



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ATENOLOL-KLORTALİDON İÇEREN KOMBİNE TİCARİ
FARMASÖTİK PREPARAT'IN KEMOMETRİK SÜREKLİ
DALGACIK DÖNÜŞÜM YÖNTEMLERİ İLE KANTİTATİF
ANALİZİ**

Ebru SAYGEÇİTLİ

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

2013-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ATENOLOL-KLORTALİDON İÇEREN KOMBİNE TİCARİ
FARMASÖTİK PREPARAT'IN KEMOMETRİK SÜREKLİ
DALGACIK DÖNÜŞÜM YÖNTEMLERİ İLE KANTİTATİF
ANALİZİ**

Ebru SAYGEÇİTLİ

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

2013-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20 / 12 / 2013

Prof. Dr. Mustafa TAŞTEKİN
Ankara Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Erdal DİNÇ
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Adnan KENAR
Ankara Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Erol ŞENER
Anadolu Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Saadet DERMİŞ
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Atenolol	5
1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	5
1.1.2. Farmakodinamik Özellikleri	6
1.1.3. Farmakokinetik Özellikleri	7
1.1.4. Etki Mekanizması	8
1.2. Klortalidon	9
1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler	9
1.2.2. Farmakodinamik Özellikleri	11
1.2.3. Farmakokinetik Özellikleri	11
1.2.4. Etki Mekanizması	11
1.3. Atenolol ve Klortalidon İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri	14
1.3.1. Atenolol-Klortalidon Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler	14
Spektrofotometri, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ve Kemometri	
1.3.2. Atenolol Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler	16
1.3.3. Klortalidon Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler	18
2.GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Spektrofotometri	21
2.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi	27
2.2. Kemometri	30
2.2.1. Sürekli Dalgacık Dönüşümü (SDD) (wavelet transform)	33
2.2.2. Sürekli Dalgacık Yöntemi – Sıfır Kesim Yöntemi	34
2.2.3. Spektrum Oranları Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi	35
2.2.4. Dalgacıklar Ailesi	37
2.3. Gereçler	38
2.3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	38

2.3.2. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları	38
2.3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
2.3.4. Analiz Edilen Bileşiklerin Ticari Preparatı	39
3. BULGULAR	40
3.1. Coiflets Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi (Coiflets Continuous Wavelet Transform Method)	40
3.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	40
3.1.2. Regresyon Analizi ve Kalibrasyon Grafiği	41
3.1.3. Kemometrik coif5-SDD Yönteminin Validasyonu	45
3.1.4. coif5-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	50
3.2. Meksika Şapka Fonksiyonu Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi (Mexican Hat Function Continuous Wavelet Transform Method)	52
3.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	52
3.2.2. Regresyon Analizi ve Kalibrasyon Grafiği	52
3.2.3. Kemometrik mexh-SDD Yönteminin Validasyonu	56
3.2.4. Kemometrik mexh-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	61
3.3. Spektrum Oranları Bior 1.1-SDD Yöntemi (Ratio Spectra - bior 1.1 Continuous Wavelet Transform Method)	63
3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	63
3.3.2. Regresyon Analizi ve Kalibrasyon Grafiği	63
3.3.3. Kemometrik SO-bior1.1-SDD Yönteminin Validasyonu	70
3.3.4. SO-bior1.1-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	75
3.4. Karşılaştırma Yöntemleri	77
3.4.1. Türev Spektrofotometri (Karşılaştırma Yöntemi)	77
3.4.1.1 Standart Çözeltilerin Hazırlanması	77
3.4.1.2 Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması	77
3.4.1.3 Türev Yönteminin Validasyonu	81
3.4.1.4 Türev Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması	86
4. TARTIŞMA	88
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
ÖZET	94
SUMMARY	95
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	100

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında atenolol ve klortalidon içeren farmasotik preparatın kantitatif analizi hiçbir ayırma işlemi gerektirmeksizin sinyal işleme yöntemleri uygulayarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen kemometrik sinyal işleme yöntemlerinin sonuçları, türev spektrofotometri yöntemi ile karşılaştırıldı. Geliştirilen analitik yöntemlerin atenolol ve klortalidon bileşiklerini içeren tabletlerin kalite kontrol ve rutin analizlerine uygulanabileceğini, yöntemlerin analitik validasyonu yapılarak analiz sonuçlarıyla ortaya konmuştur. Bu tez kapsamında çalışma amacına ulaşılmıştır. Ayrıca bu yüksek lisans tezinin sonuçları ATE ve CHL analizi için AR-GE ve ilaç endüstrisinde de kullanılabilecektir.

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

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

Hayatım boyunca ve tezim sırasında desteklerini üzerimden eksik etmeyen Aileme; tezim esnasındaki destekleri ve yardımları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATE	Atenolol
BH	% Bağıl hata
bior 1.1-SDD	(Biortogonal 1.1- Sürekli Dalgacık Dönüşüm)
BSS	% Bağıl standart sapma
CHL	Klortalidon
coif5-SDD	(Coiflets Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi)
CWT	Continuous wavelet transform
FWT	Fractional wavelet transform
GA	Güven aralığı
GK	% Geri kazanım
LOD	(Limit of Dedection) Yakalama sınırı
LOQ	(Limit of Quantification) Tayin sınırı
mexh-SDD	(Meksika Şapka Fonksiyonu Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi)
SS	Standart sapma
WT	Wavelet tarnsform

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Atenolol'ün açık formülü	5
Şekil 1.2. Atenolol'ün (20 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu	6
Şekil 1.3. Klortalidon'un açık formülü	9
Şekil 1.4. Klortalidon'un (15 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu	10
Şekil 1.5. Klortalidon'un etki mekanizması	12
Şekil 2.1. Enerji seviyeleri arasındaki fark	22
Şekil 2.2. Moleküldeki enerji seviyeleri	23
Şekil 2.3. Sürekli spektrum (moleküldeki elektronik geçişler ve UV-görünür alan spektrumu)	24
Şekil 2.4. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti	24
Şekil 2.5. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları	27
Şekil 2.6. Bir çift ışık yollu (double beam) spektrofotometrenin optik sistemi ve bileşenleri	29
Şekil 2.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler	32
Şekil 3.1. ATE (20.0-120.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin Absorpsiyon Spektrumları	42
Şekil 3.2. ATE (20.0-12.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin coif5-SDD Spektrumları	43
Şekil 3.3. Standart İlavesi tekniği ile 20.0; 60.0; 120.0 µg/mL ATE konsantrasyonları için coif5-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	48
Şekil 3.4. Standart İlavesi tekniği ile 15.0; 40.0; 60.0 µg/mL CHL konsantrasyonları için coif5-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	49
Şekil 3.5. ATE (20.0-120.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin Absorpsiyon Spektrumları	53
Şekil 3.6. ATE (20.0-12.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin mexh-SDD Spektrumları	54
Şekil 3.7. Standart İlavesi tekniği ile 20.0; 60.0; 120.0 µg/mL ATE konsantrasyonları için mexh-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	59
Şekil 3.8. Standart İlavesi tekniği ile 15.0; 40.0; 60.0 µg/mL CHL konsantrasyonları için mexh-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	60

Şekil 3.9. ATE (20.0-120.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin Absorpsiyon Oranları Spektrumları	64
Şekil 3.10. ATE (20.0-120.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin Absorpsiyon Oranları Spektrumları	65
Şekil 3.11. ATE (20.0-120.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin ATE/CHL SO-bior1.1-SDD Spektrumları	66
Şekil 3.12. ATE (20.0-120.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin CHL/ATE SO-bior1.1-SDD Spektrumları	67
Şekil 3.13. Standart İlavesi tekniği ile 20.0; 60.0; 120.0 µg/mL ATE konsantrasyonları için SO-bior1.1-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	73
Şekil 3.14. Standart İlavesi tekniği ile 15.0; 40.0; 60.0 µg/mL CHL konsantrasyonları için SO-bior1.1-SDD genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	74
Şekil 3.15. ATE (20.0-120.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) bileşiklerinin Absorpsiyon Spektrumları	78
Şekil 3.16. ATE (20.0-12.0 µg/mL) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) konsantrasyon aralığında birinci türev spektrumları	79
Şekil 3.17. Standart İlavesi tekniği ile 20.0; 60.0; 120.0 µg/mL ATE konsantrasyonları için türev yöntemi genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	84
Şekil 3.18. Standart İlavesi tekniği ile 15.0; 40.0; 60.00 µg/mL CHL konsantrasyonları için türev yöntemi genliklerine karşı çizildiğinde elde edilen doğrunun grafiği	85

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. coif5-SDD yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	44
Çizelge 3.2. coif5-SDD yönteminin ATE ve CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	46
Çizelge 3.3. coif5-SDD yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	47
Çizelge 3.4. Kemometrik coif5-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL / tablet)	51
Çizelge 3.5. mexh-SDD yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	55
Çizelge 3.6. mexh-SDD yönteminin ATE ve CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	57
Çizelge 3.7. mexh-SDD yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	58
Çizelge 3.8. mexh-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL / tablet)	62
Çizelge 3.9. SO-bior1.1-SDD yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	69
Çizelge 3.10. SO-bior1.1-SDD yönteminin ATE ve CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	71
Çizelge 3.11. SO-bior1.1-SDD yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	72
Çizelge 3.12. SO-bior1.1-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL / tablet)	76
Çizelge 3.13. Türev yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları	80
Çizelge 3.14. Türev yönteminin ATE ve CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları	82
Çizelge 3.15. Türev yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları	83

Çizelge 3.16. Türev yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL / tablet)	87
Çizelge 4.1. Ticari farmasötik preparatın analiz sonuçlarına t-testi uygulaması	91

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışıyla birlikte endüstrideki hızlı gelişmelere paralel olarak çevresel kirlenme, beslenme alışkanlıklarının değişmesi gibi nedenler ile değişik hastalık türleriyle mücadele için etkin kaliteli ilaçların geliştirilmesi gereksinimleri ortaya çıkmıştır. Hiper sanayileşmeyle birlikte çevresel atıklar ve kalitesiz gıdaların tüketimi, bu alanlardaki istenmeyen gelişmeleri kontrol altına alınabilmesi kompleks analiz problemlerinin çözümünü gerektirmektedir. Bu bağlamda üretimin kalite kontrolü analize dayanır. Dolayısıyla gıda, klinik çalışmalar, çevre, ziraat, eczacılık, kimya endüstrisi ve endüstrinin diğer branşları analitik kimyanın başlıca uygulama alanlarıdır. Özellikle insan sağlığı için ilaç endüstrisinde formülasyon öncesinde ve formülasyon sonrası ticari farmasötik ürünlerdeki kimyasal bileşenlerin rutin analizi ve kalite kontrolü, her ülkede olduğu gibi ülkemizde de Sağlık Bakanlığı ve ilgili kurumlarca yasa, yönetmelik ve yönergelerle zorunluluk olduğundan dolayı analitik kimyanın analiz teknik ve yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ticari ilaç preparatları yardımcı maddelerden oluşan sabit matriks ile bir veya daha fazla aktif bileşen içeren sistemlerdir. Analitik kimyanın ana hedeflerinden birisi ilaç preparatlarının üretiminde önce ham madde analizi ve üretimi esnasında ise kalite kontrolü için ucuz, hızlı, kolay uygulanabilir ve güvenilir sonuçlar veren analiz yöntemlerinin geliştirilmesidir.

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

Günümüzde, birden fazla aktif bileşiği içeren ticari farmasötik formülasyonların üretilmesi ve kullanılması düşük yan etki ve yüksek tedavi edici aktiviteyi arttırmak amacıyla büyük bir önem kazanmıştır. Bu kombine preparatlarda yardımcı maddeler ile birlikte birden fazla etkin madde bulunması girişimlere neden olduğu için analiz

işlemlerinde pahalı analitik tekniklerin kullanılması veya ilave kimyasal ayırma tekniklerinin analiz işlemlerinde kesinlik, doğruluğun düşmesine, analizin maliyeti ve süresinin uzamasına neden olmaktadır.

Örneğin yardımcı maddeler içeren kombine farmasötik numunelerdeki bileşiklerin aynı anda miktar tayinleri, spektrofotometrik, kemometrik kalibrasyon, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (UPLC) gibi birçok analitik yöntemle gerçekleştirilmektedir. Spektroskopik analiz işlemlerinde türev spektrofotometrisi karışımların kantitatif analizi için sıkça kullanılmaktadır, fakat bu yöntem, her zaman istenen sonuçları vermeyebilir. Bu nedenle, spektral verilere dayanan kemometrik çok değişkenli kalibrasyonlar, kompleks karışımların analizine uygulanmaktadır.

Ayrıca, standart analiz yöntemi olarak HPLC yöntemi farmasötik ve kimyasal analiz işlemlerinde kullanılmaktadır. Karmaşık ve pahalı bileşenlere sahip olan kromatografik yöntemler ve bunların kombine teknikleri olan LC-MS ve CE-MS yöntemler, analiz için yüksek maliyet ve uygun ayırma koşullarını bulmak için sıkıntılı ve uzun süreçler gerektirdiği bilinmektedir.

Analiz işlemlerinde, yukarıda bahsedilen klasik analitik yöntemlerin dezavantajları ve zorluklarıyla başa çıkabilmek ve analitik problemleri etkili kantitatif çözümü için yeni analitik tekniklere veya yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç olduğu bir gerçektir.

Modern analitik cihazların geliştirilmesiyle eş zamanlı olarak spektral analiz tekniklerinin kullanıldığı alanlarda da uygulamalı matematiğin gereçleri olan sinyal işlem yöntemleri günümüze kadar geliştirildi. Bunların en yenisi sinyal işleme yöntemleri olarak “dalgacıklar” (wavelets) yöntemidir. Dalgacık dönüşüm (wavelet transform) sinyal işleme yöntemleri, gürültünün eliminasyonu (de-noising), düzleştirme ve filtreleme (smoothing and filtering), sıkıştırma (compression), zemin çizgisinin düzeltilmesi (baseline correction) ve girişim yapan spektrumların ayrıştırılması (resolution of the overlapping spectra), spektral analiz işlemlerinde daha kesin, daha doğru ve daha güvenilir analiz sonuçlarına ulaşmak amacıyla kullanılmaktadır. (Dinç E ve ark., 2009; E. Dinç, D. Baleanu, G. Pektaş, 2009; E. Dinç, D. Baleanu, G. Pektaş, 2009)

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

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

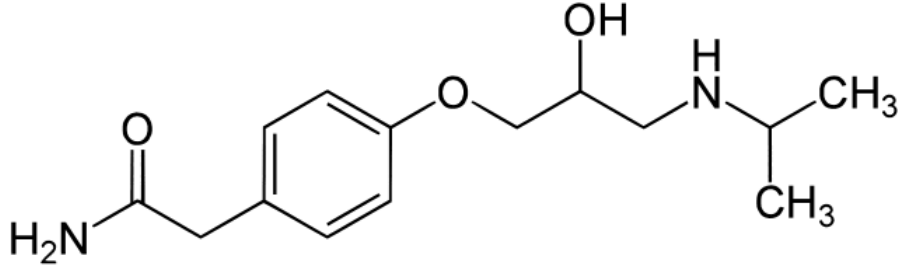
Bu çalışmanın temel amacı, atenolol ve klortalidon kombinasyonunu içeren antihipertansif preparatın analizi için pahalı cihazlar gerektiren, analiz süresi uzun ve analiz maliyeti pahalı olan ayırma yöntemlerine alternatif olacak daha hızlı, daha ekonomik ve daha güvenilir kemometrik sürekli dalgacık dönüşüm yöntemlerinin geliştirilmesi planlanmaktadır. Ayrıca geliştirilen sürekli dalgacık dönüşüm

yöntemlerinin sonuçları klasik grafik yöntemleri ile karşılaştırılması planlanmaktadır.

Bu yüksek lisans tezinin kapsamında, atenolol ve klortalidon bileşiklerini birlikte içeren farmasötik kombinasyonda bu etkin maddelerin hiçbir ayırma işlemi gerektirmeksizin ve aynı anda miktar tayinlerinin, “*Coiflets*” sürekli dalgacık dönüşüm (coif5 - SDD), “*Mexican*” şapka fonksiyonu sürekli dalgacık dönüşüm (mexh-SDD) ve spektrum oranları “*Biortogonal*” 1.1(SO-Bior SDD) sürekli dalgacık dönüşüm yöntemleri geliştirildi. Tez çalışmasında analiz için geliştirilen bu yöntemleri karşılaştırmak amacıyla türev spektrofotometrisi yöntemi geliştirildi. Tez kapsamında geliştirilen kemometrik sinyal işleme yöntemleri ve karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan türev spektrofotometri yöntemi analitik validasyon parametreleri kullanılarak valide edildi. Ticari tabletlerdeki ATE ve CHL'nin analizi için geliştirilen bütün yöntemlerin uygulamasından başarılı sonuçlar elde edildi.

1.1. Atenolol

1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 1.1. Atenolol'ün açık formülü

Molekül Formülü: C₁₄H₂₂N₂O₃

Molekül Ağırlığı : 266.3 g/mol

CAS No: 29122-68-7

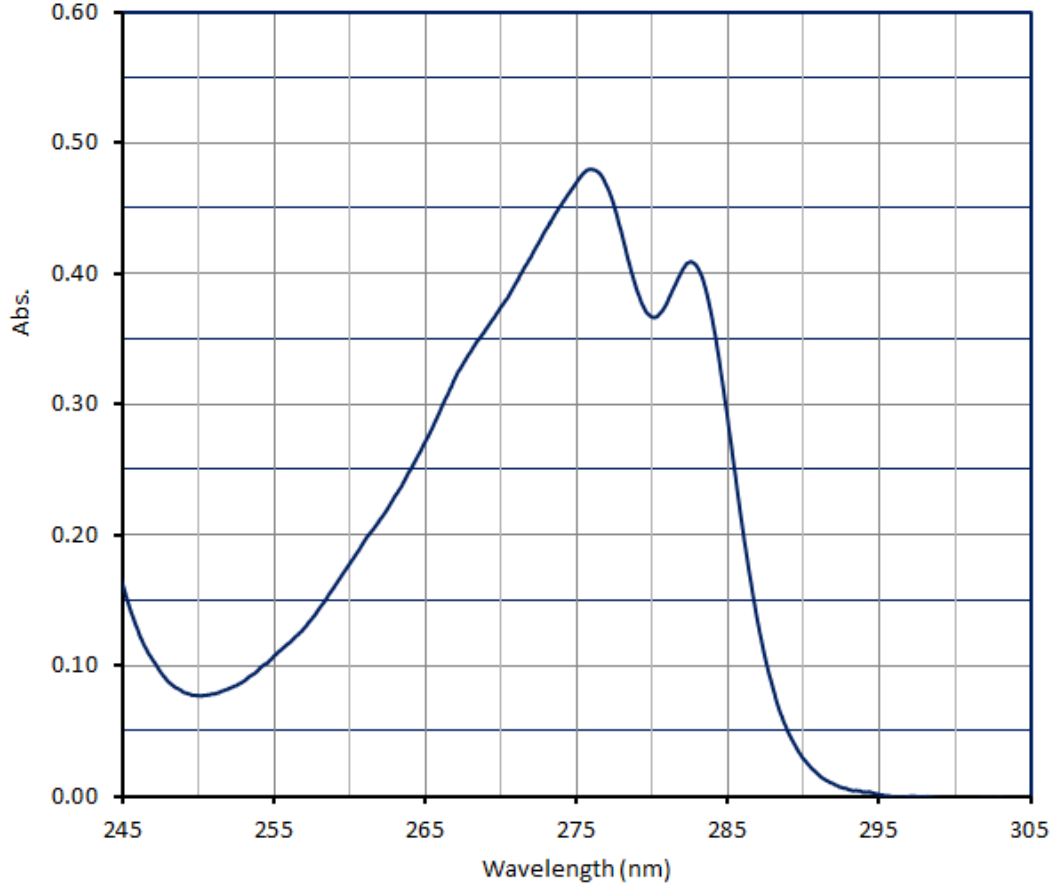
Açık Formülü: 2-[4-[(2RS)-2-Hidroksi-3-[(1-metiletil)amino]propoksi]-fenil]asetamid (Şekil 1.1)

Elementel Analizi: C %63.14 , H %8.33 , N %10.52 , O %18.02

Erime Noktası: 152°C ila 155°C

Fiziksel Özellikleri: Atenolol, beyaz veya beyaza yakın renkte bir tozdur. Distile suda az çözünür; dehidrate alkolde çözünür; metilen klorürde hafifçe çözünür. Atenolol 15-30°C arasındaki oda sıcaklığında saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır.

Metanol içerisinde çözülmüş 20.0 µg/mL ATE'nin UV spektrumu Şekil 1.2 de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Atenolol'ün (20 .0 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu

1.1.2. Farmakodinamik özellikleri:

Atenolol beta₁-selektif adrenerjik bir antagonisttir (yani, tercihen kalpteki beta₁-adrenerjik reseptörler üzerine etki gösterir). Seçicilik doz artışı ile azalmaktadır. Tüm selektif beta-blokörlerde olduğu gibi, yüksek dozlarda kullanıldığında beta₁-selektif özelliği zayıflar veya kaybolur.

Atenolol intrinsik sempatomimetik ve membran-stabilize edici aktivitelere sahip değildir ve diğer beta-adrenoreseptör bloke edici ilaçlar ile olduğu gibi, negatif

inotropik etkiler göstermektedir (dolayısıyla, kontrol edilmeyen kalp yetersizliğinde kontrendikedir).

Diğer beta-blokerler ile olduğu gibi, hipertansiyon tedavisindeki etki şekli belirsizdir.

Rasemik karışıma göre, S (-) atenololün sahip olduğu herhangi bir başka ek özelliğin farklı terapötik etkilere yol açması olasılık dışıdır.

Atenolol çoğunlukla etnik popülasyonda etkindir ve iyi tolere edilmektedir. Siyah ırka mensup hastalar tek başına atenolole göre atenolol ve klortalidon kombinasyonuna daha iyi yanıt vermektedirler.

Atenolol ve tiyazid benzeri diüretiklerin kombinasyonunun uyumlu olduğu ve genel olarak bu ilaçların tek başına kullanımlarına göre daha etkin olduğu gösterilmiştir.

1.1.3. Farmakokinetik özellikleri:

Atenolol, oral dozdan verildiğinde, dozun yaklaşık % 50-60'ı hızla absorbe olur. Kalbin atım hızı üzerindeki etkisi yaklaşık 1 saat sonra ortaya çıkar ve doruk düzeye 2-4 saat içinde ulaşır. Etki süresi genellikle yaklaşık 24 saat kadar devam eder. Atenolol kan düzeyleri tutarlıdır ve küçük değişkenlikler göstermektedir. Parantral yoldan kullanıldığında doruk etkisi 5 dakika içinde görülür ve 12 saatten daha kısa sürer. Kan basıncı üzerindeki etkisi kalp hızı üzerindeki etkileriyle eş zamanlı olarak ortaya çıkmaz. Antihipertansif etkisi de lineer bir doz-cevap ilişkisi göstermez.

Atenolol tüm vücuda dağılır ve anne sütüne geçer. Plasentayı aşar ve fetal serum konsantrasyonları annenin serum konsantrasyonlarına yaklaşık düzeye ulaşır. Atenolol, propranolol'den farklı olarak kan-beyin engelini minimal düzeyde geçer ve santral sinir sistemine (SSS) çok düşük miktarda geçebilir. Plazma proteinlerine bağlanması minimal düzeydedir (ortalama % 10) ve bu özelliği düşük lipofilikliği de göz önüne alındığında dağılım karakteristiklerinden bir bölümünü açıklayabilir.

Atenololün renal fonksiyonu normal erişkin hastalardaki serum yarı ömrü 6-7 saattir. Bu değer çocuklarda yaklaşık 4.6 saattir. Yarı ömrü renal fonksiyondaki bozukluk arttıkça daha da uzar. İlaç karaciğerde minimal düzeyde metabolize edilir

ve oral bir dozunun % 40-50'si böbreklerden değişmeden atılıma uğrar. Atenolol diyalizle uzaklaştırılabilir.

1.1.4. Etki mekanizması:

Beta adrenerjik antagonistler sempatomimetik nörotransmitterler (katekolaminler) ile yarışmaya girerek onların etkilerine karşı yönde etki gösterirler. Metroprolol gibi atenolol de düşük dozlarda kalp ve düz kaslarda bulunan beta₁- adrenerjik reseptörlerin aracılık ettiği sempatik stimülasyonu selektif olarak bloke eder. Bu etkinin farmakodinamik sonuçları şunlardır: Kalp atım hızında ve buna bağlı kalp debisinde azalma; gerek dinlenim gerekse egzersiz sırasındaki sistolik ve diyastolik kan basıncında düşme ve refleks ortostatik hipotansiyonda olası azalma. Atenolol yüksek dozlara çıkarıldığında (>100 mg/gün) bronş ve vasküler düz kaslardaki beta₂-selektif adrenerjik yanıtları da bloke eder. Bundan başka serum serbest yağ asidi konsantrasyonunu düşürür ve trigliserid düzeylerinin yükselmesine neden olur.

Beta blokajının kritik bir etkisi miyokard iskemisine karşı profilaksi sağlanması ve miyokard iskemisini azaltmasıdır. Bundan başka, beta blokaj ortaya çıkabilecek bir miyokard infarktının şiddetini azaltabilir. Bu, kısmen, nodal düzeydeki pacemaker kontrolü üzerindeki beta blokajın antiaritmik etkisine bağlanabilir.

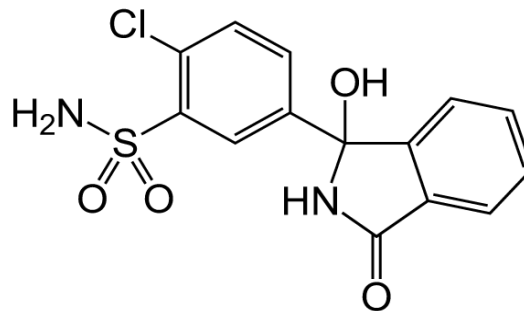
Atenolol'un hipertansiyon tedavisinde yararlı kılan etkileri şunlardır: Negatif kronotropik etkisi gerek dinlenim gerekse egzersiz sırasındaki kalp atım hızını düşürür; negatif inotropik etkisi kardiyak debinin düşmesine neden olur; santral sinir sisteminden (SSS) kaynaklanan sempatik etkinliği azaltır ve böbreklerden renin salıverilmesini baskılar. Böylece, diğer beta-blokörlerin yaptığı gibi kan basıncını değişik mekanizlar üzerinden etkiler. Genelde intrinsik sempatomimetrik etkinlik (ISA) göstermeyen beta-blokörler sol ventrikül hipertrofisi ve lipid profili üzerinde zararlı etkiler yapar ve seksüel disfonksiyona neden olurlar.

Atenolol, kalbin oksijen gereksinimini düşürmesi, kalbin hem atım hızını hem de kontraktilesini azaltması ve kan basıncını düşürmesi nedeniyle anjinanın tedavisinde kullanılır. Bununla birlikte, kalp yetmezliği olan hastalarda bunun aksi geçerli olabilir (örneğin ilacın kalbin oksijen gereksinimini artırması gibi).

Atenolol, migren baş ağrılarındaki etkinliğini açıklayabilecek çok çeşitli etkilere sahiptir. Yaptığı beta-blokaj ile arteriyel dilatasyonu önleyebilir; renin salgılanmasını inhibe edebilir ve katekolaminlerin neden olduğu lipolizi bloke edebilir. Lipolizin bloke olması araşidonik asit sentezini ve bunu izleyen prostaglandin yapımının azalmasını sağlar. Trombosit agregasyonundaki inhibisyon prostaglandinlerdeki bu azalmaya ve katekolaminlerin neden olduğu trombosit adezyonunun lokajına bağlıdır. Diğer etkileri arasında dokulara giden oksijen miktarını artırmaları ve adrenalin salıverilmesi sırasında görülen koagülasyonu önlemeleri sayılabilir.

1.2. Klortalidon

1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler



Şekil 1.3. Klortalidon'un açık formülü

Molekül Formülü: $C_{14}H_{11}ClN_2O_4S$

Molekül ağırlığı: 338.8 g/mol

CAS No: 77-36-1

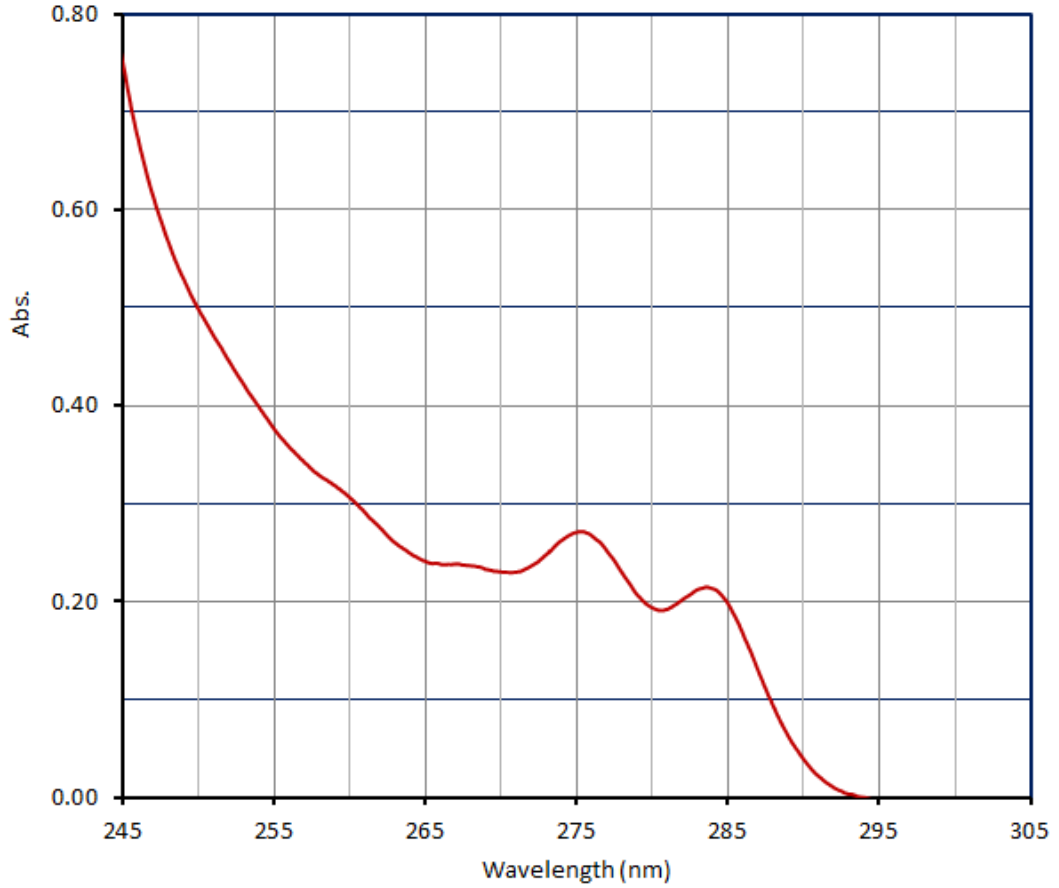
Erime Noktası: 179 °C.

Açık formülü: 2-Kloro-5-[(1RS)-hidroksi-3-okso-2,3-dihidro-1*H*-izoindol-1-il] benzensulfonamid (Şekil 1.3)

Fiziksel Özellikleri: Klortalidon, beyaz veya sarımsı-beyaz renkte kristalize bir tozdur. Suda hafifçe çözünür, metil alkol ve asetonunda çözünür; metilen klorürde

pratik olarak çözünmez; alkali hidroksitlerinin seyreltik çözeltilerinde çözünür. Klortalidon, 30°C'nin altındaki oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır. Nemden korunmalıdır.

Metanol içerisinde çözülmüş 15 µg/mL CHL'nin UV spektrumu Şekil 1.4 de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Klortalidon'un (15 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu

1.2.2. Farmakodinamik Özellikleri

Klortalidon, hipertansiyon ve ödemin kontrol altına alınmasında kullanılan tiazid benzeri bir diüretiktir. Yapı ve farmakolojik etkileri bakımından tiazidlere benzer. Tiazidlerler karşılaştırıldığında etki süresi en uzun olan ilaçtır. Bir monosülfonamil diüretik olan klortalidon sodyum ve klorür ekskresyonunu arttırmaktadır. Natriürece bir miktar potasyum kaybı eşlik etmektedir. Klortalidonun kan basıncını azaltma mekanizması tam olarak bilinmemekte ancak, vücuttaki sodyumun ekskresyonunu ve yeniden dağılımı ile ilgili olabilir.

1.2.3. Farmakokinetik Özellikleri

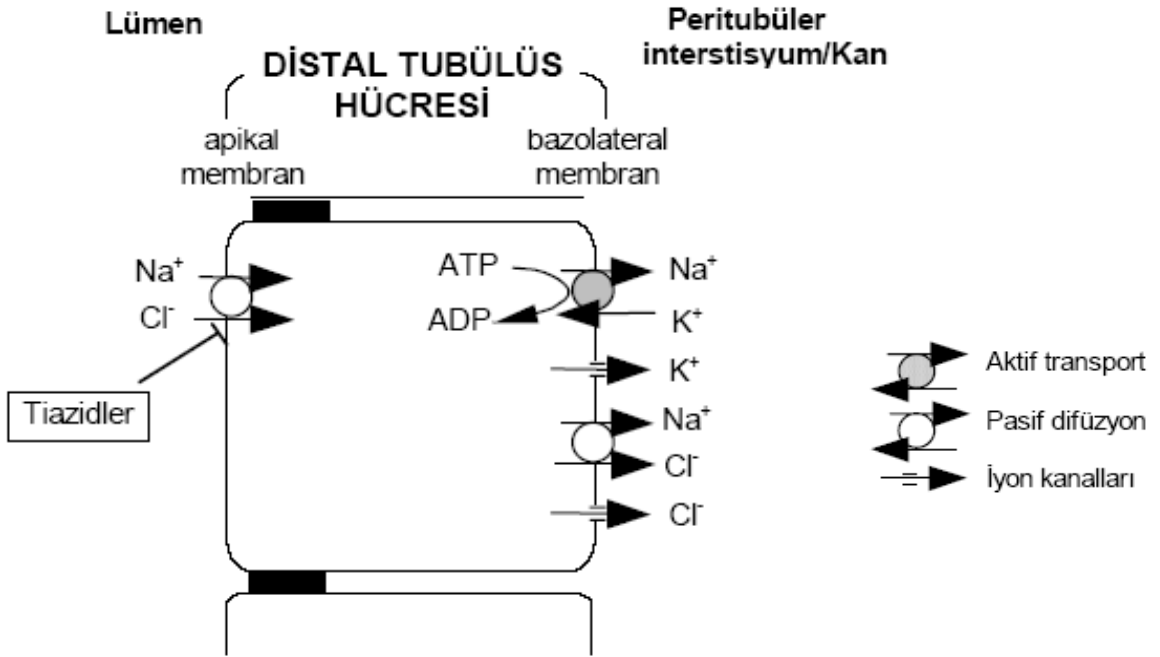
Klortalidon gastrointestinal kanaldan absorbe edilir, fakat absorbe edilen gerçek miktarı bilinmemektedir. Kanda % 90 kadarı alyuvarlardaki karbonik anhidraz enzimine bağlı halde bulunur. Tiazid grubu diüretikler ve benzerleri placentayı aşar ve anne sütüne geçerler. Klortalidon'un etkisi 2 saatte başlar, 2-6 saate doruk düzeye ulaşır ve 48-72 saat devam eder. Büyük bölümü değişmeden idrarla atılır. Küçük bir bölümü de safra yolu ile atılır. Klortalidon'un yarı ömrü 35-50 saat kadardır.

1.2.4. Etki mekanizması:

Klortalidon renal tübüler epitelyumdan sodyum iyon transporunu inhibe ederek sodyum, klorür ve suyun atılımını artırır. Primer etki yeri henle kıvrımının çıkan kolununun kortikal seyreltici segmentidir. Tiazid ve tiazid benzeri ilaçlar glomerüler filtrasyon hızını da düşürler. Bu etkileri böbrek yetmezliği olan hastalarda ilacın etkinliğinin azalmasına neden olur. Klortalidon sodyumun distal renal tubuluslara dağılımını artırarak sodyum-potasyum değiş-tokuş mekanizması yoluyla potasyum atılımını indirekt olarak artırır. Neden olduğu hipokalemi ve hipokloremi hafif metabolik alkalozu neden olabilir. Bununla birlikte diüretik etkinliği hastanın asit-

baz dengesinden etkilenmez. Klortalidon bir aldosteron antagonisti değildir ve etkileri karbonik anhidraz inhibisyonundan bağımsızdır.

Diüretikler başlangıçta kalp debisi, plazma hacmi ve ekstraselüler sıvı hacmini azaltarak kan basıncını düşürürler. Sonunda kalp debisi normal düzeylerine döner, plazma ve ekstraselüler sıvı hacmi normalden çok hafif düzeyde düşük kalır, fakat periferik vasküler rezistansta yaptıkları azalma sürekli olarak devam eder ve bunun sonucunda kan basıncı düşer. Plazma hacmindeki azalma, plazmadaki renin aktivitesinin yükselmesine ve aldosteron salgılanmasının artmasına yol açar. Bu durum tiazid diüretikler ile tedavide görülen potasyum kaybına önemli ölçüde katkıda bulunur. Genel olarak değerlendirildiğinde diüretikler sol ventrikül hipertrofisini ve glukoz toleransını daha da kötüleştirirler ve lipid profili üzerinde bozucu etkiler meydana getirirler.



Şekil 1.5. Klortalidon'un etki mekanizması

Atenolol-Klortalidon'un kombine kullanımında;

Atenolol/Klortalidon'un olağan günlük dozu, 50 mg atenolol/12.5 mg klortalidon veya 100 mg atenolol/25 mg klortalidon'dur.

Atenolol ve klortalidon kombinasyonu hipertansiyon tedavisi için kullanılır. Bu iki ilaç farklı mekanizmalarla etki eder ve aditif hipertansif etki gösterirler. Atenolol β_1 -reseptörlerine spesifik, hidrofilik bir beta-blokördür; plazma yarı ömrünün uzun olması günde tek doz alınarak kullanılmasına olanak sağlar. Atenolol yağdaki çözünürlüğü düşük olduğundan renal yoldan elimine edilir; metabolizması minimaldir ve yağda çözünen beta-blokörlere (propranolol gibi) kıyasla SSS'ye girerek santral yan etki oluşturma potansiyeli daha düşüktür. Atenolol önemli ölçüde membran-stabilize edici veya intrinsik sempatomimetik etkinlik göstermez. Klortalidon ise uzun etkili tiazid-benzeri bir diüretiktir. Diğer tiazidlerle karşılaştırıldığında, klortalidon en uzun etki süreli ilaçtır, fakat önerilen maksimum terapötik dozda kullanıldığında diüretik etkisi diğer tiazidlere benzer. Atenolol ve klortalidon kombinasyonu (Tenoretic®) ABD'de FDA tarafından Temmuz 1984'te onaylanmıştır.

Atenolol ve klortalidon kombinasyonu oral yoldan kullanılır. Atenolol ve klortalidon'un birlikte verilmesi bu iki ilacın biyoyararlanımlarını etkilemez.

Atenolol ve klortalidon kan basıncı üzerinde aditif hipertansif etki gösterirler. Tiazid diüretikler kan basıncını sodyum itrahını artırarak düşürürken, beta-blokörlerin kan basıncını düşürücü etkisi beta-reseptörler üzerindeki sempatik stimülasyonu bloke etmelerine bağlıdır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, atenolol ve klortalidon (ATE-CHL) kombinasyonu içeren kombine farmasötik preparattaki etkin maddelerin aynı anda spektrofotometrik miktar tayinleri için kemometrik sürekli dalgacık dönüşüm sinyal işleme yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar klasik spektrofotometrik yöntemler ile istatistiksel olarak karşılaştırılacaktır.

1.3. Atenolol ve Klortalidon İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri

1.3.1. Atenolol ve Klortalidon Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

Spektrofotometri, YBSK ve Kemometri

Akiful Haque.M ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada, UV Spektrofotometresi kullanılarak bulk ve tablet dozaj formlarında bulunan atenolol ve klortalidon'un eş zamanlı olarak tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bulk ve tablet dozaj formlarında bulunan ATE ve CHL'un eş zamanlı tayini için basit, güvenilir, kesin, ekonomik ve tekrarlanabilir bir UV spektrofotometrik metot geliştirilmiştir. Stok çözelti metanolde hazırlanmış, buna ilaveten seyreltmeler de metanol ile yapılmıştır. Maksimum absorbanslar atenolol ve klortalidon için sırasıyla 225 nm ve 284 nm olarak bulunmuştur. Beers Kanununa bağlı kalınarak atenololün konsantrasyon aralığı 10 – 60 µg/mL ve klortalidonun ise 30-140 µg/mL olarak gözlenmiştir. Analiz sonuçları istatistiksel ve geri kazanım çalışması ile valide edilmiştir. Geri kazanım bağlı standart sapması % 2 den az bulunmuştur. Metot etkili bir şekilde kullanılabilir özelliktedir.

Nada. S. Abdelwahab ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada, model uygulamasının güncellenmesi ile TLC-densitometrik ve kemometrik metotlar kullanılarak atenolol, klortalidon ve bozunma ürünlerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada iyi bilinen iki antihipertansiyon ilacının kombinasyonundaki başarı ve yalnız kullanımlarından çok daha büyük iyileştirici etkisi degradasyon ürünlerinin varlığında seçici olarak tespit edilmiştir. İki kemometrik metot ve tek TLC-densitometrik metot atenolol (ATE), klortalidon (CLT) ve bunların asidik bozunma ürünleri için geliştirilmiştir. Kemometrik yöntemler, Temel bileşen regresyon yöntemi (PCR) ve Kısmi en küçük kareler yöntemidir (PLS). Bu modeller tahmini olarak atenolol ve klortalidonun içine başka bir dozaj formdaki amilorid HCl (AMH) ilave edilerek güncellenmiştir. Bu güncel model üç etken maddenin tahmini yeni dozaj formlarında yeni bir kalibrasyon seti hazırlanmaksızın güvenilir ve kesin bir şekilde kullanılabilir. TLC-densitometrik metot ince tabaka üzerindeki atenolol, klortalidon, atenolol bozunma ürünleri ve

klortalidon bozunma ürünlerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak geliştirilmiştir, Silika jel plaka üzerinde 227 nm'de 75:28:2:1.6 h/h/h/h oranında karışmış kloroform:metanol:etil asetat: amonyak çözeltisi taşıma yapmıştır. Önerilen metot çalışılan maddeler ve bunların farmasötik formülasyonları için kullanıldı ve sonuçlar RP-HPLC metoduyla istatistiksel olarak karşılaştırılarak raporlanmıştır.

Elshanawane AA ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada, Amilorid HCl, Atenolol, Hidroklorotiazid ve Klortalidon kombine karışımının eş zamanlı tayini için kullanılan ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodunun geliştirilmesi ve validasyonunu gerçekleştirmiştir. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan amilorid HCl, atenolol, hidroklorotiazid ve klortalidon içeren 2 adet üçlü karışımın eş zamanlı tayini için bir HPLC metodu geliştirilmiştir; siyanopropil kolon kullanılarak her iki karışımda da memnun edici ayrımlar gözlenmiştir. Mobil faz 10 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 4.5) ve metanolün hacmen 75 : 25 oranında karışması ile oluşturulmuş, akış hızı 1 mL/dk'dır. 275 nm dalga boyunda UV deteksiyon olmuştur. Kalibrasyon grafiğindeki doğrusal konsantrasyon aralığı dört etken sırasıyla 2-10, 20-200, 10-100 ve 5-50 µg/mL'dir. Gün içi ve günler arası kesinlik değeri (bağıl standart sapma) karışım I (amilorid HCl, atenolol ve klortalidon) için <1.13 ve karışım II (amilorid HCl, atenolol ve hidroklorotiazid) için <0.93'dür. Laboratuvar şartlarında ve ticari olarak hazırlanan her iki kombinasyon için metot yüksek güvenilirlik ve kesinlikle kullanılabilir. İstatistiksel olarak karşılaştırılmasında, kabul gören ve belirlenen diğer metotlardan kayda değer bir farklılık göstermemektedir.

Mohamed Ael-M. ve Salem H. (2005) yaptıkları bir çalışmada, Kemometrik-yardımlı spektrofotometrik metot kullanılmasıyla antihipertansiyon karışımlarının tayinini gerçekleştirmiştir. İki tip hipotensif karışımın analizi için multiçeşitli bir kalibrasyon metodu tanımlanmıştır. Karışımlar ya klortalidon/atenolol ya da klortalidon/amilorid HCl-atenolol içerir. Karışımların bileşenlerinin sonuçları spektral örtüşme ile % 87.5 ve % 91.0'dır. CLS ve PCR metotları kullanılarak araştırmalar sonucunda karışımların ayrımı sağlanabilmiştir. Her bir karışımdaki bileşenler eş zamanlı olarak üç ticari preparatta yüksek güvenilirlikte dış etkensiz ya da ilavesiz olarak tayin edilmiştir. Her iki sentetik karışımda ve ticari tabletinde iyi geri kazanım elde edilmiştir. Sonuçlar diğer farmasötik metotlarla karşılaştırılmış ve

iyi sonuçlar elde edilmiştir. CLS ve PCR'dan elde edilen sonuçlar birinci dereceden türev spektrofotometrik metotla da karşılaştırılabilir olduğunu gösterir.

1.3.2. Atenolol Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

Naveen Kumar ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada, Atenolol'ün ters faz sıvı kromatografisi ile değerlendirilmesini gerçekleştirmişlerdir. Basit, kesin, hassas ve güvenilir yüksek performanslı sıvı kromatografi metodu; atenololün tayini için (53:47 h/h) oranındaki fosfat tamponu : asetonitril karışımının mobil faz olarak kullanılması ile geliştirilmiştir. Tampon, 0.02 M K_2PO_4 ve 0.003 M KH_2PO_4 'ün eş miktar karışımı ile yapılmıştır. Tespit 230 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılarak yapılmıştır. Kolon ODS'dir ve boyutları 25 mm x 4.6 mm'dir. Atenolol'ün elüsyonu ile alıkonma süresi 2.1 dk olarak belirlenmiştir. Akış hızı 1.2 mL/min'dir. Kalibrasyon eğrisi 40 ila 200 mcg konsantrasyonunda lineerdir. Dedeksiyon limiti 120 ng ve tayin limiti 510 ng'dır. Atenololün bağıl standart sapması % 0.6 geri kazanımı % 99.6 olarak bulunmuştur.

M. V. Kumudhavalli ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada, Tablet dozaj Formundaki Atenolol ve Nitrendipin'in eş zamanlı değerlendirilmesindeki HPLC metodu için geliştirme ve validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Tablet dozaj formunda bulunan atenolol ve nitrendipin tayini için kullanılacak hızlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Boyutları 4.6 x 250 mm ve partikül büyüklüğü 5 μ m olan Phenomenox C-18 kolon, hareketli fazın metanol : asetonitril : su (40:40:20 h/h) (pH 3.0'a orto fosforik asit ile ayarlanmıştır) karışımı olduğu bir isokritik modda kullanılmıştır. Akış hızı 1.5 mL/min ve dalga boyu 235 nm'dir. Atenolol için alıkonma süresi 2.61 min ve nitrendipin için 6.11 min olarak ayırışım sağlanmış, rezolüsyon 11.097 bulunmuştur. Sırasıyla atenolol'de 30-70 μ g/mL ve nitrendipin'de 6-14 μ g/mL aralığında lineerlik bulunmuştur. Atenolol'ün geri kazanımı % 99.05-100.51 ve nitrendipin'in geri kazanımı % 99.14-101.60 bulunmuştur. Tespit limiti atenolol için 1.96 μ g/mL iken nitrendipin için 0.34 μ g/mL; tayin limiti ise sırasıyla, 5.95 μ g/mL ve 1.03 μ g/mL'dir.

Metodun sağlamlığı görülmüş ve ticari formlardaki içerik için başarı ile uygulanabilir bir metottur.

Anelise Weich ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada, farmasötik preparattaki atenololün kantitatif tespiti için kullanılan HPLC ve UV spektrofotometrik metotların validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Tabletlerdeki Atenolol'ün rutin kontrolü için kullanılan hassas ve hızlı UV spektrofotometrik ve UV deteksiyonlu RP-HPLC metodu geliştirilmiştir. Mobil faz olarak pH 7.0 10 mM amonyum asetat tamponu ve asetonitrilin 80:20 oranındaki karışımı kullanılmıştır. Numune Purospher RP-18(250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolona verilmiştir. Akış oranı 0.8 mL/min'dir. Deteksiyon 275 nm'dedir. Korelasyon katsayısının 0.9999 yüksek hassasiyetli doğrusallık limiti 125 ila 375 µg/mL arasındadır. Geri kazanımı % 99.80'dir. UV spektrofotometrik metot ise 226 nm'de yapılmış ve numune sodyum asetat solüsyonunda hazırlanmıştır. Doğrusallıkta korelasyon katsayısı 0.9986 olarak gösterilmiştir. Metotların amacı, basit, hızlı, kesin, doğru ve hassas olup rutin analizlerde kullanılabilir olmasıdır.

Luis Renato Pires de Abreu ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada, insan plazmasında yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile Atenolol kantitasyonu: Biyoeşdeğerlik çalışması uygulaması gerçekleştirmişlerdir. Güvenilir, Kesin ve hassas HPLC miktar tayini metodu; her iki cinsiyetteki toplamda 24 denekte 2 adet atenolol tablet (50 mg) insan plazmasındaki biyo yeterliliğinin karşılaştırılması açısından atenolol tespiti için geliştirilmiştir. Çalışma açık, rastgele, 2-periyotlu çapraz tepkime dizaynı ile 1 hafta yıkanmasız periyotta yapıldı. Plazma numunesinde 24 saat aralıklarla gözlemlendi. Atenolol konsantrasyonu HPLC de ve floresans deteksiyonla (Ex= 258 nm; Em=300 nm) karşılaştırılarak analiz edildi. Atenololün plazmadaki konsantrasyonu zamana karşı eğim olarak çizildiğinde; şu farmakokinetik parametreler belirlenmiştir: AUC_{0-24h}, AUC_{0-∞}, C_{max}. Bunun 50-mg tabletlerin kişilerdeki geometrik anlamı yüzde oran olarak AUC_{0-24h} için % 102.2 ve C_{max} 'de % 101.6'dır. %90'lık güven aralığı sırasıyla % 100.2 ila % 105.4 ve % 100.9 ila % 103.5'dir. Bu değer referans sınırı FDA'de (Food and Drug Administration) atenolol için % 80-% 125'dir.

Torul H ve Tamer U. (2011) yaptıkları bir çalışmada, farmasötik formülasyondaki atenolol ve propranololün enantiyomerlerinin HPLC ile tayinini

gerçekleştirmişlerdir. Farmasötik formülasyondaki R(-), S(+)-atenolol ve R(-), S(+)-propranolol'un tayini için HPLC-UV valide metodu geliştirilmiştir. Bu metodun amacı numune de herhangi bir uçurma işlemi olmadan ve yapılabilir aralıklarda seçici, lineer ve tekrarlanabilir olmasıdır. Atenolol ve propranolol isomerleri Chirex 3022 (S) kolon ve mobil faz olarak hekzan-diklorometan-metanol-trifloroasetik asit (35/35/5/0.25, h/h/h/h) kullanılmasıyla ayrıştırılmıştır. LOD değeri sırasıyla R(-) ve S(+)-atenolol için 12.3 ve 9.86 µg/mL iken sırasıyla R(-) ve S(+)-propranolol için 0.61 ve 0.89 µg/mL'dir. Alıkonma süresi sırasıyla R(-) ve S(+)-atenolol için 12.4 ve 14.3 min iken sırasıyla R(-) ve S(+)-propranolol için 29.06 ve 32.71 min'dir. Amaçlanan metot farmasötik formülasyonlardaki enantiyomerlerin tayininde uygulanabildi ve plaseboda herhangi bir girişim olmadı.

Sanjay Bari ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada, bulk ve tablet formunda Losartan potasyum ve hidroklorotiazid ile kombinasyonu bulunan atenololün eş zamanlı tayini için spektrofotometrik bir metot geliştirmişlerdir. Amaç: Losartan potasyum ve hidroklorotiazid ile kombine olan Atenolol'un tayini için basit, güvenilir, hızlı ve kesin bir UV spektrofotometrik metot geliştirilmiştir. Materyal ve Metot: Metodun oluşumunda eş zamanlı olarak 251.6 ve 224.2 nm dalga boyları losartan potasyum ve atenolol; 224.2 ve 271.6 nm atenolol ve hidroklorotiazid için iki analitik dalgaboyunda çalışılmış, solvent olarak setanol-su kullanılmıştır. Sonuç ve Düşünceler: Lineerlikte gözlenen konsantrasyon aralığı Losartan potasyum için 5-30 µg/mL ($r=0.9991$), atenolol için 2-12 µg/mL ($r=0.9995$) ve hidroklorotiazid için 2-14 µg/mL ($r=0.9993$)'dir. Sonuç olarak metot istatistiksel ve geri kazanım çalışmalarıyla valide edilmiştir.

1.3.3. Klortalidon Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

Brijesh Singh ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada, ilaç formülasyonundaki klortalidonun belirlenmesi için ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografi metodunu geliştirmişlerdir. İlaç tablet formlarındaki klortalidonun belirlenmesi için; kolay, spesifik, duyarlı, kesin ve doğru yüksek performanslı sıvı kromatografi metodu geliştirilmiştir. Klortalidon; kalp, karaciğer, böbrek ve akciğer hastalıklarının

tedavisinde Hint doktorlar tarafından idrar söktürücü ilaç olarak sıkça reçetelendirilir. Metotta, ters faz C-18 kolon (lichrospher, Merck®) (250 x 4 mm, 5µm partikül büyüklüğü), mobil faz olarak 50 mM disodyum hidrojen fosfat : metanol : asetonitril'in 70:30:05 oranındaki karışımı (pH ortofosforik asit ile 3.5'e ayarlanır) kullanılır. Hidroklorotiazit, iç standart olarak kullanılır. 30 ± 2 °C kolon sıcaklığında 220 nm'de UV-dedektör ile teşhis edilir. Kalibrasyon eğrisi, 0.1 ile 3.2 µg/ml aralığındaki doğru ile bulunur. Günler içi ve günler arası varyasyon katsayı yüzdesi sırasıyla 3.31 ve 0.37 olarak bulunur.

Walters SM ve ark. (1983) yaptıkları bir çalışmada, tabletlerdeki klortalidon ve klonidin hidroklorür'ün HPLC ile belirlenmesi gerçekleştirmişlerdir.

Tabletlerdeki klortalidon ve klonidin hidroklorür'ün belirlenmesi için hızlı, ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu uygulanmıştır. Tek tabletler veya komposit numuneler suda sonike edilmiştir, metanolde seyreltilmiş ve cihaza verilmeden önce süzölmüştür. 15 mg/tablet olarak formüle edilmiş Klortalidon, 5-6 mikrometre, oktadesilsilil bağı ile spiral olarak silikaya bağlı, metanol:su (50:50) mobil fazı ile kromatografik olarak analiz edilmiştir. 0.1 veya 0.2 mg/tablet olarak formüle edilmiş Klonidin hidroklorür, 5-6 mikrometre, trimetilsilil bağı ile spiral olarak silikaya bağlı, metanol : pH 7.9 fosfat tamponu (65:35) mobil fazı ile kromatografik olarak analiz edilmiştir. Her ikisi de spektrofotometrik olarak 254 nm'de tayin edilmiştir. Altı sentetik tablet numunesinden elde edilen geri kazanım ortalaması klortalidon için % 100.3 ve klonidin hidroklorür (0.1 mg/tablet seviyesinde) % 99.7'dir. Varyasyon katsayısı sırasıyla % 0.79 ve % 1.55'dir.

Raval H.V ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada, metoprolol tartarat ve klortalidon içeren dozaj formun UV spektrofotometresi ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Metoprolol Tartarat ve Klortalidon'un eş zamanlı tayini için iki adet basit, seçici, hızlı ve kesin UV spektrofotometrik metot geliştirilmiş ve valide edilmiştir. İlk metotda eş zamanlı çalışmaya denk olması için, metoprolol tartarat ve klortalidon için sırasıyla 275 nm ve 284 nm dalga boyları seçildi. İkinci metotta ise, birinci dereceden türevlendirme baz alınarak başka bir ilacın sıfır geçme noktasında ölçüm yapılmıştır. Metoprolol tartarat ve klortalidon ölçümünde sırasıyla 270.5 nm ve 280.8 nm uygulanmıştır. Doğrusal konsantrasyon aralığı metoprolol tartarat için 25-200 µg/mL iken klortalidon için 25-200 µg/mL'dir. Amaçlanan metotlar sentetik

karışımındaki her iki ilacın belirlenmesi için başarı ile kullanılır. Metot, ICH'in doğrusallık, güvenilirlik ve kesinlik parametrelerine bağlı kalınarak valide edilmiştir.

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

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Spektrofotometri

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

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

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

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

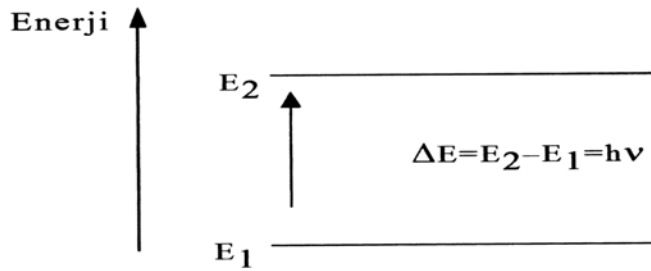
$$E = h.\nu \quad (1) \quad \text{veya} \quad E = h.c/\lambda \quad (2)$$

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

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

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

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



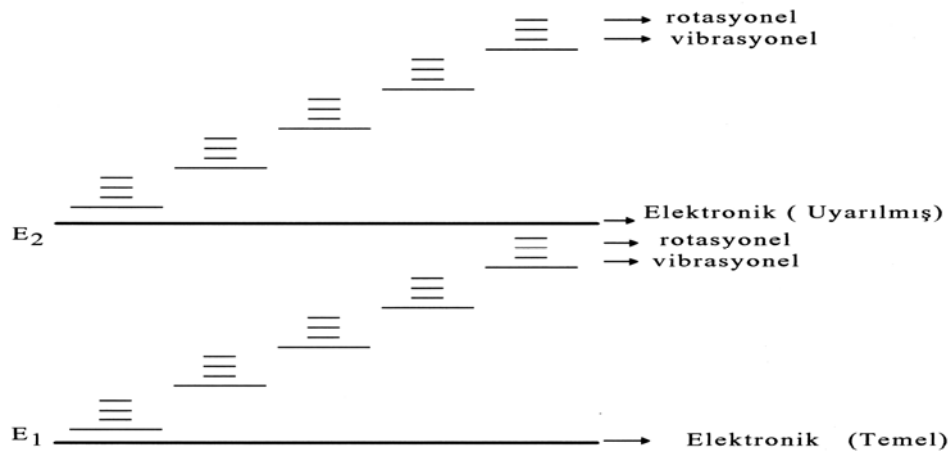
Şekil 2.1. Enerji seviyeleri arasındaki fark

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

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

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

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



Şekil 2.2. Moleküldeki enerji seviyeleri.

İki temel tip moleküler enerji çeşidi vardır:

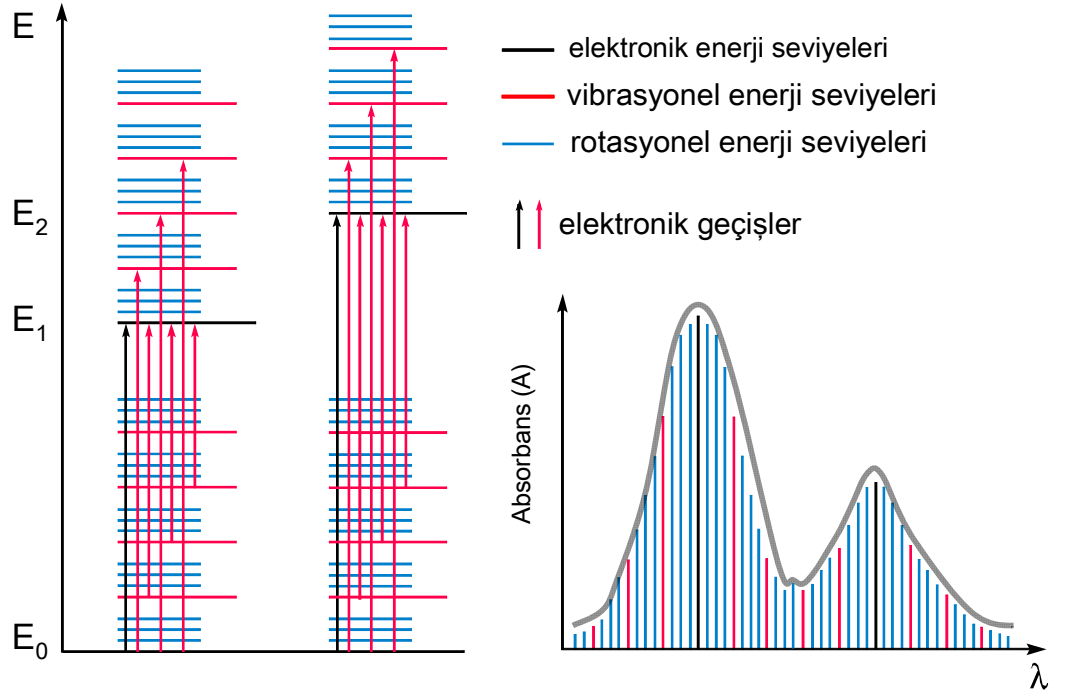
i-Elektronik uyarılma: 35–150 Kcal/mol, yani kimyasal bağlar seviyesinde bir enerji (200–800 nm'deki ışık) ile gerçekleşebilir. Bu olay sonucunda elektronlar daha yüksek enerjili orbitallere (antibağ orbitalleri) çıkarlar. Bu geçişler sırasında UV ve görünür alan spektrumu meydana gelir.

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

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

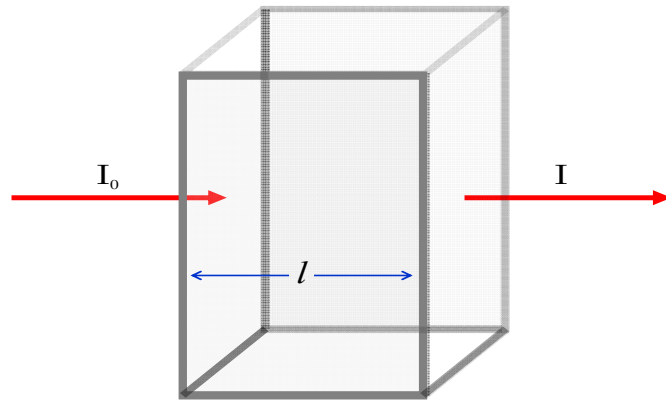
Atomların elektronik uyarılmaları sonucunda her bir yüksek enerjili atomik orbitale geçişe karşılık fotoğraf plağında bir çizgi gözlenir. Bir atomda da birden çok fazla sayıda atomik orbital olduğu için bu tür uyarılma için çok sayıda çizgiden meydana gelen "çizgi spektrumu" görülür (atomik absorpsiyon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

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



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

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



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

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

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

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

şeklinde verilir.

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

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

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

şeklinde gösterilir.

$$(l = \text{çözeltinin derinliği})$$

Yukarıda açıklanan iki kanun birleştirilerek,

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

denklemini elde edilir.

Burada: I = Numuneyi terk eden ışığın şiddeti,

I_0 = Numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti,

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı,

C = Absorpsiyon yapanın konsantrasyonu,

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

Eşitliğin eksi logaritması alınırsa,

$$\log I_0 / I = \epsilon.l.C \quad (6)$$

olur.

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

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

Bu eşitlik kısaca,

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

şeklinde verilir ve bu eşitlikten konsantrasyon (C) hesaplanabilir.

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

i) Cihazdan kaynaklanan sapmalar: Cihazdaki hatalar şunlar olabilir: Cihaza gelen potansiyelin düzgün olmaması, ışın kaynağının iyi çalışmaması, dedektör sisteminin iyi çalışmaması, kaçak ışınların olması, monokromatörün (dalga boyu seçicisi) hatalı olması, slit ayarının iyi ayarlanmaması vb.

ii) Kimyasal maddelerden kaynaklanan sapmalar: Ölçüm yapılan çözeltilerde meydana gelen iyonlara ayrışma, birleşme, kompleks oluşumu, fosforesans ve floresans olayları, çözeltilerin pH'sı ve ortam ısısı gibi olaylar nedeniyle sapmalar gözlenir.

iii) Analizci hatasından ileri gelen sapmalar: Analizcinin dikkatsizliği ve bilgisizliğinden ileri gelen uygun olmayan çözücülerle çalışmak, yüksek absorblama konsantrasyonlarında çalışmak, çözelti içinde kabarcıklar ve asılı parçacıkların bulunması, çözeltilerin ölçüldüğü kabın kirli ve çizik olması gibi sebeplerden ötürü sapmalar olabilir (Dinç, 1996; Üstündağ, 2003; Kayapınar, 2007; Kaya 2007).

2.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi

Görünür ışık toplam elektromanyetik radyasyonun çok düşük bir bölümüdür (400–800 nm) ve insan gözü tarafından renk olarak görülür. 400 nm olan alt ucunda mor renk vardır ve gökkuşağı renklerini takip ederek 800 nm olan üst sınıra geldiğinde kırmızı renk görülür. Görünür ışığın altındaki bölgeye (100–400 nm) “UV” bölgesi, üstündeki bölgeye ise (800 nm–25 μ m) “İnfrared” bölgesi adı verilir (Şekil 2.5.).

X-ışınları	Yumuşak Vakum	Yakın Görünür	Yakın	Temel	Uzak			
X-ışınları	UV	UV bölge	IR	IR	IR			
-----	-----	-----	-----	-----	-----			
1A	10 A	100A	200 nm	400 nm	800 nm	2.5 μ m	25 μ m	400 μ m

Şekil 2.5. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları.

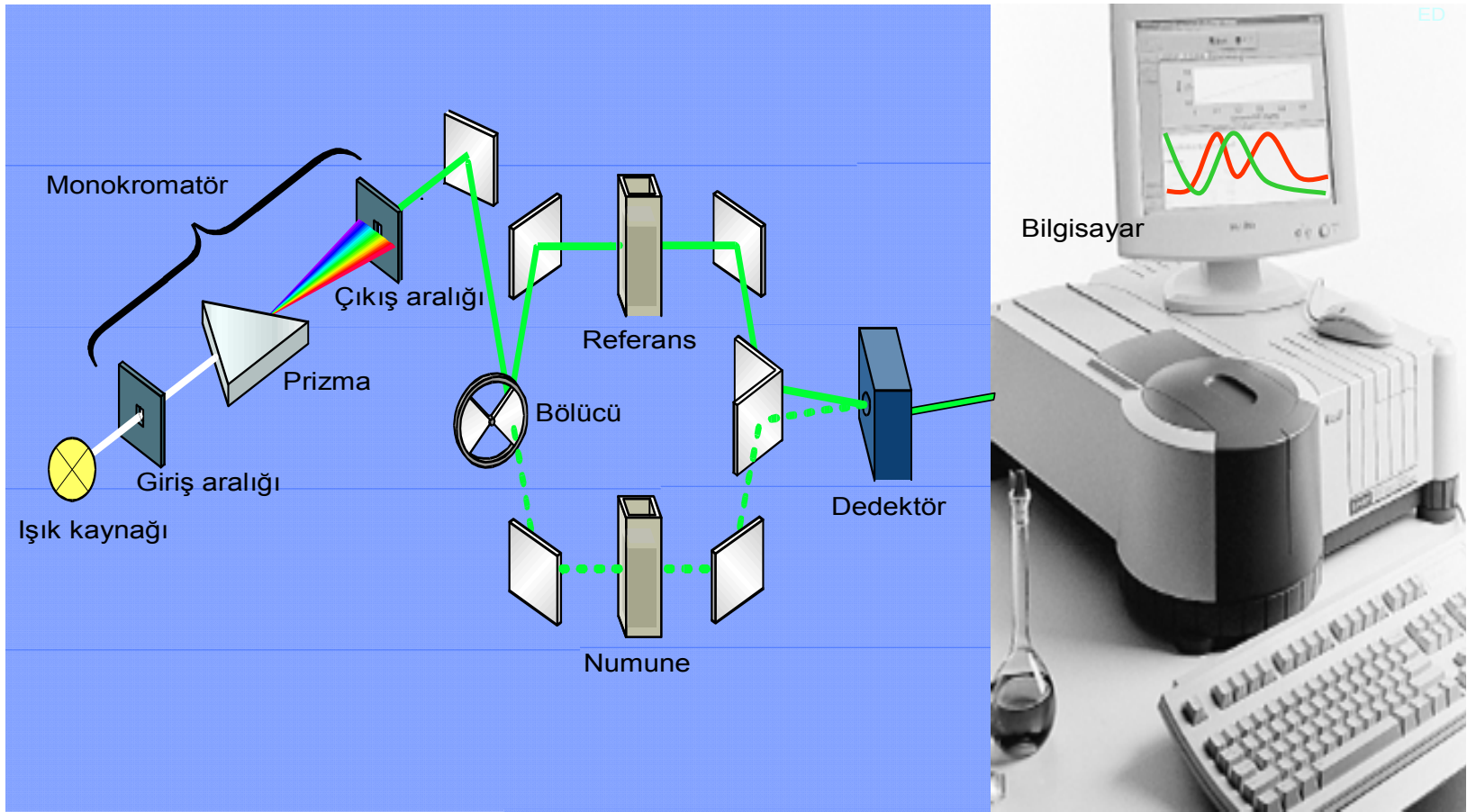
Moleküllerin elektromanyetik dalgalarla, özellikle ultraviyole, görünür alan ve enfraruj ışınları ile uyarılması sonucu meydana gelen absorpsiyondan, molekül hakkında kalitatif ve kantitatif bilgi edinmek mümkündür (Absorpsiyon spektroskopisi). UV ve görünür alandaki ışık kullanıldığında bileşiklerdeki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

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

düşürülebildiği belirtilmiştir. Bunlardan başka yöntemin kolay veri elde etmede fark edilir bir üstünlüğünün olduğunu belirtmek gerekir.

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

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



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

2.2. Kemometri

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

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

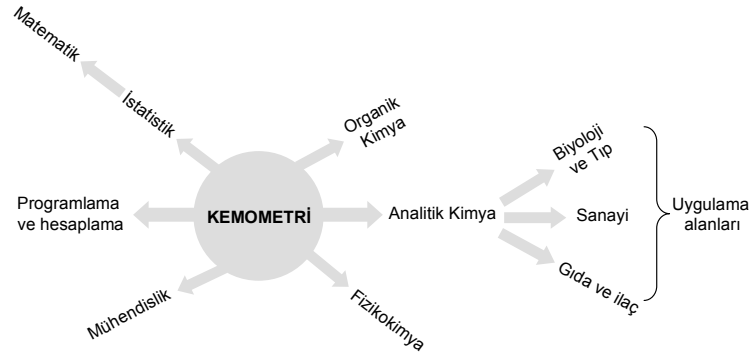
Bugün analitik kimyada kemometri disiplininin tanımı, konuları ve çözüm getirdiği problemler için artan yoğunlukta ve çok sayıda kitabının yayınlandığı görülmektedir. Bu disiplinin ortaya atıldığı günden itibaren kemometrik yöntemler ve uygulamaları ile ilgili derleme makaleler ve öğretici ders notları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

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

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

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

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



Şekil 2.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler

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

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

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

Bu tez çalışmasında dört farklı sinyal işleme yöntem kullanılmıştır.

2.2.1. Sürekli dalgacık dönüşümü (SDD) (Wavelet Transform)

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

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

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

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

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

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

2.2.2. Sürekli Dalgacık Dönüşüm–Sıfır Kesim yöntemi:

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

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

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

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

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

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

Yukarıdaki 2 nolu eşitlik SDD-katsayısı cinsinden ifade edilebilir:

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

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

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

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

Karıışımdaki M bileşiğinin miktar tayini için artan derişimlerde M bileşiğinin standart serisi hazırlanır ve karşılık gelen $C_{a,b}(A_{M,\lambda_i})$ değerleri ölçülerek kalibrasyonu grafiği elde edilir. Aynı işlem karışım numuneleri için uygulanarak ölçülen $C_{a,b}(A_{kar,\lambda_i})$ değerleri, yukarıda M bileşiği için hesaplanan kalibrasyon dekleminde yerine konarak karışımdaki M bileşiğinin konsantrasyonu hesaplanır. Bu işlem karışımdaki N bileşiği için de tekrar edilir (Dinç ve Baleanu, 2007; Dinç ve Baleanu, 2006; Dinç ve Baleanu, 2004a; Dinç ve Baleanu, 2004b; Dinç ve ark., 2005; Dinç ve ark., 2003; Dinç ve ark., 2006).

2.2.3. Spektrum Oranları-Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi:

Bu yöntemin uygulaması için, eğer M ve N bileşiklerini içeren ikili bir karışım dikkate alınır ve bu karışımın λ_i dalga boyunda absorbansı ölçülürse aşağıdaki denklem yazılabilir:

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

Aynı karışımdaki bileşiklerden birinin standart spektrumu için ;

$$A_{N,\lambda_i} = \beta_{N,\lambda_i} C_N^o \quad (2)$$

1 nolu denklem 2 nolu denkleme bölünürse, oran spektrumu elde edilebilir:

$$\frac{A_{m,\lambda_i}}{\beta_{N,\lambda_i} C_N^o} = \frac{\alpha_{M,\lambda_i} C_M}{\beta_{N,\lambda_i} C_N^o} + \frac{\beta_{N,\lambda_i} C_N}{\beta_{N,\lambda_i} C_N^o} \quad (3)$$

Bu 3 nolu eşitlik basitleştirilecek olursa,

$$\left(\frac{A_{m, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) \frac{1}{C_N^o} = \left(\frac{\alpha_{M, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) \frac{C_M}{C_N^o} + \frac{C_N}{C_N^o} \text{ veya } \left(\frac{A_{m, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) = \left(\frac{\alpha_{M, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) C_M + C_N \quad (4)$$

4 nolu denklemede $\frac{A_{m, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}}$ oran verilerinin vektörü dalgacık alanına transfer edilir ve SDD yöntemi bu oran verilerinin vektörlerine uygulanırsa,

$\frac{C_N}{C_N^o} = 0$ olur ve aşağıdaki 5 nolu eşitlik yazılabilir:

$$SDD \left(\frac{A_{m, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) \frac{1}{C_N^o} = SDD \left(\frac{\alpha_{M, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) \frac{C_M}{C_N^o} \text{ veya } SDD \left(\frac{A_{m, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) = SDD \left(\frac{\alpha_{M, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right) C_M \quad (5)$$

5 nolu denklem, SDD sinyalinin maksimum ve minimuma karşılık gelen $SDD \left(\frac{A_{m, \lambda i}}{\beta_{N, \lambda i}} \right)$ değeri, yalnızca C_M değerine bağlıdır ve C_N değerinden bağımsızdır. Maksimum ve minimuma karşılık gelen sinyal genliği, derişime karşı grafiği geçirilirse bir doğru denklemi elde edilir. Bu denklem M bileşiminin miktar tayininde kullanılır. N için benzer işlem tekrar edilir (Dinç ve Baleanu, 2007; Dinç ve Baleanu, 2006; Dinç ve Baleanu, 2004a; Dinç ve Baleanu, 2004b; Dinç ve ark., 2005; Dinç ve ark., 2003; Dinç ve ark., 2006).

2.2.4. Dalgacıklar Ailesi

Wavelets (dalgacıklar) dönüşüm yöntemleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

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

2.3. Gereçler

2.3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre (UV/ VIS): Shimadzu UV- 2550

Kuvartz küvet

Hassas terazi: Schimadzu Libror AEG-220

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

Magnet

Pipet (1-10 mL)

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

Balon joje (25-250 mL)

Beher

2.3.2. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

Microsoft Excel

Matlab 7.10 Software

PLS Toolbox 3.5 Software

Shimadzu UV Probe 2.33

2.3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol (Merck)

2.3.4. Analiz Edilen Bileşiklerin Ticari Preparatı**Tenoretic® 100/25 mg Film Tablet (AstraZeneca-Türkiye)**

Atenolol:100.0 mg

Klortalidon:..... 25.0 mg

3. BULGULAR

Bu çalışmada, ATE ve CHL bileşiklerini birlikte içeren ticari farmasötik tablet preparatın kantitatif analizinde sinyal işlemeye dayalı kemometrik yöntemlerin geliştirildi. Bu kapsamda, ATE ve CHL karışımının analizi için sinyal işleme yöntemleri olarak coif5-SDD, mexh-SDD, SO-bior-SDD yöntemleri ve türev spektrofotometrisi geliştirildi. Bu yöntemlerin geliştirilmesinde optimal sinyal işleme şartlarının bulunması en yüksek geri kazanım sonuçlarına göre saptandı. Geliştirilen kemometrik sinyal işleme yöntemleri, ATE ve CHL içeren yapay numunelerin ve ticari tabletlerin kantitatif analizine uygulandı.

3.1. Coiflets Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi

(Coiflets Continuous Wavelet Transform Method)

Karışımındaki ATE ve CHL bileşiklerinin spektral analizi çalışmasında Coiflets sürekli dalgacık dönüşüm yöntemini n=5 dereceden dönüşümü kullanıldı ve yöntem Coif5-SDD yöntemi olarak adlandırıldı.

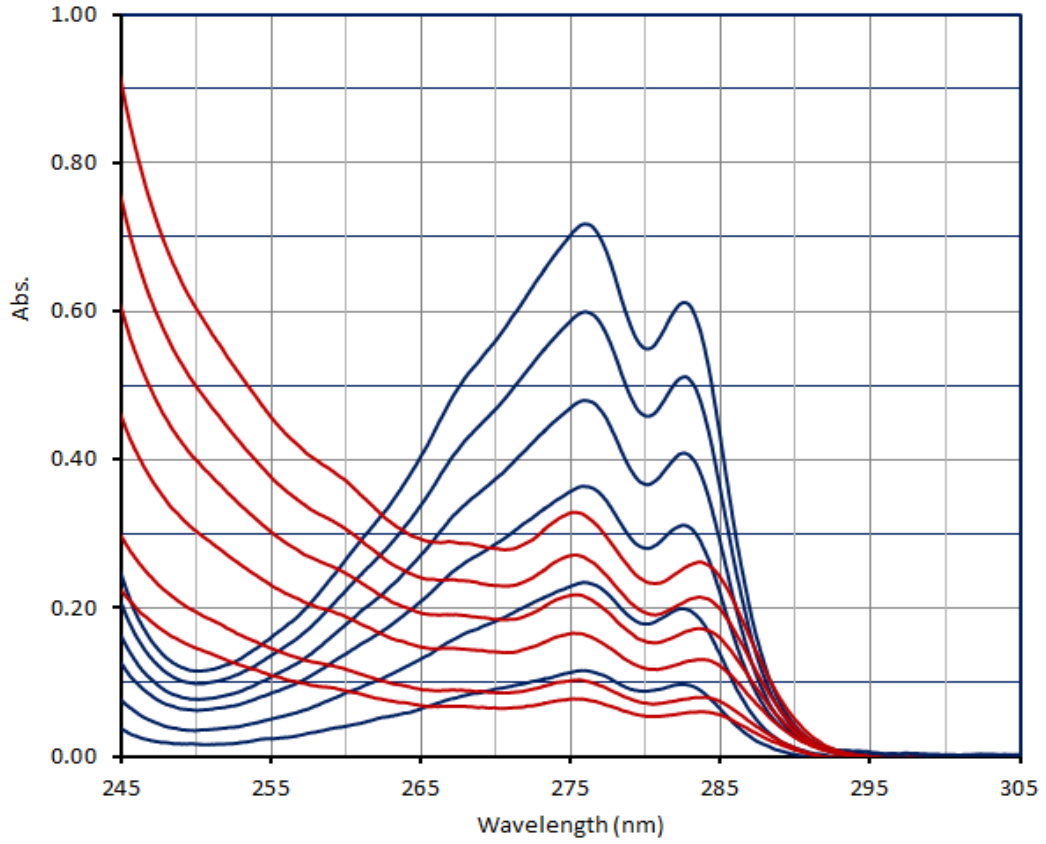
3.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

- a) ATE ve CHL stok çözeltileri, metanol içerisinde 100 mL'lik hacimde 20 mg ATE ve 20 mg CHL bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) Kalibrasyon doğru denklemi için ATE için 20.0-120.0 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) Kalibrasyon çözeltilerinin doğru denklemi için CHL için 15.0-60.0 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.

d) Kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında ATE ve CHL bileşiklerini içeren 12 değişik konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon çözeltileri hazırlandı.

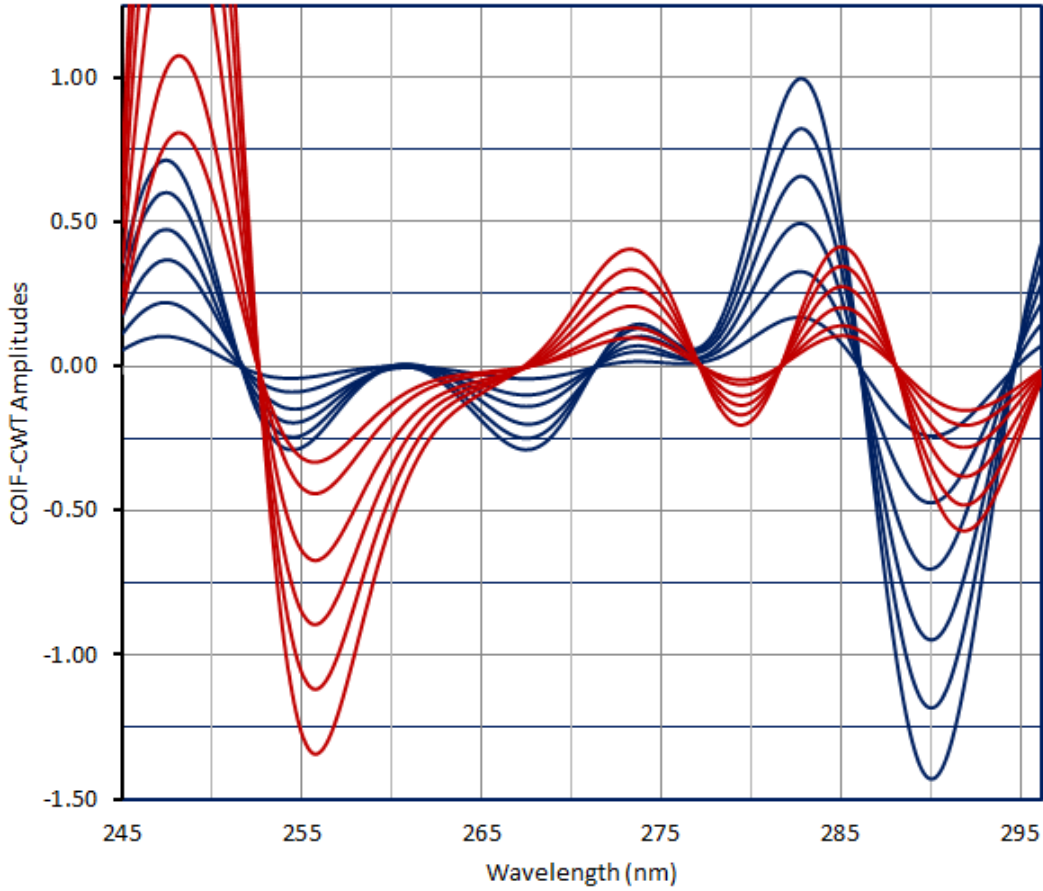
3.1.2. Regresyon Analizi ve Kalibrasyon Grafiği

Yüksek lisans tez çalışmasında, ATE ve CHL karışımlarının kantitatif analizi için coif5 sürekli dalgacık dönüşümü (coif5-SDD) yönteminin uygulanmasında metanol içerisinde ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak 245.0-305.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve ATE1, ATE2, ..., ATE6 ile CHL1, CHL2, ..., CHL6 şeklinde kodlanarak bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.1 de bileşiklerin orijinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Bu spektrumların çizdirilmesi işlemi ATE ve CHL bileşiklerini içeren diğer bütün numuneler için de tekrar edildi.



Şekil 3.1. ATE (20.0-120.0 µg/mL) (—) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) (—) bileşiklerinin; Absorbans Spektrumları (Çözücü:Metanol)

Sinyal işleme yönteminin uygulanmasında ATE ve CHL bileşiklerinin ultraviyole (UV) spektrumlarına ait sinyalleri işlemek için herbir konsantrasyon değeri için bilgisayar hafızasından ilgili numune koduyla çağrılarak absorbans verileri vektörel olarak *Microsoft Excel*'e transfer edildi ve 245.0-305.0 nm dalga boyu aralığında 1024 noktadan oluşan absorbans veriler dizisi seçildi ve dalgacık alanına taşındı.



Şekil 3.2. ATE (20.0-120.0 µg/mL) (—) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) (—) bileşiklerinin; coif5-SDD Spektrumları (Çözücü:Metanol)

Sinyal işleme yönteminin seçimi ve optimizasyonu basamağında optimal “dalgacık ailesini” (wavelet family) saptayabilmek için değişik dalgacıkları, ATE ve CHL spektrumlarının dönüşümüne uygulandı. Ancak bunlardan coiflets n=5 dereceden dönüşüm ATE ve CHL karışımının analizinde yüksek geri kazanım sonuçları sağlaması nedeniyle “*optimal family*” olarak seçildi.

Karışımındaki ATE ve CHL bileşiklerinin analizi için coif5-SDD sinyal işleme yöntemi 245.0-295.0 nm dalga boyu bölgesinde 2^{10} değerine karşılık gelen 1024 noktada kalibrasyon spektrumlarına uygulandı. coif5-SDD spektrumları, dalgacık dönüşüm katsayılarının ($C_{a,b}$) dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edildi (Şekil 3.2).

Çalışmada coif5-SDD yöntemiyle ATE ve CHL bileşiklerinin analizine uygulamasında regresyon denklemleri, kalibrasyon çözeltileri kullanılarak ATE için 284.6 nm deki ve CHL için 260.0 nm'deki coif5-SDD genlikleri ölçüldü. Kalibrasyon grafikleri, CHL için 260.0 nm'de ve ATE için 284.6 nm'de elde edilen coif5-SDD genlikleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek elde edildi. Bu iki dalga boyundaki herbir bileşik için regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları Çizelge 3.1. de verilmektedir.

Çizelge 3.1. coif5-SDD yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon Parametreleri	coif5-SDD	
	ATE	CHL
λ (nm)	284.6	260.0
Kon. Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	20.0-120.0	15.0-60.0
M	6.65×10^{-3}	-9.08×10^{-3}
N	-3.44×10^{-3}	1.27×10^{-2}
R	0.9999	0.9997
SH(m)	5.13×10^{-5}	1.19×10^{-4}
SH(n)	4.00×10^{-3}	4.67×10^{-3}
SH(r)	4.30×10^{-3}	4.65×10^{-3}
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	4.42	3.78
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	14.73	12.61

m = Regresyon denkleminin eğimi,

n = Regresyon denkleminin kesim noktası,

r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı,

SH(m) = Eğimin standart hatası,

SH(n) = kesim noktasının standart hatası,

SH(r) = Korelasyon katsayısının standart hatası,

LOD = Yakalama sınırı,

LOQ = Tayin sınırı

Çizelge 3.1 deki doğrusal regresyon analizine göre hesaplanan kalibrasyon denklemleri yardımıyla numunelerin içindeki ATE ve CHL miktarları hesaplandı.

3.1.3.Kemometrik coif5-SDD Yönteminin Validasyonu

Çalışmalarımızda coif5-SDD sinyal işleme yönteminin analitik validasyonu için metanol içerisinde ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışımı içeren çözeltilerden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak coif5-SDD sinyal işleme yöntemi ile elde edilen sonuçların kesinliği ve doğruluğu test edildi. coif5-SDD yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar, Çizelge 3.2 de sunulmaktadır. Geri kazanım değerleri, ATE için % 100.6, CHL için % 102.3 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri, ATE için % 1.85 ve CHL için %1.66 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.2. coif5-SDD yönteminin ATE-CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	İkili Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
1	100	15	98.8	15.2	98.8	101.1
2	100	20	100.3	20.7	100.3	103.4
3	100	30	99.8	31.5	99.8	104.8
4	100	40	100.0	40.5	100.0	101.3
5	100	50	99.6	50.5	99.6	101.1
6	100	60	102.0	61.4	102.0	102.4
7	20	25	21.0	25.9	105.1	103.8
8	40	25	41.3	26.4	103.2	105.6
9	60	25	60.6	25.6	101.1	102.4
10	80	25	80.0	25.5	100.1	101.9
11	100	25	98.9	25.0	98.9	100.1
12	120	25	118.3	25.0	98.6	100.1
				\bar{X}	100.6	102.3
				SS	1.87	1.70
				BSS	1.85	1.66

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

Geliştirilen Coif5-SDD yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için diğer bir validasyon işlemi olarak gün içi ve günler arası analizle gerçekleştirildi. Bu işlem için doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda ATE için (20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL) ve CHL için (15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL) her derişim için 6 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Gün içi ve günler arası elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.3 de gösterildi.

Çizelge 3.3. coif5-SDD yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	21.38	15.78	0.96	0.88	4.47	5.57	6.92	5.22	106.9	105.2
60.0	40.0	61.05	41.85	0.78	0.82	1.28	1.97	1.75	4.63	101.7	104.6
120.0	60.0	118.93	60.74	1.31	1.83	1.10	3.01	-0.89	1.23	99.1	101.2

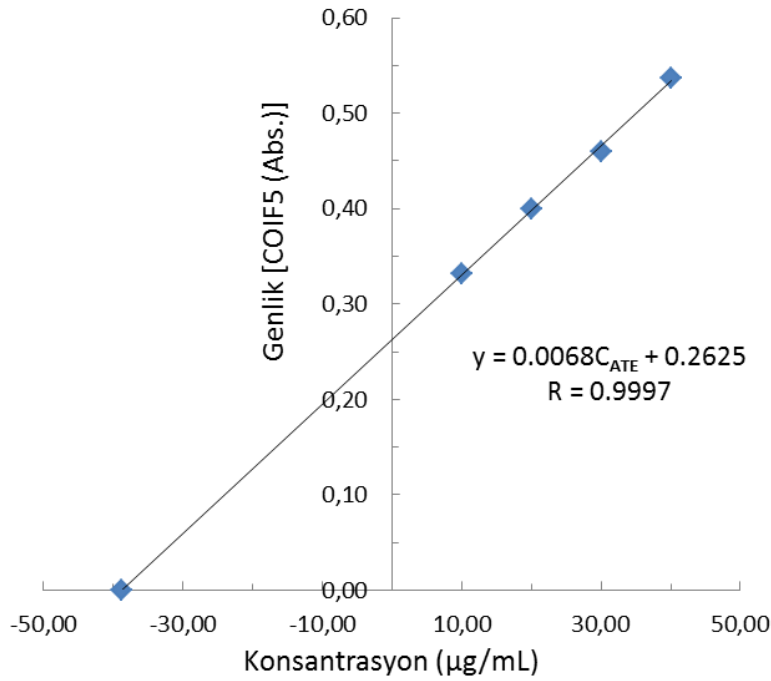
Günler arası (n=6)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	20.84	15.37	0.67	0.69	3.22	4.51	4.19	2.47	104.2	102.5
60.0	40.0	60.49	41.91	0.99	0.48	1.64	1.14	0.82	4.77	100.8	104.8
120.0	60.0	120.78	61.35	1.12	0.97	0.93	1.58	0.65	2.26	100.7	102.3

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

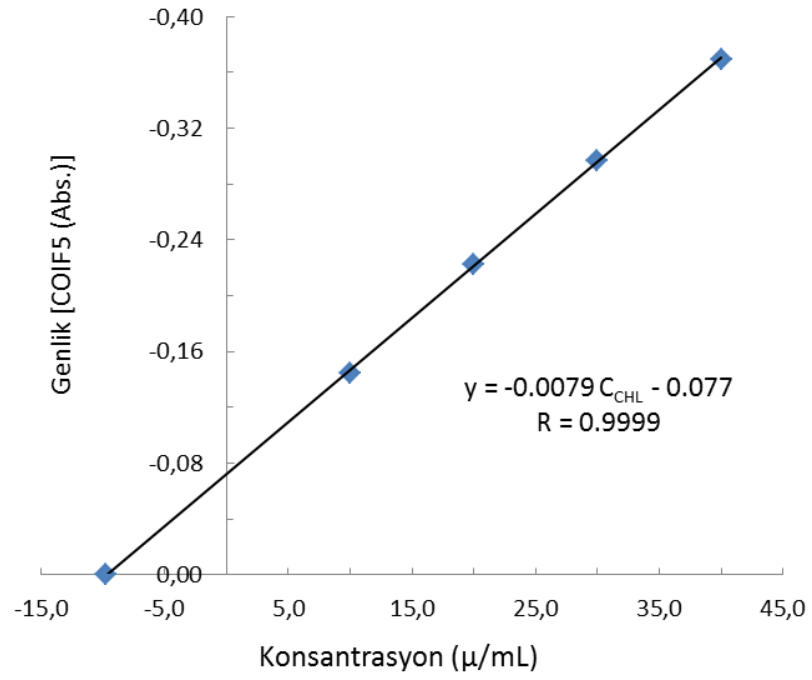
GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = % Bağlı Standart Sapma

Bu yüksek lisans tez çalışmasında önerilen coif5-SDD sinyal işleme yöntemi gerçek ticari farmasötik tabletlerin analizine uygulamadan önce, ATE ve CHL bileşiklerinin coif5-SDD yöntemiyle analizi üzerine tablet yardımcı maddelerinin girişim etkisi olup olmadığı test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 100.0 µg/mL ATE ve 25.0 µg/mL CHL'ye karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL ATE ve 15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL CHL olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Tenoretic**[®] Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen ATE ve

CHL miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki ATE ve CHL için geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde herbiri için üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Standart ilavesi tekniğinde coif5-SDD yönteminin uygulamasında tablet içerisindeki ATE için x-ksenini kestiği nokta 38.71 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna (Şekil 3.3); CHL için x-kseni kestiği nokta 9.74 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna (Şekil 3.4) karşılık gelmektedir.



Şekil 3.3. Standart ilavesi tekniği ile 20.0, 60.0 ve 120.0 $\mu\text{g/mL}$ ATE konsantrasyonları için coif5-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği



Şekil 3.4. Standart ilavesi tekniği ile 15.0, 40.0 ve 60.0 μ g/mL CHL konsantrasyonları için coif5-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği

3.1.4. coif5-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Bu yüksek lisans tez çalışmasında coif5-SDD yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde elektronik terazi kullanılarak tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balon jodede metanol içerisinde çözüldü. Balon jodedeki çözelti mekanik bir karıştırıcı ile yaklaşık 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi= 0.45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu hazırlanan tablet numune çözeltilerinin 245.0-295.0 nm dalga boyu aralığında vektörel okuma $\Delta\lambda=0.05$ nm olarak çizdirilen spektrumlardan ölçülen absorbans değerlerine coif5-SDD yöntemi uygulandı. coif5-SDD spektrumlarından ATE için 284.6 nm deki ve CHL için 260.0 nm'deki SDD genlikleri ölçülerek kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki ATE ve CHL miktarları hesaplandı. Bu tablet çözeltisi hazırlama ve coif5-SDD yöntemi uygulama işlemi 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **Tenoretic[®]** Tablet preparatına uygulandı. **Tenoretic[®]** Tablet sonuçları çizelge 3.4 de sunuldu.

Çizelge 3.4. coif5-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat, etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL /Tablet)

No.	mg/tablet	
	ATE	CHL
1	99.7	25.2
2	98.1	25.2
3	98.8	25.0
4	98.8	25.7
5	102.4	25.0
6	99.7	25.5
7	99.0	24.5
8	96.5	25.4
9	101.0	25.4
10	99.0	25.5
\bar{X}	99.3	25.2
SS	1.59	0.35
BSS	1.60	1.37
SH	0.50	0.11
GA (p=0.05)	99.30 ± 1.14	25.20 ± 0.25

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

3.2. Meksika Şapka Fonksiyonu Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemi (Mexican Hat Function Continuous Wavelet Transform Method)

Tez çalışmasında ATE ve CHL analizinde Meksika şapka fonksiyonu sürekli dalgacık dönüşüm (Mexican Hat Function Continuous Wavelet Transform, mexh-SDD) yöntemi sıfır kesim noktası tekniği ile uygulandı.

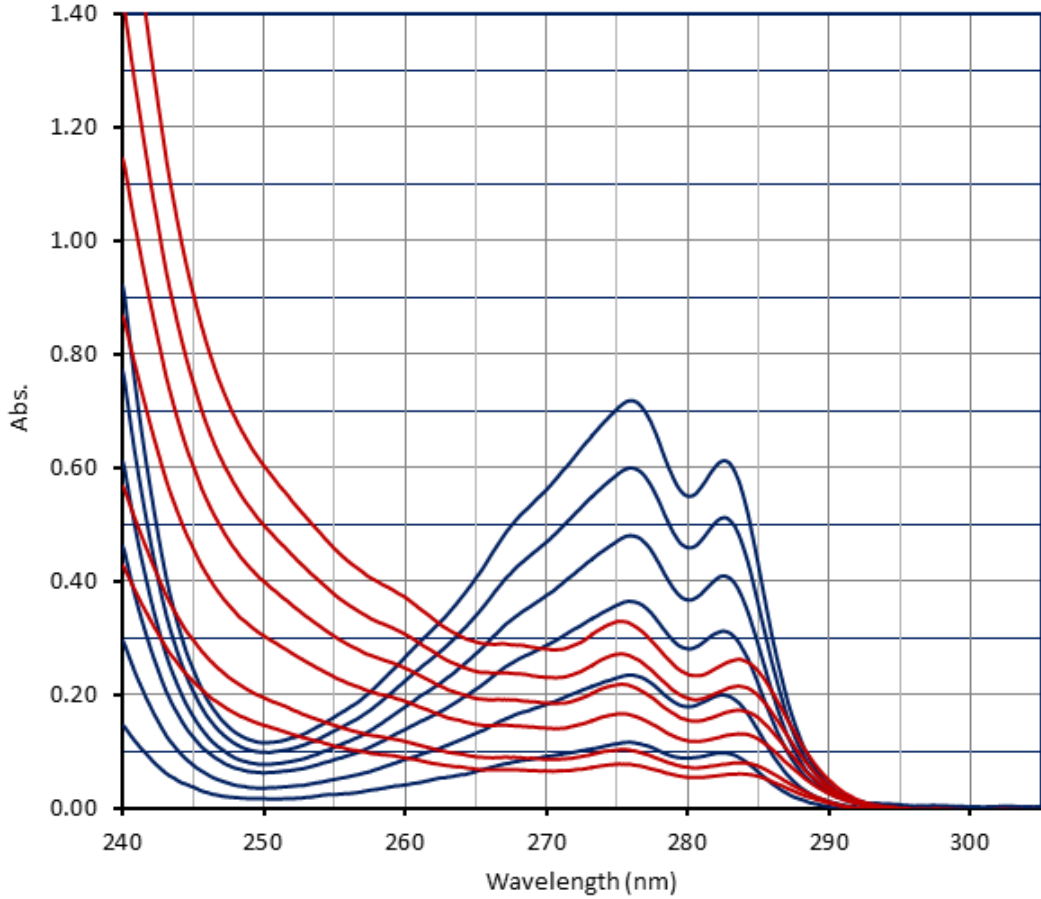
3.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

- a) ATE ve CHL stok çözeltileri, metanol içerisinde 100 mL'lik hacimde 20 mg ATE ve 20 mg CHL bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) Kalibrasyon doğru denklemi için ATE için 20.0-120.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) Kalibrasyon doğru denklemi için CHL için 15.0-60.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- d) Kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında ATE ve CHL bileşiklerini içeren 12 değişik konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon çözeltileri hazırlandı.

3.2.2. Regresyon Analizi ve Kalibrasyon Grafiği

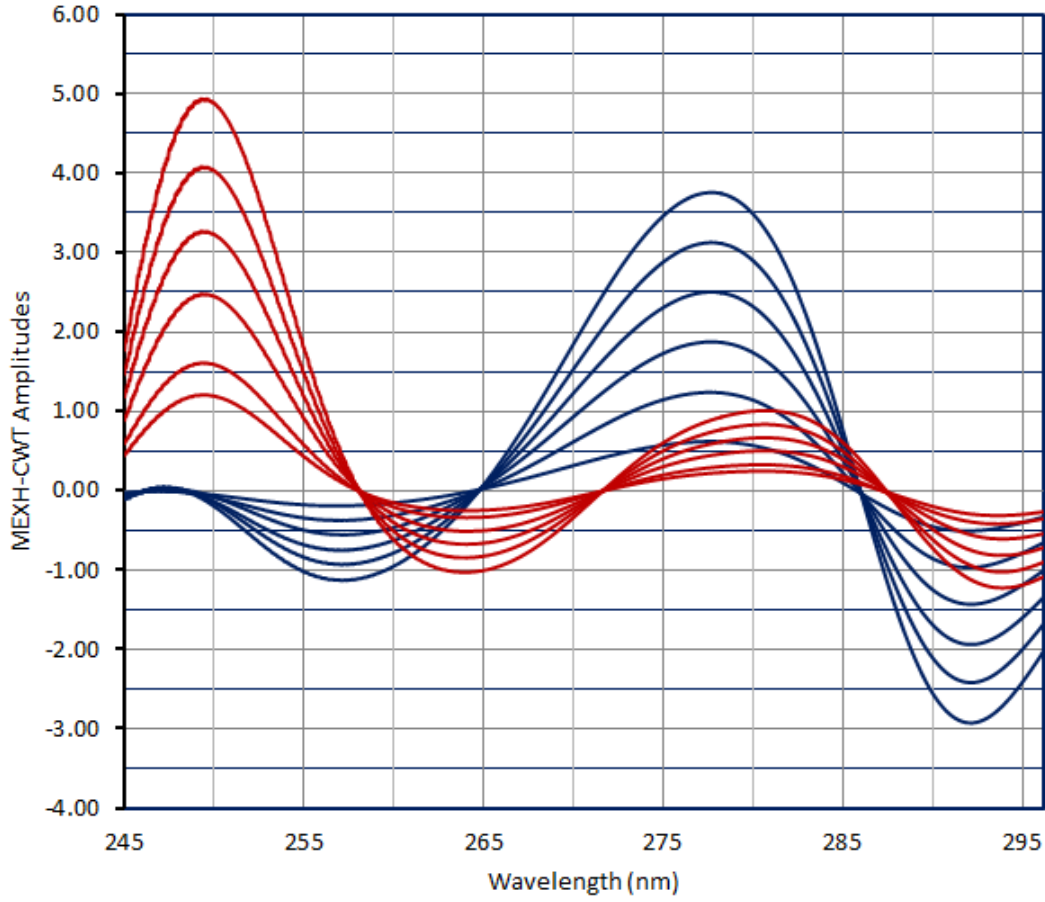
Tez kapsamında kalibrasyon eğrilerini hesaplamak için ATE-CHL karışımının kantitatif analizi için Mexican sürekli dalgacık dönüşümü (mexh-SDD) yönteminin uygulanmasında metanol içerisinde ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak, 240.0-305.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları çizdirildi ve ATE1, ATE2, ..., ATE6 ile CHL1, CHL2, ..., CHL6 şeklinde kodlanarak bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.5 de bileşiklerin orijinal absorpsiyon

spektrumları sunulmaktadır. Bu spektrum alma işlemi ATE ve CHL bileşiklerini içeren diğer bütün numuneler için de tekrar edildi.



Şekil 3.5. ATE (20.0-120.0 µg/mL) (—) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) (—) bileşiklerinin Absorbans Spektrumları (Çözücü:Metanol)

Kemometrik mexh-SDD yönteminin uygulamasında kalibrasyon ve numunelerin UV spektrumlarını işlemek için herbir konsantrasyon değeri için bilgisayar hafızasına kodlama sistemiyle kaydedildi ve daha sonra hafızadan çağrılarak absorbans verilerinin vektörleri olarak *Microsoft Excel*'e transfer edildi ve 240.0-305.0 nm dalga boyu aralığında 1024 noktadan oluşan absorbans veriler dizisi seçildi ve dalgacık alanına işlemek üzere taşındı.



Şekil 3.6. ATE (20.0-120.0 µg/mL) (—) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) (—) bileşiklerinin; mexh-SDD Spektrumları (Çözücü:Metanol)

Karışımdaki ATE ve CHL bileşiklerinin analizi için mexh (mexh wavelet transform) aileleri arasında optimal sinyal işleme yöntemi olarak saptanan mexh-SDD sinyal işleme yöntemi 245.0-295.0 nm dalga boyu bölgesinde 2^{10} değerine karşılık gelen 1024 noktada kalibrasyon spektrumlarına uygulandı. mexh-SDD spektrumları, dalgacık dönüşüm katsayılarının ($C_{a,b}$) dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edildi (Şekil 3.6).

Çalışmada mexh-SDD yöntemiyle ATE ve CHL bileşiklerinin analizi için doğrusal regresyon denklemleri, kalibrasyon çözeltileri kullanılarak ATE için 271.6 nm'deki CHL için 264.4 nm'deki mexh-SDD genlikleri ölçülerek hesaplandı. Bu iki dalga

boyundaki doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları Çizelge 3.5. da verilmektedir.

Çizelge 3.5. mexh-SDD yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon Parametreleri	mexh-SDD	
	ATE	CHL
λ (nm)	271.6	264.4
Kon. Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	20.0-120.0	15.0-60.0
M	2.04×10^{-2}	-1.76×10^{-2}
N	3.25×10^{-3}	9.76×10^{-3}
R	1.0000	0.9997
SH(m)	4.86×10^{-5}	2.08×10^{-4}
SH(n)	3.78×10^{-3}	8.14×10^{-3}
SH(r)	4.06×10^{-3}	8.10×10^{-3}
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	1.36	3.41
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	4.55	11.36

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

Çizelge 3.5 teki doğrusal regresyon analizine göre hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak numunelerin içindeki ATE ve CHL analizler gerçekleştirildi.

3.2.3.Kemometrik mexh-SDD Yönteminin Validasyonu

Çalışmalarımızda mexh-SDD sinyal işleme yönteminin analitik validasyonu için metanol içerisinde ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışımı içeren çözeltilerden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak mexh-SDD sinyal işleme yönteminin kesinliği ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım çalışmalarında mexh-SDD yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6 da sunulmaktadır. Sonuçta % geri kazanım değerleri, ATE için % 100.6 , CHL için % 103.7 olarak hesaplandı. Bağlı standart sapma değerleri, ATE için % 1.23 ve CHL için % 1.21 olarak bulundu.

Çizelge 3.6. mexh-SDD yönteminin ATE-CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	İkili Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
1	100	15	99.3	15.7	99.3	104.8
2	100	20	101.7	20.8	101.7	104.2
3	100	30	100.6	31.0	100.6	103.2
4	100	40	101.0	42.3	101.0	105.7
5	100	50	100.1	52.2	100.1	104.4
6	100	60	101.5	62.1	101.5	103.5
7	20	25	20.8	25.5	103.9	101.8
8	40	25	39.7	25.5	99.3	101.9
9	60	25	60.2	26.2	100.3	104.8
10	80	25	80.1	26.2	100.2	104.7
11	100	25	100.2	25.4	100.1	101.8
12	120	25	119.5	26.0	99.6	103.9
				\bar{X}	100.6	103.7
				SD	1.23	1.26
				BSS	1.23	1.21

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

Çalışmalarımızda geliştirmiş olduğumuz mexh-SDD yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlara göre doğruluğunu ve kesinliğini ortaya koymak için gün için ve günler arası analiz çalışması yapıldı. Bu validasyon işleminde mexh-SDD yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analiz çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda ATE için (20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL) ve CHL için (15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL) her derişim için 6 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında

hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası analiz çalışmalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. mexh-SDD yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	20.53	15.99	0.28	0.28	1.34	1.73	2.63	6.57	102.6	106.6
60.0	40.0	60.04	40.65	0.24	0.16	0.39	0.39	0.06	1.63	100.1	101.6
120.0	60.0	118.36	61.45	0.35	1.17	0.30	1.90	-1.36	2.41	98.6	102.4

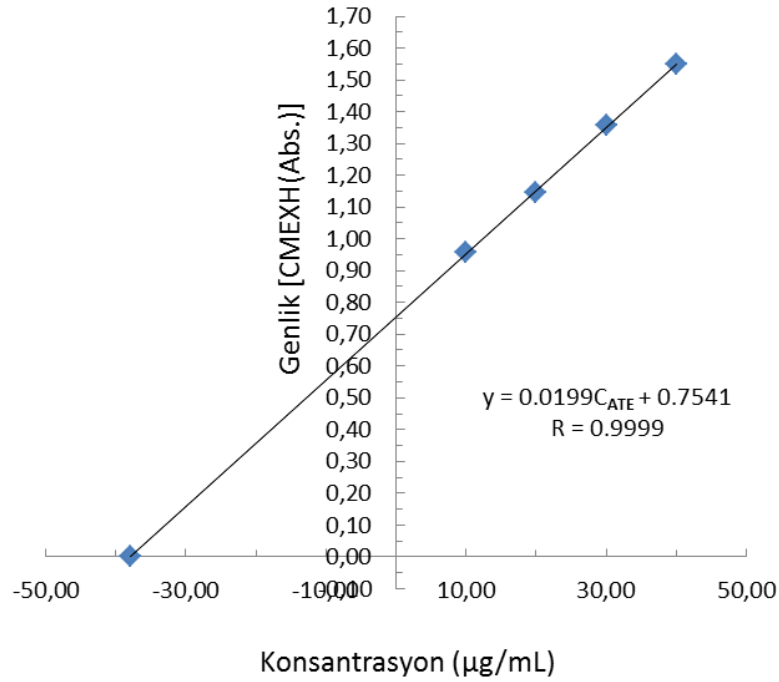
Günler arası (n=6)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	20.67	15.51	0.61	0.41	2.93	2.66	3.33	3.39	103.3	103.4
60.0	40.0	60.88	40.44	0.47	0.60	0.78	1.48	1.47	1.09	101.5	101.1
120.0	60.0	120.26	60.38	1.33	1.47	1.11	2.44	0.21	0.64	100.2	100.6

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

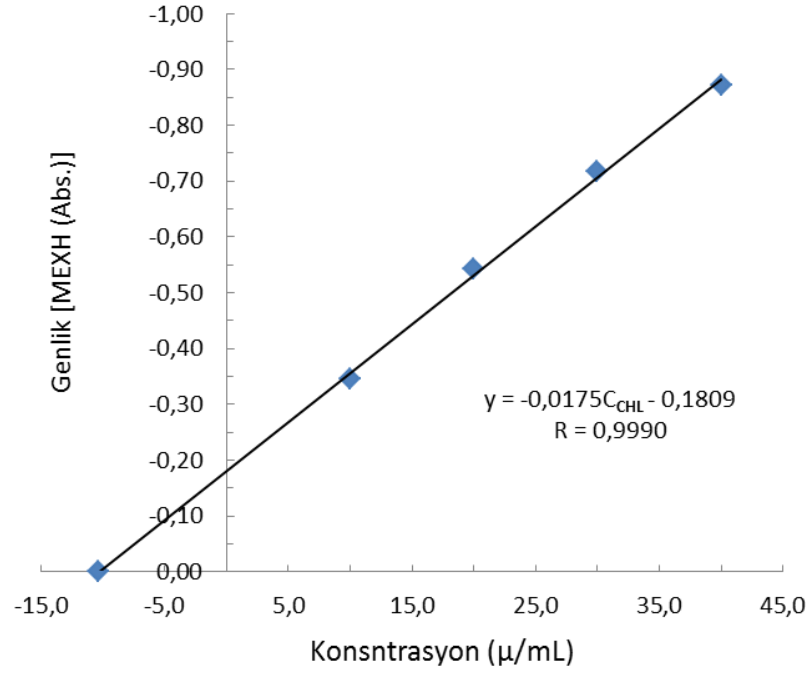
GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = % Bağıl Standart Sapma

Tez kapsamında önerilen mexh-SDD sinyal işleme yöntemi gerçek ticari farmasötik tabletlerin analizine uygulamadan önce, ATE ve CHL bileşiklerinin mexh-SDD yöntemiyle analizi üzerine tablet yardımcı maddelerinin girişim etkisi olup olmadığı araştırıldı. Bu işlem için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 100.0 µg/mL ATE ve 25.0 µg/mL CHL'ye karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL ATE ve

15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL CHL olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Tenoretic**[®] Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen ATE ve CHL miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki ATE ve CHL için geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde herbiri için üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Standart ilavesi tekniğinde mexh-SDD yönteminin uygulamasında tablet içerisindeki ATE için x-eksenini kestiği nokta 37.90 µg/mL konsantrasyonuna (Şekil 3.7); CHL için x-ekseni kestiği nokta 10.33 µg/mL konsantrasyonuna (Şekil 3.8) karşılık gelmektedir.



Şekil 3.7. Standart ilavesi tekniği ile 20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL ATE konsantrasyonları için mexh-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği



Şekil 3.8. Standart ilavesi tekniği ile 15,0, 40,0 ve 60,0 µg/mL CHL konsantrasyonları için mexh-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği

3.2.4. Kemometrik mexh-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada mexh-SDD sinyali işleme yönteminin farmasötik preparata uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balon jodede metanol içerisinde çözüldü. Balon jodedeki çözelti mekanik bir karıştırıcı ile yaklaşık 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0.45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 245.0-295.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklarla çizdirilen spektrumlarından ölçülen absorpsiyon değerlerine mexh-SDD yöntemi uygulandı. mexh-SDD spektrumlarından ATE için 271.6 nm'deki ve CHL için 264.4 nm'deki SDD genlikleri ölçülerek kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki ATE ve CHL miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **Tenoretic[®]** Tablet preparatına uygulandı. **Tenoretic[®]** Tablet sonuçları çizelge 3.8 de sunuldu.

Çizelge 3.8. mexh-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat, etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL /Tablet)

No.	mg/tablet	
	ATE	CHL
1	98.8	25.8
2	100.9	25.5
3	98.3	26.7
4	98.3	26.7
5	99.1	26.4
6	99.9	25.8
7	97.2	25.7
8	100.4	25.5
9	100.8	25.0
10	100.4	24.9
\bar{X}	99.4	25.8
SS	1.25	0.61
BSS	1.26	2.38
SH	0.40	0.19
GA (p=0.05)	99.40 ± 0.89	25.80 ± 0.44

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

3.3. Spektrum Oranları Bior 1.1-SDD Yöntemi

(Ratio Spectra- Bior 1.1 Continuous Wavelet Transform Method)

Bu bölümde, ATE ve CHL karışımının analizi için spektrum oranlarına Biortogonal 1.1 sürekli dalgacık yöntemi uygulandı. Spektrum oranları (SO)-Bior 1.1-SDD kombine bir yöntem olup. SO-Bior 1.1-SDD şeklinde hiçbir ön ayırma işlemi gerektirmeksizin ATE-CHL karışımlarına uygulandı.

3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

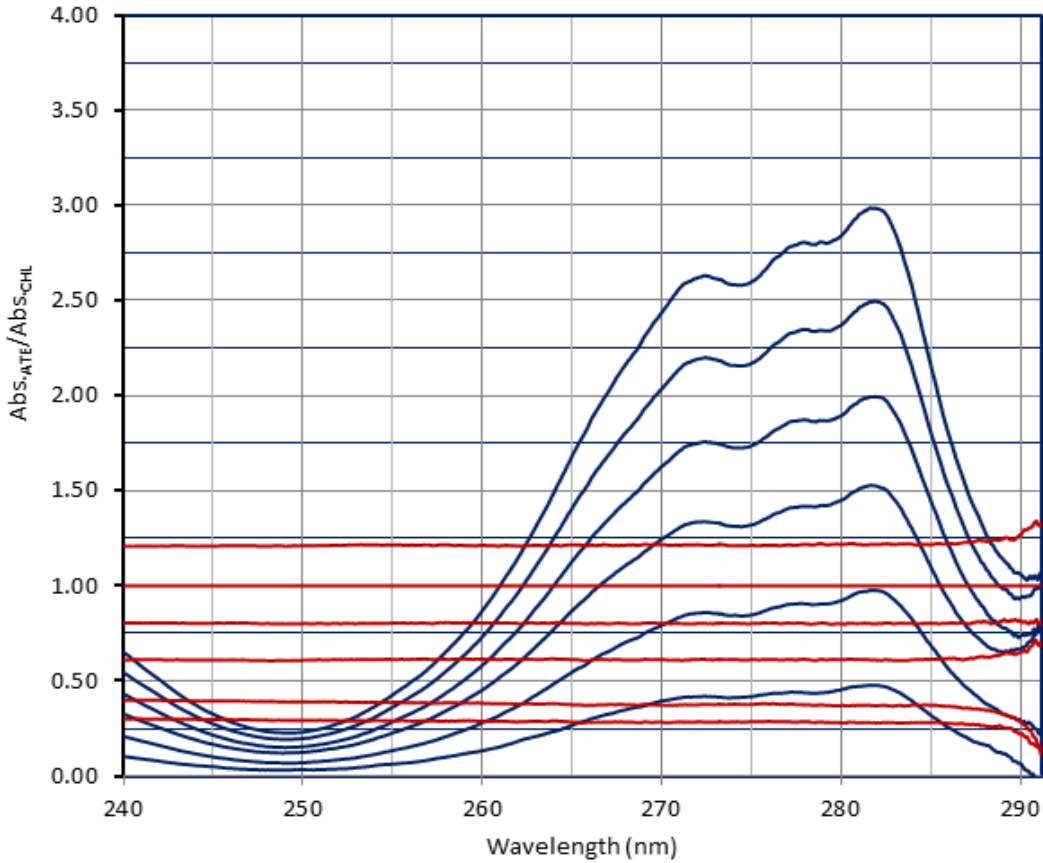
- a) ATE ve CHL stok çözeltileri, metanol içerisinde 100 mL'lik hacimde 20 mg ATE ve 20 mg CHL bileşikleri çözülerek ayrı ayrı hazırlandı.
- b) Kalibrasyon doğru denklemi için ATE için 20.0-120.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) Kalibrasyon doğru denklemi için CHL için 15.0-60.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- d) Kalibrasyon konsantrasyon aralıklarında ATE ve CHL bileşiklerini içeren 12 değişik konsantrasyondan oluşan bağımsız validasyon çözeltileri hazırlandı.

3.3.2. Regresyon Analizi ve Kalibrasyon Grafiği

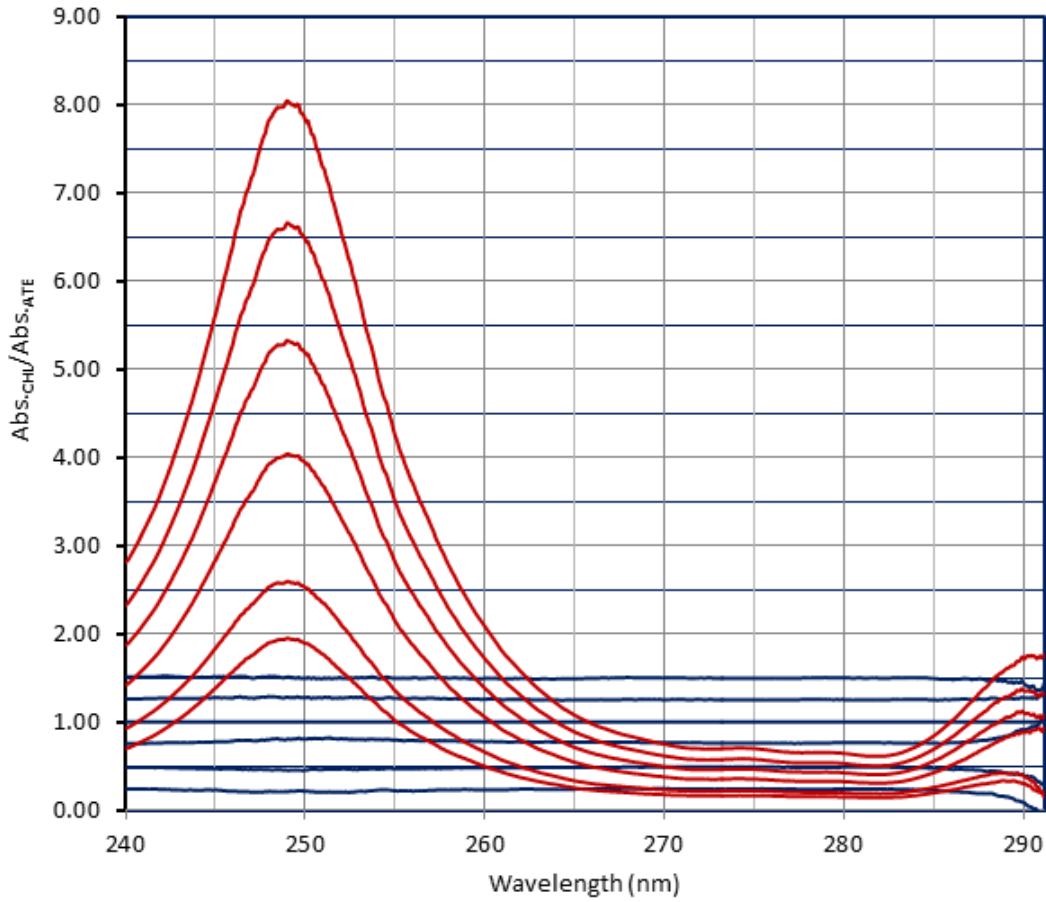
Tez kapsamında ATE-CHL karışımının kantitatif analizi için spektrum oranları sürekli dalgacık dönüşümü (SO-SDD) yönteminin uygulanmasında metanol içerisinde ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak 240.0-290.0 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.05$ nm aralıklarla orjinal absorpsiyon spektrumları kaydedildi ve ATE1, ATE2, ..., ATE6 ile CHL1, CHL2, ..., CHL6 şeklinde kodlanarak bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil

3.6 da bileşiklerin orjinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Bu spektrum alma işlemi ATE ve CHL bileşiklerini içeren diğer bütün numuneler için de tekrar edildi.

Daha önce kalibrasyonlarda kullanılmak üzere ATE için 20.0-12.00 $\mu\text{g/mL}$ ve CHL için 15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralıklarında şekil 3.6'da çizdirilen absorpsiyon spektrumları ATE ve CHL oran spektrumları elde edilmek üzere bilgisayar hafızasından çağırılarak 20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığındaki kalibrasyon spektrumları standart bölücü spektrumu olarak kullanılan 50 $\mu\text{g/mL}$ CHL'e karşılık gelen spektumlara bölünerek ATE'nin Şekil 3.9'daki oran spektrumları elde edildi ve kodlarıyla bilgisayar hafızasına kaydedildi.



Şekil 3.9. ATE (20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) ve CHL (15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) bileşiklerinin absorpsiyon oranları spektrumları (50 $\mu\text{g/mL}$ CHL'e karşılık gelen standart absorpsiyon spektrumu bölücü olarak kullanıldı.) (Çözücü:Metanol

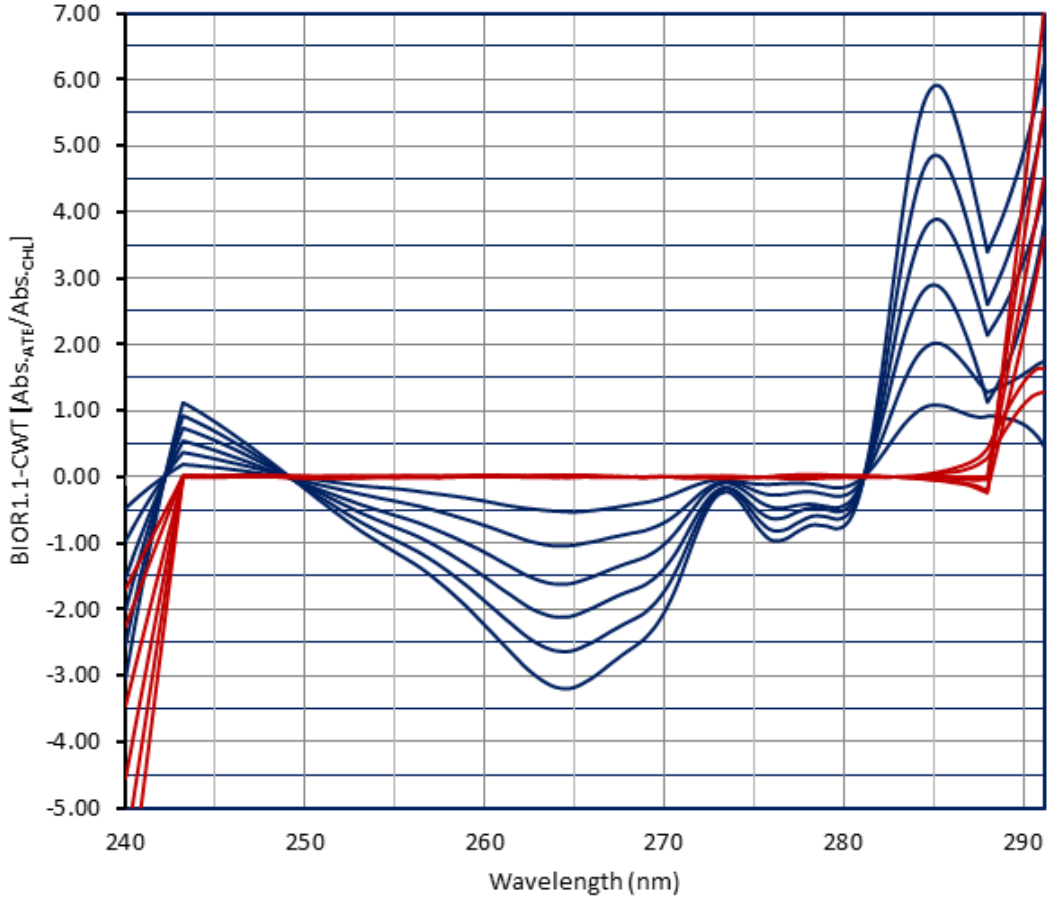


Şekil 3.10. ATE (20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) ve CHL (15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) bileşiklerinin Absorbans Oranları Spektrumları (80 $\mu\text{g/mL}$ ATE'e karşılık gelen standart absorpsiyon spektrumu bölücü olarak kullanıldı) (Çözücü:Metanol)

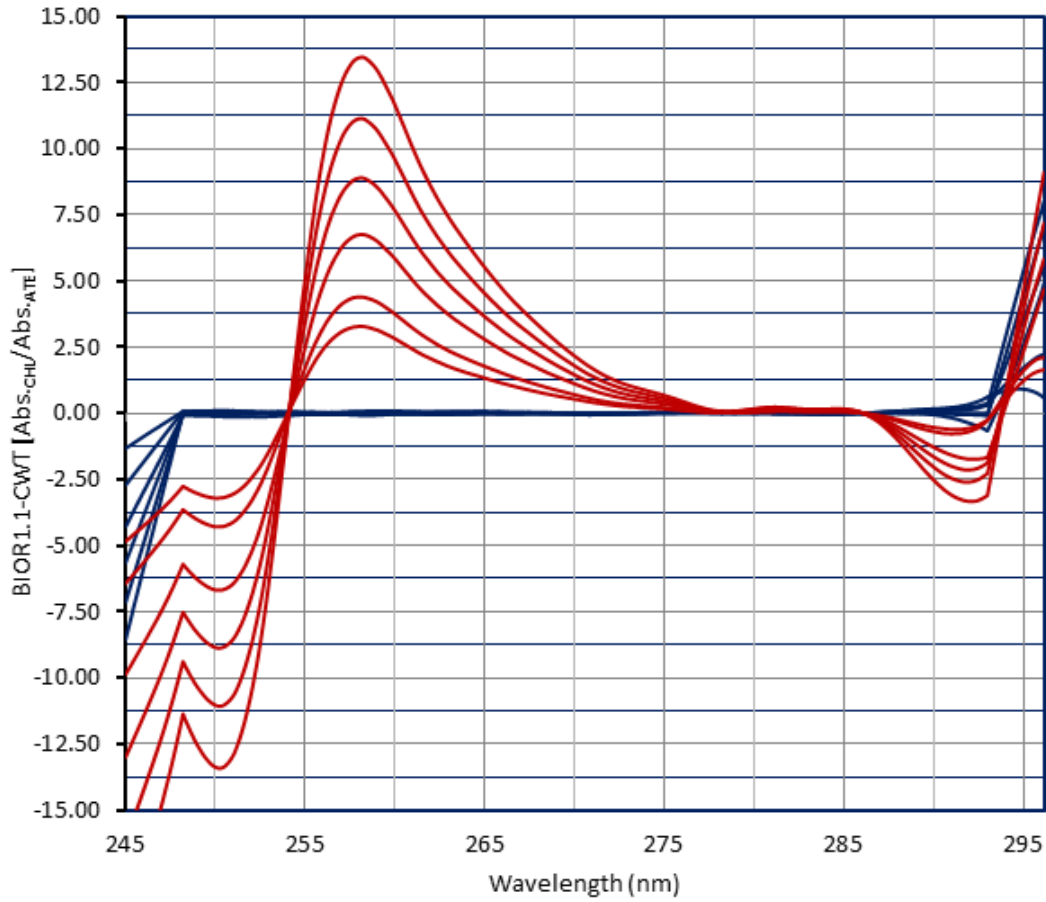
Şekil 3.9'daki ATE ve CHL bileşiklerinin ATE/CHL ve CHL/ATE oran spektrumlarının elde edilmesinde olduğu gibi ATE için 20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$ ve CHL için 15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralıklarına orijinal absorpsiyon spektrumları 80.0 $\mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen ATE'nin standart spektrumu bölücü olarak kullanılarak şekil 3.10'daki ATE/CHL ve CHL/ATE oran spektrumları kaydedilerek saklandı.

Çalışmada kalibrasyon grafiklerini elde etmek için ATE ve CHL bileşiklerinin ATE/CHL ve CHL/ATE oran spektrumlarına ait sinyalleri işlemek için herbir konsantrasyon değeri için bilgisayar hafızasından tekrar çağrılarak absorbans verilerinin vektörleri olarak *Microsoft Excel*'e aktarıldı ve 240-290 nm dalga boyu aralığında 1024

noktadan oluşan ATE/ATE ve CHL/ATE oranlarında sinyal değerlerine ait veriler dizisi seçildi ve dalgacık alanına taşındı.



Şekil 3.11. ATE (20.0-120.0 µg/mL) (—) ve CHL (15.0-60.0 µg/mL) (—) bileşiklerinin ; ATE/CHL spektrum oranları bior 1.1-SDD (SO-bior 1.1-SDD) Spektrumları (Çözücü: Metanol). (Kırmızı çizgiyle belirtilen sinyaller CHL/CHL oran spektrumlarından elde edilen spektrum oranları bior 1.1-SDD (SO-bior 1.1-SDD) spektrumlarıdır.)



Şekil 3.12. ATE (20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) ve CHL (15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) bileşiklerinin; CHL/ATE spektrum oranları bior 1.1-SDD (SO-bior 1.1-SDD) Spektrumları (Çözücü:Metanol). (Mavi çizgiyle belirtilen sinyaller ATE/ATE oran spektrumlarından elde edilen spektrum oranları bior 1.1-SDD (SO-bior 1.1-SDD) spektrumlarıdır.)

Çalışmalarda ATE-CHL karışımlarının analizi için optimal koşullarda ATE/CHL ve CHL/ATE oran spektrumlarının SDD yöntemi ile işlenebilmesi için çeşitli dalgacık (wavelet) ailesi test edildi. Bu test işleminin sonucunda Biortogonal 1.1 sürekli dalgacık dönüşümünün (bior 1.1-SDD) uygun olduğu saptandı. Dolayısıyla kalibrasyon ve numune çözeltilerinin ATE/CHL ve CHL/ATE oran spektrumlarının dönüşümü için Bior 1.1-SDD yöntemi kullanıldı.

Analiz işlemlerinde kalibrasyon numunelerinin ATE/CHL ve CHL/ATE oran spektrumları bior 1.1-SDD yöntemi optimal aile olarak 240.0-295.0 nm dalga boyu bölgesinde 2^{10} değerine karşılık gelen 1024 noktada kalibrasyon oran spektrumlarına uygulandı. Spektrum oranları bior 1.1-SDD spektrumları, dalgacık dönüşüm katsayılarının ($C_{a,b}$) dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edildi (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12).

Çalışmada SO-bior 1.1-SDD yöntemiyle ATE ve CHL bileşiklerinin analizi için doğrusal regresyon denklemleri, kalibrasyon çözeltileri kullanılarak ATE için 263.4 nm deki CHL için 252.3 nm'deki SO-bior 1.1-SDD genlikleri ölçülerek hesaplandı. Bu iki dalga boyundaki doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları Çizelge 3.9.'da verilmektedir.

Çizelge 3.9. SO-bior 1.1-SDD yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

Kalibrasyon Parametreleri	Bior 1.1-SDD	
	ATE	CHL
λ (nm)	263.4	252.3
Kon. Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	20.0-120.0	15.0-60.0
M	-2.60×10^{-2}	2.16×10^{-1}
N	1.35×10^{-3}	-5.87×10^{-2}
R	0.9998	1.0000
SH(m)	2.60×10^{-4}	8.13×10^{-4}
SH(n)	1.03×10^{-2}	3.19×10^{-2}
SH(r)	2.18×10^{-2}	3.17×10^{-2}
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	2.90	1.09
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	9.67	3.62

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

Çizelge 3.9 daki regresyon analizine göre hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak numunelerin içindeki ATE ve CHL miktarları hesaplandı.

3.3.3.Kemometrik SO-bior 1.1-SDD Yönteminin Validasyonu

Validasyon çalışmalarımızda, SO-bior-1.1-SDD sinyal işleme yönteminin geçerliliği için işlemi için metanol içerisinde ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışımı içeren çözeltilerden ibaret olan bir validasyon numune seti hazırlandı. Bu numune validasyon seti kullanılarak daha önce hesaplanan bior 1.1-SDD sinyal işleme yönteminin kesinliği ve doğruluğu test edildi. SO-bior 1.1-SDD yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10 da sunulmaktadır. Geri kazanım değerleri, ATE için % 100.8, CHL için % 99.2 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri, ATE için % 1.98 ve CHL için % 1.36 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.10 SO-bior 1.1-SDD yönteminin ATE-CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	İkili Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri Kazanım (%)	
	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
1	100	15	98.7	14.8	98.7	98.9
2	100	20	100.8	19.3	100.8	96.5
3	100	30	100.5	29.5	100.5	98.5
4	100	40	100.5	39.1	100.5	97.7
5	100	50	99.3	49.2	99.3	98.4
6	100	60	101.8	59.8	101.8	99.6
7	20	25	21.4	25.3	106.9	101.3
8	40	25	39.9	25.2	99.7	100.9
9	60	25	60.1	24.7	100.1	98.7
10	80	25	80.6	25.0	100.8	100.1
11	100	25	100.3	24.8	100.3	99.1
12	120	25	120.0	25.2	100.0	100.8
				\bar{X}	100.8	99.2
				SS	2.00	1.35
				BSS	1.98	1.36

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

Diğer bir validasyon işlemi olarak SO-bior 1.1-SDD yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analiz çalışmaları yapıldı. Bu çalışmada, doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda ATE için (20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL) ve CHL için (15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL) her derişim için 6 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Gün içi ve günler arası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. SO-bior 1.1-SDD yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	21.04	15.39	0.48	0.34	2.27	2.24	5.18	2.63	105.2	102.6
60.0	40.0	61.48	41.58	0.58	0.22	0.95	0.54	2.47	3.95	102.5	103.9
120.0	60.0	120.82	61.99	0.74	0.54	0.61	0.87	0.69	3.31	100.7	103.3

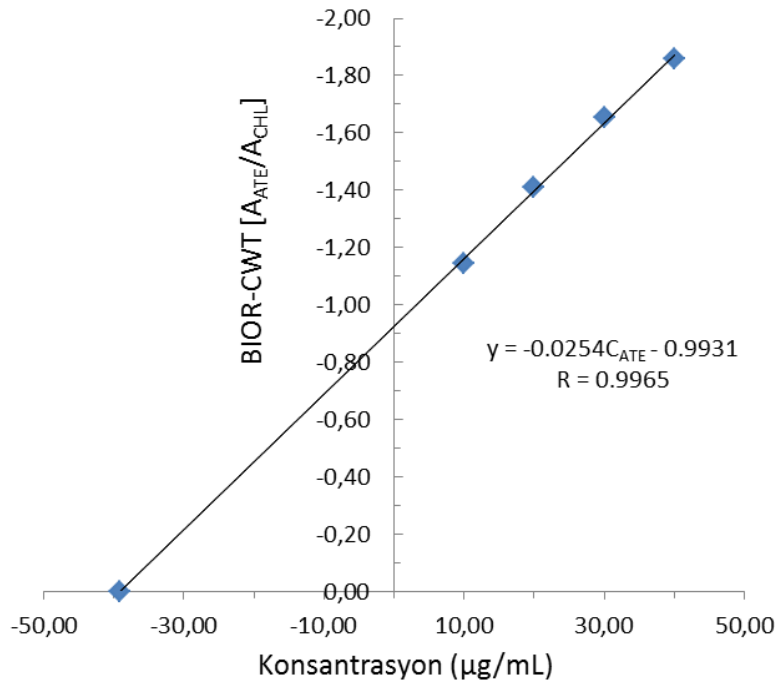
Günler arası (n=6)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	20.69	15.61	0.37	0.30	1.81	1.95	3.47	4.05	103.5	104.0
60.0	40.0	61.27	41.70	0.93	0.31	1.52	0.73	2.12	4.26	102.1	104.3
120.0	60.0	120.24	62.11	0.60	0.54	0.50	0.87	0.20	3.52	100.2	103.5

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

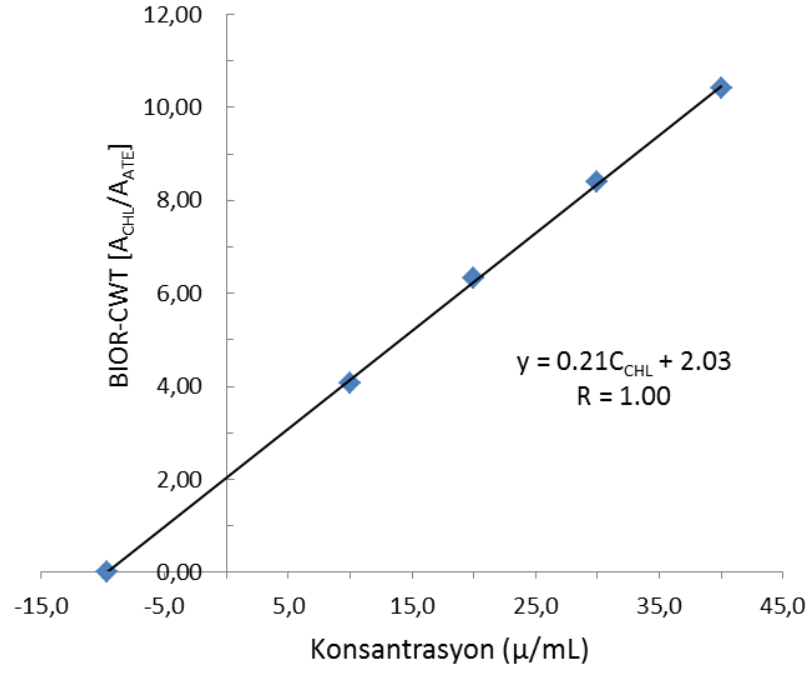
GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = % Bağıl Standart Sapma

Tez kapsamında önerilen SO-bior-1.1-SDD sinyal işleme yöntemi gerçek ticari farmasötik tabletleme uygulamadan önce, ATE ve CHL bileşiklerinin SO-bior- 1.1-SDD yöntemiyle analizi üzerine tablet yardımcı maddelerinin girişim etkisi olup olmadığı test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 100.0 µg/mL ATE ve 25.0 µg/mL CHL'ye karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL ATE ve 15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL CHL olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Tenoretic®** Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen ATE ve CHL miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar içindeki ATE ve CHL için

geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde herbiri için üç tekrar yapılarak geręekleřtirildi. Standart ilavesi tekniğinde SO-bior-1.1-SDD yönteminin uygulamasında tablet içerisindeki ATE için x-eksenini kestiği nokta 39.10 µg/mL konsantrasyonuna (Şekil 3.13); CHL için x-ekseni kestiği nokta 9.67 µg/mL konsantrasyonuna (Şekil 3.14) karşılık gelmektedir.



Şekil 3.13. Standart ilavesi tekniğinde 20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL ATE konsantrasyonları için SO-bior 1.1-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği



Şekil 3.14. Standart ilavesi tekniğinde 15,0, 40,0 ve 60,0 µg/mL CHL konsantrasyonları için SO-bior 1.1-SDD genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği

3.3.4. SO-bior 1.1-SDD Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada SO-bior 1.1-SDD sinyal işleme yönteminin farmasötik preparata uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balon jodede metanol içerisinde çözüldü. Balon jodedeki çözelti mekanik bir karıştırıcı ile yaklaşık 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0.45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 240.0-290.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.05 \text{ nm}$ aralıklarla çizdirilen absorpsiyon spektrumlarından 240.0-290.0 nm dalga boyu aralığında elde edilen ATE/CHL ve CHL/ATE şeklindeki oran spektrumlarına SO-bior 1.1-SDD yöntemi uygulandı. SO-bior 1.1-SDD spektrumlarından ATE 263.4 nm deki CHL için 252.3 nm'deki SDD genlikleri ölçülerek kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki ATE ve CHL miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **Tenoretic[®]** Tablet preparatına uygulandı. **Tenoretic[®]** Tablet sonuçları çizelge 3.12 de sunuldu.

Çizelge 3.12. SO-bior 1.1-SDD yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat, etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL /Tablet)

No.	mg/tablet	
	ATE	CHL
1	97.0	25.2
2	97.4	25.3
3	102.0	25.9
4	102.0	24.5
5	100.4	25.4
6	100.2	25.2
7	99.6	25.4
8	100.2	24.9
9	97.6	24.6
10	97.8	25.4
\bar{X}	99.4	25.2
SS	1.87	0.42
BSS	1.88	1.65
SH	0.59	0.13
GA (p=0.05)	99.40 ± 1.34	25.20 ± 0.30

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

3.4. Karşılaştırma Yöntemi

3.4.1. Türev Spektrofotometrisi (Karşılaştırma Yöntemi)

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

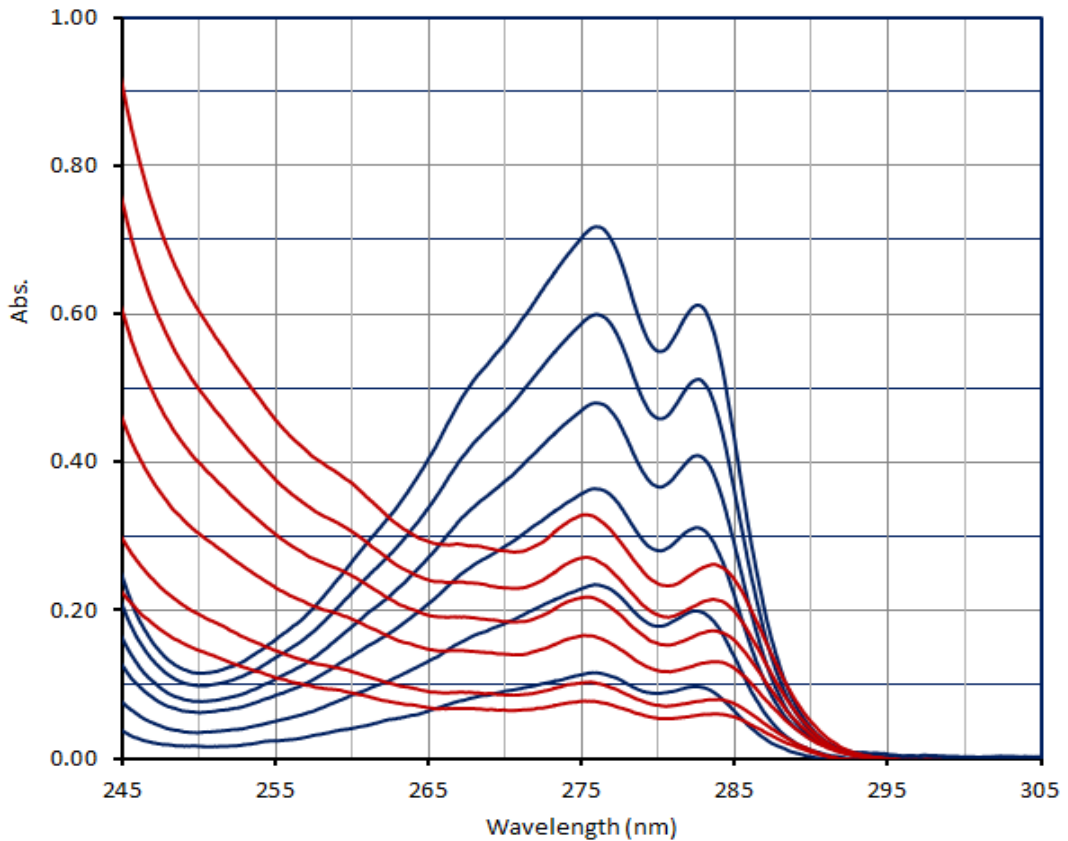
3.4.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

- a) Metanol çözeltisi içinde ATE ve CHL'nin sırasıyla 200 µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlu stok çözeltileri hazırlandı.
- b) ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.
- c) ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 12 değişik konsantrasyonlarda yapay karışımlardan oluşan validasyon seti hazırlandı.

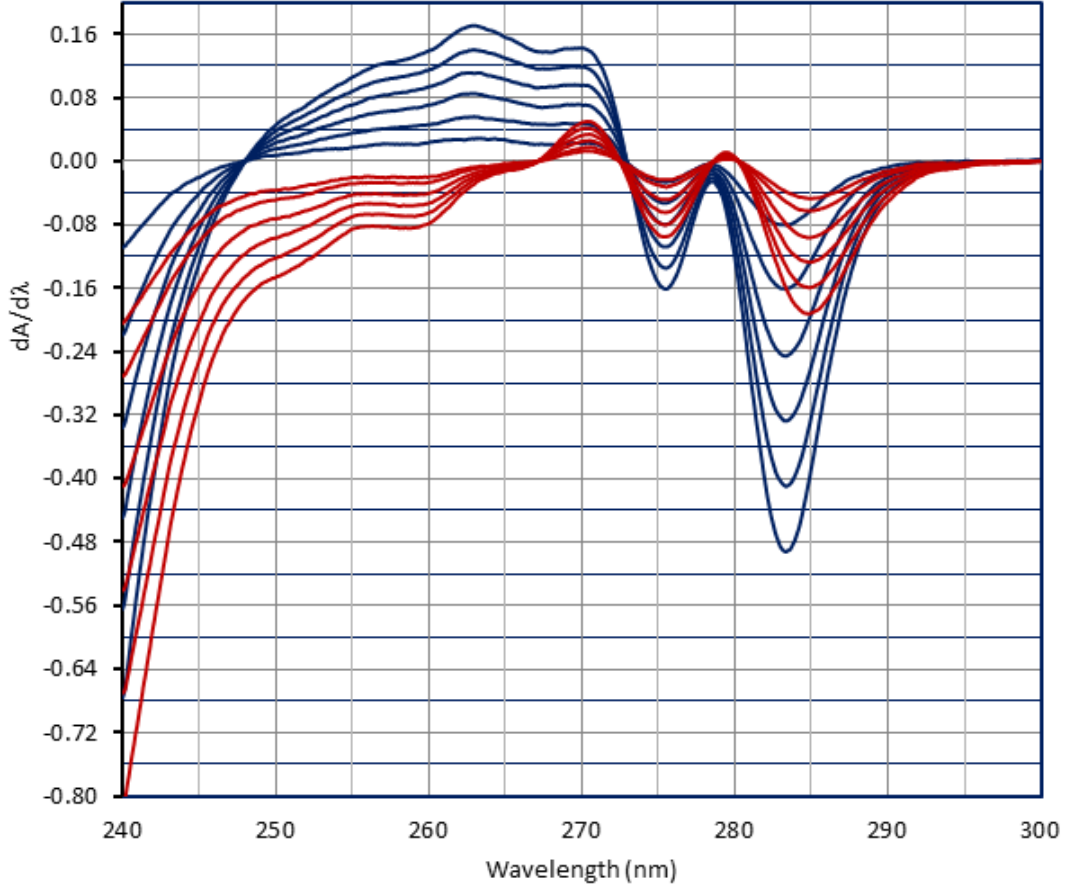
3.4.1.2. Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması

Tez kapsamında türev yönteminin uygulamasında, ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin 245.0-305.0 nm dalga boyu aralığında spektrumları çizdirildi ve bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.15'de orijinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Analiz edilen ATE ve CHL bileşiklerinin absorpsiyon spektrumlarının

birden dörde kadar değişik $\Delta\lambda$ aralıkları, değişik skala faktörleri ve değişik $\Delta\lambda$ aralıklarla düzeltirme fonksiyonları kullanımıyla türev spektrumları hesaplandı. Aynı spektral işlemler yapay ve farmasötik preparatlar için de gerçekleştirildi. Bu denemelerden sonra, skala faktörü 16 olan her iki bileşiğin absorpsiyon spektrumlarının $\Delta\lambda=16$ nm aralıkları ile birinci dereceden türevlerinin analiz için uygun olduğu elde edilen % geri kazanım değerlerinden saptandı. Bu birinci türev spektrumları, $\Delta\lambda=16$ nm aralıklarla 321 noktada düzleştirildi. Şekil.3.16, ATE için 20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$ ve CHL için 15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$ doğrusal çalışma aralığında her iki bileşiğin birinci dereceden türev spektrumlarını göstermektedir. Kalibrasyon grafikleri, ATE için 265.9 nm'de ve CHL için 248.0 nm'de $dA/d\lambda$ değerlerinin ölçümüyle elde edildi. Doğrusal regresyon analizi için istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.13. de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. ATE (20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) ve CHL (15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$) (—) bileşiklerinin; Absorbans Spektrumları (Çözücü:Metanol)



Şekil 3.16. ATE için 20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$ (—) ve CHL için 15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$ (—) konsantrasyon aralığında; Birinci türev spektrumları ($\Delta\lambda= 16$ nm aralıklarla ve skala faktörü = 16)

Çizelge 3.13 Türev spektrofotometri yöntemiyle ATE ve CHL kalibrasyonu için regresyon analiz sonuçları

	ATE	CHL
λ (nm)	265.9	248.0
Kon. Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	20.0-120.0	15.0-60.0
M	1.24×10^{-3}	-2.90×10^{-3}
N	-9.71×10^{-4}	-5.37×10^{-4}
R	0.9999	0.9999
SH(m)	6.32×10^{-6}	1.92×10^{-5}
SH(n)	4.93×10^{-4}	7.51×10^{-4}
SH(r)	5.29×10^{-4}	7.47×10^{-4}
LOD	2.91	1.90
LOQ	9.70	6.34

m = Regresyon denkleminin eğimi,

n = Regresyon denkleminin kesim noktası,

r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı,

SH(m) = Eğimin standart hatası,

SE(n) = kesim noktasının standart hatası,

SH(r) = Korelasyon katsayısının standart hatası,

LOD = Yakalama sınırı,

LOQ = Tayin sınırı

3.4.1.3. Türev Spektrofotometri Yönteminin Validasyonu

Türev spektrofotometri yönteminin validasyon işlemi için metanol çözeltisi içerisinde ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 12 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak kurulan türev yöntemi kalibrasyonunun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Türev yöntemi kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.19. de gösterildi. Geri kazanım değerleri ATE için % 99.2, CHL için % 97.7 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri ATE için % 1.62 ve CHL için % 1.87 olarak hesaplandı. (Çizelge 3.14)

Çizelge 3.14. Türev spektrofotometri yönteminin ATE-CHL ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

No.	Karışımlar($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan($\mu\text{g/mL}$)		Geri Kazanım (%)	
	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
1	100	15	96.4	15.1	96.4	100.9
2	100	20	97.3	19.1	97.3	95.4
3	100	30	97.6	29.7	97.5	98.9
4	100	40	99.6	39.5	99.6	98.7
5	100	50	100.4	48.6	100.3	97.1
6	100	60	100.1	59.2	100.1	98.6
7	20	25	19.9	25.0	99.3	99.8
8	40	25	41.0	24.2	102.5	96.9
9	60	25	59.2	23.7	98.7	94.7
10	80	25	80.4	24.1	100.5	96.4
11	100	25	100.0	23.9	100.0	95.8
12	120	25	118.0	24.8	98.4	99.0
				\bar{X}	99.2	97.7
				SS	1.61	1.82
				BSS	1.62	1.87

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

Çalışmada diğer bir validasyon işlemi olarak türev yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası analiz çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (ATE için 20.0, 60.0 ve 120.0 $\mu\text{g/mL}$ ve CHL için 15.0, 40.0 ve 60.0 $\mu\text{g/mL}$) her derişim için 5 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.15 da gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. Türev yöntemiyle ATE ve CHL analizinde kesinlik ve doğruluk sonuçları

Gün içi (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	20.56	15.84	0.45	0.37	2.18	2.35	2.80	5.62	102.8	105.6
60.0	40.0	61.16	40.11	0.32	0.29	0.53	0.73	1.93	0.28	101.9	100.3
120.0	60.0	119.83	60.33	0.62	0.47	0.52	0.78	-0.14	0.55	99.9	100.5

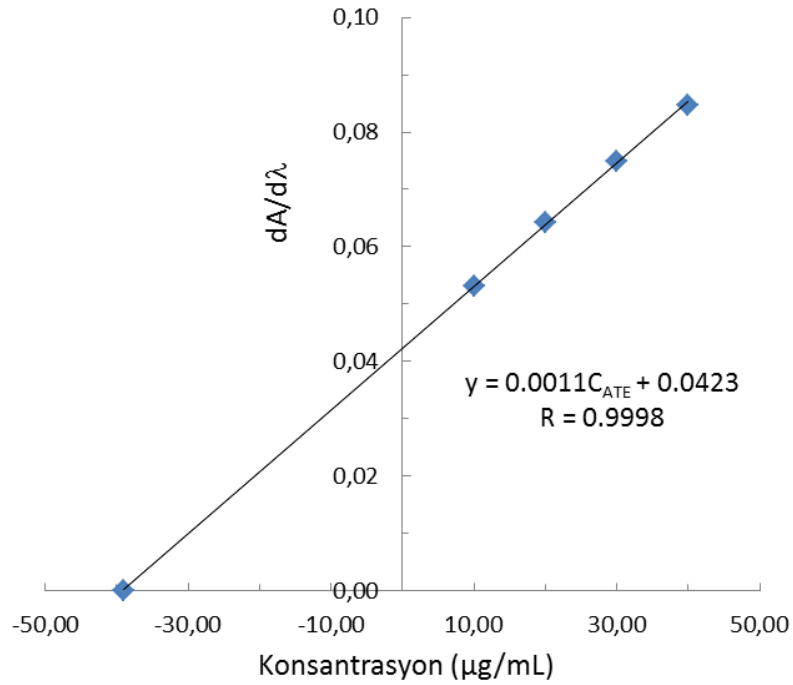
Günler arası (n=5)											
İlave edilen		Bulunan		SS		BSS (%)		BH (%)		Geri Kazanım (%)	
ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
20.0	15.0	20.13	15.74	1.65	0.41	8.21	2.57	0.66	4.93	100.7	104.9
60.0	40.0	60.16	40.55	0.32	0.54	0.54	1.34	0.27	1.38	100.3	101.4
120.0	60.0	121.82	60.53	0.45	0.61	0.37	1.01	1.52	0.88	101.5	100.9

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

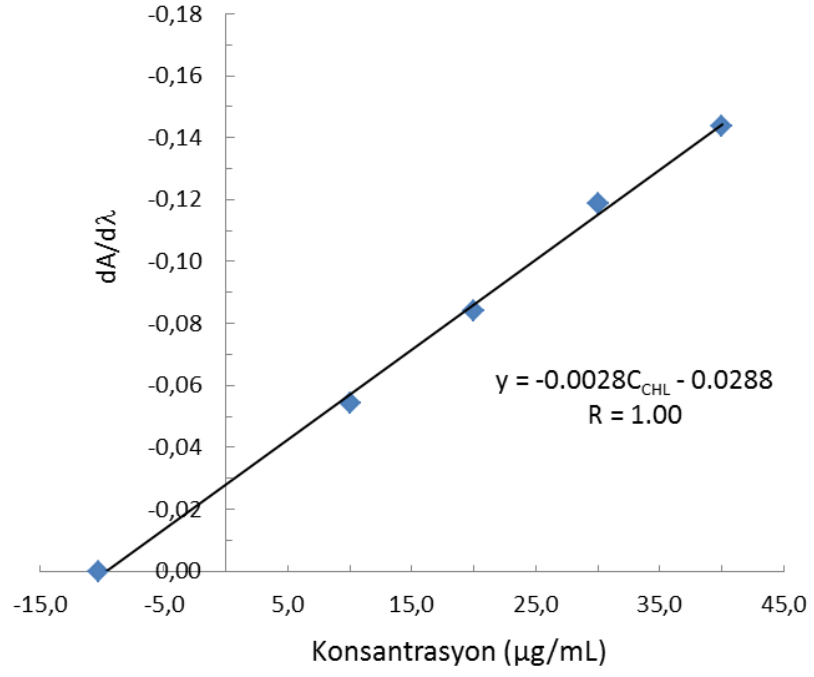
GK = Geri Kazanım, SS = Standart Sapma, BSS = % Bağıl Standart Sapma

Bu tez çalışmasında karşılaştırma yöntemi olarak geliştirilen türev yöntemini ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce ATE ve CHL içeren tabletlerde, tablet yardımcı maddelerinin analiz üzerinde bir etkisinin olup olmadığı türev yöntemi için test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 100.0 µg/mL ATE ve 25.0 µg/mL CHL'ye karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 20.0, 60.0 ve 120.0 µg/mL ATE ve 15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL CHL olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **Tenoretic®**

Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen ATE ve CHL miktarları kalibrasyondan hesaplanıp düşülerek ilave edilen standartlar ATE ve CHL için geri kazanım değerleri bulundu ve diğer istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi. türev yönteminin tablete uygulamasında ATE için x-ksenini kestiği nokta 39.00 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna (Şekil 3.17); CHL için e x-ksenini kestiği nokta 10.29 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna (Şekil 3.18) karşılık gelmektedir.



Şekil 3.17. Standart ilavesi tekniği ile 20.0, 60.0 ve 120.0 $\mu\text{g/mL}$ ATE konsantrasyonları için türev genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği



Şekil 3.18. Standart ilavesi tekniği ile 15.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL CHL konsantrasyonları için türev genliklerine karşı çizdirildiğinde elde edilen doğrunun grafiği

3.4.1.4. Türev Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Karşılaştırma türev yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balon jodede metanol içerisinde çözüldü. Balon jodedeki çözelti mekanik bir karıştırıcı ile yaklaşık 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi=0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Bu analiz çözeltilerinin 240.0-290.0 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda=0.05$ nm aralıklarla çizdirilen spektrumlarından 240.0-290.0 nm dalga boyu aralığında ölçülen absorbans değerlerine türev yöntemi uygulandı. Türev spektrumlarından ATE için 265.9 nm deki ve CHL için 248.0 nm'deki türev genlikleri ölçülerek kalibrasyon grafiklerinde yerine konularak tablet içeriğindeki ATE ve CHL miktarları hesaplandı. Bu işlem 10 kez tekrar edildi.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **Tenoretic[®]** Tablet preparatına uygulandı. **Tenoretic[®]** Tablet sonuçları çizelge 3.16 da sunuldu.

Çizelge 3.16. Türev yönteminin tablet numunelerine uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları (Ticari farmasötik preparat etiketindeki miktarlar : 100.0 mg ATE ve 25.0 mg CHL /Tablet)

No.	mg/tablet	
	ATE	CHL
1	100.9	25.1
2	97.7	25.2
3	100.6	25.6
4	99.6	25.6
5	101.7	26.4
6	100.6	26.5
7	100.0	25.4
8	102.4	25.1
9	101.3	25.3
10	101.2	25.5
\bar{X}	100.6	25.6
SS	1.30	0.50
BSS	1.29	1.95
SH	0.41	0.16
GA (p=0.05)	100.60 ± 0.93	25.60 ± 0.36

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

4. TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tezi kapsamında bir antihipertansif kombine tablet preparatı içerisindeki ATE ve CHL'nin kantitatif analizleri için Coif5-SDD, mexh-SDD ve spektrum oranlar bior 1.1-SDD (SO-bior 1.1-SDD) yöntemleri geliştirildi. Bu önerilen kemometrik sinyal işleme yöntemlerinin sonuçları, türev spektrofotometresi yöntemiyle karşılaştırıldı.

Dalgacık dönüşüm yöntemleri, standart çözeltilerin UV spektrumlarının veya oran spektrumlarının SDD işleminden sonra standart kalibrasyon çözeltilerinin, SDD spektrumlarının sıfır kesim noktalarına karşılık gelen SDD sinyal genlikleri arasındaki ilişkiye dayalı olarak doğrusal regresyon analizi uygulanarak kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesine dayanmaktadır. Numune içeriğindeki ATE ve CHL bileşiklerinin analizi işleminde de numunelerin UV spektrumlarına kalibrasyon şartlarında SDD dönüşümü uygulandıktan sonra kalibrasyon denklemleri kullanılarak numune içeriği analiz edildi.

Analiz çalışmasında kemometrik sinyal işleme yöntemlerinin uygulamasında optimal deneysel ve spektral koşullar belirlendi. Spektral çalışmalarda metanol çözücü sistem olarak seçildi. Analizlerde ATE ve CHL bileşiklerinin, ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltilerinin ve numunelerin, 240.0-305.0 nm dalga boyu aralığında orijinal absorpsiyon spektrumları $\Delta\lambda=0.05$ nm aralıklar ile kaydedildi. Bu orijinal spektrumların dönüştürülmesinde optimal dalgacık (Wavelet) ailesini (family) saptamak için birçok değişik dalgacık ailesi test edildi. Burada ancak ATE-CHL karışımının analizi için orijinal spektrumların dönüşümünde coif5 ve mexh'in uygun olduğu ATE/CHL ve CHL/ATE oran spektrumlarının dönüşümünde ise bior1.1 dalgacık ailesinin uygun olduğu belirlendi.

Optimal sürekli dalgacık dönüşümlerinin (coif5 ve mexh) saptanmasının ardından; coif5-SDD metodunda ATE için 20.0-120.0 µg/mL ve CHL için 15.0-60.0

$\mu\text{g/mL}$ doğrusal çalışma aralığında standart kalibrasyon serileri hazırlandı ve bileşiklerin bu standart serilerinin 245.0-305.0 nm dalga boyu aralığında ultraviyole (UV) spektrumları çizdirildi (Şekil 3.1). Aynı spektral koşullarda validasyon ve numune çözeltilerinin spektrumları da çizdirildi. Sinyal analiz yönteminin uygulanmasında ATE ve CHL bileşiklerinin standart kalibrasyon serilerinin, validasyon ve numuneleri 245.0 – 295.0 nm dalga boyu aralığında $2^{10} = 1024$ elemanlı absorbans verilerinden oluşan spektral vektörler coif5-SDD yöntemi ile işlendikten sonra Şekil 3.2 deki coif5-SDD spektrumları elde edildi. coif5-SDD spektrumları kullanılarak ATE için 284.60 nm de ve CHL için 260.0 nm de SDD-sinyalleri ölçülerek her iki bileşik için regresyon analiziyle doğru denklemleri hesaplandı (Çizelge 3.1). mexh-SDD metodunda ATE için 20.0-120.0 $\mu\text{g/mL}$ ve CHL için 15.0-60.0 $\mu\text{g/mL}$ doğrusal çalışma aralığında standart kalibrasyon serileri hazırlandı ve bileşiklerin bu standart serilerinin 240.0-305.0 nm dalga boyu aralığında ultraviyole (UV) spektrumları çizdirildi (Şekil 3.5). Aynı spektral koşullarda validasyon ve numune çözeltilerinin spektrumları da çizdirildi. Sinyal analiz yönteminin uygulanmasında ATE ve CHL bileşiklerinin standart kalibrasyon serilerinin, validasyon ve numuneleri 245.0-295.0 nm dalga boyu aralığında $2^{10} = 1024$ elemanlı absorbans verilerinden oluşan spektral vektörler mexh-SDD yöntemi ile işlendikten sonra Şekil 3.6 deki mexh-SDD spektrumları elde edildi. mexh-SDD spektrumları kullanılarak ATE için 271.6 nm'de ve CHL için 264.4 nm de SDD-sinyalleri ölçülerek her iki bileşik için regresyon analiziyle doğru denklemleri hesaplandı (Çizelge 3.5).

Tez içeriğinde geliştirilen sinyal işleme (coif5-SDD, mexh-SDD) yöntemlerinin ve spektrum oranları bior1.1-SDD yönteminin analitik validasyonu için çalışma aralığı içerisinde olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda ATE ve CHL içeren yapay karışımlardan oluşan validasyon seti, yine üç farklı konsantrasyon seviyesinde beş farklı tekrarla hazırlanan yapay karışımların gün içi ve günler arası analizi için geri kazanım çalışması yapıldı (sırasıyla, Çizelge 3.3, 3.7, 3.11). Bu yöntemlerle yapılan analizlerde numune içeriğinden gelen ATE ve CHL üzerine tablet yardımcı maddelerinin etkisinin olmadığı bulundu.

Geliştirilen yöntemlerin validasyonu ve uygulanabilirliği için yapılan geri kazanım sonuçları ve sonuçlara uygulanan istatistiksel testler (Çizelge 3.2, 3.6, 3.10)

yöntemlerin ATE ve CHL analizi için yüksek geri kazanım değerleriyle tatmin edici doğruluk ve kesinliğe sahip olduklarını ve analiz üzerine tablet yardımcı maddelerinin herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Sinyal işleme yöntemleri, ticari tablet formülasyonlarındaki ATE ve CHL bileşiklerinin aynı anda miktar tayinlerine hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulandı ve son derece tatmin edici sonuçlar alındı (Çizelge 3.4, 3.8, 3.12).

Bu tez çalışmasında önerilen kemometrik sinyal işleme yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla birinci türev spektrofotometresi yöntemi geliştirildi ve karışımlardaki ATE ve CHL'nin kantitatif analizi için kullanıldı.

Geliştirilen coif5-SDD, mexh-SDD ve SO-bior1.1-SDD sinyal işleme yönteminin validasyonu için uygulanan validasyon işlemleri, türev yöntemi için de gerçekleştirildi. Sonuçlar gün içi ve günler arası analizi için geri kazanım kesinlik ve doğruluk test sonuçları Çizelge 3.11 de sunuldu.

Geri kazanım çalışmalarında, coif5-SDD, mexh-SDD, bior 1.1-SDD ve türev yöntemlerin yapay karışımlara uygulamasında elde edilen ortalama % geri kazanım ve karşılık gelen bağıl standart sapma değerleri sırasıyla ATE için % 100.6, % 1.87 (coif5-SDD); % 100.6, % 1.23 (mexh-SDD); % 100.8, % 1.98 (SO-bior1.1-SDD); % 99.2, % 1.62 (TY) ve CHL için % 102.3, % 1.66 (coif5-SDD); % 103.7, % 1.21 (mexh-SDD); % 99.2, % 1.36 (SO-bior1.1-SDD); % 97.7, % 1.87 (TY) olarak bulundu. Yöntemler için gün içi ve günler arası ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri gün içinde ATE için % 106.9-% 101.7-% 99.1, % 4.47-% 1.28-% 1.10 (coif5-SDD); % 102.6-% 100.1-% 98.6, % 1.34-% 0.39-% 0.30 (mexh-SDD); % 105.2-% 102.5-% 100.7, % 2.27-% 0.95-% 0.61 (SO-bior1.1-SDD); % 102.8-%101.9-% 99.9, % 2.18-% 0.53-% 0.52 (TY) ve CHL için % 105.2-% 104.6-% 101.2, % 5.57-% 1.97-% 3.01 (coif5-SDD); %106.6-%101.6-% 102.4, % 1.73-% 0.39-% 1.90 (mexh-SDD); % 102.6-%103.9-% 103.3, % 2.24-% 0.54-% 0.87 (SO-bior1.1-SDD); % 105.6-% 100.3-% 100.5, % 2.35-% 0.73-% 0.78 (TY); günler arasında ATE için % 104.2-% 100.8-% 100.7, % 3.22-% 1.64-% 0.93 (coif-SDD); % 103.3-% 101.5-% 100.2, % 2.93-% 0.78-% 1.11 (mexh-SDD); % 103.5-% 102.1-% 100.2, % 1.81-% 1.52-% 0.50 (SO-bior1.1-SDD); % 100.7-% 100.3-% 101.5, % 8.21-% 0.54-% 0.37 (TY) ve CHL için % 102.5-% 104.8-%

102.3, % 4.51-% 1.14-% 1.58 (coif5-SDD); % 103.4-% 101.1-% 100.6, % 2.66-% 1.48-% 2.44 (mexh-SDD); % 104.0-% 104.3-% 103.5, % 1.95-% 0.73-% 0.87 (SO-bior1.1-SDD); % 104.9-% 101.4-% 100.9, % 2.57-% 1.34-% 1.01 (TY) olarak hesaplandı.

Analitik validasyon işleminden sonra yöntemler ticari tabletlerin analizine uygulandı ve tatmin edici sonuçlar elde edildi (Çizelge 3.4, 3.8, 3.12 ve 3.16). Geliştirilen coif5-SDD, mexh-SDD ve SO-bior 1.1-SDD yöntemleriyle ticari tabletlerdeki ATE ve CHL bileşiklerinin kantitatif analizinde karşılaştırma yöntemlerinin (türev) sonuçlarıyla karşılaştırılabilir sonuçlar elde edildi. Sinyal işleme yöntemleri ile ticari tabletlerin analizi için elde edilen sonuçları karşılaştırmak amacıyla t-testi uygulandı ve istatistiksel test sonuçları t -hesaplanan $<t$ -tablo ve p -değeri $>p=0.05$ olduğu için yöntemlerden elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.1 de sunuldu.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar, yeni geliştirilen sinyal işleme yöntemlerinin ATE ve CHL içeren ticari farmasötik tablet preparatların rutin analizlerinde ve kalite kontrolünde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.1. Ticari farmasötik preparatın analiz sonuçlarına t-testi uygulaması

	Coif5-SDD		mexh-SDD		SO-bior1.1-SDD		Türev spektrofotometri	
	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL	ATE	CHL
\bar{X}	99.3	25.2	99.4	25.8	99.4	25.2	100.6	25.6
SS	1.59	0.35	1.25	0.61	1.87	0.42	1.30	0.50
t -hesap	2.23	1.76	2.15	1.14	1.74	2.13	t -tablo = 2.26	
p -değeri	0.05	0.11	0.06	0.28	0.12	0.06	$p = 0.05$	

\bar{X} =Ortalama, SS=Standart Sapma

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

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

Bu yüksek lisans tez çalışmasında ATE ve CHL bileşiklerini içeren bir ticari farmasötik preparatın kantitatif analizi için yeni, hızlı, kolay uygulanabilir ve güvenli sonuçlar veren yöntemler geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amacı gerçekleştirmek amacıyla, ATE-CHL karışımın analizi için kemometrik coif5, mexh ve bior1.1 yöntemleri geliştirildi. Ayrıca tez kapsamında coif5, mexh ve bior1.1 yöntemleriyle elde edilen sonuçları karşılaştırmak amacıyla türev spektrofometri yöntemi uygulandı.

Tez kapsamında geliştirilen ve başarılı bir şekilde ATE ve CHL içeren tabletlerin analizine uygulanan kemometrik sinyal işleme yöntemleriyle son derece başarılı sonuçlar elde edildi. Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemler, analiz işlemlerinde son derece hızlı, kolay uygulanabilir olup, güvenilir ve ekonomiktir. Kemometrik coif5, mexh ve bior1.1 yöntemleri, kromatografik yöntemlerle karşılaştırıldığında yukarıda sayılan avantajların yanında herhangi bir ön ayırma işlemi kullanmaksızın kombine preparatların analizi için karşılaştırılabilir sonuçlar sağlaması bakımından da avantajlıdır.

Tez kapsamında ATE ve CHL miktar tayinleri için geliştirilen bu kemometrik yöntemleri, türev spektrofometri yöntemi kullanılarak sonuçlar karşılaştırıldı. Kemometrik sinyal işleme yöntemleriyle ATE ve CHL için elde edilen sonuçların türev

spektrofotometri sonuçlarıyla karşılaştırılması için t-tesisi uygulandı ve sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Çizelge 4.1). Bu tez çalışmasında deneysel koşulları ve kemometrik parametreleri optimize edilen yöntemleri, daha sonraki bilimsel araştırmalarda ve ilaç endüstrisinde ATE ve CHL bileşiklerinin kalite kontrol ve rutin analizi için kullanılabilmesi bakımından tez çalışmasını orijinal kılmaktadır.

ÖZET

Atenolol/Klortalidon İçeren Kombine Ticari Farmasötik Preparatın Kemometrik Sürekli Dalgacık Dönüşüm Yöntemleri ile Kantitatif Analizi

Bu tezin amacı ATE ve CHL içeren yapay karışımların ve ticari farmasötik tablet numunelerinin aynı anda kantitatif analizi için yeni kemometrik sürekli dalgacık dönüşüm yöntemleri geliştirmektir. Ek olarak, tez kapsamında yeni geliştirilen sinyal işleme yöntemleriyle; türev spektrofotometrisi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıdır.

Bu bağlamda, birkaç ayrı dalgacık türüne ATE ve CHL'den en iyi geri kazanım tayinini elde etmek amacıyla optimal sürekli dalgacık transfer yaklaşım testi uygulanmıştır. Bunun sonucu olarak; sürekli dalgacık türü analiz metodu ile belirlenen sinyaller olarak bulunmuştur.

Kalibrasyon grafikleri coif5-SDD, mexh-SDD ve SO-bior1.1-SDD genlikleri ve konsantrasyon (ATE için 20.0 – 120.0 µg/mL ve CHL için 15.0 – 60.0 µg/mL konsantrasyon aralığında) arasındaki matematiksel ilişkiye doğrusal regresyon analizi uygulanarak elde edildi.

Geliştirilen coif5-SDD, mexh-SDD, SO-bior1.1-SDD ve türev yöntemlerinin doğruluğu aşağıdaki parametreler kullanılarak gösterilmiştir. Bunlar, geri kazanım çalışması, günüçi ve günler arası çalışmasıdır.

Örneğin, coif5-SDD metodu uygulamasıyla yüzde olarak geri kazanım ve bağlı standart sapma ATE için % 100.6 ile % 1.87, CHL için % 102.3 ile % 1.66 olarak elde edilmiştir; mexh-SDD metodunda ATE için geri kazanım % 100.6, standart sapması % 1.23 ve CHL için geri kazanım % 103.7 ve standart sapması % 1.21 olarak bulunmuş; SO-bior1.1-SDD metodunda ATE için geri kazanım % 100.8, standart sapması % 1.98 ve CHL için geri kazanım % 99.2 ve standart sapması % 1.36 olarak bulunmuş ve türev metodunda ATE için geri kazanım % 99.2, standart sapması % 1.62 ve CHL için geri kazanım % 97.7 ve standart sapması % 1.87 olarak bulunmuştur.

Buna ilave olarak ATE – CHL karışımları için gün içi, günler arası analizleri ve türev yöntemini içeren uygulamalardan memnun edici sonuçlar alınmıştır.

Geliştirilen coif5-SDD, mexh-SDD, SO-bior1.1-SDD ve Türev metodlarının tümü, ATE ve CHL'nin ticari tabletlerde eş zamanlı olarak tayinleri için başarıyla uygulanmıştır ve tüm metodlardan elde edilen sonuçlarda, iyi bir kabul edilebilirlik mevcuttur.

Anahtar Kelimeler : Atenolol; İkili karışım; Kantitatif Analiz, Kemometrik sürekli dalgacık dönüşüm yöntemi; Klortalidon.

SUMMARY

Quantitative Analysis of Commercial Pharmaceutical Preparation Containing Atenolol and Chlortalidone by Continuous Wavelet Transform Methods

In this thesis, new signal processing methods named continuous wavelets transforms were developed for the simultaneous quantitative evaluation of ATE and CHL compounds in a commercial pharmaceutical formulation. For a comparison, first derivative spectrophotometry was used for the analysis of the commercial tablets containing ATE and CHL drugs.

In this study, several wavelet families at different scaling factors were tested to select suitable families giving the highest recovery results of the analysis of ATE and CHL. As a result of these tests the application of coiflets 5 continuous wavelet transform (coif5-CWT) and Mexican hat continuous wavelet transform (mexh-CWT) to the UV absorption spectra of the related compounds were found to be optimal ones. On the other hand, the use of biorthogonal 1.1 continuous wavelet transform (RS-bior1.1-CWT) to the ratio spectra (RS) of this spectra provided us the optimal signal processing to reach desirable recovery results of the analyzed compounds.

Calibration equations were obtained by applying the linear regression analysis to the relationship between coif5-CWT, mexh-CWT and bior1.1-CWT amplitudes and concentration for ATE and CHL in the range of 20.0 – 120.0 µg/mL for ATE and 15.0 – 60.0 µg/mL for CHL, respectively.

The validity of the proposed chemometric signal processing methods were performed by using the recovery studies, intra-day and inter-day analyses and standard addition technique. In the recovery study, percent mean recoveries with relative standard deviations obtained by applications of coif5-CWT method were found as 100.6 % with 1.87 % for ATE and 102.3 % with 1.66 % for CHL; for mexh-CWT methods were found as 100.6 % with 1.23 % for ATE and 103.7 % with 1.21 % for CHL; for bior1.1-CWT methods were found as 100.8 % with 1.98 % for ATE and 99.2 % with 1.36 % for CHL.

In the case of intra-day and inter-day analysis and standard addition technique, the mentioned methods gave us the satisfactory results for the analysis of the ATE – CHL mixtures.

The analysis results provided by the proposed CWT signal processing methods (coif5-CWT, mexh-CWT and RS-bior1.1-CWT) were statistically compared with those obtained from first derivative spectrophotometry.

The proposed coif5-SDD, mexh-SDD and SO-bior1.1 methods were successfully applied to the simultaneous quantitative estimation of ATE and CHL in commercial tablets and a good agreement was observed.

Key Words: Atenolol; Binary mixture; Chemometric continuous wavelet transform methods; Chlortalidone; Quantitative Analysis.

KAYNAKLAR

- ABREU L, CASTRO S, PEDRAZZOLI J. (2003). Atenolol Quantification in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography: Application to Bioequivalence Study, *AAPS Pharma Sciences* 5 (2): Article 21
- ANAL BIOANAL CHEM (2003) 377: 1159-1164, DOI 10.1007/s00216-003-2185-6.
- AFKAMI, A., Madrakina, T., & Ababsi-Tarighat, Simultaneous determination of calcium, magnesium and zinc in different foodstuffs and pharmaceutical samples with continuous wavelet transform, *Food Chemistry*, 109, 660-669, 2008
- CORNELL J.A. (1990). Experiments with mixtures: design, models and the analysis of mixture data. New York, Wiley, 2nd edn.
- DAUBECHIES I. Ten Lectures on Wavelets, Society for Industrial and Applied Mathematics Philadelphia 1992
- DEMİRCAN Ş, SÜSLÜ İ, DİNÇ E, ALTINÖZ S, (2009). Continuous wavelet transform for the resolution of the overlapping voltametric signals and simultaneous determination of levodopa, *Reviews in Analytical Chemistry*, 28 (21) 137-149, 2A.90.
- DİNÇ E, BALEANU D. A review on the wavelet transform applications in analytical chemistry, in *Mathematical Methods in Engineering*, Springer: The Netherlands, p. 265-284, 2007.
- DİNÇ E, BALEANU D. Multicomponent quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spironolactone in tablets by chemometric analysis methods, *Journal of AOAC International*, 87(2), 360-365, 2004.
- DİNÇ E, BALEANU D. Application of wavelet method for the simultaneous quantitative determination of benazepril and hydrochlorothiazide in their mixtures, *Journal of AOAC International* 87(4), 834-841, 2004.
- DİNÇ E, ÖZDEMİR A, BALEANU D. An application of derivative and continuous wavelet transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixture of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets, *Talanta* 65, 36-47, 2005.
- DİNÇ E, BALEANU D, ÜSTÜNDAĞ Ö. An approach to quantitative two-component analysis of a mixture containing hydrochlorothiazide in tablets by one-dimensional continuous daubechies and biorthogonal wavelet analysis of UV-spectra, *Spectroscopy Letters* 36, 341-355, 2003.

- DİNÇ E, ÖZDEMİR A, BALEANU D. Comparative study of the continuous wavelet transform, derivative and partial least squares methods applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37(3), 569-575, 2005.
- DİNÇ E, BALEANU D. Continuous wavelet transform applied to the overlapping absorption signals and their ratio signals for the quantitative resolution of mixture of oxfendazole and oxclozanide in bolus, *Journal of Food Drug Analysis* 15(2), 109-117, 2007.
- DİNÇ E, PEKTAŞ G, BALEANU D. “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(2), 79-92, 2009.
- DİNÇ E, BALEANU D. “Application of Haar and Mexican hat wavelets to double divisor-ratio spectra for the multicomponent determination of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol in effervescent tablets” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(3), 434-444 (2008).
- DİNÇ E, BALEANU D. Giuseppina Ioele, Michele De Luca M, Gaetano Ragno, “Multivariate analysis of paracetamol, propiphenazone, caffeine and thiamine in quaternary mixtures by PCR, PLS and ANN calibrations applied on wavelet transform data” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(5), 1471-1475 (2008).
- DİNÇ E, PEKTAŞ G, BALEANU D. “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(2), 79-92 (2009).
- DİNÇ E, BALEANU D, KANBUR M. “Spectrophotometric multicomponent determination of tetramethrin, propoxur and piperonyl butoxide in insecticide formulation by principal component regression and partial least squares techniques with continuous wavelet transform”, *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 49(4), 218-225 (2004).
- DİNÇ E, SERİN C, DEMİRÖZ FT, DOĞANAY T, “Dissolution and assaying of multicomponent tablets by chemometric methods using computer-aided spectrophotometer”, *International Journal of Pharmaceuticals*, 250(2), 339-350 (2003).
- DİNÇ E, KAYA S, DOĞANA T, BALEANU D. Continuous wavelet and derivative transforms for the simultaneous quantitative analysis and dissolution test of levodopa-benserazide tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 991-995, 2007.
- DİNÇ E ve BALEANU D. (2002b). “Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques”, *IL Farmaco*, 57, 33-37
- DİNÇ E ve KANBUR M. (2002). “Spectrophotometric multicomponent resolution of a veterinary, formulation containing oxfendazole and oxclozanide by multivariate

calibration-prediction techniques”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis and Biomed. Anal.*, 28, 779-788

DUBECHIES I., 1992; Mallat S., 1998; Leung A.K.M., 1998; Walczak B., 2000; C. X. Ma, X. B. Shao, 2004

ERTÜRK S, ÇETİN SM, ATMACA S. Simultaneous determination of moexipril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(3) 505-511 (2003).

JANSSON P. A. (1984). (Editor), *Deconvolution: with applications in spectroscopy*. New York, Academic Pres

JOLIFFE I.T. (1987). *Principal Component Analysis*. New York, Springer-Verlag

KOWALSKI B. R. (1984). (Editor), *Chemometrics, Mathematics and Statistics in Chemistry*, Reidel, Dordrecht

KOWALSKI B.R. (1984). (Editor). *Chemometrics: mathematics and statistics in chemistry*. Dordrecht, Reidel

KRAMER R. (1998). *Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York

KUMAR N, VERMA N, SONGH O, JOSHI N, SINGH K (2010). Estimation of Atenolol by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chemistry* 7 (3): 962-966

KUMUDHAVALLI M. V., ANAND BABU K., JAYAKAR B. (2011). Development and validation of a RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Atenolol and Nitrendipine in Tablet Dosage Form, *Der Pharma Chemia* 3 (4): 63-68

LEUNG A.K.M. (1998). A review on applications of wavelet transform techniques in chemical analysis: 1989-1997 *Chem.Intell. Lab. Sys.*

MARTENS, H., Naes, T., *Multivariate Calibration by Data Compression*, Norwegian Food Research Institute, Aas-NHL, Norway, (1984)

SINGH B., PATEL D.K., MASSART D. L., GHOSH S.K. (2009). A Reversed-phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Chlortalidone in Pharmaceutical Formulation, *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 1, Issue 2

TORUL H, TAMER U (2011). Determination of Enantiomers of Atenolol and Propranolol in Pharmaceutical formulations by HPLC, *Journal of the Association of Official Analytical Chemistse*, 94 (3): 833-8

- UĞURLU G, ÖZALTIN N, DİNÇ E. “Spectrophotometric determination of risedronate sodium in pharmaceutical preparations by derivative and continuous wavelet transforms”, *Reviews in Analytical Chemistry*, 27(4), 215-233 (2008)
- WALTERS SM, STONYS DB, (1983). Determination of Chlortalidone and Clonicine Hydrochloride in Tablets by HPLC, *Journal of Chromatography Sciences* **21 (1)**: 43-5
- WALCZAK, B. Wavelets in Chemistry, Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands 2000
- WEICH A, OLIVEIRA C, MELO J, GOEBEL K, ROLIM C (2007). Validation of UV Spectrophotometric and HPLC Methods for Quantitative Determination of Atenolol in Pharmaceuital Preparations , *Latin American Journal of Pharmacy* **26 (5)**: 765-70
- WOLD H., in: Johnson, N.L., S. (Eds), *Encyclopaedia of Statistical Sciences*, Wiley and Sons, New York (1984).

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı: Ebru

Soyadı: Saygeçitli

Doğum yeri: Adana

Doğum tarihi: 26.09.1986

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Fulya Mahallesi Sakızağacı Sok. Mutlu Apt. 5/11
Şişli / İstanbul, (0505) 780 7948

II-Eğitimi:

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2004-2008)

Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi (2000-2004)

Gazi İlköğretim Okulu (1997–2000)

Yabancı Dil: İngilizce

Ünvanlar: Kimyager

Mesleki Deneyimi: İlaç Ruhsatlandırma Uzmanı, Kimyager