

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ANTİBİYOTİK İLAÇ NUMUNELERİNİN PCR VE PLS  
İLE HPLC VE/VEYA SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ**

**Ayşe Mine SARIDAĞ**

**Danışman  
Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**ISPARTA – 2017**



© 2017 [Ayşe Mine SARIDAĞ]

## TEZ ONAYI

**Ayşe Mine SARIDAĞ** tarafından hazırlanan **Bazı Antibiyotik İlaç Numunelerinin PCR ve PLS İle HPLC ve/veya Spektrofotometrik Tayinleri** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

**Danışman**

**Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ**  
Süleyman Demirel Üniversitesi

**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY**  
Süleyman Demirel Üniversitesi

**Jüri Üyesi**

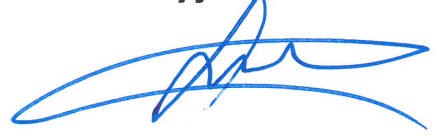
**Yrd. Doç. Dr. Hale SEÇİLMİŞ CANBAY**  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

**Enstitü Müdürü Prof. Dr. Yasin TUNCER**

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Ayşe Mine SARIDAĞ**



# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇİNDEKİLER-----	i
ÖZET -----	iii
ABSTRACT-----	iv
TEŞEKKÜR-----	v
ŞEKİLLER DİZİNİ-----	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ-----	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ-----	ix
1. GİRİŞ-----	1
1.1. Etken Maddelerin Genel Özellikleri-----	2
1.1.1. Amoksisilin Genel Özellikleri-----	2
1.1.2. Klaritromisin Genel Özellikleri-----	4
1.1.3. Lansoprazolün Genel Özellikleri-----	5
1.2. Kromatografik Analiz Yöntemleri-----	7
1.2.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)-----	9
1.2.2. Kromatografinin temel parametreleri-----	12
1.3. Kemometri-----	16
1.3.1. Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları (Multivariate calibration algorithms)-----	19
1.3.1.1. Temel bileşen analiz methodu (Principal component (PCA) method)-----	19
1.3.1.2. Temel bileşen regresyon metodu (Principal component regression (PCR) method)-----	21
1.3.1.3. Kısmi en küçük kareler metodu (Partial least squares regression (PLS) metodu)-----	23
1.3.2. Derişim (kalibrasyon) seti tasarımı-----	26
1.3.3. Çapraz validasyon prosedürü (Cross validation procedure)-----	26
1.3.4. Varyans analizi (ANOVA)-----	27
1.3.5. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları-----	28
1.3.5.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları-----	28
1.3.5.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis)-----	28
1.3.5.3. Organik bileşiklerin kantitatif analizleri-----	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ-----	31
3. MATERYAL VE METOT-----	41
3.1. Materyal-----	41
3.2. Kullanılan Cihazlar-----	41
3.2.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı-----	41
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler-----	41
3.3.1. Kullanılan Çözeltiler-----	43
3.4. Yöntem-----	45
3.4.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi-----	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI-----	46
4.1. HPLC Sistem Uygunluk Parametreleri-----	46
4.1.1. İç standartın belirlenmesi-----	46
4.1.2. Sistem uygunluk sonuçları-----	46

4.1.3. Amoksisilin, Klaritromisin ve Lansoprasolün HPLC ile analiz yönteminin validasyonu -----	48
4.1.3.1. Kalibrasyon doğrusu ve duyarlılık-----	48
4.1.3.2. Doğruluk ve kesinlik -----	51
4.1.3.2. Geri kazanım -----	53
4.2. Kemometri -----	57
4.2.1. Kalibrasyon seti -----	60
4.2.2. Spektral koşulların optimizasyonu-----	61
4.2.3. Temel bileşen regresyon yöntemi (PCR)-----	61
4.2.3.1. Temel bileşen regreyon (PCR) kalibrasyonu -----	62
4.2.3.2. Kalibrasyon yönteminin validasyonu -----	64
4.2.3.3. PCR ANOVA testi -----	66
4.2.3.4. PCR yönteminin istatistiksel analizi -----	67
4.2.3.4.1. Çapraz validasyon ve kalibrasyonun standart hatası -----	67
4.2.4. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi (PLS)-----	69
4.2.4.1. Kısmi en küçük karaeler (PLS) kalibrasyonu -----	69
4.2.4.2. PLS kalibrasyon yönteminin validasyonu -----	69
4.2.4.3. PLS yöntemi için ANOVA testi -----	71
4.2.4.4. PLS yönteminde istatistiksel analiz -----	72
4.2.4.4.1. Kalibrasyonun standart hatası -----	72
4.2.5. PCR ve PLS yönteminin ilaç numunesine uygulanması -----	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ -----	75
KAYNAKLAR -----	77
ÖZGEÇMİŞ-----	83

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## BAZI ANTİBİYOTİK İLAÇ NUMUNELERİNİN PCR VE PLS İLE HPLC VE/VEYA SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ

Ayşe Mine SARIDAĞ

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ

Bu tez çalışmamızda; kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden temel bileşen analiz yöntemi (PCA), temel bileşen regresyon yöntemi (PCR) ve kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS), ilaç numunesinde bulunan amoksisilin (AMX), lansoprazol (LNZ) ve klaritromisin (CTM) etken maddelerinin aynı anda miktar tayinlerinde hiçbir ayırma işlemi uygulanmaksızın başarı ile uygulanmıştır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile yapılan çalışma sonucu elde edilen veriler kemometrik olarak değerlendirilmiştir.

Kemometrik yöntemlerin validasyonunda; AMX, LNZ ve CTM için sırasıyla 10-50 ppm, 5-25 ppm ve 120-600 ppm derişim aralıklarında her bileşen için 20 adet yapay karışım seti hazırlanmıştır. Optimize edilmiş HPLC metodu ile elde edilen veriler 6 farklı dalga boyunda DAD dedektör yardımıyla yapılmıştır (205 nm, 210 nm, 215 nm, 220 nm, 225 nm ve 230 nm). Kullanılan istatistik program ile kalibrasyon setinin pik alan oranları (etken madde /iç standart) ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. AMX, LNZ ve CTM karışımlarının analizi sonucunda elde edilen verilere PCR ve PLS yöntemleri uygulanarak, % geri kazanım sonuçları ile buna karşılık gelen bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. % geri kazanım sonuçları PCR yöntemine göre AMX, LNZ, CTM için sırasıyla %99,99; %100,05; ve %100,0; PLS yönteminde %99,99; %99,96 ve %99,94 olarak bulunmuştur. Bağıl standart sapma sonuçları AMX, LNZ, CTM için sırasıyla PCR yöntemine göre 0,0004; 0,02; ve 0,0002; PLS yönteminde 2,93; 2,39 ve 1,96 olarak bulunmuştur.

Elde edilen veriler doğrultusunda PCA, PCR ve PLS yöntemleri; ilaç numunesindeki AMX, LNZ ve CTM 'nin eş zamanlı miktar tayinlerine uygulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan kemometrik yöntemler çok bileşenli ticari ilaç numunesinin kantitatif tayini ve çözünürlük testleri için etkili bir yöntem olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Amoksisilin, Klaritromisin, Lansoprazol, HPLC, PCR, PLS  
**2017, 83 sayfa**

## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **HPLC AND/OR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF SOME ANTIBIOTICS DRUG SAMPLES WITH PCR AND PLS**

**Ayşe Mine SARIDAĞ**

**Süleyman Demirel University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ**

In this thesis, three different chemometric calibration methods including principle component analysis (PCA), principal component regression (PCR) and partial least square (PLS) were successfully applied to the simultaneous determination of amoxicillin, lansoprazole, and clarithromycin in drug sample without using any separation step. The results obtained by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were evaluated chemometrically.

In the validation of chemometric methods; 20 artificial mixture sets were prepared for each component at 10-50 ppm for AMX, 5-25 ppm for LNZ and 120-600 ppm for CTM. The data obtained by optimized HPLC method were measured by DAD detector with 6 different wavelengths (205 nm, 210 nm, 215 nm, 220 nm, 225 nm ve 230 nm). The variance-covariance matrix of the peak area ratios (active ingredient/ internal standard) and concentration values in the calibration set were calculated by using the statistical program. % Recovery results and relative standard deviation values were calculated by applying PCR and PLS methods to the obtained data in the analysis result. The % recovery results for AMX, LNZ and CTM were found to be 99.99%, 100.05% and 100.0% in PCR method and 99.99%, 99.96% and 99.94% in PLS method, respectively. The relative standard deviation results for AMX, LNZ and CTM were found to be 0.0004, 0.02, ve 0.0002 in PCR method and 2.93, 2.39 ve 1.96 in PLS method, respectively.

PCA, PCR and PLS methods in the direction of the obtained data were applied on the simultaneous analysis results of AMX, LNZ and CTM in the drug sample. Both of the twochemometric methods in this study can be satisfactorily used for the quantitative analysis and for dissolutions tests of multicomponent commercial drug.

**Keywords:** Lansoprazole, Clarithromycin, Amoxicillin, HPLC, PCR, PLS  
**2017, 83 pages**

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmayı bana öneren, çalışmalarımın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları aşmakta bilgi ve tecrübesi ile yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ 'a teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca analizler esnasında yakın ilgi gösteren, bilgi ve önerilerini esirgemeyen, yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY 'a teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarım esnasında laboratuvar imkanlarını bana sunan ve desteğini esirgemeyen, sevgili proje hocam Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Bölüm Başkanı Prof. Dr. Zübeyde ÖNER 'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

4068-YL2-14 numaralı Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında her zaman bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Sinan Akbal 'a teşekkür ederim.

Ayrıca bütün hayatım boyunca iyi ve kötü günlerimde her daim yanımda olan bana dürüstlüğü ve sabrı öğreten ve desteğini hiç esirgemeyen, sevgili babacığım ve anneciğime teőekkürü bir borç bilirim.

Ayşe Mine SARIDAĞ  
ISPARTA, 2017

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. Amoksisilin moleküler yapısı -----	2
Şekil 1.2. Klaritromisinin moleküler yapısı -----	4
Şekil 1.3. Lansoprazolün molekül yapısı -----	6
Şekil 1.4 Kromatografik ayırım -----	8
Şekil 1.5. Kromatografi teknikleri -----	8
Şekil 1.6. HPLC sistemi -----	11
Şekil 1.7. Pik çifti ayırımı üzerine $R_s$ değerinin etkisi -----	14
Şekil 1.8. Kromatogramda etkin tabaka hesaplamada kullanılan veriler -----	15
Şekil 1.9. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkisi -----	18
Şekil 1.10. (a) $X_1$ ve $X_2$ olan iki değişkenleri için PC1 ve PC2 temel bileşenlerini gösteren diyagram, (b) Temel bileşen eksenlerinin noktasal gösterimi -----	20
Şekil 1.11. PLS2 kalibrasyon şeması -----	24
Şekil 3.1. Amoksisilin, Klaritromisin ve Lansoprazol etken maddelerini içeren ilaç numunesi -----	44
Şekil 4.1. Etken madde standartlarının karışım kromatogramı 1) Amoksisilin 2) Lansoprazol 3) Atorvastatin ve 4) Klaritromisin -----	47
Şekil 4.2. Amoksisilin analizine ait doğrusal kalibrasyon grafiği -----	49
Şekil 4.3. Klaritromisin analizine ait doğrusal kalibrasyon grafiği -----	50
Şekil 4.4. Lansoprazolün analizine ait doğrusal kalibrasyon grafiği -----	51
Şekil 4.5. A) 60 ppm AMX içeren tablete katkı yapılmamış çözeltiliye ait kromatogram, B) 60 ppm AMX içeren tablete aynı derişimde AMX standartı ile ilave edilmiş çözeltiliye ait kromatogram (1:AMX, 2:IS) -----	55
Şekil 4.6. A) 25 ppm LNZ içeren tablete katkı yapılmamış çözeltiliye ait kromatogram, B) 25 ppm LNZ içeren tablete aynı derişimde LNZ standartı ile ilave edilmiş çözeltiliye ait kromatogram (1:AMX, 2:IS) -----	55
Şekil 4.7. A) 700 ppm CTM içeren tablete katkı yapılmamış çözeltiliye ait kromatogram, B) 700 ppm CTM içeren tablete aynı derişimde CTM standartı ile ilave edilmiş çözeltiliye ait kromatogram (1:AMX, 2:IS) -----	56
Şekil 4.8. Araştırmada kullanılan etken maddelerin 3'lü karışımına ait kromatogram -----	58
Şekil 4.9. Etken maddelerin kalibrasyon grafikleri -----	59
Şekil 4.10. Etken madde standartlarının karışımlarının farklı dalga boylarındaki kromatogramları (A:205 nm, B:210 nm, C:215 nm, D:220 nm, E:225 nm, F:230 nm) -----	61
Şekil 4.11. AMX için PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen lineer regresyon grafiği ve istatistik sonuçları -----	67
Şekil 4.12. LNZ için PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen lineer regresyon grafiği ve istatistik sonuçları -----	68
Şekil 4.13. CTM için PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen lineer regresyon grafiği ve istatistik sonuçları -----	68

Şekil 4.14. AMX için PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçları-----	72
Şekil 4.15. LNZ için PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçları-----	73
Şekil 4.16. CTM için PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçları-----	73



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan etken maddeler ve özellikleri-----	42
Çizelge 3.2. Analizde kullanılan kimyasal maddeler-----	42
Çizelge 4.1. Amoksisilin, klaritromisin, lansoprazol ve iç standart için sistem uygunluk parametreleri-----	47
Çizelge 4.2. Amoksisilin analizine ait kalibrasyon grafik parametreleri-----	49
Çizelge 4.3. Klaritromisin analizine ait doğrusal kalibrasyon grafik parametreleri-----	50
Çizelge 4.4. Lansoprazolün analizine ait doğrusal kalibrasyon grafik parametreleri-----	51
Çizelge 4.5. Amoksisilinin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik verileri-----	52
Çizelge 4.6. Lansoprazolün analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik verileri-----	52
Çizelge 4.7. Klaritromisinin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik verileri-----	53
Çizelge 4.8. Amoksisilin içeren tablete ait geri kazanım verileri-----	53
Çizelge 4.9. Klaritromisin içeren tablete ait geri kazanım verileri-----	54
Çizelge 4.10. Lansoprazol içeren tablete ait geri kazanım verileri-----	54
Çizelge 4.11. Tablet katkılı ve katkısız olarak elde edilen kromatogram pik alanları-----	57
Çizelge 4.12. AMX, LNZ ve CTM için kalibrasyon seti-----	60
Çizelge 4.13. AMX, LNZ ve CTM etken madde karışımlarının PCR kalibrasyon yöntemi ile elde edilen geri kazanım verileri-----	65
Çizelge 4.14. PCR ANOVA test sonuçları-----	66
Çizelge 4.15. AMX, LNZ ve CTM sentetik karışımlarına PLS kalibrasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri-----	70
Çizelge 4.16. PLS yöntemi ANOVA test sonuçları-----	71
Çizelge 4.17. Ticari ilaç numunesine PCR ve PLS yöntemlerinin uygulanması sonucunda elde edilen AMX, CTM ve LNZ değerleri ( $\mu\text{g}/\text{tablet}$ )-----	74

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asetonitril
AMX	Amoksisilin
ANOVA	Varyans analizi
ATR	Atorvastatin
CTM	Klaritormisin
GK	Geri kazanım
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
k	Kapasite faktörü
LNZ	Lansoprazol
LOD	Teşhis alt sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
N	Etkin tabaka sayısı
NH <sub>3</sub>	Amonyak
NH <sub>4</sub> Cl	Amonyum klorür
PC	Temel bileşen
PCA	Temel bileşen analizi
PCR	Temel bileşen regresyon yöntemi
PLS	Kısmi en küçük kareler yöntemi
PRESS	Tahmin edilen hataların karelerinin toplamı
PSO	Pik simetri oranı
R	Regresyon katsayısı
R <sub>s</sub>	Ayırma gücü
RSD	Bağıl standart sapma
SEC	Kalibrasyonun standart hatası
SEP	Tayinin standart hatası
IS	İç standart
SD	Standart sapma
t <sub>R</sub>	Alıkonma zamanı
Σ	Ortalama
α	Seçicilik

## 1. GİRİŞ

İlaç, tıpta kullanılan ve biyolojik etkinliği olan saf kimyasal madde veya ona eşdeğer bitkisel veya hayvansal kaynaklı, standart miktarda etken madde içeren bir karışımdır. Bir başka deyişle ilaç, hastalıkların teşhisi, tedavisi, cerrahi girişimlerin kolaylaştırılması ve bazı fizyolojik olayların değiştirilmesi amacıyla kullanılan; doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal maddelerdir. İlaçlar taşıyıcı ve etken madde olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. İlacın ana bileşeni olan etken madde, canlıda biyolojik ve fizyolojik etki gösteren hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan bir veya birkaç kimyasal madde karışımından oluşur. Taşıyıcı ise etken maddenin hasta tarafından kolay alınabilmesi veya iyi doze edilebilmesi için katılan fizyolojik etkisi olmayan glikoz, parafin, gliserin gibi kimyasal maddelerdir. Etken maddeler yeterli dozda alındığında insan sağlığına faydalı olurken, az alınması durumunda fayda sağlamaz, aşırı alındığında veya yanlış kullanıldığı durumlarda ise insan sağlığına oldukça tehlikeli boyutlarda zarar vermektedir. Bu sebeple ilaçların üretiminden, kullanımına ve vücuttan atılımına kadar olan tüm noktalarda miktar analizleri önemlidir.

İlaç piyasasındaki kombine preparatların artışına paralel olarak farmasötik ticari ürünlerin kalite kontrol ve rutin analizleride zorlaşmaktadır. İlaç endüstrisindeki analitik çalışmalarda tek başına, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımların kantitatif analizi için spektrofotometri, spektroflorimetri, infrared spektrofotometrisi, voltametri, kromatografi, kütle spektrometresi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve bu yöntemlerin kombine şekilleri kullanılmaktadır.

Analitik kimyada hiçbir ön ayırma işlemi yapmaksızın kombine ilaç numunelerinin aynı anda kantitatif analizi son derece önemlidir. Analitik yöntemler geliştirmek amacıyla, klasik analitik yöntemler ile birlikte değişik matematiksel algoritmalara dayanan hesaplama teknikleri kombine olarak uygulanmaktadır. Klasik analitik yöntemler ile kemometrik kalibrasyonların

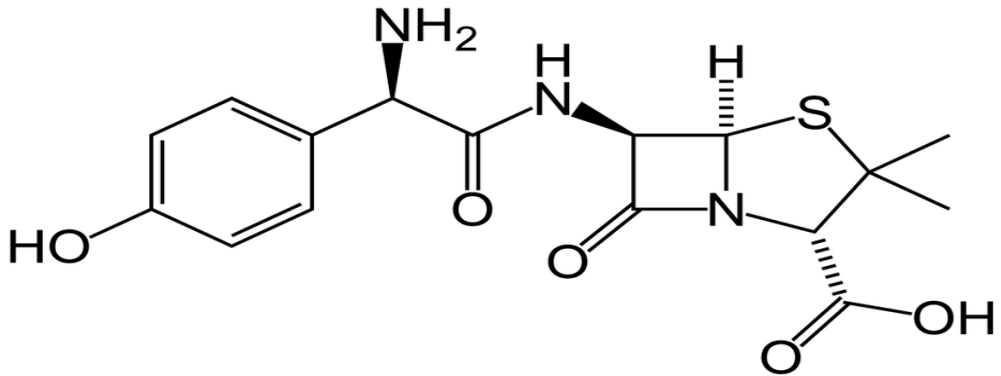
karışım analizlerinde başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle kemometrik yöntemler ilaç numunelerinin analizinde artan yoğunlukta kullanılmaktadır (Kaya, 2007).

Bu çalışmada ilaç etken maddelerinden klaritromisin, amoksisilin ve lansoprazol'ün miktar tayinlerini yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemiyle tayin edip elde edilen verileri kemometrik yöntemle değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu bölümde analizi yapılmış olan lansoprazol, amoksisilin ve klaritromisin etken maddeler hakkında bilgi verilmektedir.

## 1.1. Etken Maddelerin Genel Özellikleri

### 1.1.1. Amoksisilin

Kapalı formülü  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  olan amoksisilin açık formülü şekil 1.1'de gösterilmiştir. Amoksisilin IUPAC'a göre sistematik adı 7-[2-amino-2-(4-hidroksifenil)-asetil] amino-3,3-dimetil-6-okso-2-tia-5-azabisiklo [3.2.0] heptan-4-karboksilik asit 'tir.



Şekil 1.1. Amoksisilin moleküler yapısı

Bir antibiyotik olan amoksisilin penisilin grubuna ait bir amino penisilindir. *L.monocytogenes* ve *E.faecalis*'e karşı penisilin G'den daha etkili oldukları için

aminoglikozidlerle kombine olarak tercih edilirler (Öncül, 2002). *Listeria monocytogenes* ve duyarlı enterokokların tedavisi için penisilinden daha etkilidir. Amoksisilin penisiline dirençli *Streptococcus pneumonia* 'ya karşı kullanılan tüm oral  $\beta$ -laktamların en aktifidir. Penisiline duyarlı yarı sentetik olan bu ilaç farmakolojik bakımdan ampisilinin yakın akrabasıdır. İlaç oral yoldan alınmak için tasarlanmış ve aside dayanıklıdır (Brunton ve ark., 2006). Amoksisilin oral verildiğinde ampisiline oranla daha iyi bir biyoyararlanım elde edilir (Öncül, 2002). Gastrointestinal kanaldan ampisiline göre daha hızlı ve tam emilmesi bu iki madde arasındaki en büyük farkıdır. Ayrıca ampisilin besinlerden etkilenirken amoksisilin besinlerden etkilenmez. Amoksisilinin yarılanma ömrü  $1,7 \pm 0,3$  saat kadardır. Amoksisilinin oral yoldan biyoyararlanımı  $\%93 \pm 10$ , idrarla atılımı  $\%86 \pm 8$ , plazmada bağlı kısmı  $\%18$ ,  $T_{max}$  1-2 ve oral yoldan  $C_{max}$   $5 \mu\text{m}/\text{mL}$  (Brunton ve ark., 2006). Amoksisilin ise  $\%90$  oranında emilir ve gıdalardan etkilenmez. Amoksisilinin 500 mg oral alımından 2 saat sonra serum pik konsantrasyonu 4-12 mg/L arasındadır. Amoksisilinin doku dağılımı iyidir. Bu nedenle otitis media, pnömoni, sinüzit, bronşit, tifo, üriner sistem enfeksiyonlarında halen kullanımı önerilen antibiyotiklerdir (Öncül, 2002).

Penisilin grubu antibiyotiklerin en önemli yan etkileri alerjik reaksiyonlara neden olmalarıdır. Penisilin allerjisi toplumda oldukça yaygındır. Her 100 kişiden 3-10'u penisiline karşı allerjiktir. Bu duyarlılık çoğu kez hafif reaksiyonlarla kendini gösterir. Penisilin heptan yapısında bir molekül olduğundan, kullanım sayısı ile anafilaksi riski artış göstermektedir. Bu nedenle yetişkinlerde görülen anafilaksi riski çocuklara oranla daha yüksektir. Penisilin molekülleri arasında çarpaz reaksiyon bulunduğundan, allerji durumlarında penisilin dışında başka molekül yapısına sahip antibiyotiklerin kullanımı gerekmektedir (Öncül, 2002).

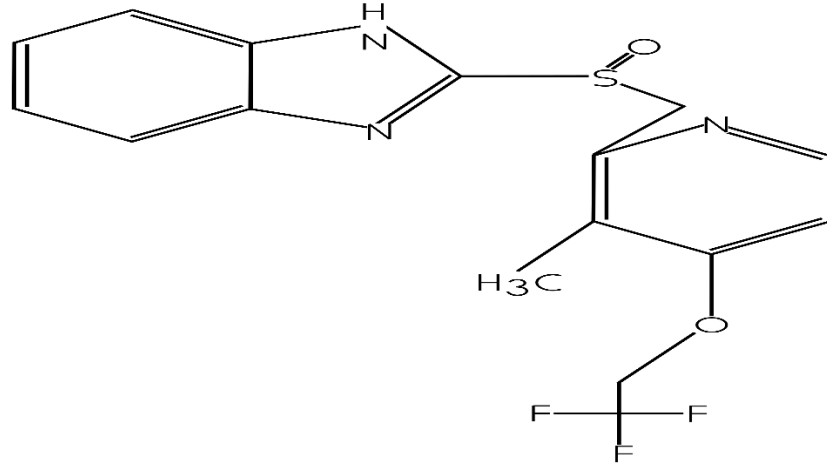


klaritromisinden daha fazla antibakteriyel etkinliğe sahiptir (Brunton ve ark., 2006).

Karitromisinin 6. pozisyonundaki hidroksil grubunun metilasyonu sonucu asit dengesini ve doku penetrasyonu (doku içine nüfuz etmek) geliştirir ve etki spektrumunu genişletir. Klaritromisin streptokok ve stafilokokların duyarlı suşlarına karşı eritromisinden daha etkilidir. Klaritromisin *H. influenza* ve *N.gonorrhoeae* orta derece etkili iken *Clamidy* türleri, *L.pneumophila*, *B.burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae* ve *H.pylori* 'e karşı etkinliği iyidir. Klaritromisin oral yolla alındığında ilk emilim konsantrasyonu %50-55 oranında iken 2 saat sonra doruk konsantrasyonuna ulaşır. Doruk konsantrasyonunda plazmada 2-3 µg/ml oranında bulunmaktadır (plazmadaki bağlı olan kısmı %42-50 oranındadır). Aç veya tok karnına alınabilir ancak biyoyararlanımı artırmak için yemeklerden sonra alınmalıdır. Klaritromisinin biyoyararlanımı %55±8 'dir. Klaritromisin böbrek ve böbrek dışı mekanizmalar ile atılır. Karaciğerde aktif 14-hidroksi metaboliti başta olmak üzere metabolize olur. Başlıca metabolik yollar oksidatif *N-demetilasyon* ve 14. pozisyonundaki hidroksillenmedir. Klaritromisinin eliminasyon yarılanma ömrü 3-7 saat aralığında değişir ve yüksek dozlarda bu yarılanma ömrü daha uzun sürer. İdrarda değişime uğramadan atılan klaritromisin miktarı verilen doza ve formülasyona bağlı olarak %20-40 (genellikle %36) arasında değişmektedir. Verilen dozun %10-15'lik bir miktarıda 14-hidroksiklaritromisin olarak atılır. Karaciğer ve böbrek hastalarında kreatinin klerensi %30mL/dk'dan az olmadığı sürece doz ayarlamasına gerek duyulmaz (Brunton ve ark., 2006).

### **1.1.3. Lansoprazolün Genel Özellikleri**

Kapalı formülü  $C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$  olan lansoprazolün açık formülü, Şekil 1.3 'de gösterilmektedir. IUPAC'a göre sistematik adı [3-metil-4-(2,2,2-trifloroetoksi)-2-bridinil] metilsülfinil]-1H-benzoimidazol olan lansoprazolün molekül ağırlığı 369,363 g/mol 'dür.



Şekil 1.3. Lansoprazolün molekül yapısı

Lansoprazol mide asidi salgılanmasını spesifik olarak inhibe eden bir proton pompası inhibitörleri grubundan bir antiülser ilaçtır. Proton pompası inhibitörleri, aktivasyonu için asit ortama ihtiyaç duyan ön-ilaçlardır. Sistemik dolaşıma geçtikten sonra ön-ilaç midede diffüze olmakta ve asidik sekresyon yapan kanaliküllerin içerisinde birikmektedir. Burada proton ile katalizlenen bir tetrasiklik süfenilamid oluşumu ile aktifleşir ve kanaliküller içerisinde geri difüze olmayacak şekilde tutar. Bu aktive olmuş form H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPaz 'da bulunan sisteinlerin sülfidril grupları ile kovalent bağ yaparak pompa molekülünü geri dönüşümsüz olarak inaktive etmektedir. Yarılanma ömrü kısa (0,5-2 saat) olmasına rağmen asit sekresyonu uzun süremektedir (24-48 saat). Proton pompası inhibitörleri asit üretiminin son basamağını inhibe ettikleri için uyarıcı faktörler ne olursa olsun etkili asit baskılanması yaparlar. Lansoprazolün mide lümenindeki asit tarafından yıkılmasını engellemek için oral doz formları iki farklı formülasyonda oluşturulmuştur: (1) jelatin kapsüller içinde enterik kaplamalı ilaçlar ve (2) süspansiyon için toz şeklinde enterik kaplı granüller. Proton pompası inhibitörleri ince bağırsakta emildikten sonra yüksek oranda proteinlere bağlanmaktadır. Proton pompası inhibitörleri hepatik sitokrom enzimleri tarafından metabolize edilir. Bundan dolayı bu yol ile temizlenen diğer ilaçların eliminasyonu ile etkileşebilir.

Lansoprazolün oral yoldan biyoyararlanımı %81±22, idrar ile atılımı %1'den daha az, plazmada bağlı kısım %97, dağılım hacmi 0,35±0,05 (L/kg), yarılanma ömrü 0,90±0,44 (saat), T<sub>max</sub> 1,3±0,6 (saat) ve C<sub>max</sub> 248±140 (ng/mL)' dir.

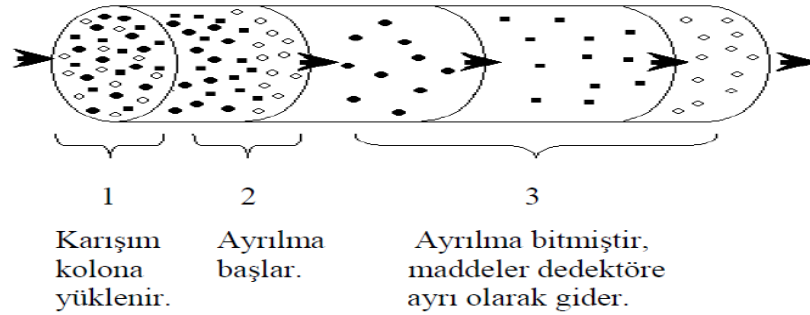
Proton pompa inhibitörlerinin sık rastlanan yan etkileri bulantı, karın ağrısı konstipasyon, gaz, baş ağrısı, döküntü ve diyaredir (Brunton ve ark., 2006).

## **1.2. Kromatografik Analiz Yöntemleri**

Kromatografi, bir karışımda bulunan birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzer olan bileşenlerin ayrımını gerçekleştiren bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemin genel adıdır (Skoog, 1998). Bu yöntem ilk kez 1903 yılında Rus botanikçi Mikhail Semyonovich Tswett tarafından renkli bitki pigmentlerinin ayrımında kullanılmıştır. 1931'de Kuhn ve Lederer bu tekniği karotenlerin ve ksantofillerin ayrımı için kullanmıştır (Anonim, 2010g). Martin ve Synger ise 1941 yılında modern gaz ve sıvı kromatografisinin temellerini atmışlardır. Son derece duyarlı ve etkin bir ayırma yöntemi olan kromatografi ile günümüzde binlerce maddenin karışımları analiz edilebilir (White, 1990).

Kromatografik yöntemlerde çalışma düzeni temel olarak sabit faz ve hareketli faz (mobil faz) olmak üzere 2 bileşenden oluşur. Kromatografik ayırmada numune gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sisteme taşınır. Hareketli faz bir kolon içinde yerçekimi kuvveti ile veya banyo kolondaki sabit faz içerisinden geçerilir. Hareketli faz içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesi ile etkileşmesinden dolayı, bir miktar tutunur. Bu tutulma numunedeki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur ve böylece bileşenler farklı hızda ilerledikleri için sabit fazın sonuna doğru birbirinden ayrılarak kolonu farklı zamanlarda terkederler. Böylece sabit fazdan çıkan analit derişimler uygun biçimde ölçülmüş olur. Sonuç olarak derişime karşı zaman grafiği elde edilir ve bu grafiğe "kromatogram" adı

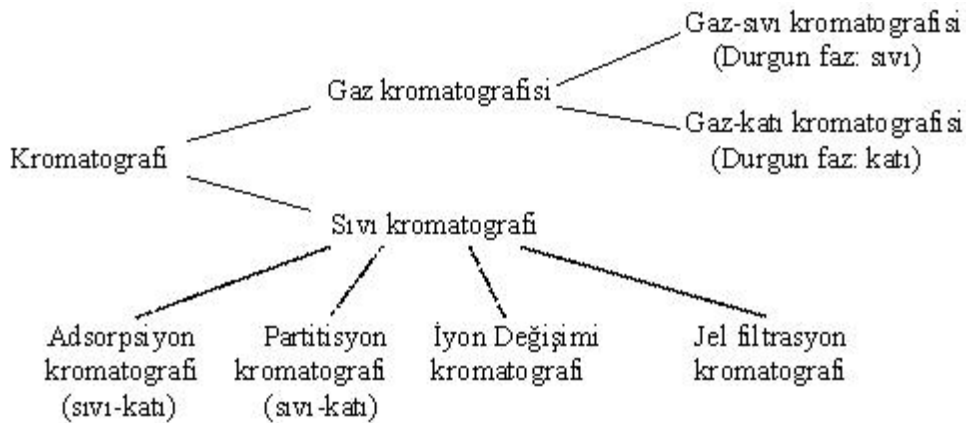
verilir (Anonim 2010h). Karışımda bulunan kimyasalların kolondan akışı esnasındaki ayrımı ve hareketli faz hızıyla kolondan geçişi, Şekil 1.4 'de gösterilmektedir.



Şekil 1.4 Kromatografik ayırım

Analitin kolon boyunca hareket etmesi sabit ve hareketli fazın arasındaki kimyasal ve fiziksel dengedeki tutunmadan kaynaklanır ve bu tutunma çözünürlük, elektron çifti alıcı-vericisi ve iyonik etkileşimlere bağlıdır (Hamilton, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Adıgüzel, 2009).

Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvıdır ve hareketli faz ise gaz veya sıvıdır. Kromatografi hareketli fazın sıvı veya gaz olmasına göre sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi olarak ikiye ayrılırlar. Bu ayırım Şekil 1.5 'de gösterilmektedir (Anonim, 2010h).



Şekil 1.5. Kromatografi teknikleri

Kromatografik yöntemler hareketli fazın gaz veya sıvı olmasına, sabit fazın katı yada gaz olmasına, kromatografik ayırmanın mekanizmasına ve ayırma tekniğine göre adlandırılırlar (Adamovics, 1997).

- Adsorpsiyon kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Eleme kromatografisi
- Dağılma kromatografisi (Ters-faz sıvı kromatografisi ve Normal faz sıvı kromatografisi)
- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

### **1.2.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)**

Yaklaşık olarak 35 yıl öncesinde, Horvath ve Melander, ters faz sıvı kromatografi yönteminin (HPLC) analitik ayırmalar için sıklıkla tercih edildiğini belirtmişlerdir (Horvath ve Melander, 1977). Günümüzde de analitik ayırmaların %80-90' ında HPLC yöntemi kullanılmaktadır. Pratikte bütün ters faz ayırmaları, kimyasal olarak modifiye edilmiş hidrofobik yüzey içeren sabit fazlarla gerçekleşmektedir. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan madde sabit faz içinde en hızlı yol alırken (kolonda en az kalırken), çekim kuvveti en çok olan en yavaş yol alır. Bu yüzden kolona aynı anda enjekte edilen maddeler kolonu farklı zamanlarda terk ederler. Bu sırada her maddenin tanecikleri kendi aralarında kümeler meydana getirerek kolondan aşağıya doğru bantlar şeklinde yol alırlar ve sabit fazda, yüzey kimyasında ve geometrisindeki küçük değişiklikler tayin edilen bileşikte gerçekleşen yüzey etkileşimlerinde farklılıklar meydana getirir. Bu farklılıklar kromatografik seçiciliği sağlar (Kazakevich ve Lobrutto, 2007).

HPLC bütün analitik ayırma yöntemleri arasında en yaygın kullanılan bir kromatografi yöntemidir. Bunun nedenleri ise:

- Duyarlılığı ve doğruluğu yüksek olduğundan miktar tayinlerine kolayca uyarlanabilir olması,
- Uçucu olmayan ve sıcakta kolayca bozulan maddelerin ayrılmasında uygun olması,
- Sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilir olmasıdır.

HPLC `nin avantajları;

- Kolon ayırıcılığı yüksektir.
- Tekrarlanabilirliği yüksektir.
- Nicel analize uygundur.
- Analiz süresi genelde kısadır.
- Geniş derişim aralıklarında analiz yapılmayı sağlayacak kadar esnektir.
- Düşük sıcaklıklarda uygulanır.
- Madde gerikazanımı kolaydır.
- Dedektör seçme olanağı sunar.

HPLC `nin uygulanabileceği maddelere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal organik türevler ve çeşitli inorganik bileşikler gösterebilir (Skoog ve ark., 1998).

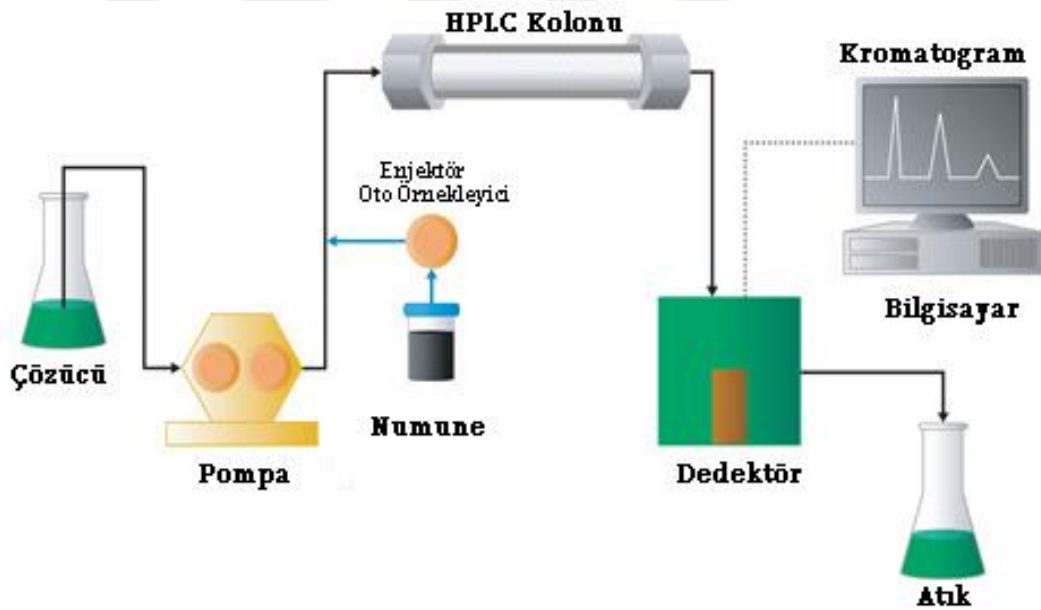
HPLC temel kısımları (Şekil 1.6):

- Rezervuar (hareketli fazın pompa tarafından çekilerek sisteme yönlendirildiği yer)
- Pompa (izokratik ve gradient akış olmak üzere 2 tür akış gerçekleştirilebilir)
- Enjeksiyon birimi (numunenin sisteme yüklendiği alan)
- Kolon ( sabit fazın bulunduğu ayrımın gerçekleştiği birim)
- Dedektör (numunedeki bileşenlerin kolondan çıkışını tespit eden birim)

- Kaydedici (dedektörden gelen sinyaller kromatograma dönüştürerek kaydeden birim)

HPLC de bulunan dedektör türleri:

- UV dedektörler (Sabit dalga boyunda, Değişken dalga boyunda ve Diod-Array dedektör (DAD))
- Refraktif indeks dedektörler
- Floresans dedektörler
- Elektrokimyasal dedektörler
- Buharlaştırıcı ışık saçılım dedektörleri
- Kondüktivite dedektörleri (Meyer, 1999; Skoog ve ark, 1998)



Şekil 1.6. HPLC sistemi

Hareketli faz, analitin alıkonmasının kontrolünde önemli rol oynar. Kromatografik ayırımın başarılı bir şekilde geliştirilmesi için çözücü bileşiminin değişimi, organik modifiyerin tipi, pH ve tampon konsantrasyonu, kullanılan değişkenlerdir. Hareketli faz pH' sı analitin iyonlaşmasını, hidrofobisitesini ve alıkonmasını etkiler. HPLC' de yaygın olarak kullanılan hareketli fazlar su-

organik çözücü ikili karışımlarıdır. En yaygın kullanılan organik çözücüler metanol ve asetonitrildir. Organik çözücünün derişimi, tayin edilecek bileşğin alıkonmasında önemli rol oynar. Organik çözücü derişimi az olan hareketli fazla yapılan analizlerde bileşğin alıkonma süresi uzar iken, fazla olmasında ise bileşğin alıkonma süresi kısalır. Hareketli faz hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken kullanılan çözücülerin birbiriyle karışmasıdır. Ayrıca hareketli fazda yüksek derişimde tampon kullanılamaz.

HPLC yönteminde kolon dolgu maddesi çok önemlidir. Dolgu maddesi küçüldükçe kolondaki teorik tabaka sayısı artar. HPLC de bazen kolon dolgu maddesi etkisinin dışında önemli bir bant genişlemesi olur. Buna kolon ekstra bant genişlemesi denir. Bant genişlemesi genel olarak, enjeksiyondan, dedektörden ve boru birleştirme kısımlarında ileri geldiği halde, ekstra bant genişlemesi, sıvının kolon duvarlarına yakın olduğu bölgelerdeki akış hızıyla, kolonun orta kısımlarındaki akış hızının farklı olmasından ileri gelir. HPLC de kolon dolgu maddesi çok önemlidir. Dolgu maddesi küçüldükçe kolondaki teorik tabaka sayısı artar (Waters, 2011).

### **1.2.2. Kromatografinin temel parametreleri**

Kromatografik bir sistemde veriler kromatogramlar ile yorumlanır. Kromatogram; analizi yapılan numunenin her bir bileşeni için belirli zamanlarda konsantrasyon değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir dedektör ile zamana karşı çizilen pikleri gösteren grafiktir. İki bileşenli bir numuneye ait kromatogram, Şekil 1.7 'de verilmiştir. Bir kromatogramı yorumlamada kullanılan parametreler şunlardır.

- Alıkonma zamanı ( $t_R$ ),
- Kapasite faktörü ( $k$ ),
- Seçicilik ( $\alpha$ ),
- Etkin tabaka sayısı ( $N$ ),
- Ayırma gücü ( $R_s$ ),

- Kolon verimliliği,
- Pik simetri oranı (PSO)

### ***Kapasite Faktörü (k)***

Kromatografide örneğin enjeksiyonundan sonra analit pikinin dedektöre gelmesine kadar geçen zamana alıkonma zamanı denir ve  $t_R$  ile tanımlanır. Kromatografide alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen (k) yararlanılır. Bir kromatografik çalışmada kapasite faktörünün büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğunu; küçük olması ise bileşenin hareketli faza ilgisinin büyük olmasından dolayı taşıyıcı fazla hızla taşındığını gösterir. HPLC ayırmalarında k, mümkün olduğunca 1-10 arasında olmalıdır. k değerlerinin bu aralıkta olması, mobil faz ve kolon özelliklerinin değiştirilmesi ile sağlanır. İzokratik bir çalışmada bu aralık sağlanamadığında gradient çalışma tercih edilir (Skoog vd. 2011). Kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1.1)$$

$t_0$  = kolonda tutunmayan türün kolonda tutunma süresi (KBr veya urasil)

$t_R$  = kolonda bileşenin tutunma süresi

### ***Seçicilik Faktörü ( $\alpha$ )***

Seçicilik sabit faz özelliğine göre değişiklik gösterse de kısmen hareketli fazın bileşiminden de etkilenir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi kolonda daha uzun süre tutunan maddeye ait kapasite faktörünün daha kısa süre tutunan maddeye ait kapasite faktörüne oranlanması ile bulunur ve Eşitlik 1.2 'de verilmiştir (Skoog, 1998; White, 1990; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992). İki pikin birbirinden ayrılması seçicilik faktörü  $\alpha$ , ile gösterilir. (Skoog vd. 2011).  $\alpha$  daima 1 den büyük ve 1,15 eşit ise iki bileşiğin %98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir (Poole ve ark., 1991, Yıldız, 1997; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; White, 1990).

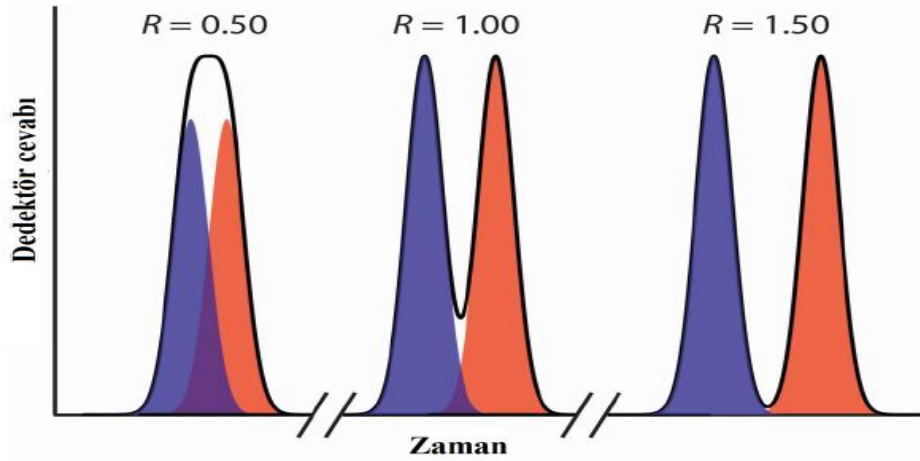
$$\alpha = k_2/k_1 = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0) \quad (1.2)$$

$k_2$ = daha kuvvetli tutunan tür için dağılma katsayısı

$k_1$ =daha az kuvvetle tutunan tür için dağılma kat sayısı

### **Ayırma Gücü ( $R_s$ )**

Ayırıcılık kolon etkinliğinin ve çözücü etkinliğinin bir ölçüsüdür. Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü  $R_s$ , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu hesaplamada kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Pik çiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma faktörünün en az 1,5 olması istenir.  $R_s=1,5$  olduğu zaman maddeler %95 birbirinden ayrılmış kabul edilir.  $R_s=1$  iken, maddeler birbiri içine %4 oranında girmiş durumdadır ve  $R_s=0,75$  'de ayırım olmamaktadır (Şekil 1.7). Ayırma gücü, 1 ve 1' den küçük olduğunda yeterli ayırım gerçekleşmemektedir (Poole ve Poole, 1991, Adamovics, 1997; Bidlinmeyer, 1992; White, 1990).



Şekil 1.7. Pik çifti ayırımı üzerine  $R_s$  değerinin etkisi

Ayırma gücü aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$R_s = (1/4) \sqrt{N} [(\alpha - 1)/ \alpha] [k_2/(1+k_2)] \quad (1.3)$$

$N$ = etkin (teorik) tabaka sayısı (2000'den büyük olmalıdır.)

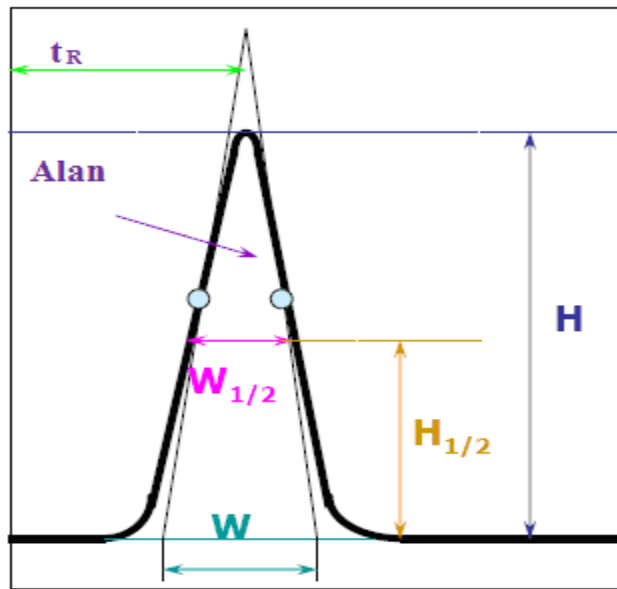
$\alpha$ = seçicilik katsayısı

$k$ = alıkonma zamanı

### ***Etkin Tabaka sayısı (N)***

Bir kromotogramda etkin tabaka sayısı  $N$  ile ifade edilir. Etkin tabaka sayısı aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır ve kullanılan veriler, Şekil 1.8 'de verilmiştir.

$$N = 5,54 (t_R/W_{1/2})^2 \quad (1.4)$$



Şekil 1.8. Kromotogramda etkin tabaka hesaplamada kullanılan veriler

### ***Kolon Verimliliği***

Kolon verimliliğinin nicel ölçüsü olarak genellikle iki terim kullanılır. Bunlar tabaka yüksekliği ( $H$ ) ve tabaka sayısı ( $N$ )'dır. Bu iki terim arasındaki aşağıdaki bağıntı kullanılarak kolon verimliliği anlatılmaktadır.

$$H=L/N$$

(1.5)

L, kolon dolgusunun uzunluğudur. Kolon verimliliği kolon tipi, sabit faz tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akışı gibi parametrelere göre değişebilmektedir. Bir kolonda, tabaka sayısının artması (N) ve tabaka yüksekliğinin (H) azalmasıyla verimlilik artar (Yılmaz, 2011, White, 1990; Bidlinmeyer, 1992; Hamilton, 1982).

### **1.3. Kemometri**

Kimyada yada analitik kimyada verilerin işlenmesi ve istatistiksel değerlendirilmesi ile bu verilerin sağlandığı deney faktörlerinin araştırılması, optimize edilmesi, zaman tasarrufunun sağlanması ve kantitatif ölçümler için kalibrasyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan deneysel tasarımların hazırlanması kimyanın belki de en çok hesaplama ve modelleme çalışmalarına ihtiyaç duyduğu alanlardır. Temel kimya ve fizik bilgileri ile birlikte mühendislik ve hesaplama tekniklerine, matematik ve istatistik konularına dayanan kimyada verilerin işlendiği ve değerlendirildiği alan kemometri olarak bilinmektedir (Kitiş, 2011).

Kemometri, çeşitli yöntemlerle elde edilen kimyasal verilere matematiksel tekniklerin uygulanması ile bu verilerden daha fazla yararlı bilgilerin özümlemesi olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda bilgisayarlı aygıtların gelişimi ile birlikte birçok veri elde edilmiş ve çok sayıda verinin işlenmesi ve değerlendirilmesi konusunda istatistiksel bilgilere gereksinim duyulmuştur. Günümüzde kemometri yalnızca veri değerlendirme değil, bir veri tasarımında yol gösterici olarak da kullanılmaktadır.

Kimyasal analizde işlenecek verilere temel oluşturan sinyaller, ölçüm cihazından çıktığı şekli ile analog (ham) ve sayısal sinyal olarak ikiye ayrılabilir. Sayısal sinyallerin daha az gürültü bileşeni içermesi, elektriksel

girişimlere daha az uğraması ve bilgisayarlı sistemlere uyumlu oluşu gibi üstünlükleri vardır (Özdemir, 2011).

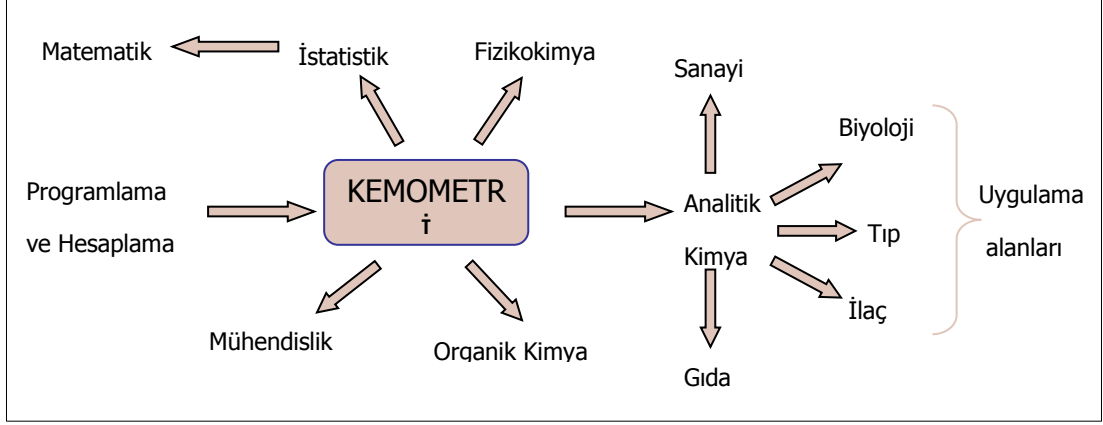
Tanımlayıcı ve yargılayıcı istatistik (descriptive and inference statistics), sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay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

Kemometri disiplinde temel olarak üzerinde vurgu yapılan istatistik-matematik yöntemleridir. Rastgele (düzensiz) veriler, sırasıyla istatistiğin tanımlayıcı ve açıklayıcı yöntemleriyle test ve karakterize edilirler. 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.

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 kitaplardan ve yayınlanan bilimsel makalelerden gözlenmektedir. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri, Şekil 1.9'da sunulmaktadır.



Şekil 1.9. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkisi

Şekil 1.9'da görüldüğü gibi kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektiği açıktır. Burada programlama ve hesaplamanın yeride çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların geneli kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle ya da basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığından dolayı bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB, MINİTAB ve diğer paket programlar kullanılmaktadır.

Kemometri; analitik kimya, gıda kimyası, çevre kimyası, adli tıp, biyoloji ve arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimcilerinin, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasötik (ilaç) kimyacıları, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda, deneysel tasarım ve ilaç tasarımında, yapı-etki ilişkisi çalışmalarında kemometriyi kullanmaktadırlar (Dinç, 2009).

### **1.3.1. Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları (Multivariate calibration algorithms)**

Modern otomatik analiz yöntemleri çok sayıda veriyi kolayca elde etmemize olanak sağlamaktadır. Örneğin klinik kimyada, kan, idrar gibi numunelerin her biri için birçok analiti saptamada rutin olarak kullanılmaktadır. Bazı kromatografik ve spektroskopik yöntemlerde, sadece tek bir örneğin bileşenlerine ait analitik veriler saptanmaktadır. Her bir örnek için birçok değişkenin ölçüldüğü durumlarda, çok değişkenli veri üretilmektedir (Miller and Miller, 2000).

#### **1.3.1.1. Temel bileşen analiz metodu (Principal component analysis (PCA) method)**

Temel bileşen analizi çok değişkenli verilerin boyutunu indirgemek veya verileri azaltmak için kullanılan bir yöntemdir. Çok değişkenli verilere temel bileşen analizi uygulanmanın amacı, temel de iki şekilde açıklanır.

1. PCA, bir orijinal değişkeni temsil eden  $n$  sayıda orijinal aksı (doğruyu), yeni akslar (doğrular) haline rotasyonunu ve transformasyonunu kapsamaktadır. Bu transformasyon işleminde yeni akslar, verilerin maksimum varyans yönelimleri boyunca uzanır ve bu yeni değişkenler arasında korelasyon bulunmaz. Numune verileri varyansının çoğunu açıklamak için ihtiyaç olan yeni değişkenlerin sayısı,  $n$  sayıdaki orijinal aksdan daha azdır.

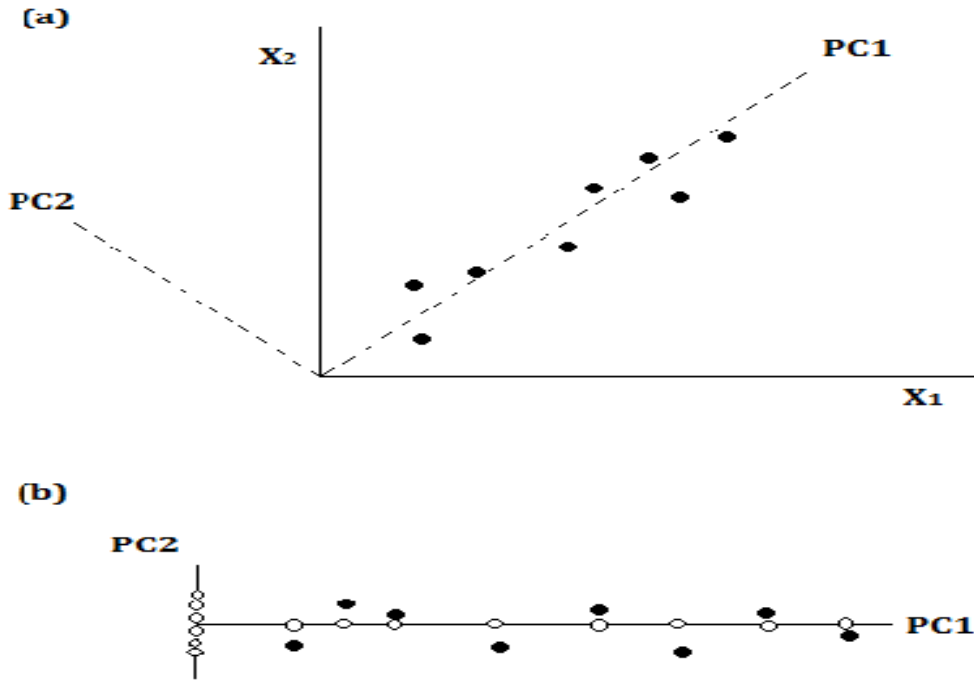
2. PCA, verilerdeki bazı gerçek yapıları tayin eden değişkenleri veya değişken bileşenlerini ortaya çıkarır. Bunlar kimyasal ve fizikokimyasal kavramlar ile yorumlanabilmektedir (Dinç, 2009).

Temel bileşen analizinde,  $X_1, X_2, \dots, X_n$  olmak üzere her bir örneği tanımlayan orijinal verilerin, lineer kombinasyonları olan  $Z_1, Z_2, \dots, Z_n$  olarak temel bileşenleri bulunmaktadır.

$$\begin{aligned}
Z_1 &= a_{11}Z_1 + a_{12}Z_2 + a_{13}Z_3 + \dots a_{1n}Z_n \\
Z_2 &= a_{21}Z_1 + a_{22}Z_2 + a_{23}Z_3 + \dots a_{2n}Z_n
\end{aligned}
\tag{1.6}$$

Esas bileşenler seçilirken; birinci temel bileşen (PC1)  $Z_1$ , veri setindeki varyasyonların çoğundan; ikinci temel bileşen (PC2)  $Z_2$  ise kalan varyasyonların arasında kalan kısımdan oluşmaktadır. Böylece, PCs sayısı orijinal değişken sayısının azaltıldığı yeni bir korelasyon oluşturur

Şekil 1.9 ortamda sadece iki değişken ve iki temel bileşen bulunan bir metodun anlatılmaktadır. Şekil 1.10.(a)'da temel bileşenler kesikli çizgilerle gösterilmektedir ve birbirlerine dik açı oluştururlar, yani ortogonaldirler (diksel). Şekil 1.10.(b) iki yeni eksene ait olan noktaları ve aynı zamanda PC1 ve PC2 üzerindeki noktaların tasarımını göstermektedir.



Şekil 1.10. (a)  $X_1$  ve  $X_2$  olan iki değişkenleri için PC1 ve PC2 temel bileşenlerini gösteren diyagram, (b) Temel bileşen eksenlerinin noktasal gösterimi

Esas bileşenler birbirine dik açı oluşturur. Bu özellik diksellik olarak adlandırılır (Uyanık, 2008). Esas bileşenler genellikle ortak varyans (kovaryans) matrisinden elde edilir. Ortak varyans, iki değişkenin birleşik varyansının bir ölçüsüdür. Matematiksel anlamda temel bileşenler (PC), ortak varyans matrisinin eigenvektör (özvektör)'leridir. Özvektörlerin bulunmasında kullanılan tekniğe eigenanalizi adı verilir. Her esas bileşene (yani, eigen vektörüne) karşılık gelen eigen değeri, o esas bileşenle tanımlanan veri takımının standart sapmasının ve varyansının değerini gösterir (Miller and Miller, 2000).

### **1.3.1.2. Temel bileşen regresyon metodu (Principal component regression (PCR) method)**

Kemometrik kalibrasyon metodlarından birisi olan bu yöntem, derişim seti için ölçülen absorban verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir.

Martens ve Naes (1984) tarafından verilen şemaya göre basamakları aşağıdaki biçimde açıklanmaktadır:

Analiz edilecek maddenin derişim ve absorban verilerinin varyans-kovaryansı bulunur.

↓

Varyans-kovaryans saçılma matrisinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır.

↓

Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi :

$$C = a + b A \quad (1.7)$$

C: analiz edilecek maddenin derişimidir.

a: sabit sayı

b: temel bileşenlerin sayısı

C: loading matriksinin (q) çarpımından elde edilir.

$$b = P \times q \quad (1.8)$$

$$q = D \times T^T \times Y_0 \quad (1.9)$$

P öz vektörlerin matriksidir, öz vektörler kolon matriksi en uygun öz değere (faktöre) ya da öz değerlere (faktörlere) karşılık gelmektedir. q vektörü C loadings olarak adlandırılır ve T (sayı matriksi) üzerinden C'nin regresyonu ile tayin edilir. D diagonal matriks olup her bir öz değer tersine eşittir.  $t_1$  sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir:

$$t_1 = A_0 \times P_1 \quad (1.10)$$

Ortalanmış absorbans ( $A_0$ ) ve ortalanmış derişim, ( $C_0$ ) ile gösterilebilir. Burada a sabiti genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir:

$$a = C_0 - A_0^T \times b \quad (1.11)$$

Herbir aşamada elde edilen değerler 1.7 numaralı denklemde yerine konarak numunenin bilinmeyen derişimi hesaplanabilir.

### **Yöntemin avantajları:**

- Dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir,

- Çoklu bileşen analiz için kullanılabilir,
- PCR data işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına olanak tanır.
- Analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir.
- Bazen orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir,
- Kalibrasyon için ölçülen absorbanların dekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdan ve ölçüm aletlerinden gelen gürültünün eliminasyonuna olanak sağlar.

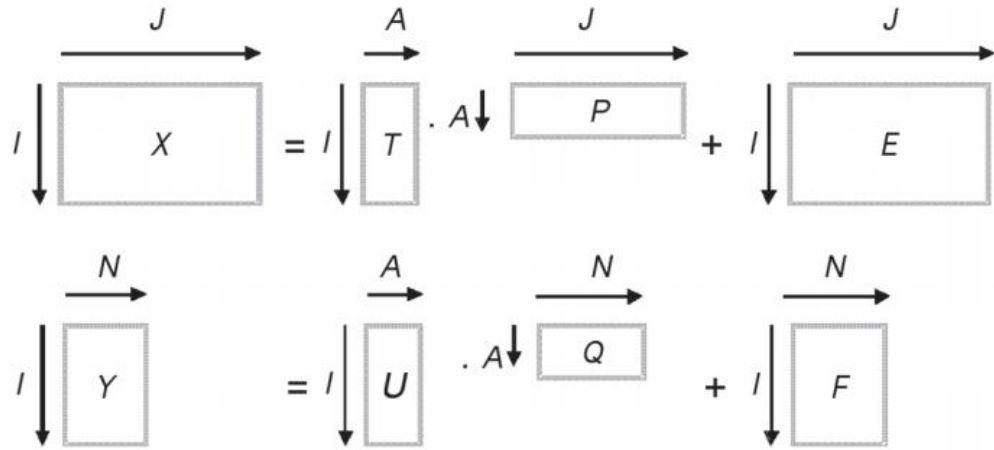
#### **Yöntemin dezavantajları:**

- Hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır,
- Yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için),
- Kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere karşılık gelmeyebilir,
- Genellikle çok sayıda kalibrasyon numunesinin kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir,
- Kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin derişimleri ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur (Dinç 2007).

#### **1.3.1.3. Kısmi en küçük kareler metodu (Partial least squares regression (PLS) method)**

Kemometrik kalibrasyonlardan en yaygın ve popüler olanı PLS yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize olan PLS algoritması (orthogonal-ized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-orthogonalized PLS algorithm)

gibi şekilleri vardır. Ortogonalize ve ortogonalize olmayan PLS algoritması arasındaki temel fark X den faktörlerin çıkarılmasıdır. PLS kalibrasyonunun PLS1 ve PLS2 şeklinde iki çeşiti söz konusudur. PLS1 de bir bileşik model içerisinde iken; PLS2 de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir. Wold ve Martens tarafından verilen PLS algoritması en genel olanlarıdır. PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X- ve Y-blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezleştirilmiş X-değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y-değişkeninin parçalanması Şekil 1.11 'de gösterilmiştir.



Şekil 1.11. PLS2 kalibrasyon şeması

$$\begin{aligned}
 X &= T \cdot P^T + E \\
 Y &= U \cdot Q^T + F \\
 Y &= X \cdot B + F \\
 B &= W(P^T \cdot W)^{-1}Q^T
 \end{aligned}
 \tag{1.12}$$

X= bağımlı değişken (örneğin absorbans verileri),

Y= bağımsız değişken (örneğin derişimi),

T= X için sayı matrisi,

U= Y için sayı matrisi,

P= X için yük matrisi

Q= Y için yük matrisi,  
E= X-kalıntı matrisi,  
F= Y-kalıntı matrisi,  
W= max(kovaryans( E, F))

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) lineer regresyon denkleminde yerine konulursa analizi edilecek numunenin absorbands değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanabilir.

### **Yöntemin avantajları:**

- PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır,
- Tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir,
- Kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik derişimlerini yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır,
- Yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir,
- Bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir,
- Bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS' nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metotları PCR' den daha iyi sonuçlar verir.

### **Yöntemin dezavantajları:**

- PLS hesaplamaları klasik metotlardan daha yavaştır,

- PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur,
- Genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir,
- Kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin derişimleri ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur (Dinç, 2007).

### **1.3.2. Derişim (kalibrasyon) seti tasarımı**

Kemometrik (CLS, ILS, PCR, PLS) kalibrasyonlar için kalibrasyon seti ya rastgele (randomly) yada analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin derişimlerini içerecek şekilde kalibrasyon (derişim) seti tasarımı yapılır. Simetrik kalibrasyon setinin planlanmasında analiz edilecek maddelerin derişimleri, kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturmalıdır. Kemometrik çalışmalarda rastgele kalibrasyon setinin hazırlanmasından ziyade, analiz edilecek maddelerin derişimlerine göre simetrik bir kalibrasyon setinin hazırlanması elde edilecek sonuçların doğruluğu ve hataların minimize edilmesi açısından tercih edilecek bir durumdur. Çalışmalarda derişim seti hazırlanmasında, çeşitli tasarım şekilleri verilmekle birlikte rastgele hazırlanan derişim setleri de kullanılmaktadır.

### **1.3.3. Çapraz validasyon prosedürü (Cross validation procedure)**

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

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon prosedürü (Cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için karelerin tahmin (tayin) hatalarının toplamı (prediction error sum of squares→PRESS) hesaplanır. Optimal faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler minimum PRESS değeri ve F-istatistiğidir (Dinç, 2007).

#### **1.3.4. Varyans analizi (ANOVA)**

Varyans analizi tekniği kullanılarak grup ortalamaları arasındaki farklılığın veya farklı analitik yöntemler ile elde edilen analiz sonuçlarının ortalamaları arasındaki farklılığın önemli olup olmadığına bakılabilir. Bir araştırmada k tane işlemin ( veya k tane yöntemin) n tekrarının sonunda elde edilen veriler bir tabloda özet haline getirilir. Sonra kontrol ve karşıt hipotezi aşağıdaki şekilde kurulur.

$H_0$ : İşlemlerin temsil ettiği popülasyon ortalamaları arasındaki fark tesadüften ileri gelmektedir. İşlem ortalamaları arasındaki gözlenen fark sıfır kabul edilebilir:

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k \text{ 'dir.}$$

$H_1$ : En az iki muamele grubunun ortalaması arasında gözlenen fark tesadüften ileri gelmektedir. En az iki işlem grubunun incelenen özellik üzerine olan etkileri birbirinden farklıdır, yani aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Karşıt hipotez kurulurken en az iki işlem arasındaki fark önemlidir denilmektedir. Çünkü kontrol hipotezinin yapılan analiz sonucunda reddedilmesi için denemede dikkate alınan k tane işlemin birbirinden farklı olması gerekmez. En az iki işlem arasındaki farklılık kontrol hipotezinin reddedilmesine sebep olabilir.

Yapılan hipotez kontrolü sonucunda karşıt hipotez kabul edilmiş ise bu en az iki grup ortalaması arasındaki farklılığın önemli olduğu “çoklu karşılaştırma yöntemleri” kullanılarak araştırılır (Dinç, 2009).

### **1.3.5. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları**

#### **1.3.5.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları**

Analitik kimyadaki miktar tayini çalışmalarında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri ya da çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), potansiyometre, IR spektrofotometre, UV- görünür alan spektrofotometre, spektroflorimetre ve kapiler elektroforez gibi analitik cihazlardan elde edilen analitik verilere uygulanmaktadır. Analitik kimyanın prensip ve yöntemleri çok değişik komşu disiplin tarafından kullanılmaktadır. Bu da analitik kimyanın biyoloji, tıp, ziraat, gıda ve eczacılık gibi alanlarda geniş bir uygulama alanı olduğunu göstermektedir. Analitik çalışmalarda kemometrik yöntemlerin uygulamaları anorganik analiz, organik analiz, ilaç analizi, klinik ve biyolojik numunelerin analizi, gıda ve su analizleri, çevre analizleri ve stabilite tayinleri, çözünme hızı testleri şeklinde özetlenebilir.

#### **1.3.5.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis)**

Son yıllarda çoklu bileşen analizi, analitik kimyacılar için en önemli konulardan birisi oldu. Bu bağlamda, aynı anda miktar tayinlerinin klinik kimyası, ilaç analizi kirlilik kontrolü vb. gibi değişik disiplinler ile ilgili aktif bileşikleri içeren karışımların kantitatif analizi için oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonların absorbands sinyallerine uygulanmasıyla çok bileşen analizlerinden elde edilen sonuçların doğruluğu, yöntem ve kullanılan analitik sinyallere bağlıdır.

İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda, çoklu bileşen analizinde kemometrik kalibrasyon ya da çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri,

doğrudan absorbans sinyallerine uygulandığı gibi türev absorbans sinyallerine de uygulanabilir.

### **1.3.5.3. Organik yapıdaki bileşiklerin kantitatif analizleri**

#### **a) Farmasötik analizdeki uygulamalar**

Farmasötik preparatlar, sabit matriks bileşimi ile nispeten yüksek seviyede bir, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren ticari formülasyonlardır. Farmasötik preparatların kantitatif analizinde CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri artan yoğunlukta kullanılmaktadır. Yardımcı maddelerin varlığında girişim yapan bileşikler içeren kombine farmasötik preparatların analizi, hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın, klasik analitik yöntemlerle mümkün değil iken kemometrik yöntemlerle çözümü son derece basit bir işlemdir. Bu yüzden farmasötik numunelerin analizi için kemometrik yöntemler, potansiyel araçlardır. Kemometrik yöntemler, farmasötik ürünlerin kararlılık (stability) ve bozunma miktarı tayinlerinde de kullanılmaktadır.

#### **b) Gıdalardaki renk maddelerinin analizi**

Kemometrik yöntemlerin yiyecek ya da içeceklerde, renk maddelerinin analizine artan yoğunlukta uygulandıkları gözlenmektedir. Gıdalarda bulunan renklendiriciler, özellikle gıdaları cezbedici kılmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu yüzden de bazı renklendiriciler aşırı derecede tüketilebilir ve bu da sağlık açısından zararlıdır. Bu nedenle analitik kimya açısından renk maddelerinin analizi önemlidir. Gıda numunelerinin analizinde bazı maddelerin izolasyonu için ön işlemler uygulanabilir.

#### **c) Biyolojik sıvılardaki uygulamaları**

Biyolojik sıvılar, çok kompleks ve düşük derişim seviyesinde bileşikler ile karakterize edilirler. Genellikle klinik amaçlar için biyolojik sıvıların doğrudan

spektrofotometrik analizlerinde duyarlılık ve seçicilik düşüktür. Spektral olarak kemometrik yöntemlerin biyolojik sıvıların analizinde kullanımında ekstraksiyon, zenginleştirme, sıvı veya katı faz ekstraksiyonu gibi ön işlemler gereklidir. Bütün bu güçlükler rağmen spektral olarak kemometrik yöntemler ile biyolojik sıvıların analizi çalışmaları vardır. Biyolojik sıvıların analizinde HPLC-kemometrik uygulamalarına ait çalışmalar ile de gözlenmektedir.

#### **d) Çevre analizindeki uygulamaları**

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin çevre analizindeki uygulamaları, analitik kimya açısından önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle bu yöntemlerin yeraltı sularındaki, bazı kalıntılarda, bitki numunelerinde ve ticari preparatlardaki pestisitlerin analizinde uygulandığı gözlenmektedir.

#### **e) İnorganik analizlerdeki uygulamalar**

Çok değişkenli CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyonlarının inorganik maddelerin analizlerinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Sanayi ürünlerinde, gıda ve ilaç preparatlarında, çevre numunelerinde katyonların, anyonların ve iyon gruplarının miktar tayinleri için uygun bir reaktif ile oluşturdukları kompleks bileşikler üzerinden spektrofotometrik yöntemlerle veya spektrofotometrik ölçümlere dayalı olarak kemometrik kalibrasyonlar kullanılmaktadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Khaled M. Darwish ve ark. 2013 'de yapmış oldukları bir çalışmada; türevlendirme için ön kolon kullanılmış ters faz-HPLC yönteminin doğruluğu, geçerliği ve güvenilirliği, Omeprazol, Tinidazol ve Doksisisiklin hiklat veya Klaritromisin içeren iki üçlü karışımın eşzamanlı tayini için kabul etmişlerdir. Ayırma pH'sı 5,66 ayarlanmış asetonitril-metanol-su karışımı kullanılarak kesintisiz gardient elüsyon sistemiyle C18 kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. İlaçlar, sırasıyla Omeprazol, Tinidazol, Doksisisiklin hiklat ve Klaritromisin için 1–112; 5–125; 2,5–550 ve 2,5–100 mg/mL konsantrasyon aralıklarında 277 nm'de tespit edilmiştir. Kızılötesi ve kütle spektroskopisi ile klaritromisin türevini izole eden ve tanımlayan ilk yöntem olmuştur. Bu yöntem Omeprazol, tinidazol, doksisisiklin hiklat ve klaritromisinin kombine karışımlar ve farmasötik formülasyonu için eş zamanlı tayini için ilk çalışma olmuştur.

Jiang ve çalışma arkadaşları 2007 'de yapmış oldukları bir çalışmada; hızlı ve hassas bir yöntem, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi ile insan plazmasındaki Klaritromisin için geliştirmişlerdir. Klaritromisin ve iç standart 200 µL asetonitril ile matristen (50 µL) çöktürülmüştür. HPLC ile ayırmada mobil faz olarak formik asit: 10mM amonyum asetat: metanol (1: 99: 400 v/v/v) kullanılmıştır. Elektrosprey pozitif iyonizasyon kütle spektrometresi ile algılama deneye göre 2,4 dk içinde tamamlanmıştır. Doğrusallık 0,50 ng/mL tespit limiti ile konsantrasyon aralığı 10-5000 ng/mL 'de belirlenmiştir. Gün içi ve günler arasının bağıl standart sapması sırasıyla <math>\%3,73</math> ve <math>\%9,93</math> ölçülmüştür. Yöntem Klaritromisinin iki tablet formülasyonu için bioeşdeğerlik çalışması için uygulanmıştır.

Li ve çalışma arkadaşları 2007 'de yapmış oldukları çalışmada, fare plazmasında klaritromisin tayini için ön kolon türevlendirmesi ve 270 nm'de UV dedöktör kullanılan yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yönteminin geçerliliğini onaylamışlardır. Klaritromisin, fare kanına etil eter katılarak alkolü koşullar altında iç standart (eritromisin) ile alkol katılarak ve

Trimetilbromosilan ile türevlendirilerek ve ekstrakte edilmiştir. Analizler elüsyon boyunca 40 °C'de C18 kolonda gerçekleştirilmiştir ve mobil faz olarak potasyum dihidrojen fosfat (50mM, %0,7 trietilamin, pH:6,8), asetonitril ve metanol (30:45:25 v/v/v) kullanımıştır. Klaritromisinin fare plazmasındaki standart kalibrasyon grafiği 0,1-10 µg/µl aralığında doğrusallığı (r= 0,9998) olmuştur. Gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) sırasıyla 30 ng/mL ve 0,1 µg/mL 'dir. Gün içi ve günler arası test değişkenlik aralığı sırasıyla %2,6-7,4 ve %3,3-8,5 'dir. Bu yöntem farelerde klaritromisinin farmakokinetik bir çalışmasında başarıyla uygulanmıştır.

Franziska Lange ve çalışma arkadaşlarının 2006 'da yapmış oldukları bir çalışmada; makrolit antibiyotikleri geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Her yıl kişi başına 1gr düzeyinde). Vücuda büyük oranda değişmeden girerler ve atık su tesislerinde bile bozulmazlar. Çok fazla çabalamadan, ozonlama ile atıkları elimine edilebilir (uzaklaştırılabilir). Makrolit antibiyotikler bileşimlerindeki karbonhidrat kalıntılarının birinde dimetilamino gruplarının tümüne sahiptir. Bu fonksiyonel gruplar ozonlama reaksiyonunun hedefidir ve klaritromisin için daha kapsamlı bir çalışma için seçilmiştir. Çünkü ozon ile serbest aminin reaksiyonu pH'ya bağlıdır (pH:7,  $k=4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Trimetilenaminin ozonolize benzer şekilde ana reaksiyon N-oksit verimi bir oksijen atomunun transferiyle olur (HPLC ve MS-MS ile tanımlanmıştır). Minör bir ürün (%10'luk formaldehit verimine dayanan) dimetil klaritromisin bulundurur (HPLC ve MS-MS ile tanımlanan). Dimetilamino grubu Hedeflerine göre makrolit antibiyotikleri ile bağlaması için gerekli olmuştur. Sonuç olarak, bu işlevsel grubun kimyasal değişiklikleri özellikle bir proton alıcısı olmayan N-oksitin oluşumu gibi, *Pseudomonas putida* 'nın gelişimini engelleme yolu denendiğinde bu ilaçları inaktive eder. Bu, ozon tarafından klaritromisinin mineralizasyonu ozondan 100 kat daha fazla gerekli olduğu gibi atık su arıtımında da önemlidir.

Pappa-Louisi ve çalışma arkadaşlarının 2001'de yapmış oldukları bir çalışmada; klaritromisin ve roksitromisin makrolid antibiyotiklerinin

amperometrik dedektörle optimum şartlar siklik voltametrik çalışmalar ve HPLC- elektrokimyasal dedektörle farklı sıcaklıklarda (22,5-60 °C) ve tampon (pH:7), metanol, asetonitril ve isopropanolün ikili, üçlü ve dörtlü farklı sulu karışımlarıyla elde edilen sinyaller tarafından bulunmuşlardır. Bu koşullar bir iç standart olarak roksitromisin kullanılarak insan plazmasındaki klaritromisinin nicel analizi için uygulanabilirliği kanıtlanmıştır. Bu, elektrokimyasal tepkilerin hassaslığından ve tekrarlanabilirliğinden emin olmak için eluent bileşeni ve kolon sıcaklığına verilen dikkat ile gösterilmiştir, hemde her iki makrolid için düzgün şekilli pikler analiz edilmiştir.

Hanumanturayudu ve çalışma arkadaşlarının 2013'de yapmış oldukları bir çalışmada; lansoprazol antibiyotiklerin yanı sıra reflü Zollinger-Ellison sendromu, mide ülseri ve Helikobakter pilori enfeksiyonlarının tedavisi için gerekmektedir. Lansoprazol bir proton pompa inhibitör sınıfına aittir. Basit, hızlı, seçici ve izokratik ters faz-UPLC metodu, su: asetonitril: trietilamin (50:50:1) 'den oluşmuş ve pH 6,8'e ortofosforik asit ile ayarlanmış mobil faz kullanılarak (akış hızı 0,70 mL/dk) aktif farmasötikal bileşenlerin (API'S) miktar tayini için geliştirilmiştir. Su: asetonitril: trietilamin (50:50:1 v/v) pH 10,5'e ortofosforik asit ile ayarlanmış mobil faz örnek seyreltici olarak kullanılmıştır. Kromatografik ayırma 2,1 X 100 mm, 1,8 µm boyutlarındaki Acquity UPLC HSS T3 kolonunda gerçekleştirilmiştir. Kolon ve numune sıcaklıkları oda sıcaklığında olmuştur. UV dedektör 285 nm'de ölçüm yapmıştır. Lansoprazolün geliş süresi yaklaşık 2 dk ve toplam çalışma süresi 6 dk olmuştur. Geliştirilen metot ICH prensiplerinin gerekliliklerine göre valide edilmiştir. Yöntemin sonuçlarının karşılaştırılması geleneksel HPLC göre yapılmıştır. UPLC yöntemi analiz süresi, verimlilik ve hassasiyet açısından üstün bulunmuştur. Geleneksel HPLC metoduyla Lansoprazolün çalışma süresi yaklaşık 15 dk olmuştur. Geliştirilmiş metodun HPLC yöntemiyle kıyaslandığında uygun maliyetli ve daha zordur. Metod düzenli bir şekilde Kalite Kontrol Laboratuvarı'nda rutin analizlerde kullanılabilir.

Noubarani ve çalışma arkadaşlarının 2010'da yapmış oldukları bir çalışmada insan plazmasında dört proton pompa inhibitörünün (PPI), omeprazolun (OPZ), pantoprazolün (PPZ), lansoprazolün (LPZ) ve rabeprazol (RPZ) konsantrasyonlarının ölçümü için basit ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirmeyi amaçlamışlardır. Oda sıcaklığında ters faz TRACER EXCEL 120 ODS-A kolonu üzerinde, 1 mL/dk akış hızında, mobil faz olarak fosfat tamponu (10mM)/asetonitril (53/47, v/v trietil amin ile pH'sı 7,3 ayarlanmış) izokratik elüsyon kullanılarak iç standart ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu boyunca analitlerin ayrılmıştır. Seçilen proton pompa inhibitörlerinin toplam analitik çalışma süresi 10 dk'dır. Analizler, omeprazol için 20-2500 ng/mL, pantoprazol için 20-4000 ng/mL, lansoprazol için 20-3000 ng/mL ve rabeprazol için 20-1500 ng/mL çalışma aralığında iyi doğruluk ( $r^2=0,99$ ) göstermiştir. Metodun geri kazanımı %80'e eşit veya daha fazla ve miktar belirleme tayin alt sınırı 4 proton pompa inhibitörü içinde 20 ng/ml olmuştur. Tüm bileşenlerin gün içi ve günler arası değerlendirmesinde varyasyon katsayısı ve hata katsayısı %9,2'den daha düşüktür. Sonuçlar, bu yöntemin insan plazmasında bu 4 bileşenin belirlenmesinde basit, hızlı, kesin ve doğru bir deney olduğunu göstermiştir. Bu valide edilmiş yöntem, farmakokinetik çalışmalarda kullanılabilecek kadar hassas ve tekrarlanabilir. Aynı zamanda bu yöntem seçilen proton pompa inhibitörlerinin analizi isteniyor ise zamana ve maliyete fayda sağlamaktadır.

Al-Momani ve ark. 2010'da yapmış oldukları bir çalışmada, farmasötikal kombinasyonlardaki ve insan plazmasındaki lansoprazolün kantitatif tayini için kromatografik ve spektrofotometrik bir metot geliştirmişlerdir. Analitik parametreler Uluslararası Uyumluluk Topluluğunun prensiplerine göre çalışılmıştır. Akış Enjeksiyon Analiz (FIA) yöntemi asidik ortamdaki N-bromosüksinimid (NBS) 'nin bilinen aşırılığı ile lansoprazolün oksidasyonuna dayanır, mor rengini beyazlatmak için kloronilik asit (CAA) ile fazla oksidasyon reaksiyonu ile takip edilebilmiştir. Ayırma asetonitril: trietilamin: fosfat tamponu (60: 0,2: 39,8 v/v) pH'sı 4,0 ayarlanmış olan bir mobil faz ile RP-C18 kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kumar Reddy ve çalışma arkadaşları 2009'da yapmış oldukları bir çalışmada; pantoprazol sodyum ve lansoprazolün analizi için basit, hızlı ve kesin yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi ticari farmasötik ürünlerdeki bileşenlerin tayini için kullanmış, geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Bileşenler 230 nm'de UV dedektör ile akış hızı 1mL/dk'da asetonitril: fosfat buffer (60:40, v/v pH:7,0) oluşan mobil fazdan faydalanılarak C18 kolonda (Inertsil C18, 5 µ, 150 mm x 4,6 mm) izokratik elüsyonda iyi ayrılmıştır. Pantoprazol sodyum ve lansoprazolün kolonsa tutunma süresi 2,017 dk ve 2,538 dk bulunmuştur. Prosedür doğrusalılık için valide edilmiştir (kolerasyon katsayısı=0,999). Çalışmalar kullanılan mobil faz ile ters faz sıvı kromatografinin pantoprazol sodyum ve lansoprazol için hassas ve seçici olduğunu göstermiştir.

Petkovska ve çalışma arkadaşları 2009 'da yapmış oldukları bir çalışmada; Lansoprazol mobil faz olarak asetonitril: %1'lik trietilamin (41:59 v/v) pH:6,6 olan 25 °C'de Zorbax Eclipse XDB C18 (4,6mm × 50mm, 1,8 µm parçacık boyutlu) kolon kullanılan ters faz HPLC tarafından beş ilgili bileşen varlığında belirlemişlerdir. Kromatografik ayırma için toplam süre yaklaşık 3 dk'dır. Deneysel tasarlama deneysel faktöriyel tarama (23 dizayn full faktöriyel) ve optimizasyon (tepki yüzeyi metodolojisi) için kullanılmıştır. Ayırmanın niteliği ayırma ( $R_s$ ) ve Kromatografik Yanıt Fonksiyonu ile ölçülür. Yöntemin seçiciliği, hassasiyeti linearitesi ve doğruluğu valide edilmiştir.

Patil Javesh ve çalışma arkadaşları 2014 'de yapmış oldukları bir çalışmada; ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC) yöntemi satılan kapsül formülasyonlarındaki (Novaclox) amoksisilin trihidrat ve dikloksasilin sodyum'un aynı anda tespiti için geliştirmişler ve valide etmişlerdir. Önerilen yöntemde 230 nm'de UV dedektörden, akış hızı 1 mL/dk akış hızında, bir C18 kolondan (250 mm x 4,6 mm x 5 µm parçacık boyutlu) ve metanol: su (70:30 v/v) karışımı ortofosforik asit ile pH:3'e ayarlanmış olan hareketli fazdan yararlanılmıştır. Kolonda tutunma süresi amoksisilin trihidrat ve dikloksasilin sodyum için sırasıyla 2.33 ve 5.25 dk bulunmuştur.

Doğrusallık her iki ilaç içinde 10-50 µg/ml konsantrasyon aralığında olduğu bulunmuştur. Gün içi ve günler arası sistem ve metodun % Bağıl Standart Sapması (RSD) %2 olduğu bulunmuştur. % Geri kazanım oranı amoksisilin trihidrat ve diklosasilin sodyum için sırasıyla %100,52 ve %100,32'dir. Önerilen metot spesifik, lineer, hassas, kesin ve zordur. Dolayısıyla geliştirilmiş ve valide edilmiş RP-HPLC yöntemi kapsül formülasyonundaki amoksisilin trihidrat ve dikloksasilin sodyumun eş zamanlı tayini için rutin olarak kullanılabilir.

Sheikh ve çalışma arkadaşları, 2013'de yapmış oldukları bir çalışmada; amoksisilin ve klavulanik asit kombinasyonu yarı sentetik aminopenisilin amoksisilin ve bir beta-laktamaz önleyicisi yani klavulanat potasyumdan (Klavulanik asitin potasyum tuzu) oluşan yaygın olarak kullanılan bir oral antibiyotik kombinasyonudur. Basit, hızlı ve düşük maliyetli ters fazlı HPLC metodu farmasötik formülasyonlarda amoksisilin trihidrat ve klavulanat potasyumunun eş zamanlı olarak belirlenmesi için Hibar-Purospher yıldız ters faz (RP-18e) kolonu (4,6 x 250 mm, 5 µm) kullanılarak daha hassas ve doğru bir şekilde geliştirilmiştir. Ayırma 1,3 mL/dk akış hızında mobil faz olarak pH:3 (Ortofosforik asit ile ayarlanır) ile 90:10 v/v oranında tampon-metanol kullanılarak izokratik elüsyonda elde edilmiştir. Algılama 235 nm'de yapılmıştır. Klavulanat potasyum ve amoksisilin trihidratın tutulma süresi sırasıyla 4.7 ve 10,0 dakika olmuştur. Algılama limiti amoksisilin için 0,015 µg/mL ve klavulanat potasyum için 0,12 µg/mL olmuştur.

Beg ve ark. 2012 'de yapmış oldukları bir çalışmada; 229 nm'de UV dedektör ile hızlı ve hassas yeni RP-HPLC metodunu farmasötikal formülasyonlarındaki ve tablet ilaçlarındaki amoksisilin trihidratın rutin analizleri için geliştirmişlerdir (Damoxy ve Amoxil). Kromatografik ayırma, 1mL/dk akış hızında, fosfat tamponu: metanol (50:50, v/v) pH:3.0 olan hareketli faz karışımı ve izokratik elüsyonu kullanarak MG tipli Capacel Pak C18 kolon üzerinden görüntülenmiştir. Metod analize uygunluğu, doğruluğu, hassasiyeti, duyarlılığı, sistem seçiciliği, güvenilirliği ve doğrusallığı ( $r^2=0.999$ ) için valide

edilmiştir. Pik alanı ve alıkonma süresi sinyalleri alındığı esnada hareketli faz, akış hızı ve pH kombinasyonu gibi 3 faktör kullanarak güvenilirliğin valide edilmesi için box-behnken deneysel dizayndan faydalanılmıştır. Sistemde pH'nın sinyal üzerine bir etkisi olmazken, akış hızı ve mobil faz kombinasyonundaki minör değişimlerin sinyal üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir. Deneysel dizayn geliştirmesinde sonuç, önerilen bu metot amoksisilin trihidratın rutin analizleri için basit, hassas ve son derece güvenilir olan ANOVA kullanılarak istatistiksel analizler valide edilmiştir.

Sonawane ve çalışma arkadaşlarının, 2010'da yapmış oldukları bir çalışmada; yeni basit hızlı ve hassas ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemini yağlı süspansiyondan amoksisilin trihidrat ve bromheksin hidrokloridin eş zamanlı tayini için geliştirmişlerdir. Metanol: buzlu asetik asit (50:50 v/v) mobil fazı ile partikül boyutu 5 µm olan ODS C18 (250 X 4.5 mm ID) kolonu kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk'dır ve görüntü 254 nm'de algılamıştır. Amoksisilin trihidrat ve bromheksin hidroklorürün alıkonma süresi sırasıyla 3,04 ve 8,18 gözlenmiştir. Amoksisilin trihidrat ve bromheksin hidroklorür için doğruluk sırasıyla 8-50 µg/mL ve 5-25 µg/mL aralığındadır. Geri kazanım yüzdesi amoksisilin trihidrat ve bromheksin hidroklorür için sırasıyla %99,54 ve %98,65'dir. Önerilen metot kombine halde bulunan amoksisilin ve bromheksin hidroklorürün rutin analizi için uygulanabilir.

Raju ve çalışma arkadaşlarının, 2009'da yapmış oldukları bir çalışmada; üzerinde bir C8 kolonu bulunan lineer gradiyent HPLC Avrupa Farmakopesinde listelenmiş amoksisilin ile farklı olan maddelerin ayrılması için ve yeni olarak bozulma safsızlığını belirlemek için kullanmışlardır. Amoksisilin piki için USP plak sayısı 3000 den fazla oldu ve USP 'de aynı pik 2,0 'dan daha az kuyruk oluşturmuştur. Zorlayarak bozunma çalışmaları metodun özgünlüğünü ve stabilitesini belirten doğasını göstermek için ICH stres çalışma kılavuzlarını kullanarak amoksisilin ilaç maddesinde yapılmıştır. Sıcaklık ve alkali bozunmadan sonra gözlenen yeni bir safsızlık N-pivaloylamoxicillin olarak tanımlanmıştır. Birbirinden ayrı maddeler için LOD

ve LOQ sırasıyla %0,045 ve %0,086 (w/w) 'nın altında olmuştur. Yöntem ICH analitik metot validasyon kurallarına göre tam olarak doğrulanmıştır. Çalışmanın sonuçları, yöntemin spesifik, kesin, doğrusal, güvenilir olduğunu ispatlamış ve amoksisilin ilaç maddesinin stabilitesinin değerlendirilmesi için kullanılabilir bulmuşlardır.

Tavakoli ve çalışma arkadaşlarının 2007'de yapmış oldukları bir çalışmada; tablet formülasyonları ve sonraki istikrar çalışmaları için ilaç ekipmanlarının uyumluluk çalışmaları ile ilaç profilleri belirlendi diye, kolay hızlı, hassas ve güvenilir bir ters faz-HPLC yöntemi tek dalga boyunda amoksisilin ve metronidazolün eş zamanlı miktar tayini için geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Filtrelenen numune bir izokratik ayırma işlemiyle, 254 nm'de tamponlu mobil faz (pH 4,0) kullanılarak ve UV tespiti ile C18 kolonunda uygulanmıştır. Kantitasyon iç standart yöntemiyle belirlenmiştir. Amoksisilin için 0,15-600 µg/mL ve metronidazol için 0,13-300 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallığı saptanmıştır. Gün içi ve gün arasındaki hassasiyeti %2,5'den daha az olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen kantitasyon ve LOD limitleri amoksisilin için 0,05 ve 0,15 µg/mL, metronidazol için 0,10 ve 0,13 µg/mL olarak belirlenmiştir. İki aktif bileşenin belirlenmesi ürünlerin yardımcı maddelerinden etkilenmemiştir. Örneklerin verildiği ortam (release media) 37°C'de ve HPLC enjektörü 12 saat boyunca stabil durumda kalabilmiştir.

Matar 2006 'da yapmış olduğu bir çalışmada; insan plazmasında amoksisilin miktarının belirlenmesi için hızlı, basit, doğru, hassas, tekrarlanabilir ve iç standart sefadoksil kullanılan bir HPLC metodu geliştirmiş ve doğrulamıştır. Yöntem, ters fazlı sıvı kromatografisinden önce bir ultrafiltrasyon aşamasını içerir. İlaç ve iç standart, oda sıcaklığında Symmetry C18 paslanmaz çelik kolondan (5 µm, 150x4,6 mm I.D.) metanol: 75 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu çözeltisinden (10: 90, v/v) (fosforik asit ile pH 3,0'a ayarlandı) oluşan bir mobil faz yardımıyla 1,5 mL/dk akış hızında ayrılmıştır. Akış 228 nm'de ayarlanmış bir UV dedektör kullanılarak izlenmiştir. Her analize 10 dakika yeterli olmuştur. Miktar tayini ilaç ile iç standardın pik

oranının ölçümü ile gerçekleştirilmiş ve plazmada amoksisilin miktar seviyesi 0.5 µg/mL olmuştur (%RSD ve %DEVs <15% imiş). Yöntem, iyi bir hassasiyet göstermiştir: Amoksisilin için gün içi %RSD değerleri 1,41-6,86 aralığında oldu buna karşın dört farklı konsantrasyonda gün arası değerler %1,13-8,16 aralığında olmuştur. Yöntem hızlı (toplam çalışma süresi <12 dakika) ve doğru (DEVs,% <10%) bulunmuştur. Ortalama nispi iyileşme %99,67 ve ortalama mutlak iyileşme %86,68 olmuştur. Stabilitate testi, 70°C'de depolandığında amoksisilin plazmada en az 4 hafta stabil olduğunu göstermiştir. Bu yöntem sağlıklı tavşanların kullanıldığı bir farmakokinetik çalışmada başarıyla uygulanmıştır.

Dousa ve çalışma arkadaşları 2005'de yapmış oldukları bir çalışmada; önceden karıştırılmış karışımdaki amoksilinin tespiti ve miktarı için HPLC aracılığıyla rutin olarak hızlı bir analitik prosedür geliştirmiş ve test etmişlerdir. Örnekler 100 ml metanol-su (800:200 v/v) karışımı kullanılarak 10 dakika ekstraksiyon edilmiştir. Ekstrakt mobil faz olarak 10 mM hekzan-1-sülfonik asit sodyum tuzu (pH 3,5) içeren su-metanol-fosforik asit-trietilamin (842:150:4:4) ile Agilent Zorbax SB-C18 kolonu (4,6 mm×150 mm, i.d., 5µm partükül boyutlu) üzerinde ters faz tarafından analiz edilmiştir. UV tespiti 230 nm'de gerçekleştirilmiştir. Seçicilik, doğrusallık, çözelti stabilitesi, doğruluk, hassaslık, algılama limiti ve belirleme limiti için yöntem doğrulanmıştır. Amoksisilin için dedektör tepkisi 0,9999 korelasyon katsayısı ile 2,0- 40,0 mg/mL arasında seçilen konsantrasyon aralığında doğrusal olmuştur. Doğruluk ortalaması %0,6 standart sapma ile %100,1 olmuştur. Tespit limiti ve belirleme limiti sırasıyla 0,1 ve 0,3 mg/mL olmuştur, ön karışım örneğinde sırasıyla 10 ve 30 mg/kg'e karşılık gelmiştir. Örnekler ve standart çözelti 4 saat boyunca stabil kalmıştır. Bu method seçici ve rutin analizlerde kullanılabilir bulunmuştur.

Wibawa ve arkadaşlarının 2002'de yaptıkları çalışmada; hızlı, seçici ve hassas olan HPLC analizi düşük konsantrasyonlu amoksisiline (<1 µg/mL ) veya küçük hacimli numunelere uygulanabilen fare plazması, mide suyu aspiratı ve

gastrik dokusundaki amoksisilin rutin analizleri için geliştirmişler; bununla birlikte uygulaya bilmişlerdir. Amoksisilin, sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılarak geri kazanılan fluorasan ürünlerinin bir formu da internal yeiden düzenleme vasıtasıyla dönüştürülmüştür. Kromasil ODS 3 µm (150 x 13,2 mm ID ) kolonun 40°C 'de ölçülmüştür ve metanol-su (55:45 v/v) içeren mobil faz kullanılmıştır. Florometrik algılama  $\lambda_{ex}$ :365 nm ve  $\lambda_{em}$ :445 nm de gerçekteşmiştir. Amoksisilin nicel analizlerinin limiti mide suyu (500 µL) içinde 0,1 µg/mL, plazma (50 µL) içinde 0,5 µg/mL ve gastrik dokusu (250 mg) içinde 0,075 µg/mL 'dır. Bu metot en az mide suyunda 15 µg/mL, plazmada 200 µg/mL ve gastrit dokusunda 100 µg/g'da doğrusaldır. Bununla birlikte gün içi ve günler arası RSDs %19'dan daha azdır. Bu analizler özel farelerde farmokokinetik çalışmalar için fare plazması, mide suyu ve gastrit dokusu içinde amoksisilin ölçümü için uygulanabilir.

Hsu ve çalışma arkadaşları 1992'de yapmış oldukları bir çalışmada, Ters faz sıvı kromatografisi metodu ile amoksisilin ve preparatlarının tayini için geliştirmişlerdir. Doğrusal kalibrasyon aralığı 0,2 ila 2,0 mg/mL ( $r = 0,9998$ ) ve geri kazanımlar genellikle %99'dan fazladır. HPLC değerlendirme sonuçları toplu ilaç maddesi ve kapsül, enjeksiyon ve amoksisilin ve bozulmuş amoksisilin içeren granül formülasyonlarının mikrobiyolojik bir tayininden elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. %99 güvenilirlik seviyesinde, sonuçlar karşılaştırıldığında yöntemler arası önemli farklılıklar gözlemlenmemiştir. Ticari formülasyonlarda analiz edildi ve önerilen yöntemle elde edilen sonuçlar mikrobiyolojik yöntemle bulunanlarla çok yakın olmuştur. Sonuçlar, önerilen metodun amoksisilin preparatlarının stabilite çalışmaları ve tayininde mikrobiyolojik metodlar için uygun bir yedek olduğunu göstermiştir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

Bu çalışmada, ilaç etken maddesi olarak kullanılan amoksisilinin, klaritromisinin ve lanzoprazolün aynı anta tayini ve nicel analizi yüksek performans sıvı kromatografisi ile yapılmıştır. Bu analiz sonucunda elde edilen veriler, PCA, PCR, PLS, gibi kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Etken maddelerin önce ayrı ayrı daha sonra sentetik karışımları hazırlanarak spektrumları alınmıştır. Son olarak da ilaç numunesindeki ölümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler lisansı elimizde bulunan Minitab 16 istatistik programıyla değerlendirilmiştir.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

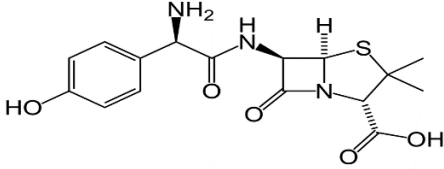
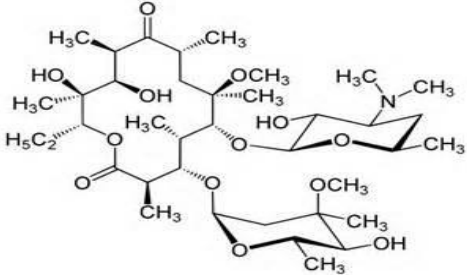
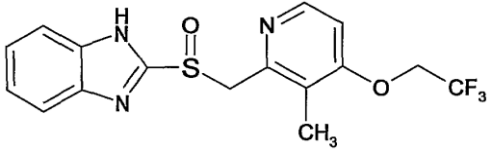

##### **3.2.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı**

Etken maddelerin kromatografik ayrımları Shimadzu LC-20 AT serisi ters faz HPLC, kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol nitesi (CBM-20A), pompa (LC-20AT), gaz giderme birimi (DGU-20A 5 ), oto enjektör (SIL-20A), kolon fırını (CTO-10AS VP) ve dedektör (SPD-M20A /Diyode Array Detector (DAD)) bulunmaktadır. Yüksek performans sıvı kromatografisinde (HPLC) kolon olarak XTerra®RP18 (4,6 x 250mm, 5µm) tercih edilmiştir. Mobil faz için 0,45µm HV Durapore® Membran filtre kullanılmıştır.

#### **3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Analizler esnasında kullanılan etken madde standartları analitik saflıkta veya HPLC saflıkta kullanılmış olup, maddeler için herhangi bir saflaştırma işlemine gerek duyulmamıştır. Çalışmada kullanılan etken madde özellikleri, izelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan etken maddeler ve özellikleri

Bileşimin adı	Sistemik adı	Temin edildiği firma	Maksimum absorbanst yaptığı dalga boyu
Amoksisilin		SIGMA A8523	205 nm
Klaritromisin		SIGMA C9742	210 nm
Lansoprazol		SIGMA L8533	205 nm
Atorvastatin		SIGMA Y0001328	210 nm

Kromatografik çalışmada kullanılan diğer kimyasallar, Çizelge 3.2' de yer almaktadır.

Çizelge 3.2. Analizde kullanılan kimyasal maddeler

Bileşik adı	Kullanım Amacı	Açıklama
Asetonitril (ACN)	Mobil faz için kullanılan organik çözücü	Merck, HPLC saflığında
Amonyumklorür (NH <sub>4</sub> Cl)	Mobil fazın pH ayarlamasında kullanılır	Merck, analitik saflıkta
Amonyak (NH <sub>3</sub> )	Mobil faz pH ayarlamada kullanılır	Merck, analitik saflıkta

### **3.3.1. Kullanılan Çözeltiler**

Çalışmada, kromatografik ölçümler için klaritromisin 1000 ppm, amoksisilin 500 ppm, lanzoprazol 500 ppm ve atorvastatin 500 ppm olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

#### **Stok Amoksisilin Çözeltisi (500 ppm)**

Amoksisilin maddesinden 5 mg tartılarak bir miktar mobil fazda çözüldükten sonra son hacim 10 mL' ye tamamlandı.

#### **Stok Klaritromisin Çözeltisi (1000 ppm)**

Klaritromisin maddesinden 10 mg tartılarak bir miktar mobil fazda çözüldükten sonra son hacim 10 mL' ye tamamlandı.

#### **Stok Lanzoprazol Çözeltisi (500 ppm)**

Lanzoprazol maddesinden 5 mg tartılarak bir miktar mobil fazda çözüldükten sonra son hacim 10 mL' ye tamamlandı.

#### **Stok Atorvastatin Çözeltisi (500 ppm)**

Atorvastatin maddesinden 5 mg tartılarak bir miktar mobil fazda çözüldükten sonra son hacim 10 mL' ye tamamlandı.

#### **Tablet numune çalışması**

Amoksisilin, Klaritromisin ve Lanzoprazol ilaç formülasyonlarında miktar tayini yapabilmek için aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır. İlaç tableti, Şekil 3.1'de gösterilmektedir.

10 tane ilaç tableti tartılır ve havanda iyice ezilerek toz haline getirilir.



1 tablet ağırlığı kadar toz ilaçtan alınır.



100 ml mobil faz ilave edilir (Bu miktar ppm aralığına göre ayarlanır.)



Ultrasonik banyoda 25 dk çözünmesi beklenir.



Mavi bant süzgeç kağıdından süzülür.



Süzüntü kalibrasyon derişim aralığına gelene kadar seyreltilir.



Şekil 3.1. Amoksisilin, Klaritromisin ve Lanzoprazol etken maddelerini içeren ilaç numunesi

### **Kromatografik çalışmada kullanılan mobil faz**

Asetonitril ve su (45:55 v/v) karışımına 25 mM amonyum klorür( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) konsantrasyonunda ilave edilir ve pH 10 'a derişik amonyak ( $\text{NH}_3$ ) ile ayarlanır. Mobil faz 0,45  $\mu\text{m}$  çaplı filtre kâğıdı ile süzülür. Mobil faz ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

### **3.4. Yöntem**

#### **3.4.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi**

Bu çalışmada, kromatografik ölçümlerle ilaç aktif maddelerinin stok çözeltilerinin kromatogramları okunmuştur. Bu işlem için önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların kromatogramları alınmıştır. Son işlem olarak da ilaç örneklerinde ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, farklı kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk aşamada kromatogramdaki piklerin analizlenen etken maddelerin olup olmadığı kontrol edilmiştir. Kontrol işlemi boş enjeksiyon, saf su ve mobil faz enjeksiyonu yapılarak kromatogramın düz olması sağlanmıştır. İkinci aşamada, saf ilaç etken maddelerinin tek tek kromatogramları alınmıştır. Bu işlem ilaç etken maddelerinin validasyon ve kalibrasyon setleri için uygun derişimler hazırlanarak yapılmıştır. Son basamakta ise, piyasada satılan ilaç numunesindeki ilaç etken maddelerinin çözeltileri incelenmiştir.

HPLC koşulları, izokratik programda, akış hızı 1ml/dk, enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlanmıştır. HPLC kemometrik analiz süresince, maddelerin pik alanları 205, 210, 215, 220 ve 225 nm olmak üzere beş dalga boyunda iç standarda karşı analiz edilerek pik alanlarının oranları karşılaştırılmıştır.

## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

### **4.1. HPLC Sistem Uygunluk Parametreleri**

#### **4.1.1. İç standartın belirlenmesi**

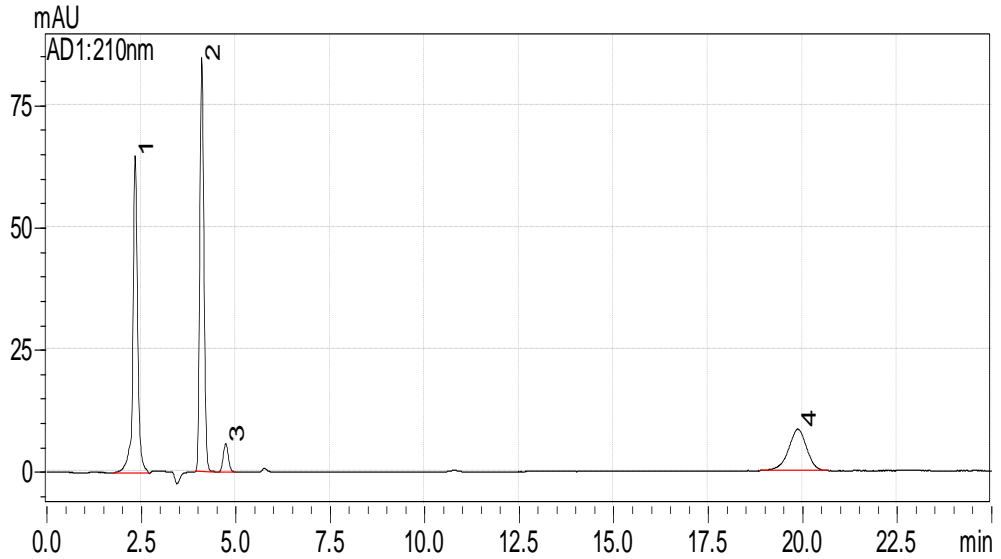
Analiz esnasında numuneye ve kalibrasyon standartlarına belirli miktarda eklenen maddeye iç standart denir. Kalibrasyon fonksiyonlarının hazırlanmasında ve numune hazırlık işlemlerinde eklenen iç standart derişimi sabit tutulmaktadır. İç standartın uygun seçilmesi sistematik ve rastgele oluşabilen hataları engelleyebilir. Amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazol analizleri esnasında iç standart seçimi için farklı ilaç aktif maddeleri denenmiştir. Seçicilik, analiz süresi ve ayırma gücü gibi parametreler göz önünde tutularak amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazol analizi için iç standart olarak atorvastatin seçilmiştir. Seçilen iç standart analizi yapılan bileşiklerden yapıca farklıdır.

#### **4.1.2. Sistem uygunluk sonuçları**

Sistem uygunluk testleri (SUT), Food Drug Administration (FDA) ve United States Pharmacopeia (USP) tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir. Bu çalışmada amoksisilin, klaritromisin, lansoprazol ve atorvastatin için belirlenen optimum şartlarda sistem uygunluk testleri geliştirilmiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan etken maddeler yapıca birbirinden çok farklı olduğu için kemometrik çalışmada göz önünde bulundurulduğundan dolayı kuyruklanma (kapasite) faktörü ve ayırma gücü ( $R_s$ ) göz ardı edilmiştir. Belirli derişimlerde hazırlanan çözeltilerin sisteme enjeksiyonundan sonra kromatografik parametreler hesaplanmıştır. Amoksisilin, klaritromisin, lansoprazol ve iç standart için sistem uygunluk testlerinden elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.1'de verilmektedir. Bu dört etken maddenin sistem uygunluk testlerinden elde edilen 210 nm'deki kromatogramları, Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Amoksisilin, klaritromisin, lansoprazol ve iç standart için sistem uygunluk parametreleri

Parametreler	AMX	LNZ	IS	CTM	Önerilen Değerler
Alıkonma zamanı (T.R)	2,336	4,052	4,798	20,382	
Kuyruklanma faktörü (Tailling F.)	0,997	1,198	1,144	0,957	0,95-1,20
%RSD (Alıkonma zamanı)	0,098	0,242	0,407	0,924	≤1
%RSD (Pik alanı)	0,784	0,535	0,881	0,885	≤1
Teorik tabaka sayısı (N)	2336,5	5883,64	5496,44	8158,174	>2000



Şekil 4.1. Etken madde standartlarının karışım kromatogramı 1) Amoksisilin 2)Lansoprazol 3) Atorvastatin ve 4) Klaritromisin

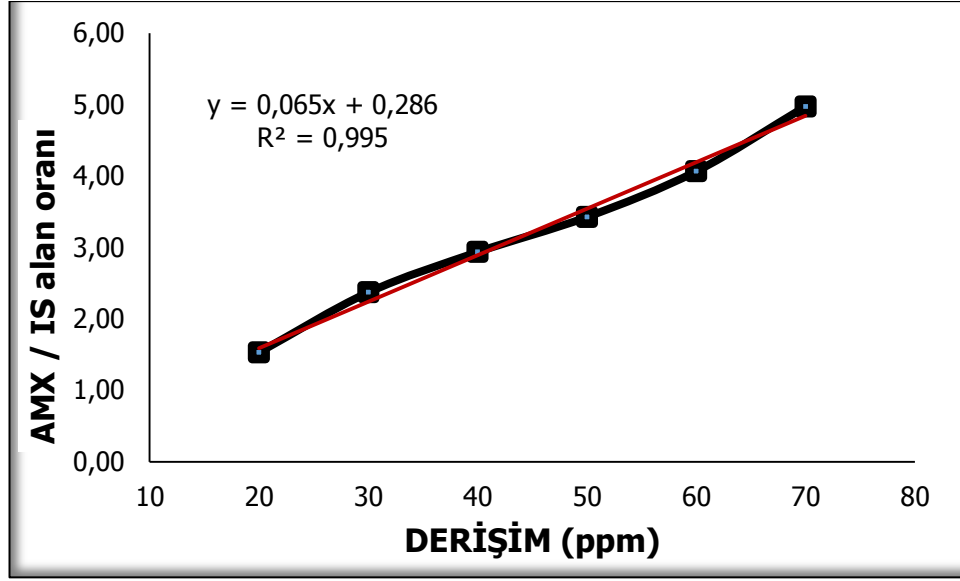
### **4.1.3. Amoksisilin, Klaritromisin ve Lansoprasolün HPLC ile analiz yönteminin validasyonu**

Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak gayesi ile validasyon parametrelerine göre test edilmesi kaynaklarda belirtilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu yüzden validasyon çalışmalarında; duyarlık, kesinlik, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, ve geri kazanım gibi parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirilmesi yapılmıştır.

#### **4.1.3.1. Kalibrasyon doğrusu ve duyarlılık**

Amoksisilin HPLC ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve lineer aralığın saptanmasında amoksisilin 20-70 ppm aralığında (Şekil 4.2) farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusu ve duyarlılığı verilerine göre teşhis sınırı değeri tayin alt sınırı değerinden küçük olmalıdır ( $LOD < LOQ$ ).

Kalibrasyon doğrusu, amoksisilin her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının iç standart (atorvastatin) pik alanına oranının, amoksisilin derişim değerine karşı işaretlenmesi ile oluşturulan grafikdir. Geliştirilen yöntem amoksisilin için 20-70 ppm arasında doğrusaldır. Amoksisilin için elde edilen doğrusallık verileri, Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Amoksisilin analizine ait doğrusal kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2. Amoksisilin analizine ait kalibrasyon grafik parametreleri

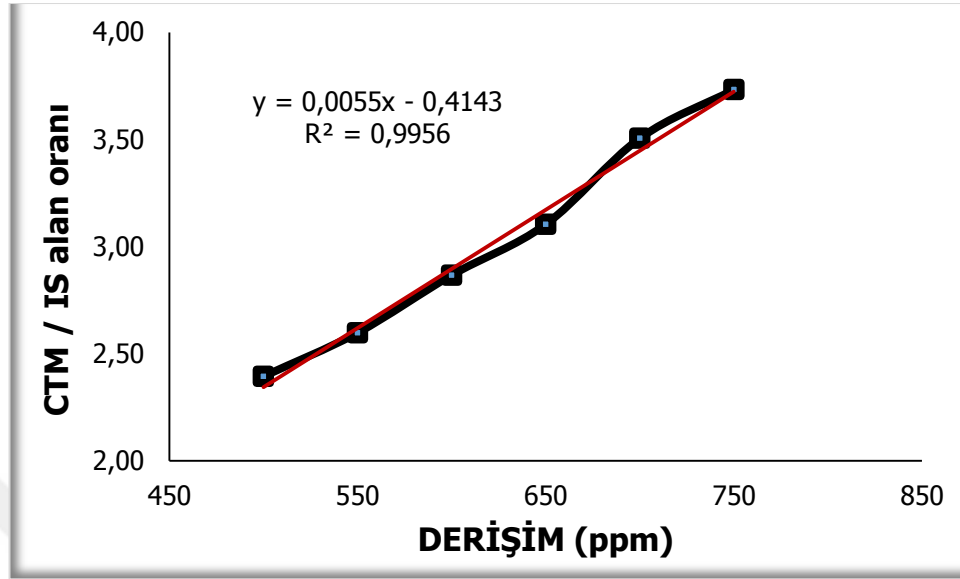
<b>Regrasyon Denklemi</b>	$y = 0,065x + 0,286$
<b>Denklemin Standart Sapması</b>	0,131
<b>Kesimin Standart Sapması</b>	0,151
<b>Eğimin Standart Sapması</b>	0,003
<b>Kolerasyon Katsayısı (R)</b>	0,995
<b>Kalibrasyon Aralığı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	20-70
<b>Teşhis Sınırı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	6,585
<b>Tayin Alt Sınırı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	19,955

\* $y = bx + a$  ; x:  $\mu\text{g/mL}$  biriminde derişim, y: amoksisilin/iç standart alan oranı değerleri

Klaritromisinin HPLC ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve lineer aralığın saptanmasında klaritromisinin 500-750 ppm aralığında (Şekil 4.3) farklı deişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır.

Kalibrasyon doğrusu, klaritromisinin her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının iç standart (atorvastatin) pik alanına oranının, klaritromisinin derişim değerine karşı işaretlenmesi ile oluşturulan grafikdir. Geliştirilen yöntem

amoksisilin için 550-750 ppm arasında doğrusaldır. Klaritromisin için elde edilen doğrusallık verileri, Çizelge 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.3. Klaritromisin analizine ait doğrusal kalibrasyon grafiği

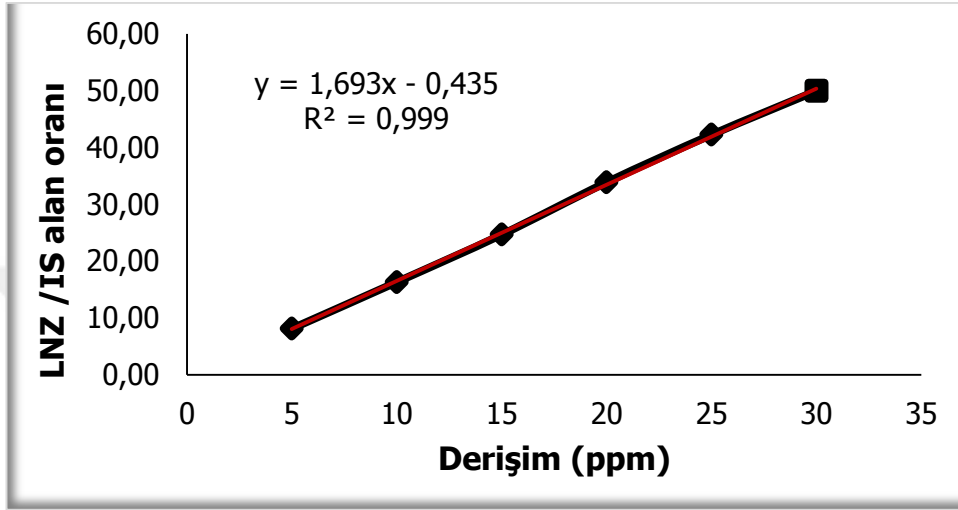
Çizelge 4.3. Klaritromisin analizine ait doğrusal kalibrasyon grafik parametreleri

<b>Regrasyon Denklemi</b>	$y = 0,0055x - 0,4143$
<b>Denklemin Standart Sapması</b>	0,0545
<b>Kesimin Standart Sapması</b>	0,0003
<b>Eğimin Standart Sapması</b>	0,1644
<b>Kolerasyon Katsayısı (R)</b>	0,9956
<b>Kalibrasyon Aralığı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	500-750
<b>Teşhis Sınırı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	32,5815
<b>Tayin Alt Sınırı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	98,732

\* $y = bx + a$  ; x:  $\mu\text{g/mL}$  biriminde derişim, y:klaritromisinin/iç standart alan oranı değerleri

Lansoprazolün HPLC ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve lineer aralığın saptanmasında amoksisilinin 5-30 ppm aralığında (Şekil 4.4) farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır.

Kalibrasyon doğrusu, lansoprazolün her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının iç standart (atorvastatin) pik alanına oranının, lansoprazolün derişim değerine karşı işaretlenmesi ile oluşturulan grafiktir. Geliştirilen yöntem lansoprazol için 5-30 ppm arasında doğrusaldır. Lansoprazol için elde edilen doğrusallık verileri, Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Lansoprazolün analizine ait doğrusal kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.4. Lansoprazolün analizine ait doğrusal kalibrasyon grafik parametreleri

<b>Regrasyon Denklemi</b>	$y = 1,693x - 0,435$
<b>Denklemin Standart Sapması</b>	0,387
<b>Kesimin Standart Sapması</b>	0,36
<b>Eğimin Standart Sapması</b>	0,019
<b>Kolerasyon Katsayısı (R)</b>	0,999
<b>Kalibrasyon Aralığı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	5-30
<b>Teşhis Sınırı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,754
<b>Tayin Alt Sınırı (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	2,284

\* $y = bx + a$  ; x:  $\mu\text{g/mL}$  biriminde derişim, y: lansoprazol/iç standart alan oranı değerleri

#### 4.1.3.2. Doğruluk ve kesinlik

Amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazolün analizi için kesinlik ve doğruluk çalışmaları, amoksisilin için 10-70 ppm derişim aralığında, klaritromisin 500-750 ppm derişim aralığında ve lansoprazol 5-30 ppm derişim aralığında gerçekleştirilmiştir ve gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7' de gösterilmektedir.

Gün içi çalışma, iki farklı derişim üzerinden (amoksisilin 30 ppm ve 60 ppm, klaritromisin 550 ppm ve 700 ppm, lansoprazol 10 ppm ve 25 ppm derişim aralığından kullanılan) 3 bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içinde HPLC' ye enjekte edilerek yapılmıştır. Günler arası çalışmada ise iki farklı derişim üzerinden (amoksisilin 30 ppm ve 60 ppm, klaritromisin 550 ppm ve 700 ppm, lansoprazol 10 ppm ve 25 ppm derişim aralığından kullanılan) 3 bağımsız çözelti kullanılarak 3 farklı günde HPLC' ye enjekte edilerek yapılmıştır.

Çizelge 4.5. Amoksisilinin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik verileri

<b>AMX</b>	Teorik Derişim ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Gün İçi Derişim Ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Günler Arası Derişim Ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
	30	30,448 $\pm$ 0,14	0,446	28,051 $\pm$ 0,49	1,733
	60	60,218 $\pm$ 0,16	0,265	59,441 $\pm$ 0,71	1,190

Çizelge 4.6. Lansoprazolün analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik verileri

<b>LNZ</b>	Teorik Derişim ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Gün İçi Derişim Ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Günler Arası Derişim Ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
	10,00	9,896 $\pm$ 0,051	0,03	9,643 $\pm$ 0,141	1,459
	20,00	23,57 $\pm$ 0,104	0,441	23,269 $\pm$ 0,383	1,645

Çizelge 4.7. Klaritromisin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik verileri

CTM	Teorik Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Gün İçi Derişim Ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Günler Arası Derişim Ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g/mL}$ )
	550,00	554,259 $\pm$ 1,52	0,276	541,716 $\pm$ 6,81	1,269
	700,00	703,034 $\pm$ 2,38	0,338	691,872 $\pm$ 10,5	1,517

#### 4.1.3.3. Geri kazanım

Amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazolün tayini için geliştirilen analiz yöntemi piyasada satılan tabletlere uygulanmıştır. Amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazol içeren preparattan miktar tayini yapmak amacıyla materyal metot bölümünde anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmıştır. Yapılan analiz sonucunda okunan pik alan değerleri kalibrasyon denklemine göre yorumlanarak tabletin içerdiği amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazolün miktarları hesaplanmıştır. Tabletten hesaplanan ilaçtaki amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazol miktarları sırasıyla, Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.8. Amoksisilin içeren tablete ait geri kazanım verileri

AMX		
Teorik derişim (ppm)	Deneyysel derişim (ppm)	% Geri kazanım
30,00	30,514	100,165
40,00	41,802	100,638
60,00	57,908	100,367
		$\Sigma=100,389$
		SD=0,237
		%RSD=0,236

Çizelge 4.9. Klaritromisin içeren tablete ait geri kazanım verileri

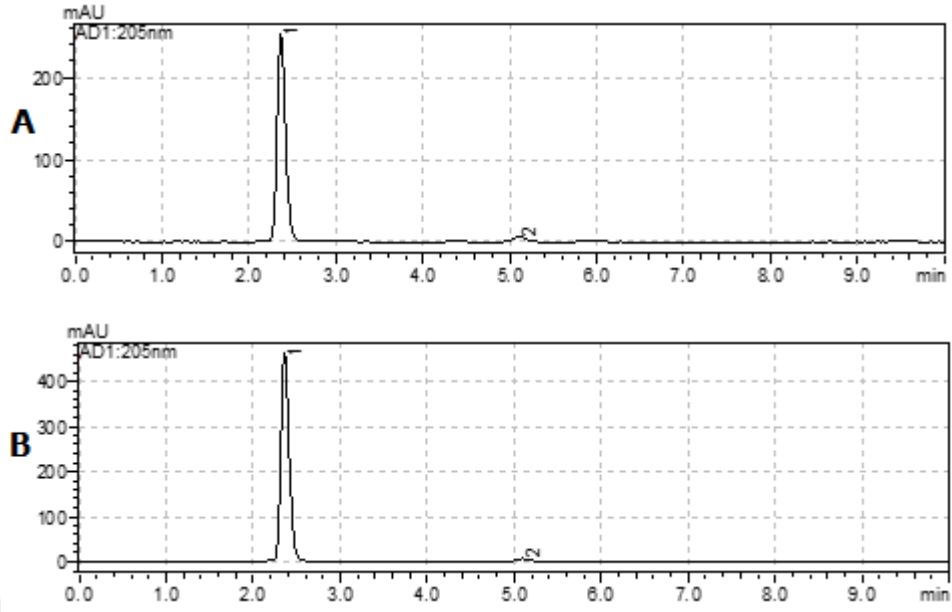
<b>CTM</b>		
Teorik derişim (ppm)	Deneysel derişim (ppm)	% Geri kazanım
550,00	529,058	99,038
650,00	632,361	99,826
700,00	693,454	99,752
		$\Sigma=99,539$
		SD=0,435
		%RSD=0,437

Çizelge 4.10. Lansoprazol içeren tablete ait geri kazanım verileri

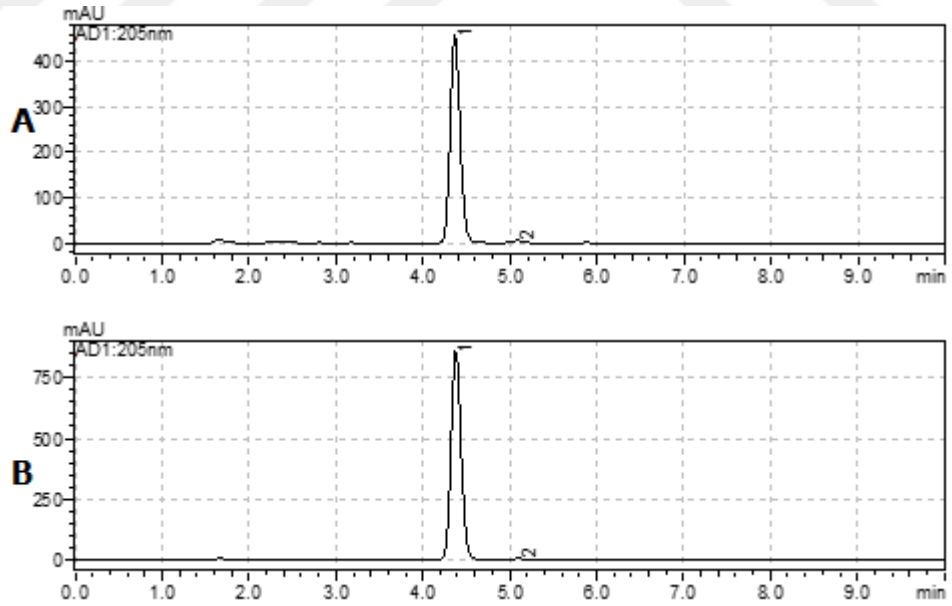
<b>LNZ</b>		
Teorik derişim (ppm)	Deneysel derişim (ppm)	% Geri kazanım
10,00	10,45	101,174
20,00	20,26	101,281
25,00	25,14	101,298
		$\Sigma=101,251$
		SD=0,067
		%RSD=0,067

Tablet içerisinde bulunan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla geri kazanım çalışması yapılmaktadır. Çalışmadaki hesaplamalar sonucunda % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan % geri kazanım değerlerinin %95-%110 aralığında olması yöntemin gerikazanım için uygun olduğunu göstermektedir.

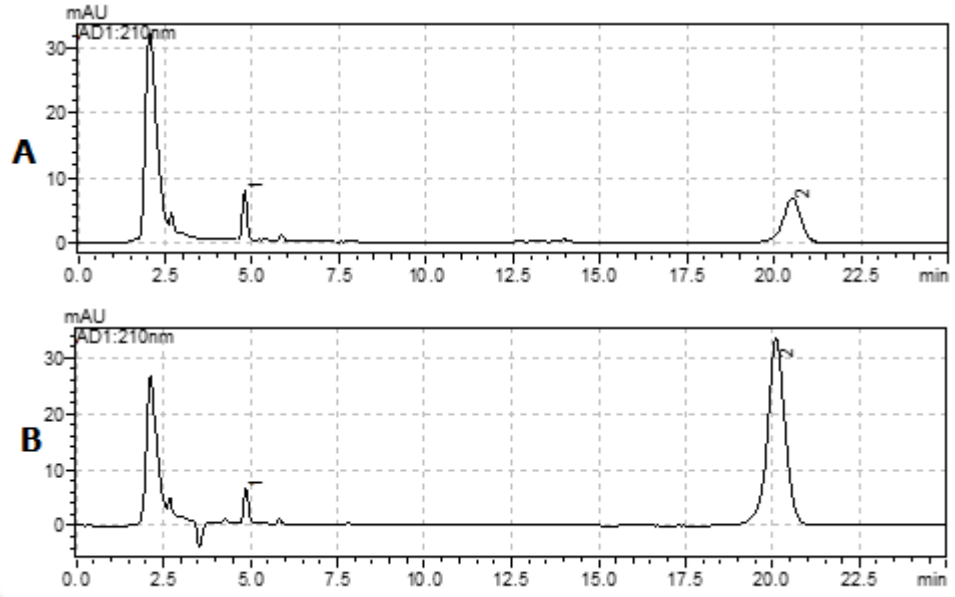
Bu hesaplanan sonuçlar, Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10' da gösterilmiştir. Tablet numunelerinin analizini gösteren kromotogramlar ile bileşiklere belirli derişimlerde katkı yapılan numunenin analizine ait kromotogramlar, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7' de gösterilmektedir.



Şekil 4.5. A) 60 ppm AMX içeren tablet çözeltisine ait kromatogram, B) 60 ppm AMX içeren tablete aynı derişimde AMX standardı ile ilave edilmiş çözeltiye ait kromatogram (1:AMX, 2:IS)



Şekil 4.6. A) 25 ppm LNZ içeren tablet çözeltisine ait kromatogram, B) 25 ppm LNZ içeren tablete aynı derişimde LNZ standardı ile ilave edilmiş çözeltiye ait kromatogram (1:AMX, 2:IS)



Şekil 4.7. A) 700 ppm CTM içeren tablet çözeline ait kromatogram, B) 700 ppm CTM içeren tablete aynı derişimde CTM standardı ile ilave edilmiş çözeltiye ait kromatogram (1:AMX, 2:IS)

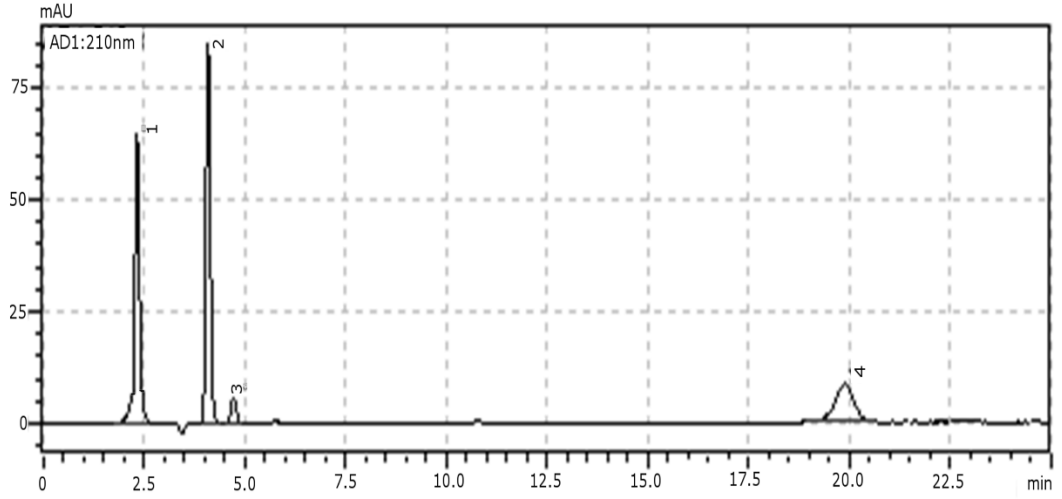
Tablet analizi sonucunda elde edilen pik alanlarının ve tablete belirli oranda katkı yapılarak elde edilen pik alanlarının iç standarta oranlanarak elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.11'de verilmektedir.

Çizelge 4.11. Tabletın katkılı ve katkısız olarak elde edilen kromatogram pik alan oran değerleri

	<b>Derişim(ppm)</b>	<b>Katkısız tablet</b>	<b>Katkılı tablet</b>
<b>AMX/IS alan oranı</b>	30,000	2,269	4,223
	40,000	3,004	5,619
	60,000	4,050	7,965
<b>CTM/IS alan oranı</b>	550,000	2,496	5,492
	650,000	3,064	6,084
	700,000	3,399	7,240
<b>LNZ/IS alan oranı</b>	10,000	17,264	34,392
	20,000	33,867	68,160
	25,000	42,119	84,995

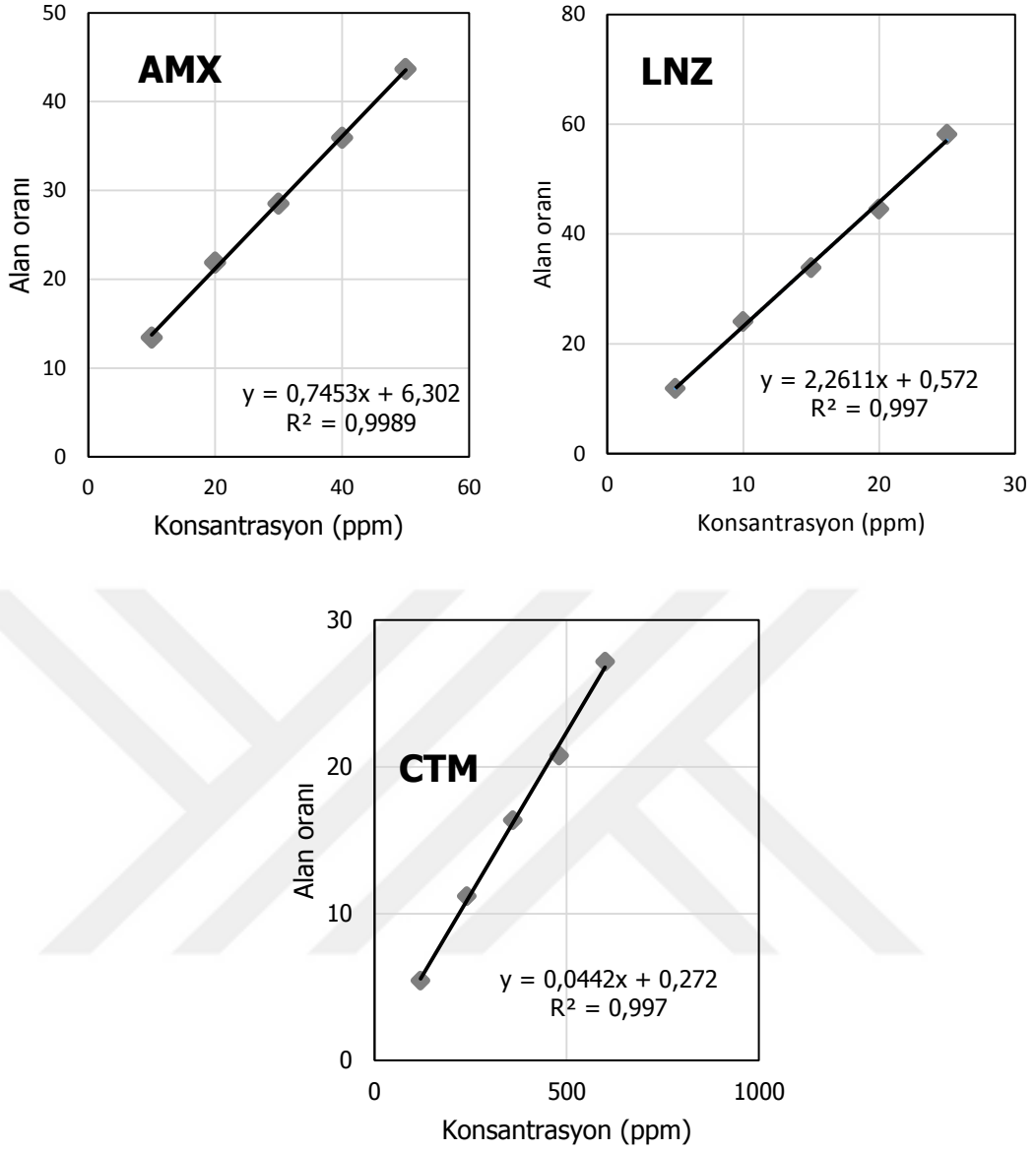
#### 4.2. Kemometri

Kemometrik çalışmamıza ilk olarak ilacımızda bulunan 3 etken maddenin (amoksisilin, lansoprazol ve klaritromisin ) ve iç standartın (atorvastatin) bir arada bulunduğu sentetik karışım hazırlanarak yüksek performans sıvı kromatografisi ile analizi yapılmıştır. Bu karışıma ait olan kromatogram Şekil 4.8' de verilmiştir.



Şekil 4.8. Araştırmada kullanılan etken maddelerin 3'lü karışımına ait kromatogram

Yeterli ayrımı gerçekleştirebilen en iyi mobil faz bulunmuş ve en yüksek absorbands veren 6 farklı dalga boyu seçilmiştir. Bu seçilen dalga boyları arasında en yüksek absorbands veren dalga boyunda elde edilen etken madde standartlarının alanlarının (AMX için 205 nm, LNZ için 205 nm ve CTM için 210 nm) ATR (IS) alanına oranlayarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve maddelerin lineer olduğu derişim aralıkları belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Etken maddelerin kalibrasyon grafikleri

Kalibrasyon grafikleri incelendiğinde  $R^2$  (korelasyon katsayısı) değerleri amoksisilin, lansoprazol ve klaritromisin için sırasıyla 0,9989; 0,997 ve 0,997 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değerler tek tek kromotogramları alınan etken madde bileşiklerinin pik alanları ile konsantrasyonları arasında lineer bir bağıntı olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.1. Kalibrasyon seti

Kemometrik kalibrasyon seti için mobil faz çözeltisi içinde AMX için 10-50 ppm, LNZ için 5-25 ppm ve CTM için 120-600 ppm derişim aralığında her üç bileşigi içeren 20 farklı şekilde simetrik bir kalibrasyon seti oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon seti, Çizelge 4.12'de verilmektedir.

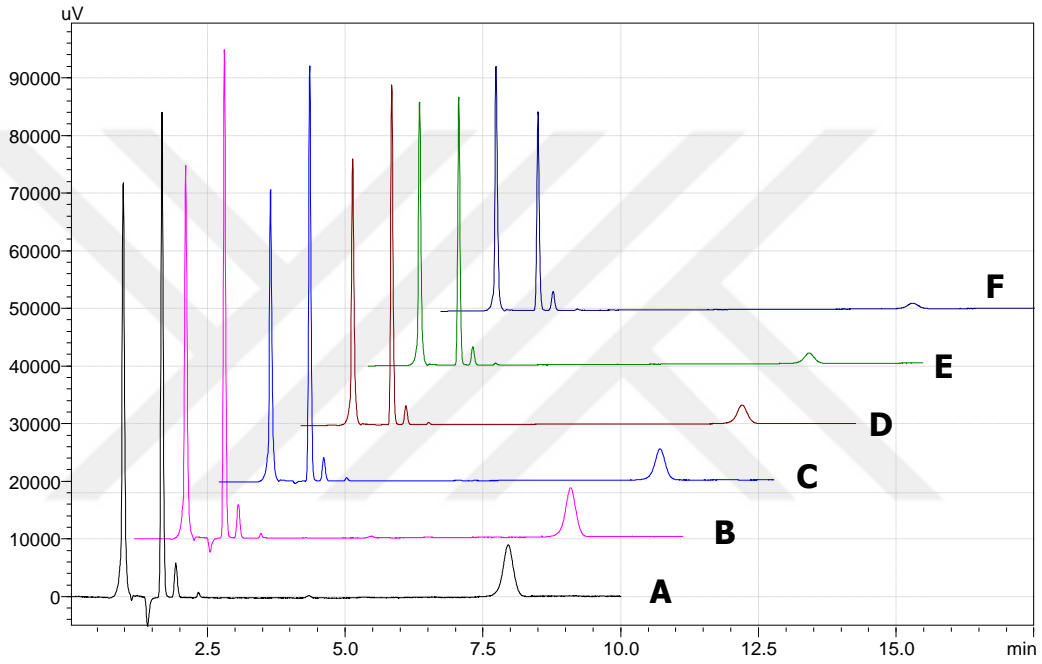
Çizelge 4.12. AMX, LNZ ve CTM için kalibrasyon seti

SIRA NO	LNZ	AMX	CTM	
<b>KALİBRASYON SETİ</b>	<b>S1</b>	5	10	120
	<b>S2</b>	10	20	240
	<b>S3</b>	15	30	360
	<b>S4</b>	20	40	480
	<b>S5</b>	25	50	600
<b>VALİDASYON SETİ</b>	<b>S6</b>	15	10	120
	<b>S7</b>	15	20	240
	<b>S8</b>	15	30	360
	<b>S9</b>	15	40	480
	<b>S10</b>	15	50	600
	<b>S11</b>	5	30	120
	<b>S12</b>	10	30	240
	<b>S13</b>	15	30	360
	<b>S14</b>	20	30	480
	<b>S15</b>	25	30	600
	<b>S16</b>	5	10	360
	<b>S17</b>	10	20	360
	<b>S18</b>	15	30	360
	<b>S19</b>	20	40	360
	<b>S20</b>	25	50	360

Çalışmamızda rastgele kalibrasyon seti yerine simetrik kalibrasyon seti tercih etmemizin nedeni analiz sırasında oluşabilmesi ihtimal kalibrasyon hatalarını minimize etmektir.

#### 4.2.2. Spektral koşulların optimizasyonu

Bu çalışmada AMX, LNZ ve CTM karışımı için en uygun mobil faz seçilmiştir ve 180-750 nm dalga boyu aralığında etken maddelerin taraması yapılmıştır. Bu taramaya ait en iyi absorbands veren 6 dalga boyu (205, 210, 215, 220, 225, 230 nm) seçilmiştir. Seçilen bu dalga boyların ait kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.10'da verilmektedir.



Şekil 4.10. Etken madde standartlarının karışımlarının farklı dalga boylarındaki kromatogramları (A:205 nm, B:210 nm, C:215 nm, D:220 nm, E:225 nm, F:230 nm)

#### 4.2.3. Temel bileşen regresyon yöntemi (PCR)

PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbands matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.2.1.2'de ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

#### 4.2.3.1. Temel bileşen regreyon (PCR) kalibrasyonu

PCR algoritmasına göre hazırlanan kalibrasyon setinin 6 farklı dalga boyunda DAD dedektör yardımı ile pik alanları ölçülmüştür. Kullanılan istatistik programı ile kalibrasyon setinin pik alan oranları (etken madde/IS) ile derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon seti için varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işleminden sonra derişim-pik alan oranları arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kurulmuştur. AMX, LNZ, CTM ve IS içeren karışımların belirlenen dalga boylarındaki absorbands değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. PCR kalibrasyonu için her bir etken madde için tek tek PCA analizi yapılarak aşağıdaki program çıktısı elde edilmiştir.

Korelasyon matrisinin özdeğerleri;

Özdeğer	10,877	3,760	3,314	0,018	0,011	0,006	0,005	0,003	0,002
Oran	0,604	0,209	0,184	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam	0,604	0,813	0,997	0,998	0,999	0,999	1,000	1,000	1,000

Özdeğer	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,000	-0,000
Oran	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,000	-0,000
Toplam	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
C4	0,234	-0,209	-0,269	-0,043	0,047	-0,144	0,357	-0,026	0,248
C5	0,236	-0,217	-0,257	0,241	0,008	0,140	-0,053	-0,026	-0,236
C6	0,238	-0,209	-0,256	0,038	0,138	0,048	0,185	0,033	0,109
C7	0,241	-0,203	-0,250	-0,466	-0,292	-0,171	-0,217	0,084	-0,227
C8	0,238	-0,213	-0,253	0,137	0,153	0,064	-0,218	0,225	-0,134
C9	0,238	-0,203	-0,262	0,108	-0,025	0,048	-0,041	-0,294	0,202
C10	0,245	-0,109	0,302	-0,038	-0,172	-0,073	0,403	-0,016	0,133
C11	0,238	-0,119	0,314	0,144	-0,337	0,219	-0,023	-0,309	-0,305
C12	0,238	-0,107	0,320	-0,016	-0,078	0,076	0,291	-0,155	0,079
C13	0,243	-0,116	0,302	-0,352	-0,185	-0,153	-0,226	0,186	-0,159
C14	0,241	-0,105	0,313	0,129	0,393	-0,046	-0,318	0,351	0,044
C15	0,243	-0,097	0,311	0,162	0,339	-0,033	-0,138	-0,047	0,262
C16	0,227	0,338	-0,054	0,009	0,042	-0,691	0,215	0,145	-0,045
C17	0,228	0,335	-0,050	0,373	0,037	-0,050	0,066	-0,062	-0,368
C18	0,228	0,336	-0,040	-0,247	0,396	0,159	0,114	-0,283	-0,402
C19	0,232	0,324	-0,073	-0,202	-0,004	-0,045	-0,439	-0,481	0,420
C20	0,233	0,322	-0,060	-0,330	0,030	0,567	0,200	0,410	0,170
C21	0,220	0,345	-0,082	0,390	-0,505	0,081	-0,152	0,264	0,205

Variable	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18
C4	0,129	0,517	0,351	-0,123	0,058	0,119	0,095	-0,164	-0,372
C5	-0,162	0,379	-0,399	-0,048	-0,237	0,188	0,260	0,412	0,185
C6	0,077	-0,336	-0,298	-0,407	-0,361	-0,375	-0,147	-0,311	0,033
C7	0,079	-0,026	-0,133	-0,056	0,510	-0,110	0,179	-0,160	0,207
C8	-0,081	-0,338	0,176	0,160	0,016	0,597	-0,326	-0,150	-0,092
C9	-0,013	-0,216	0,292	0,487	0,040	-0,427	-0,043	0,366	0,042
C10	-0,154	0,070	0,009	-0,168	0,188	0,124	-0,529	0,229	0,424
C11	-0,215	0,104	-0,185	0,140	0,051	-0,131	-0,181	-0,284	-0,464
C12	0,225	-0,471	-0,028	-0,080	0,050	0,306	0,537	0,154	-0,117
C13	0,066	0,079	0,351	0,023	-0,631	-0,056	0,025	0,054	0,063
C14	0,023	0,039	-0,012	-0,274	0,301	-0,258	-0,036	0,321	-0,309
C15	0,079	0,204	-0,126	0,355	0,031	0,012	0,174	-0,471	0,400
C16	-0,195	-0,101	-0,303	0,306	-0,079	-0,004	0,009	0,054	-0,200
C17	-0,279	-0,066	0,470	-0,279	0,092	-0,136	0,231	-0,161	0,244
C18	0,509	0,090	-0,039	0,072	0,011	0,020	-0,229	0,095	0,009
C19	-0,233	-0,003	-0,050	-0,293	-0,056	0,200	-0,039	0,035	-0,058
C20	-0,338	0,021	-0,022	0,184	0,011	-0,066	0,115	-0,020	-0,042
C21	0,512	0,063	-0,059	0,001	0,001	0,004	-0,086	0,002	0,023

Her bir etken madde özdeğerleri incelendiğinde ilk 7 bileşenin absorpsiyondaki değişiminin % 100 'ünden sorumlu olduğu görülmektedir. Bu nedenle regresyon işlemi ilk yedi özdeğer esas alınarak yapılmaktadır. Fakat yapmış olduğumuz bu çalışmada diğer bileşenlerde işin içine katılarak yapıldığından aşağıdaki regresyon eşitlikleri türetilmiştir.

$$C_{LNZ} = -3,85337 + 3,06688 C4 - 4,24642 C5 - 0,131122 C6 + 0,994359 C7 + 1,77897 C8 - 1,65757 C9 - 2,42981 C10 + 6,70127 C11 - 0,450866 C12 - 4,36405 C13 + 2,63393 C14 - 1,02903 C15 + 2,10623 C16 - 1,95863 C17$$

$$C_{AMX} = 9,04348 - 4,17751 C4 + 11,0803 C5 - 13,9486 C6 + 6,13129 C7 - 0,932853 C8 + 4,47098 C9 + 11,1786 C10 - 23,0078 C11 + 18,1208 C12 - 11,7337 C13 + 7,28144 C14 - 1,83286 C15 - 2,97311 C16 + 2,0915 C17$$

$$C_{CTM} = 12,2776 + 3,64425 C4 + 48,687 C5 - 71,5755 C6 + 34,314 C7 - 43,5405 C8 + 50,4408 C9 + 15,4442 C10 - 93,1125 C11 + 108,08 C12 - 77,7025 C13 + 101,534 C14 - 64,8281 C15 + 14,3026 C16 + 15,3817 C17$$

#### **4.2.3.2. Kalibrasyon yönteminin validasyonu**

PCR yöntemini valide etmek için AMX 10-50 ppm için, LNZ 5-25 ppm için ve CTM 120-600 ppm için çalışma aralığında olacak şekilde farklı derişimlerde 15 adet yapay karışım çözeltilisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (Çizelge 4.12) kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri; LNZ için %100,05; AMX %99,99 ve CTM için %100,0 olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma değerleri; LNZ için 0,02; AMX için 0,0004 ve CTM için 0,0002 olarak hesaplanmıştır. PCR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.13.' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.13. AMX, LNZ ve CTM etken madde karışımlarının PCR kalibrasyon yöntemi ile elde edilen geri kazanım verileri

Karışım No	LAN			AMX			CTM		
	Karışım (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri kazanım	Karışım (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri kazanım	Karışım (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri kazanım
1	15	15,00817	100,0544	10	9,999792	99,99792	120	120,0008	100,0006
2	15	15,00774	100,0516	20	19,99977	99,99886	240	240,0005	100,0002
3	15	15,00766	100,0511	30	29,99974	99,99912	360	360,0002	100,0001
4	15	15,00724	100,0483	40	39,99972	99,99931	480	480,0001	100
5	15	15,00672	100,0448	50	49,99971	99,99941	600	599,9997	99,99995
6	5	5,005356	100,1071	30	29,99982	99,9994	120	119,9996	99,99969
7	10	10,006	100,06	30	29,9998	99,99932	240	240	100
8	15	15,00729	100,0486	30	29,99974	99,99915	360	360,0002	100
9	20	20,00886	100,0443	30	29,99969	99,99895	480	480,0004	100,0001
10	25	25,01086	100,0435	30	29,9996	99,99866	600	600,0013	100,0002
11	5	5,000548	100,011	10	9,9999	99,999	360	359,9997	99,99992
12	10	10,00449	100,0449	20	19,9998	99,99899	360	359,9999	99,99998
13	15	15,00796	100,0531	30	29,99972	99,99908	360	360,0002	100
14	20	20,01135	100,0568	40	39,99964	99,9991	360	360,0005	100,0001
15	25	25,01521	100,0609	50	49,99954	99,99909	360	360,0011	100,0003
	Σ = 100,052 RSD= 0,01919			Σ =99,99902 RSD= 0,000367			Σ = 100,0001 RSD= 0.000209		

Σ: ortalama değer,RSD: bağıl standart sapma

#### 4.2.3.3. PCR ANOVA testi

PCR kalibrasyon yönteminin kesinlik ve doğruluğunu valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=28, %95 güven aralığında F-tablo değeri=4,19 olmasına karşılık AMX için F-test değeri ve p-değeri, LNZ için F-test değeri  $1,24 \times 10^{-05}$  ve p-değeri 0,997211 ve CTM için F-test değeri ve p-değeri olarak bulunmuştur (Şekil 4.14).

Çizelge 4.14. PCR ANOVA test sonuçları

	<b>Varyans Kaynağı</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P-değeri</b>	<b>F ölçütü</b>
<b>AMX</b>	Gruplar Arasında	5,38E-07	1	5,38E-07	3,77E-09	0,99995	4,19597
	Gruplar İçi	3999,98	28	142,856			
	Toplam	3999,98	29				
<b>LNZ</b>	Gruplar Arasında	0,00044	1	0,00044	1,24E-05	0,99721	4,195972
	Gruplar İçi	1000,5	28	35,7322			
	Toplam	1000,5	29				
<b>CTM</b>	Gruplar Arasında	5,39E-07	1	5,39E-07	2,62E-11	1	4,19597
	Gruplar İçi	576000	28	20571,4			
	Toplam	576000	29				

SS: karelerin toplamı, df: serbestlik derecesi, MS: karelerin toplamı

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için %95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Gruplar arası serbestlik derecesi=1 Grup içi serbestlik derecesi=28  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğundan dolayı bu

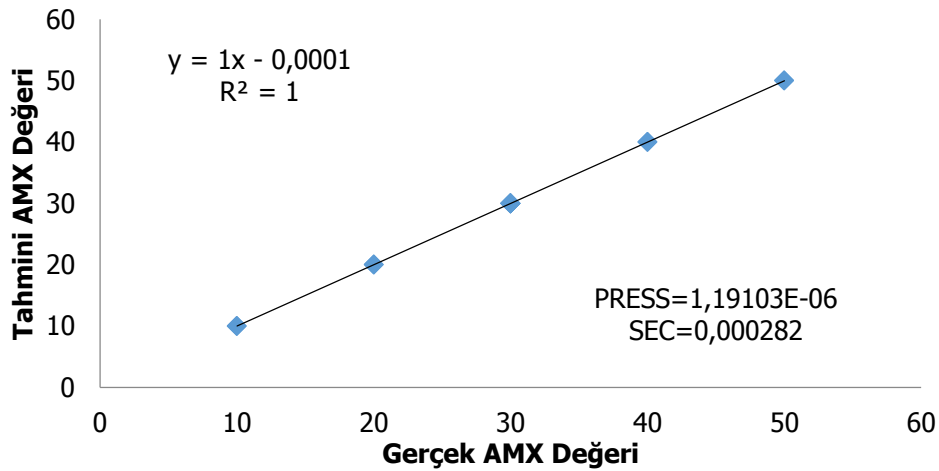
kalibrasyon modeli ticari ilaç numunesinin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.2.3.4. PCR yönteminin istatistiksel analizi

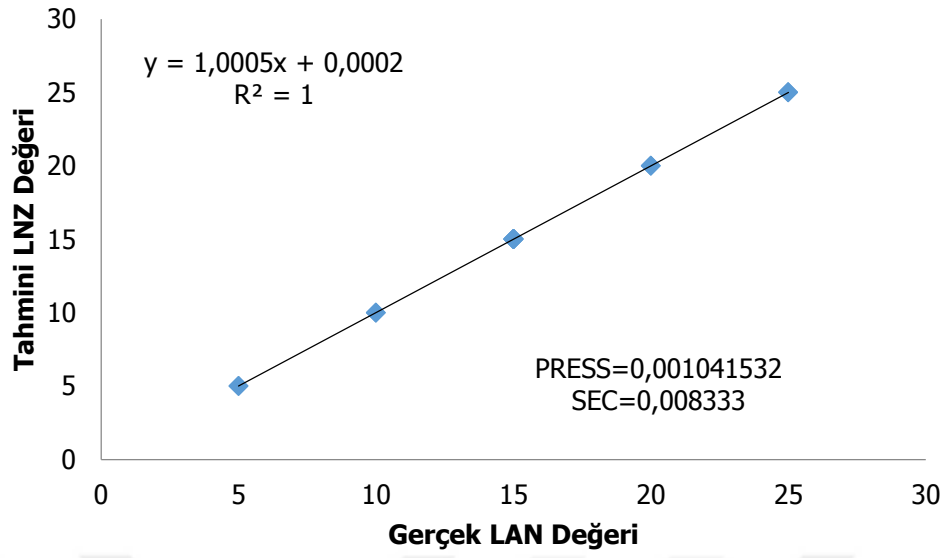
##### 4.2.3.4.1. Çapraz validasyon ve kalibrasyonun standart hatası

AMX, LNZ ve CTM içeren karışımlardan bu maddelerin miktar tayini için PCR kalibrasyonunun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. PCR kalibrasyonunda AMX, LNZ ve CTM için kurulan PRESS değeri sırasıyla  $1,19 \times 10^{-6}$ ;  $1,04 \times 10^{-3}$  ve  $4,4 \times 10^{10-6}$  olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Hesaplanan PRESS sonuçları yeterince küçüktür.

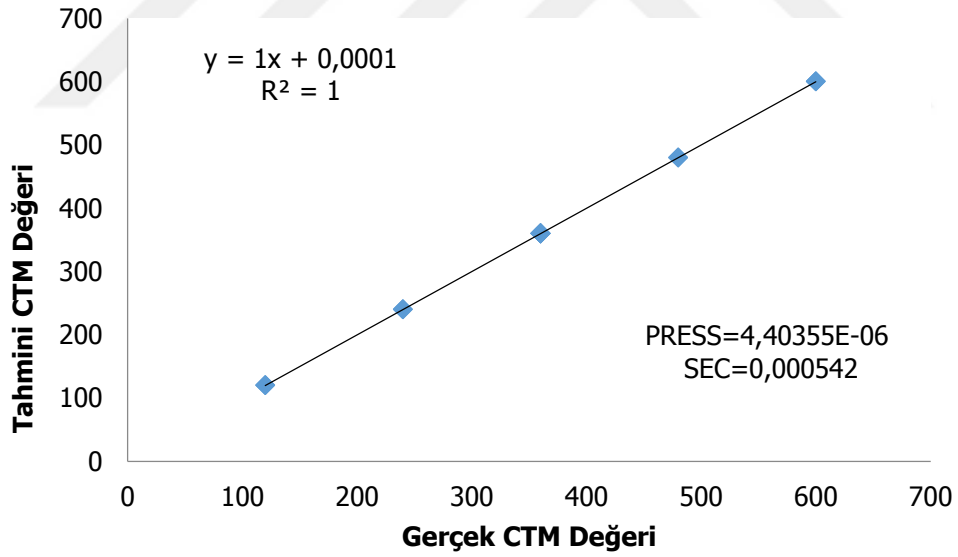
Kalibrasyonun standart hatası (SEC), gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki bağıntıya dayalı olarak AMX, LNZ ve CTM için sırasıyla  $2,82 \times 10^{-4}$ ,  $8,33 \times 10^{-3}$  ve  $5,42 \times 10^{-4}$  olarak hesaplanmıştır. Gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonlar için lineer regresyon analiz sonuçları, AMX için Şekil 4.11, LNZ için Şekil 4.12, CTM için Şekil 4.13' de sunulmaktadır.



Şekil 4.11. AMX için PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen lineer regresyon grafiği ve istatistik sonuçları



Şekil 4.12. LNZ için PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen lineer regresyon grafiği ve istatistik sonuçları



Şekil 4.13. CTM için PCR kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen lineer regresyon grafiği ve istatistik sonuçları

#### **4.2.4. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi (PLS)**

PLC yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbands matrisinin parçalanması ile oluşan temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.3.1.3' de ayrıntılı olarak verilmektedir.

##### **4.2.4.1. Kısmi en küçük kareler (PLS) kalibrasyonu**

PLS yönteminde Çizelge 4.12'ye göre hazırlanmış olan kalibrasyon seti 205-230 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda=5$  nm aralıklarla 6 noktada absorbands değerleri okundu. Bölüm 1.3.1.3.'de açıklanan PLS algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbands konsantrasyon değerlerine göre varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbandlara varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemi uygulandıktan sonra konsantrasyonlar arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı olarak PLS kalibrasyonu kuruldu. AMX, LNZ ve CTM içeren karışımların belirlenen dalga boylarındaki (205, 210, 215, 220, 225 ve 230 nm) absorbandları okunarak PLS kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirildi.

##### **4.2.4.2. PLS kalibrasyon yönteminin validasyonu**

PLS yöntemini valide etmek için mobil faz içerisinde AMX 10-50 ppm için, LNZ 5-25 ppm için ve CTM 120-600 ppm için çalışma aralığında olacak şekilde farklı derişimlerde 15 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (Çizelge 4.12) kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonunun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri AMX, LNZ ve CTM için sırasıyla %99,99; %99,96 ve %99,94 olarak hesaplanmıştır. Standart sapma değerleri ise AMX için 2,93; LNZ için 2,39 ve CTM için 1,96 olarak bulunmuştur. PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen veriler, Çizelge 4.15'de verilmektedir.

Çizelge 4.15. AMX, LNZ ve CTM sentetik karışımlarına PLS kalibrasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri

Karışım No	LAN			AMX			CTM		
	Karışım (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri Kazanım	Karışım (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri Kazanım	Karışım (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri Kazanım
1	15	15,0164	100,1093	10	10,061	100,61	120	115,84	96,53333
2	15	15,1211	100,8073	20	20,2937	101,4685	240	245,927	102,4696
3	15	15,1265	100,8433	30	30,3289	101,0963	360	358,496	99,58222
4	15	14,9339	99,55933	40	39,5599	98,89975	480	477,61	99,50208
5	15	15,0561	100,374	50	50,2037	100,4074	600	598,39	99,73167
6	5	5,1683	103,366	30	30,7981	102,6603	120	120,383	100,3192
7	10	9,8218	98,218	30	28,8793	96,26433	240	241,251	100,5213
8	15	14,4492	96,328	30	28,6218	95,406	360	354,14	98,37222
9	20	20,0764	100,382	30	30,5963	101,9877	480	484,237	100,8827
10	25	25,0296	100,1184	30	29,9475	99,825	600	598,511	99,75183
11	5	4,7262	94,524	10	9,555	95,55	360	352,039	97,78861
12	10	10,3466	103,466	20	20,6682	103,341	360	372,091	103,3586
13	15	15,3934	102,6227	30	31,5334	105,1113	360	369,013	102,5036
14	20	19,8071	99,0355	40	38,634	96,585	360	349,55	97,09722
15	25	24,9272	99,7088	50	50,319	100,638	360	362,322	100,645
	<b>ORT=99,96418 ST SAPMA=2,386449</b>			<b>ORT=99,99004 ST SAPMA=2,932383</b>			<b>ORT=99,93728 ST SAPMA=1,958439</b>		

#### 4.2.4.3. PLS yöntemi için ANOVA testi

PLS kalibrasyonunun doğruluk ve kesinliğini valide etmek için hesaplanan sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=28 %95 güven aralığında F-tablo değeri 4,196 olmasına karşılık AMX için hesaplanan F-test değeri  $9,37 \times 10^{-12}$  ve p-değeri 0,99; LNZ için hesaplanan F-test değeri  $3,74 \times 10^{-11}$  ve p-değeri 0,99 ve CTM için hesaplanan F-test değeri  $6,49 \times 10^{-8}$  ve p-değeri 0,99 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. PLS yöntemi ANOVA test sonuçları

	<i>Varyans Kaynağı</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>F-ölçütü</i>
<b>AMX</b>	Gruplar Arasında	1,33E-09	1	1,33E-09	9,37E-12	0,999998	4,195972
	Gruplar İçinde	3983,399	28	142,2642			
	Toplam	3983,399	29				
<b>LNZ</b>	Gruplar Arasında	1,33E-09	1	1,33E-09	3,74E-11	0,999995	4,195972
	Gruplar İçinde	999,198	28	35,68564			
	Toplam	999,198	29				
<b>CTM</b>	Gruplar Arasında	0,001333	1	0,001333	6,49E-08	0,999799	4,195972
	Gruplar İçinde	575570,6	28	20556,09			
	Toplam	575570,6	29				

SS: karelerin toplamı, df: serbestlik derecesi, MS: karelerin toplamı

ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için %95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Gruplar arası serbestlik derecesi=1 Grup içi serbestlik

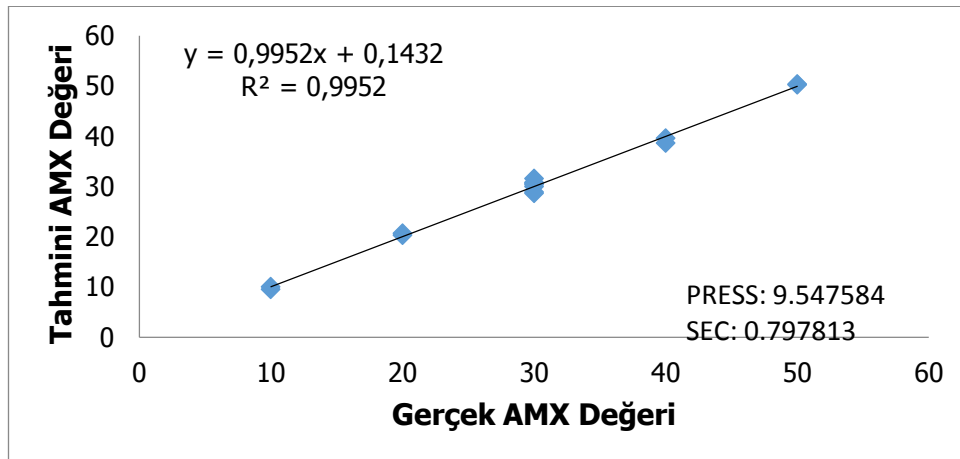
derecesi=31.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.2.4.4. PLS yönteminde istatistiksel analiz

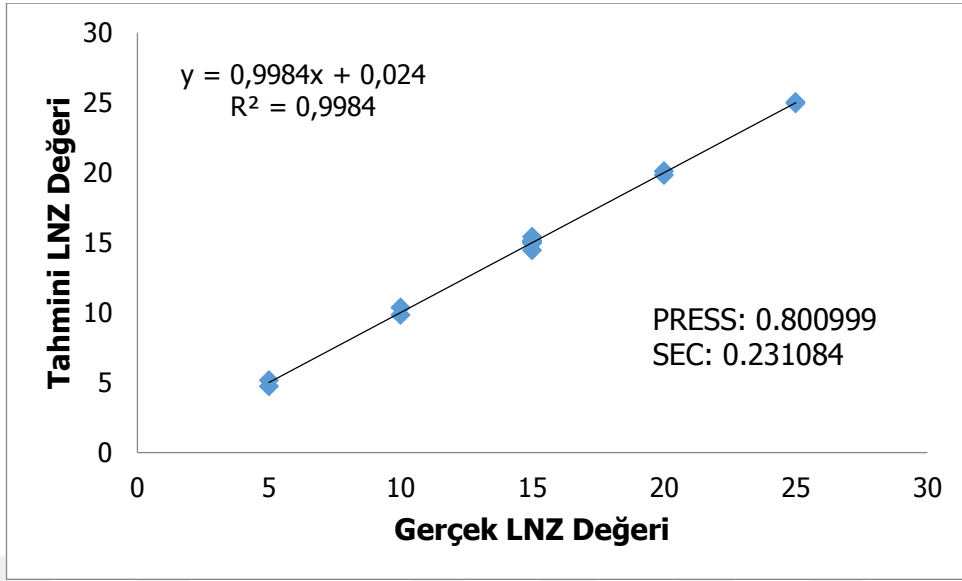
##### 4.2.4.4.1. Kalibrasyonun standart hatası

AMX, LNZ ve CTM içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Kurulan PLS kalibrasyonunda PRESS değeri AMX, LNZ ve CTM için sırasıyla 9,5475; 0,80 ve 524,6199 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır.

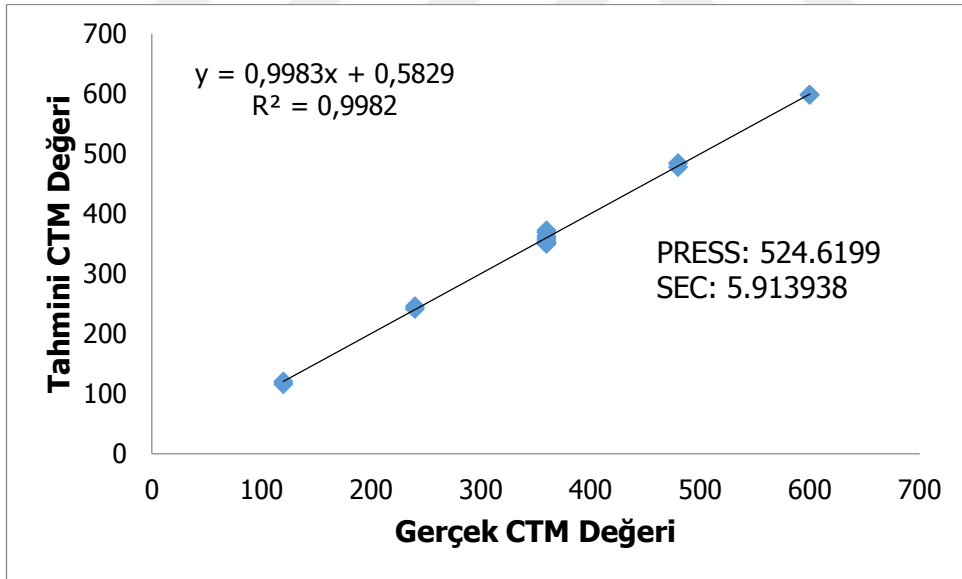
Kalibrasyonun standart hatası (SEC), gerçek ve tahmin edilen derişimler arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve AMX, LNZ ve CTM için sırasıyla 0,7978; 0,2310 ve 5,9139 olarak bulunmuştur. Gerçek ve tahmin edilen derişim için lineer regresyon analiz sonuçları AMX için Şekil 4.14'de, LNZ için Şekil 4.15 'de ve CTM için ise Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.14. AMX için PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları



Şekil 4.15. LNZ için PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen değerlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları



Şekil 4.16. CTM için PLS kalibrasyon basamağında gerçek ve tahmin edilen değerlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları

#### 4.2.5. PCR ve PLS yönteminin ilaç numunesine uygulanması

PLS ve PCR yönteminin AMX, CTM ve LNZ etken maddelerini bulunduran ilaç numunesi Bölüm 3.3.1'e göre tablet çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 205-230 nm dalga boyu aralığında HPLC ile ölçülen absorban değerleri, Bölüm 1 ve 1De açıklanan PCR ve PLS algoritması uygulandı ve tablet içeriğinde bulunan AMX, CTM ve LNZ hesaplanmıştır. Bu işlem için n=8 tekrar yapılmıştır. Elde edilen veriler 8 deneyin ortalaması olarak, Çizelge 4.17'de verilmektedir.

Çizelge 4.17. Ticari ilaç numunesine PCR ve PLS yöntemlerinin uygulanması sonucunda elde edilen AMX, CTM ve LNZ değerleri ( $\mu\text{g}/\text{tablet}$ )

	<b>PCR</b>	<b>PLS</b>
<b>AMX</b>	1001,05 $\pm$ 0,28	996,05 $\pm$ 2,28
<b>CTM</b>	499,68 $\pm$ 3,84	494,24 $\pm$ 3,70
<b>LNZ</b>	30,01 $\pm$ 0,14	28,12 $\pm$ 1,18

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde insanların hastalıklardan kurtulmak amacıyla kullandıkları en etkili maddeler ilaçlardır. İlaçlar içerdikleri etken maddeler sayesinde canlı bünyesinde etki göstermektedir. İlaç etken maddeleri belirli bir miktar alındıklarında canlı bünyesinde olumlu etki sağlarken, aşırı dozlarda alınmasında önemli derecede zararlı etkisi olan kimyasallardır. Bu yüzden ilaç etken madde analizleri önemlidir.

Bu tez çalışmasında ilaç etken maddelerinden AMX, LNZ ve CTM bileşiklerine hiçbir ön ayırma işlemi uygulanmaksızın aynı anda analiz etmek için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Bu HPLC yönteminin geliştirilmesi ve optimum şartların sağlanmasında pH'nın önemli bir rolü vardır. Optimum koşulların pH 'sı 10 olarak tespit edilmiştir. Her bir bileşiğin kantitatif tayini için optimum şartlar sağlandıktan sonra; bu bileşiklerin kemometrik kalibrasyonu için PCA, PCR ve PLS olmak üzere üç farklı kemometri yöntemi geliştirilmiştir. HPLC 'de validasyon ve kemometrik çalışmalar için gerekli olan verileri elde etmek için ise yeni jenerasyon XTerra®RP18 (4,6 x 250mm, 5µm) kolonu tercih edilmiştir.

Geliştirilen HPLC yöntemi ile sistem uygunluk parameteleri tayin edilmiş ve elde edilen veriler doğrultusunda yöntemin uygulanabilir olduğu saptanmıştır. Bu yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon çalışmasında; doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik, gerikazanım ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler incelendi ve istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Bu veriler doğrultusunda amoksisilin, lansoprazol ve klaritromisinin kantitatif tayin için standart yöntemi ile gerçekleştirildi.

Kemometrik çalışmanın asıl amacı numune analizlerindeki hataları azaltmak veya ortadan kaldırmaktır. Kemometrik kalibrasyonun duyarlılığı, doğruluğu ve hassaslığı kemometrik algoritmalar ve çok dalga boylu HPLC verilerinin kombine kullanımı ile artmaktadır. Bu amaçla HPLC metodunda öncelikle

etken maddelerimizin en iyi absorbands verdiği dalga boyunun 210 ve 205 nm olduğu belirlendi ve bu dalga boylarına en yakın absorbandsı veren 215, 220, 225 ve 230 nm dalga boyları kemometrik çalışmamız için seçildi. Bu dalga boyundan elde edilen etken madde alanlarının iç standart alanına oranlanması ile elde edilen veriler için PCA, PCR ve PLS yöntemleri uygulandı. Uygulanan yöntemin doğruluğu analitlerin farklı konsantrasyonlardaki sentetik karışımlarının analizi ile test edildi. PCR ve PLS için geri kazanım miktarları hesaplandı ve ortalama geri kazanımlar % 99,9–100,5 aralığında olduğu, Tablo 4.13 ve 4.14 'de verilmiştir. HPLC, PCR ve PLS arasında uyumlu sonuçlar olduğu gözlemlendi. Elde edilen veriler ışığında bağıl standart sapmaların %2,4 'den küçük olması yöntemin hassasiyetini gösterdi ve tekrarlanabilirliğinin bir hayli yüksek olması duyarlı ve doğru sonuç verdiğini kanıtladı.

Sonuç olarak ticari ilaç numunesinde amoksisilin, klaritromisin ve lansoprazol'un DAD dedektör ile eş zamanlı HPLC tayini yapıldı ve bu maddelerin kemometrik analizinde yöntemin kullanılabilirliği gösterilmektedir. Daha önce kemometrik yöntemlerle bu etken maddelerin eş zamanlı olarak belirlenmesine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Analitlerin tam ayrımı 20 dk içinde başarı ile yapıldı. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan yöntemin amoksisilin, lansoprazol ve klaritromisin etken maddelerinin eş zamanlı rutin analizi için oldukça ucuz, kolay, hızlı ve uygun olduğu tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

Adamovics, J.A., 1997. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Marcel Dekker, New York.

Adıgüzel, C., 2009. Etodolak'ın stabilite göstergeli sıvı kromatografisi ile ilaç dozaj şekillerinden tayini. Ankara Üniveristesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik kimya anabilim dalı yüksek lisans tezi, 2009, Ankara.

Al-Momani, I.F., Rababah, M.H., 2010. Validation of HPLC and FIA spectrophotometric methods for the determination of lansoprazole in pharmaceutical dosage forms and human plasma. American Journal of Analytical Chemistry, 1, 34-39.

Anonim, 2010. Kromatografi. Erişim Tarihi: 09.06.2017.  
<http://www.analitik.hacettepe.edu.tr/Demolar/kromatografi.pdf>

Anonim.2010h. Kromatografi. Tarihi: 22.06.2010.  
[www.kimyasanal.net/yukle/kromatografi.doc](http://www.kimyasanal.net/yukle/kromatografi.doc)

Beg, S., Kohli, K., Swain,S., and Hasnain, M.S., 2012. Development and validation of RP-HPLC method for quantitation of amoxicillin trihydrate in bulk and pharmaceutical formulations using box-behnken experimental design. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35, 393–406.

Bidlingmeyer, B.A., 1992. Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 69-200.

Brunton, L.L., Lazo, B.S., Parker, K.L., 2006. Tedevinin farmakolojik temelleri. Çev. Süzer, Ö., Nobel Tıp Kitabevleri, 2009, İstanbul.

- Darwish, K.M., Salama, İ., Mostafa, S., and El-Sadek, M., 2013. RP-HPLC/Pre-Column derivatization for analysis of Omeprazole, Tinidazole, Doxycycline and Clarithromycin. *Journal of Chromatographic Science*, 51, 566–576.
- Dinç, E., 2009. Kemometrik İşlem ve Yöntemlerin Analitik Kimyadaki Tipik Uygulamaları. *Uygulamalı Kemometri Yaz Okulu Notları*, 13-17.
- Dinç, E., Bilgili, A., Hanedan, B., 2007. Simultaneous Determination of Trimethoprim and Sulphamethoxazole in Veterinary Formulation by Chromatographic Multivariate Methods. *Pharmazie*, 62(3), 179-184.
- Dousa, M., and Hosmanova, R., 2005. Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 373–377.
- Hamilton, R.J., Sewel, P.A. 1982. *Introduction to high performance liquid chromatography*. 2. ed, Chapman and Hall, New York, 1-160.
- Hanumanturayudu, K., Sreeramulu, J., Maheswara Reddy, M., 2013. Stability indicating assay method for lansoprazole a comparative study by UPLC and HPLC. *International Journal of Science and Technology*, 7(1), 372-380.
- Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1977. Liquid Chromatography of Ionogenic Substances With Nonpolar Stationary Phases. *Analytical Chemistry*, 49, 142.
- Hsu, M.C., ve Hsu, P.W., 1992. High-performance liquid chromatographic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(6), 1276-1279.

- Jiang, y., Wang, J., Li, H., Wang, Y., Gu, J., 2007. Determination of clarithromycin in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 1460–1464.
- Kaya, B., 2007. Kombine Farmasotik Preparatlardan Telmisartan ve Hidroklorotiyazid'in Kemometrik Kalibrasyon Yöntemleriyle Aynı Anda Tayini. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 104s, Ankara.
- Kazakevich, Y., Lobrutto, Y., 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley-Interscience, 1135p, Canada, USA.
- Kitiş F., 2011. İlaç numunelerinde kafein ve parasetamol'ün kemometrik yöntemlerle tayinleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 60s, Isparta.
- Kumar Reddy, B.P., Ramanjaneya Reddy, Y., and Ramachandran, D., 2009. Determination of pantoprazole sodium and lansoprazole in individual tablet dosage forms by RP-HPLC using single mobile phase. *E-Journal of Chemistry*, 6(2), 489-494.
- Lange, F., Cornelissen, S., Kubac, D., Sein, M.M., Sonntag, J.V., Hannich, C.B., Golloch, A., Heipieper, H.J., Möder, M., Sonntag, C.V. 2006. Degradation of macrolide antibiotics by ozone: A mechanistic case study with clarithromycin. *Chemosphere*, 65, 17-23.
- Li, W., Jia, H., Zhao, K., 2007. Determination of clarithromycin in rat plasma by HPLC–UV method with pre-column derivatization. *Talanta*, 71, 385–390.

- Matar, K.M., 2006. Simple and rapid LC method for the determination of amoxicillin in plasma. *Chromatographia*, 64(5/6), 255-260.
- Meyer, R.V., 1988. *Practical High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Toronto, Canada, 35-42.
- Miller, J.N., Miller, J.C., 2000. *Statistic and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 215-220. Pearson Education Limited, 263pp, England.
- Noubarani, M., Keyhanfar, F., Motevalian, M., Mahmoudian, M., 2010. Improved HPLC method for determination of four PPIs, Omeprazole, Pantoprazole, Lansoprazole and Rabeprazole in human plasma. *J Pharm Pharmaceut Sciences*, 13(1), 1-10.
- Öncül, O., 2002. Antibiyotikler I. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri / Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Yetişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31, Kasım 2002, s. 23-38.
- Özdemir, D., 2011. *Kemometri Temel Eğitimi*. Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Akademik ve Sektörel Eğitimleri Dizisi-II, 64s.
- Pappa-Louisi, A., Papageorgiou, A., Zitrou, A., Sotiropoulos, S., Georgarakis, E., Zougrou, F., 2001. Study on the electrochemical detection of the macrolide antibiotics clarithromycin and roxithromycin in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 755, 57-64.
- Patil Javesh, K., Patil Kapil, A., Pawar Sunil, P., 2014. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of amoxicillin and dicloxacillin in bulk drug and capsules. *An International Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 39-47.

Petkovska, R., Cornett, C., and Dimitrovska, A., 2008. Chemometrical approach in lansoprazole and its related compounds analysis by rapid resolution RP-HPLC method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®*, 31, 2159–2173.

Poole, C.F. and Poole, S.K., 1991. *Chromatography Today*. Elsevier Science, 1026p, Amsterdam.

Raju, CH.B.V.N., Sharma K.K., Rao, CH.S., and Rao, G.N., 2009. RP -HPLC method for analysis of related substances in amoxicillin drug substance. *Acta Chromatographica*, 21(1), 57–70.

Sheikh, A.F., Naqvi, S.B., Khaliq, S.S., Iqbal, J., Shaikh, D., and Perveen, S., 20013. Simultaneous and rapid determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical formulations by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method. *African Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacy*, 4(1), 58-69.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2011. *Analitik Kimya Temel İlkeler*. Çev. Kılıç, E., Yılmaz, H., Bilim Yayınları, 1051, Ankara.

Skoog, D., Holler, F.J., Nieman, T.A. 1998. *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, 743. *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, USA, 673-766.

Sonawane, L.V., Bari, S.B., 2010. Development and validation of RP-HPLC method for the simultaneous estimation of amoxicillin trihydrate and bromhexine hydrochloride from oily suspension. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 1, 107.

Tavakoli, N., Varshosaz, J., Dorkoosh, F., Zargarzadeh, M.R., 2007. Development and validation of a simple HPLC method for

simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 325–329.

Uyanık, A., 2008. Analitik Kimyacılar için İstatistik ve Kemometri, 254-259.

Waters, 2017. How Does High Performance Liquid Chromatography Work?

Erişim

Tarihi:

11.12.2017.

[http://www.waters.com/waters/en\\_TR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_TR](http://www.waters.com/waters/en_TR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_TR)

White, R., 1990. Chromatography/ Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications. New York and Basel, Marcel Dekker, Inc, 1-15.

Wibawa, J.I.D., Fowkes, D., Shaw, P.N., Barrett, D.A., 2002. Measurement of amoxicillin in plasma and gastric samples using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. Journal of Chromatography B, 74, 141-148.

Yıldız A., Genç Ö., ve Bektaş S., 1997. Enstürmantal Analiz Yöntemleri Kitabı (II. Baskı). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A-64, 25-29, Ankara.

Yılmaz, M., 2011. Doğal Sularda ve Atıksularda Endokrin Sistemini Bozabilecek Bazı Östrojenlerin Kalıntılarının Tayinleri İçin LC-UV ve GC-MS Yöntemlerinin Optimizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 153, Isparta.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Mine SARIDAĞ  
Doğum Yeri ve Yılı : Gaziantep, 1988  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : a.mine\_srdg@outlook.com.tr

## Eğitim Durumu

Lise : Gaziantep Cumhuriyet Lisesi, 2005  
Önlisans : SDÜ Şarkikaraağaç M.Y.O., Gıda Teknolojisi, 2009  
Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2013

## Yayınları

- Zübeyde ÖNER, Ayşe Mine SARIDAĞ; 2015; " Keçi peynirinde olgunlaşma sırasında görülen proteolitik değişimler ve peptit oluşumları"; 9. Gıda Mühendisliği Kongresi (sayfa:148); İzmir/ Türkiye.
- Zübeyde ÖNER, Ayşe Mine SARIDAĞ; 2015; " Microbiological and physical properties of Turkish white cheese "; International Dairy Food World Dairy Summit; Vilnius/ Litvanya
- Zübeyde ÖNER, Ayşe Mine SARIDAĞ; 2015; " İdentification of antioxidant activity of peptides of beyaz cheese produced from ovine milk "; International Dairy Food World Dairy Summit; Vilnius/ Litvanya
- Zübeyde ÖNER, Ayşe Mine SARIDAĞ; 2015; "Antioxidant activity of Bioactive Peptides in Goat cheese "; Traditional Foods from Adriatic to Caucasus Saraybosna / BOSNA-HERSEK
- Zübeyde ÖNER, Ayşe Mine SARIDAĞ; 2016; "Identification of Bioactive Peptides in Kashar Cheese and Their Antioxidant Activites"; 2<sup>nd</sup> Congress on Food Structure & Desing (Sayfa:116); Antalya/ Türkiye.
- Ahmet Hakan AKTAŞ, A.Mine SARIDAĞ; 2017; "Liquid chromatographic-chemometric techniques for the simultaneous Lansoprazole, Amoxicillin and Clarithromycin in commercial preparation"; Journal of Chromatographic Since; 1-7.