis of a binary mixture system. *Revista de Chimie*, **60**: 662-665.
- DÎNÇ E, PEKTAŞ G, BALEANU D, (2009a). Continuous wavelet transform and derivative spectrophotometry for the quantitative spectral resolution of a mixture containing levamisole and triclabendazole in veterinary tablets. *Reviews in Analytical Chemistry*, **28**: 79-92.
- DÎNÇ E, RAGNO G, BALEANU D, DE LUCA M, IOELE G, (2012a). Fractional wavelet transform-continuous wavelet transform for the quantification of melatonin and its photodegradation product. *Spectroscopy Letters*, **45**: 337-343.
- DÎNÇ E, (2012). Special issue 12th national spectroscopy congress, Turkey, with international participation. *Spectroscopy Letters*, **45**:313-314.
- DÎNÇ, E, ERTEKİN, ZC, ROUHANI, G, (2015). A new RP-UPLC method for simultaneous quantitative estimation of bisoprolol hemifumarate and hydrochlorothiazide in tablets using experimental design and optimization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **38**: 970-976.

- DİNÇ E., BALEANU D., TAŞ K. (2007). Applications of Wavelets: Continuous wavelet analysis for the ratio signals of the absorption spectra of binary mixtures, *Mathematical Methods in Engineering*, 285-293, Springer.
- DİNÇ E. (2009). Spektrofotometik analizlerde sinyal işleme yöntemleri ve uygulamaları. XI. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 23-26 Haziran, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara.
- FRANCA JR, BATISTA LD, RIBEIRO TG, FERNANDES C, CASTILHO RO, FARACO AAG, (2015). Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for determination of bimatoprost in chitosan-based ocular inserts. *Analytical Letters*, **48**: 531–540.
- FECHTNER RD, WEINREB RN, (1994). Mechanisms of optic nerve damage in primary open angle glaucoma. *Surv Ophthalmol*, **39**: 23-42.
- GUNALP İ, (1992). Parasempatik ve sempatik ilaçların glokom tedavisindeki yeri, genel ilkeleri, Ankara Oftalmoloji Demegi Akademik Eğitim Programı XII. Ulusal Oftalmoloji Kursu klinik Uygulamalı Glokom Kursu, Yıldırım Basımevi, Ankara, 99-113.
- GUPTA V, SRİNIVASAN G, SHARMA A, (2007). Comparative evaluation of bimatoprost monotherapy in primary chronic angle closure and primary open angle glaucoma eyes: a three-year study. *J Ocul Pharmacol Ther*, **234**: 351-358.
- GUPTA V, OV M, RAO A, SHARMA A, SIHOTA R, (2012). Long-term structural and functional outcomes of therapy in juvenile-onset primary open-angle glaucoma: a five-year follow-up. *Ophthalmologica*, **228**: 19-25.
- HAFAZ HM, ELSHANAWANY AA, ABDELAZIZ LM, MOHRAM MS, (2015). Design of experiment utilization to develop a simple and robust RP-UPLC method for stability indicating method of anti glaucoma ophthalmic drops. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, **10**: 46-67.

- HAMILTON RJ, SEWELL PA, (1982). Introduction to high performance liquid chromatography. 2nd Edt., Chapman and Hall, USA.
- HOSKINS Jr HD, KASS M, (1989). Introduction and Classification of the Glaucomas, Becker-Shaffers Diagnosis and Therapy of the Glaucomas- 6th Ed., Klein EA., the c.v. Mosby Company, St. Louis, Toronto, Baltimore p.: 1-9.
- HYLTON C, ROBIN AL, (2003). Update on prostaglandin analogs. *Curr Opin Ophthalmol.*, **14**: 65-69.
- IBRAHIM F, EL-ENANY N, EL-SHAHENY RN, MIKHAIL IE, (2015). Validated spectrofluorimetric and spectrophotometric methods for the determination of brimonidine tartrate in ophthalmic solutions via derivatization with NBD-Cl. Application to stability study. *Luminescence*, **30**: 309–317.
- JAIN PS, KHATAL RN, JIVANI HN, SURANA SJ, (2011). Stability-indicating densitometric HPTLC analysis of brimonidine tartrate in the bulk drug and in eye drops. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, **24**: 166-171.
- JOHANSSON M, FRANSSON D, RUNDLOF T, HUYNH N-H, ARVIDSSON T, (2014). A general analytical platform and strategy in search for illegal drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **100**: 215-229.
- KAYAALP SO, (1985). Beta adrenergik reseptör blokerleri rasyonel tedavi yönünden. *Tıbbi Farmakoloji*, 1192-1220.
- KAYA B, DİNÇ E, BALEANU E, (2009). Chemometric methods for the simultaneous spectrophotometric determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in the commercial pharmaceuticals. *Revista de Chimie*, **60**: 544-550.
- KARAMANOS NK, LAMARİ F, KATSİMPRİS J, GARTAGANİS S, (1999). Development of an HPLC method for determining the α_2 -adrenergic receptor agonist brimonidine in blood serum and aqueous humor of the eye. *Biomed. Chromatogr.*, **13**: 86–88

- KHOSLA PK, NAYAK BK, PRAKASH P, RATNAKAR KS, (1981). Effect of hyperosmotic agent (mannitol) on ciliary epithelium. *Indian J Ophthalmol.*,**29**: 29-34
- KITAZAWA Y, et al, (1996). The effect of topical beta blockers on plasma lipids and lipoproteins in: Glaucoma, Decision making in therapy Milano, 181-183.
- KRSTULOVIIC AM, BROWN PR, (1982). Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications, John Wiley & Sons, USA.
- KUBOTA K, NAKAMURA H, KOYAMA E, YAMADA T, KIKUCHI K., ISHIZAKI T. (1990). Simple and sensitive determination of timolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B:Biomedical Sciences and Applications*, **533**:255-263.
- KULKARNI SP, AMIN PD, (2000). Stability indicating HPTLC determination of timolol maleate as bulk drug and in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**: 983-987.
- Lacroix PM, Dawson BA, Sears RW, Black DB, (1994). HPLC and NMR methods for the quantitation of the (R)-enantiomer in (-)- (S)-timolol maleate drug raw materials. *Chirality*, **6**: 484-491.
- LADDHA UD, BARSE RK, ZILPELWAR RV, TAGALPALLEWAR AA, (2014). Development and validation of stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography method for timolol maleate. *International Journal of PharmTech Research*, **6**: 1429-1435.
- LESKEA MC, HEIJL A, HYMAN L, BENGTSSON B, KOMAROFF E, (2004). Factors for progression and glaucoma treatment: the Early Manifest Glaucoma Trial. *Curr Opin Ophthalmol*,**15**: 102-106.

- LEE HB, SARAFIN K, PEART TE, (2007). Determination of β -blockers and β 2-agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1148**:158–167.
- LINDSEY JD, KASHIWAGI K, KASHIWAGI F, WEINREB RN, (1997). Prostaglandin action on ciliary smooth muscle extracellular matrix metabolism: implications for uveoscleral outflow. *Surv Ophthalmol.*, **41**: 53-9.
- LOTFY HM, HEGAZY MA, REZK MR, OMRAN YR, (2014). Novel spectrophotometric methods for simultaneous determination of timolol and dorzolamide in their binary mixture. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **126**:197–207.
- MAO LK, STEWARD WC, SHIELDS MB, (1991). Correlation between intra ocular pressure control and progressive glaucomatous damage in primary open-angle glaucoma. *Am. Ophthalmol*, **111**: 51-54.
- MADHAVI A, NAIDU A, RAO DVS, SRINIVASU P, (2009). Development and validation of a new lc method for analysis of brimonidine tartrate and related compounds. *Chromatographia*, **69**: 1413-1419.
- MAGUREGUI MI, JIMÉNEZ RM, ALONSO RM, AKESOLO U, (2002). Quantitative determination of oxprenolol and timolol in urine by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **949**:91-97.
- MAGUREGUI MI, ALONSO RM, JIMÉNEZ RM, (1996). A rapid quantitative analysis of the β -blocker timolol in human urine by HPLC-electrochemical detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **19**: 1643-1652.
- MARINI RD, CHIAP P, BOULANGER B, RUDAZ S, ROZET E, CROMMEN J, HUBERT Ph, (2006). LC method for the determination of R-timolol in S-timolol maleate: Validation of its ability to quantify and uncertainty assessment. *Talanta*, **68**:1166–1175.

- MARLEY A, CONNOLLY D, (2014). Determination of (R)-timolol in (S)-timolol maleate active pharmaceutical ingredient: Validation of a new supercritical fluid chromatography method with an established normal phase liquid chromatography method. *Journal of Chromatography A*, **1325**:213– 220.
- MARTENS H, NAES T,(1989). Multivariate Calibration, John Wiley & Sons, Chichester, ISBN 0 471 90979 3.
- MATHRUSRI AM, NARENDRA R, PATTANAIK MR, (2015). Novel analytical spectrophotometric methods for the quantification of brimonidine tartrate -An α adrenergic agonist. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, **8**: 509-514.
- MAZZO DJ,(1984). Simultaneous determination of maleic acid and timolol by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **299**: 503-507.
- MOHAMED AMI, W HMA, MOUSAHS, (2014). Simultaneous determination of dorzolamide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid–liquid microextraction combined with HPLC. *Talanta*, **130**:495–505.
- MOHAMED SR, HANAN AM, SHEREEN MT, MONA NS, (2014). Simultaneous determination of Timolol maleate and Brimonidine tartrate in their pharmaceutical dosage form. *Analytical Chemistry Letters*, **4**: 132-145.
- MOHAMMEDI H, SHYALE S, SHANTA KUMAR SM, (2011). Physico-chemical characterization, UV Spectrophotometric method development and validation studies of Timolol maleate. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **6**: 163-166.
- MOHIT M, RAVI T, (2011). Method Development and Validation of Brimonidine Tartrate by High Performance Liquid Chromatography. *Asian Journal of Research in Chemistry*, **4**: 1591-1593.
- NAGORI BP, MARU A, MUYSUNI P, GUPTA S, (2011). Method development and its validation for simultaneous estimation of timolol maleate and dorzolamide

- hydrochloride in as API and in ophthalmic solution dosage form by RPHPLC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3**:866-874.
- NARDIN GF, ZIMMERMAN TJ, (1996). Ocular Cholinergic agents in: The Glaucomas. Shields MB, Ritch R, Krupin T eds. 2nd Edt., mosby-year book, st .louis, p.:1399-1408.
- NARENDRA A, DEEPIKA D, ANNAPURNA MM, (2012). Liquid chromatographic method for the analysis of brimonidine in ophthalmic formulations. *E-Journal of Chemistry*, **9**: 1327-1331.
- NASIR F, IQBAL Z, KHANA, AHMAD L, SHAH Y, KHAN AZ, KHAN JA, KHAN S (2011). Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. *Journal of Chromatography B*, **879**:3434– 3443.
- NOELADIAS A, SUBRAHMANYAM EVS, SHABARAYA R, MISQUITH J, (2013). New analytical method and its validation for the estimation of dorzolamide hydrochloride in bulk and marketed formulation. *International Journal of ChemTech Research*, **5**: 1655-1663.
- OLAH TV, GILBERT JD, BARRISH A, (1993). Determination of the β -adrenergic blocker timolol in plasma by liquid chromatography—atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **11** : 157-163.
- ORZALES N, ROSSETTI L, INVERNIZZI T, BOTTOLI A, AUTELITANO A, (2000). Effect of timolol, latanoprost, and dorzolamide on circadian IOP in glaucoma or ocular hypertension. *Am J Ophthalmol*, **130**: 687-690.
- PALABIYIK IM, GÖKER E, ÇAĞLAYAN MG, ONUR F, (2013). Multivariate optimization model in a partial least squares-1 method for simultaneous determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops. *Current Pharmaceutical Analysis*, **9**: 404-412.

- Paolera MD, Kasahara N, Umbelino CC, Walt JG, (2008). Comparative study of the stability of bimatoprost 0.03% and latanoprost 0.005%: a patient-use study. *BMC Ophthalmology*, **8**: 1-5.
- PEKTAŞ G, DİNÇ E, BALEANU D, (2009). Combined application of continuous wavelet transform-zero crossing technique in the simultaneous spectrophotometric determination of perindopril and indapamid in tablets. *Quimica Nova*, **32**:1416-1421.
- TIJANA R, BILJANA JANCIC S, ANDELIJA M, DARKO I, MIRJANAM, (2012). Improved chromatographic response function in HILIC analysis: Application to mixture of antidepressants. *Talanta*, **98**:54-61.
- RELE RV, MHATRE VV, PARAB JM, WARKAR CB, (2011). Simultaneous RP HPLC determination of Latanoprost and Timolol Maleate in combined pharmaceutical dosage form. *J Chem Pharm Res*, **3**:138-144.
- SHAMSIPUR M, ABDOLLAHPOUR A, HEYDARI R, (2011). Development and validation of a new high performance liquid chromatographic method for enantioseparation of dorzolamide hydrochloride on a coated cellulose phenylcarbamate chiral stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **34**: 1367-1380.
- SHAMSIPUR M, HEYDARI R, JAMASBI ES, ABDOLLAHPOUR A, (2010). Chiral separation and quantitation of dorzolamide hydrochloride enantiomers by high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, **33**:2328–2333.
- SHARMA N, RAO SS, REDDY AM, (2012). A Novel and rapid validated stability-indicating uplc method of related substances for dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in ophthalmic dosage form. *Journal of Chromatographic Science*, **50**:745–755.
- SHADOUL WA, GAD KARIEM EA, ADAM ME, IBRAHIM KEE, (2011). Simultaneous determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in ophthalmic solutions using HPLC. *Elixir Pharmacy*, **38**: 4060-4063.

- SHIRKE RR, PAI N, (2002). Rp-hplc determination of brimonidinetartrate in brimonidine tartrate eye drops. *Indian Drugs*, **39**:484-486.
- SINGH K, ZIMMERMAN TJ, (1995). Update on the status of topical beta blockers in the treatment of glaucoma in: *Ophthalmology Clinics Of North America*, New 48 developments in glaucoma Lee DA. Edt. N.B. Saunders company Philadelphia, 295-302.
- SNYDER LR, GLAJCH JL, KIRKLAND JJ, (1988). Practical HPLC Method Development. John Wiley & Sons, USA.
- SONANIS MC, RAJPUT AP, (2011). Development and validation of a new stability indicating analytical methodfor the determination of related components of brimonidine tartrate indrug substances and drug product using uplc. *Int J Pharm Pharm Sci*, **3**: 145-150.
- SUNITHA G, BHAGIRATH R, ALAPATI VR, RAMAKRISHNA K, SUBRAHMANYAM CVS, ANUMOLUPD, (2013). Fluorimetric quantification of brimonidine tartrate in eye drops. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **75**: 730-732.
- TURAÇLI E, (2003). Prostaglandin analogları. *Glokom.*, 126-128.
- TRACQUI A, KINTZ P, HIMBER J, LUGNIER AAJ, MANGIN P, (1988). A specific HPLC method for determination of β -blockers topically used in ophthalmological diseases.*Forensic Science International*, **38**:37-41.
- WANARE RS, KABRA AO, DESHMUKH A, AHER N,(2012). Simultaneous estimation of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops by a rp-hplc method.*Pharmacie Globale (IJCP)*, **3** (02).
- WOODWARD DF, KRAUSS AH, WANG JW, et al., (2007). Identification of an antagonist thatselectively blocks the activity of prostamides (prostaglandin-ethanolamides) in the feline iris. *Br J Pharmacol*, **1503**: 342-352.
- YANOFF M, DUKER JS, (2008). Ophtalmology.Chapter 10,*Glaucoma*,p.:1102-1105.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Eda

Soyadı: BIYIK

Doğum yeri: Ankara

Doğum tarihi: 20.07.1984

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi-Yenimahalle / ANKARA Tel: (0312) 343 10 50

II- Eğitimi:

Lisans: Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi (2003–2007)

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2007 – 2010)

Doktora: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı (2010 – 2016)

Yabancı Dil: İngilizce

III- Unvanlar: - Uzman Kimyager (01.11.2010)

IV- Mesleki Deneyimi:

Kimyager
2013-

GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI,
ANKARA

Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü
Biyoteknoloji Araştırma Merkezi

Memur-Kimyager 2012-2013	GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI, ANKARA Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü Numune Kabul ve Rapor Düzenleme Birimi
Öğretim Elemanı Yardımcısı 2011-2012	UŞAK ÜNİVERSİTESİ, UŞAK Merkezi Laboratuvar
Kalite Kontrol Analisti 2007-2008	DROGSAN İLAÇ FAB. Kalite Kontrol Birimi
Kimyager 2007-2008	DÜZEN LABORATUVARI Özel Kimya Bölümü

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

-

VI- Bilimsel İlgi Alanları:

Makaleler:

- 2016 Eda Büker and Erdal Dinç, A New UPLC Method with Chemometric Design–Optimization Approach for the Simultaneous Quantitation of Brimonidine Tartrate and Timolol Maleate in an Eye Drop Preparation, Journal of Chromatographic Science, 2016, doi: bmw160.
- 2016 Erdal Dinç and Eda Büker, Parallel factor analysis and trilinear partial least squares applied to the UPLC-PDA data array for the quantification of brimonidine tartrate and timolol maleate in an eye drop formulation, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2016
<http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2016.1174941>
- 2016 Erdal Dinç, Z. Ceren Ertekin and Eda Büker, Two-way and three-way approaches to ultra high performance liquid chromatography–

- photodiode array dataset for the quantitative resolution of a two-component mixture containing ciprofloxacin and ornidazole, *Journal of Separation Science*, 2016 39, 3488-3497.
- 2015 Saadet Dermiş, Z. Ceren Ertekin, Eda Bükler, Erdal Dinç, A new ultra performance liquid chromatographic method for the determination of omeprazole in a capsule dosage form, *Asian Journal of Chemistry*, 2015 27 (12), pp. 4689-4692
- 2015 Saadet Dermiş, Eda Bükler, Z. Ceren Ertekin, Erdal Dinç, A new ultra performance liquid chromatographic method for the determination of pantoprazole in a capsule dosage form, *Asian Journal of Chemistry*, 2015 27 (12), pp. 4675-4678,
- 2012 Erdal Dinç, Eda Bükler, Continuous wavelet transforms and ultra performance liquid chromatography applied to the simultaneous quantitative resolution of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide in tablets, *Journal of AOAC International* (in press 2012).
- 2011 Erdal Dinç, Eda Bükler, Dumitru Baleanu, Fractional and continuous wavelet transforms for the simultaneous spectral analysis of a binary mixture system (2011) *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 16 (12), pp. 4602-4609.
- 2011 Erdal Dinç, Eda Bükler, Dumitru Baleanu, Ultra performance liquid chromatography for the rapid determination of allura red in a commercial liquid drink, *Revista de Chimie*, 62 (4), pp. 459-461, 2011.
- 2012 Erdal Dinç, Eda Bükler, A new application of continuous wavelet transform to overlapping chromatograms for the quantitative analysis of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in

tablets by ultra-performance liquid chromatography. J AOAC Int.
2012 May-Jun;95(3):751-6

Bildiriler:

- 2016 Elif Varhan Oral, Z. Ceren Ertekin, Eda B ker, Erdal Din , 25-28
Mayıs 2016. “A Chemometric Optimization Approach for the
Chromatographic Quantification of Domperidone and Lansoprazole
in a Commercial Formulation”. Third International Conference On
New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya,
Turkey
- Eda B ker, Erdal Din , 25-28 Mayıs 2016 “PLS and PCR approaches
to the Spectrophotometric Quantitative Estimation of Dorzolamide
Hydrochloride and Timolol Maleate in a Commercial Eye Drop
Sample” Third International Conference On New Trends In
Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey
- Erdal Din , Z. Ceren Ertekin, Eda B ker, 25-28 Mayıs 2016
“Simultaneous Quantitative Analysis of a Ternary Mixture with
PARAFAC Decomposition” Third International Conference On New
Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey
- Erdal Din , Eda B ker, 25-28 Mayıs 2016 “Two and Three-Way
Calibration Methods for The Multicomponent Analysis of a Two-
Component Mixture in Commercial Eye Drop Preparation” Third
International Conference On New Trends In Chemometrics And
Applications, Side-Antalya, Turkey
- Eda B ker, Erdal Din , 25-28 Mayıs 2016 “Chemometric
Optimization and UPLC Analysis of Dorzolamide Hydrochloride and
Timolol Maleate in a Commercial Eye Drop Preparation” Third
International Conference On New Trends In Chemometrics And
Applications, Side-Antalya, Turkey

Eda B ker, Erdal Din , 25-28 Mayıs 2016 “The Simultaneous Chromatographic Quantitation Analysis of Two-Component Mixture Using Experimental Design and Optimization” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Erdal Din , Eda B ker, 25-28 Mayıs 2016 “Multi-Way Analysis of the UPLC-PDA Data for the Quantitative Resolution of Brimonidine Tartrate and Timolol Maleate in a Commercial Ophthalmic Solution” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Erdal Din , Eda B ker, Z. Ceren Ertekin, 25-28 Mayıs 2016 “Simultaneous Quantitative Determination of a Two-Component Mixture with Trilinear PLS Algorithm” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Saadet Dermi , Eda B ker, Z. Ceren Ertekin, Erdal Din , 25-28 Mayıs 2016 “Univariate Calibration Model for the Chromatographic Analysis of Pantoprazole in Tablets” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Eda B ker, Erdal Din , 25-28 Mayıs 2016 “PLS and PCR Approaches the Spectrophotometric Quantitative Estimation of Brimonidine Tartrate and Timolol Maleate in a Commercial Eye Drop Sample” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Z. Ceren Ertekin, Eda B ker, Elif Varhan Oral, Berrin Ziyadano ulları, Hamdi Temel, Recep Ziyadano ulları, Erdal Din , 25-28 Mayıs 2016 “One Dimensional Continuous Wavelet Transform

Approaches to the Simultaneous Determination of Domperidone and Lansoprazole in Tablets” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Erdal Dinç, Nagehan Yaşar, Eda Bükler, 25-28 Mayıs 2016 “UPLC Method for the Simultaneous Quantitative Analysis of Ivermectin and Praziquantel in a Veterinary Formulation Using Univariate Least Square Calibration Technique” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Erdal Dinç, Z. Ceren Ertekin, Eda Bükler, Ferdi Tokar, 25-28 Mayıs 2016 “PARAFAC Approach to Spectrochromatographic Array for the Quantitative Resolution of a Two-Component Mixture Containing Isoniazid and Pyridoxine Hydrochloride” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Erdal Dinç, Eda Bükler, Z. Ceren Ertekin, 25-28 Mayıs 2016 “Application of Tucker3 Model to the Spectrofluorimetric Data for the Quantitation of an Antihypertensive Drug Combination” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Sümeysra Çetinkaya, Eda Bükler, Gül Dursun, 25-28 Mayıs 2016 “*In vitro* Antioxidant Activities of Various Solvent Extracts From *Achillea ketenoğlu*” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Sümeysra Çetinkaya, İpek Sutar, Eda Bükler, 25-28 Mayıs 2016 “*In Vitro* Antioxidant Activities of Various Solvent Extracts from *Liquidambar Orientalis Mill.*” Third International Conference On

New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Sümeysra Çetinkaya, Eda Büker, İlknur Çınar, 25-28 Mayıs 2016 ” In vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Rheum ribes” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Ferdi Tokar, Eda Büker, Z. Ceren Ertekin, Erdal Dinç, 25-28 Mayıs 2016 “Development of a UPLC Method by Experimental Design and Optimization for Simultaneous Quantification of Isoniazid and Pyridoxine” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

Z. Ceren Ertekin, Eda Büker, Elif Varhan Oral, Berrin Ziyadanoğulları, Hamdi Temel, Recep Ziyadanoğulları, Erdal Dinç, 25-28 Mayıs 2016 “One Dimensional Continuous Wavelet Transform Approaches to the Simultaneous Determination of Domperidone and Lansoprazole in Tablets” Third International Conference On New Trends In Chemometrics And Applications, Side-Antalya, Turkey

2014 Ünal A., Çalışkan M., Şahin M., Bıyık E. and Kolankaya N., 2-6 Haziran 2014. “Biotechnology, Genetic Resources and Bio-Economy Related Activities in Turkey” III. International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, Sarajevo, Bosnia Herzegovina

2014 Bıyık E., Ayaz K. and Ünal A., 2-6 Haziran 2014. “Lyophilization Methods in Conservation of Culture Collection” III. International Congress of Molecular Biology and Biotechnology, Sarajevo, Bosnia Herzegovina.

2013 Erdal Dinç, Nurten Özdemir, M. Günseli Tilkan, Ghazal Rouhani and Eda Büker, 2013. “Application of the Chemometric Calibration

- Methods to the Multi-Wavelength UPLC Data for the Quantitative Resolution and In Vitro Dissolution Testing of Antiretrovirals in a Tablet Dosage Form”. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ankara University
- 2013 Eda B ker and Erdal Din , 2013. “One Dimensional Continuous Wavelet Transform Applied To The Overlapping Absorption Signals For The Quantitative Analysis Of Dorzolamide And Timolole In A Commercial Eye Drop”. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ankara University
- 2011 Erdal Din , Eda B ker, Quantitative Analysis Of Olmesartan Modoxomil and Hydrochlorotiazide in Mixtures by Calibration Methods Based On The Spectral Regression Functions, XII. Spectroscopy Congress, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ankara University
- 2010 3RD CONFERENCE ON NONLINEAR SCIENCE AND COMPLEXITY İNGİLİZCE S ZL  SUNUM “Fractional and continuous wavelet transforms for the simultaneous spectral analysis of a binary mixture system” ANKARA/TÜRKİYE

VII- Bilimsel Etkinlikleri:

Projeler

	ARDEB 3001 Projesi - Araştırmacı
	Bütçe: 60.000,00 TL
T�B�TAK	Kodu: 214Z186 15.02.2015-15.02.2016
	Tamamlandı
ANKARA	Araştırma Projesi
ÜNİVERSİTESİ	Bütçe: 20.000,00 TL
BAP	Sözleşme Tarihi: 14.04.2016

ANKARA	Araştırma Projesi
ÜNİVERSİTESİ	Bütçe: 17.000,00 Tl
BAP	Sözleşme Tarihi: 29.04.2016
	Araştırma Projesi
TAGEM	Bütçesi: 150.000,00 Tl
	2015-2018

VIII- Diğer Bilgiler

- Organizasyonunda katkıda bulunduğu sempozyum ve Kongreler:

-

III ULUSLAR ARASI KEMOMETRİ KONGRESİ ANKARA
ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ ANKARA/TÜRKİYE

Organizasyon Komitesi

II ULUSLAR ARASI KEMOMETRİ KONGRESİ ANKARA
ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ ANKARA/TÜRKİYE

Organizasyon Komitesi

I. ULUSLAR ARASI KEMOMETRİ KONGRESİ ANKARA
ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ ANTALYA/TÜRKİYE

Organizasyon Komitesi

XII. ULUSAL SPEKTROSKOPİ KONGRESİ ANKARA
ÜNİVERSİTESİ

ECZACILIK FAKÜLTESİ ANTALYA/TÜRKİYE

Organizasyon Komitesi

Alınan Eğitim, Sertifika ve Ödüller

	II. ULUSLAR ARASI KEMOMETRİ KONGRESİ
2013	ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ ANKARA/TÜRKİYE
2011	Atomik Absorpsiyon Spektrometresi, Ultraviyole Görünür Spektrometresi ve Mikrodalga Numune Hazırlama

	sistemlerindeki son gelişmelerin	Terra Firması	
	organizasyonu ve Analytik Jena ve CEM Firmaları	İZMİR	
	/TÜRKİYE		
2011	Brookfield	SEM FİRMASI	İSTANBUL
2011	UHPLC ANT TEKNİK	BALIKESİR/TÜRKİYE	
2011	AFM ve Nanoindentasyon	Çalışmalarında Son Gelişmeler	
	İNCEKARALAR & AGILENT	ANTALYA/TÜRKİYE	
2011	NMR & EPR	ANATEK	ANKARA/TÜRKİYE
2011	GIDA LABORATUVARI VE AKREDİTASYONU		
	BURSA GIDA KONTROL VE ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ		
	BURSA/TÜRKİYE		
2011	XII. ULUSAL spektroskopi KONGRESİ	ANKARA	
	ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ		
	ANTALYA/TÜRKİYE		
2011	I.ULUSLAR ARASI KEMOMETRİ KONGRESİ		
	ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK KONGRESİ		
	ANTALYA/TÜRKİYE		
2010	3rd Conference on Nonlinear Science and Complexity		
	ÇANKAYA ÜNİVERSİTESİ	ANKARA/TÜRKİYE	