



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**DİFLUKORTOLON VALERAT VE İZOKONAZOL'ÜN
FARMASÖTİK PREPARATLARDA
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERLE AYNI
ANDA MİKTAR TAYİNLERİ**

Elif KARACAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feyyaz ONUR**

2009- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİFLUKORTOLON VALERAT VE İZOKONAZOL'ÜN
FARMASÖTİK PREPARATLARDA
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERLE AYNI
ANDA MİKTAR TAYİNLERİ**

Elif KARACAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Feyyaz ONUR**

2009- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekillerin Listesi	x
Çizelgelerin listesi	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve amaç	1
1.2. Kimyasal ve fiziksel özellikler	3
1.2.1. Diflukortolon valerat	3
1.2.2. İzokonazol nitrat	5
1.3. Türkiye’de DİF içeren preparatlar	7
1.4. Türkiye’de DİF ve İZO içeren preparatlar ile ilgili bilgiler	8
1.4.1. TRAVAZOL [®] Krem (Bilim)	8
1.4.2. TRAVOCORT [®] Krem (İntendis)	9
1.5. Dünyada DİF İçeren Ticari Preparatlar	10
1.6. Türkiye’de İZO İçeren Preparatlar	11
1.7. Dünyada İZO İçeren Ticari Preparatlar	12
1.8. Üzerinde Çalışma Yapılan Etken Maddelerin Miktar Tayinleri Konusundaki Literatür Çalışmaları	13
1.8.1. DİF İçin Yapılmış Çalışmalar	13
1.8.2. İZO İçin Yapılmış Çalışmalar	15

2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Kullanılan Yöntemler	16
2.1.1. Türev Spektrofotometri	16
2.1.2. Kemometrik Yöntemler	21
2.1.2.1. Tek Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri	22
2.1.2.1.1. Klasik Tek Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri	23
2.1.2.1.2. Matris Cebirin Basit Lineer Regresyonda Kullanılması	27
2.1.2.1.3. Ters Tek Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri	27
2.1.2.2.1. Klasik En Küçük Kareler Yöntemi (KLEK)	30
2.1.2.2.2. Ters En Küçük Kareler Yöntemi (TEK)	31
2.1.2.2.3. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (TBR) Ve Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (KEK)	33
2.1.2.3. İstatistiksel Değerlendirme	36
2.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	38
2.1.3.1. Sistem Uygunluk Testleri	46
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Orijinleri	51
2.3. Kullanılan Cihazlar	51
2.4. Kullanılan Bilgisayar Programları	51
2.5. Kullanılan Bilgisayar Konfigürasyonu	51
2.6. Üzerinde Çalışma Yapılan Farmasötik Preparatlar	52
2.6.1. TRAVAZOL® Krem (Bilim) (Batch No:6050058a)	52
2.6.2. TRAVOCORT® Krem (Intendis) (Batch No:73316a)	52

2.7. Standart Maddelerin Stok Çözeltileri	53
2.7.1. Türev Spektrofotometride Kullanılan Stok Çözeltiler	53
2.7.2. Kemometrik Yöntemlerde Kullanılan Stok Çözeltiler	53
2.7.3. YPSK'de Kullanılan Stok Çözeltiler	53
3. BULGULAR	54
3.1. Kullandığımız Etken Maddelerin Saflık Kontrolleri	54
3.1.1. DİF İçin Saflık Kontrolü	54
3.1.2. İZO İçin Saflık Kontrolü	54
3.2. Kemometrik Tekniklerle Spektroskopik Verilerin	
Değerlendirilmesi Yöntemleri ile Elde Edilen Sonuçlar	58
3.2.1. Kemometrik Çalışmalar	58
3.2.1.1. DİF + İZO karışımında DİF ve İZO'nun TBR Yönteminin	
Spektrofotometrik Analizlerde Kullanılması ile Miktar Tayini	59
3.2.1.2. Kemometrik Yöntemlerle Elde Edilen Sonuçlara Göre	
TSH, KSH ve THKT Değerlerinin Hesaplanması	63
3.2.1.3. ANOVA Testi	65
3.2.1.4. TBR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	65
3.2.1.4.1. Seçicilik	65
3.2.1.4.2. İşlem	68
3.3. Türev Spektrofotometri ile Yapılan Miktar Tayini Çalışmaları	71
3.3.1. DİF + İZO Karışımında DİF'in Miktar Tayini	74
3.3.2. DİF + İZO Karışımında İZO'ün Miktar Tayini	78

3.3.3. ANOVA Testi	80
3.3.4. ¹ D Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	80
3.3.4.1. Seçicilik	80
3.3.4.2. İşlem	83
3.4. YPSK İle Yapılan Çalışmalar	87
3.4.1. ANOVA Testi	93
3.4.2. YPSK Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	93
3.4.2.1. Seçicilik	93
3.4.2.2. İşlem	97
4. TARTIŞMA	100
4.1. DİF + İZO Karışımının Analizi İçin Yapılan Çalışmalar	100
4.1.1. Kemometrik Yöntemlerin Kullanılışı	100
4.1.1.1 Temel Bileşen Regresyonu (TBR) Yöntemi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar	100
4.1.2. Türev Spektrofotometri (¹ D) ile Yapılan Çalışmalar	103
4.1.2.1. DİF'in Miktar Tayini	103
4.1.2.2. İZO'ün Miktar Tayini	105
4.1.3. YPSK ile Yapılan Çalışmalar	108
4.2. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	108
4.3. Geliştirilen Yöntemlerin Birbirleriyle Karşılaştırılmaları	113

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	114
ÖZET	115
SUMMARY	116
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ	121

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, diflukortolon valerat ve izokonazol nitrat etken maddelerinin ikili karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda, aynı anda miktar tayinleri için 1. Türev Spektrofotometri, Temel Bileşen Regresyonu ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemleri geliştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca benden maddi manevi hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, hem derslerim hem de tez çalışmalarım sırasında bana tecrübeleriyle yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Feyyaz ONUR'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına, derslerim ve diğer çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerinden faydalanmamı sağladıkları için teşekkür ediyorum.

Yalnızca akademik çalışmalarımda değil her konuda bana büyük destek sağlayan Araştırma Görevlisi Dr. İsmail Murat PALABIYIK'a teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans öğrenimim süresince benden yardımlarını esirgemeyen Uzman Eczacı Araştırma Görevlisi Özgür ÜSTÜNDAĞ, Uzman Eczacı Araştırma Görevlisi Burcu DOĞAN TOPAL, Araştırma Görevlisi M. Gökhan ÇAĞLAYAN, Eczacı Burçin BOZAL, Kimyager Gözde PEKTAŞ 'a teşekkür ediyorum.

Bütün yaşantım boyunca aldığım bütün kararları destekleyen ve ne olursa olsun hep yanımda olan aileme, son olarak ise bütün yüksek öğrenimim boyunca bana hep güç veren, zor zamanlarımı kolaylaştıran nişanlım Doğan MANSUROĞLU'na sonsuz teşekkür ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DİF	Diflukortolon Valerat
İZO	İzokonazol Nitrat
CHL	Klorzoksazon
IS	İç Standart
TBR	Temel Bileşen Regresyonu (PCR, Principle Component Regression)
TBA	Temel Bileşen Analizi (PCA, Principal Component Analysis)
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)
¹ D	1. Türev Spektrofotometri (First Derivative Spectrophotometry)
TEK	Ters En Küçük Kareler (ILS, Invers Least Squares)
KLEK	Klasik En Küçük Kareler (Classical Least Squares)
MLR	Çoklu Lineer Regresyon (Multiple Linear Regression)
PCA	Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis)
KEK	Kısmi En Küçük Kareler (PLS, Partial Least Squares)
NIPALS	Non-Lineer Iterative Partial Least-Squares
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC, Thin Layer Chromatography)
SUT	Sistem Uygunluk Testleri (System Suitability Tests)
YS	Yakalama Sınırı (LOD, Limit of Detection)
TAS	Tayin Alt Sınırı (LOQ, Limit of Quantitation)
SS	Standart Sapma (Standard Deviation)
BSS	Bağıl Standart Sapma (RSD, Relative Standard Deviation)
GA	Güven Aralığı (Confidence Limits)
UV	Ultraviyole
IR	Infrared
THKT	Tahmin Hatalarının Karelerinin Toplamı (PRESS, Prediction Error Sum of Squares)
KSH	Kalibrasyonun Standart Hatası (SEC, Standard Error of Calibration)
TSH	Tahminin Standart Hatası (SEP, Standard Error of Prediction)
RMS	Karekök Ortalama (Root Mean Squares)

ŞEKİLLER

1.1. DİF'ın metanol – su (3:1 h/h) karışımındaki 12 µg/mL çözeltilisinin UV spektrumu	4
1.2. İZO'un metanol – su (3:1 h/h) içerisindeki 120 µg/mL çözeltilisinin UVspektrumu	6
2.1. Gauss tipindeki bir eğrinin belirli noktalardaki tanjantları ve karşılıkları	17
2.2. Türev eğrilerinin şekilleri	18
2.3. Pikten pike ölçüm	20
2.4. Pikten sıfıra ölçüm	20
2.5. Teğet yöntemi ile ölçüm	21
2.6. Regresyon grafiği	24
2.7. Bir YPSK cihazının şeması	40
2.8. Teorik tabaka sayısı hesabını gösterir kromatogram	47
2.9. Pik asimetrisi ve kuyruklanma faktörü hesabını gösterir kromatogram	58
2.10. Kapasite faktörü hesabını gösterir kromatogram	49
2.11. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi	50
3.1. Metanol - su (3:1) içerisinde 12 µg/mL DİF çözeltilisinin 0. derece UV absorpsiyon spektrumu	55
3.2. Metanol - su (3:1) içerisinde 120 µg/mL İZO çözeltilisinin 0. derece UV absorpsiyon spektrumu	55
3.3. DİF'ın IR spektrumu	56
3.4. İZO'ün IR spektrumu	57
3.5. Metanol - su (3:1) içerisinde a) 12 µg/mL DİF çözeltilisinin, b) 120 µg/mL İZO çözeltilisinin absorpsiyon spektrumları	58
3.6. Metanol - su (3 : 1) içerisinde 100 µg/mL İZO ve 16 µg/mL DİF karışım çözeltilisinin orijinal UV absorpsiyon spektrumu ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü=0)	71
3.7. Metanol - su (3 : 1) içerisinde 100 µg/mL İZO ve 16 µg/mL DİF	

karışım çözeltisinin 2. türev spektrumu ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü =50)	72
3.8. Metanol - su (3 : 1) içerisinde 100 $\mu\text{g/mL}$ İZO ve 16 $\mu\text{g/mL}$ DİF	
DİF karışım çözeltisinin 1. türev spektrumu ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü =20)	72
3.9. Metanol - su (3 : 1) içerisinde 100 $\mu\text{g/mL}$ İZO ve 16 $\mu\text{g/mL}$ DİF	
karışım çözeltisinin 3. türev spektrumu ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü =100)	73
3.10. Metanol - su (3 : 1) içerisinde 100 $\mu\text{g/mL}$ İZO ve 16 $\mu\text{g/mL}$ DİF	
karışım çözeltisinin 4. türev spektrumu ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü =150)	73
3.11. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 7 $\mu\text{g/mL}$ DİF, b) 20 $\mu\text{g/mL}$ DİF,	
c) 30 $\mu\text{g/mL}$ DİF, d) 120 $\mu\text{g/mL}$ İZO çözeltilerinin orijinal	
absorpsiyon spektrumları	75
3.12. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 7 $\mu\text{g/mL}$ DİF, b) 20 $\mu\text{g/mL}$ DİF,	
c) 30 $\mu\text{g/mL}$ DİF, d) 120 $\mu\text{g/mL}$ İZO çözeltilerinin	
1. türev spektrumları ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü : 20)	75
3.13. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 20 $\mu\text{g/mL}$ DİF, b) 70 $\mu\text{g/mL}$ İZO,	
c) 120 $\mu\text{g/mL}$ İZO, d) 200 $\mu\text{g/mL}$ İZO çözeltilerinin orijinal	
absorpsiyon spektrumları ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü : 20)	79
3.14. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 20 $\mu\text{g/mL}$ DİF, b) 70 $\mu\text{g/mL}$ İZO,	
c) 120 $\mu\text{g/mL}$ İZO, d) 200 $\mu\text{g/mL}$ İZO karışım çözeltilerinin	
1. türev spektrumları ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü : 20)	79
3.15. a) 0.8 $\mu\text{g/mL}$ Kloroksazon (iç standart) b) 32 $\mu\text{g/mL}$ DİF ve	
c) 260 $\mu\text{g/mL}$ İZO nun geliştirilen YPSK yöntemindeki kromatogramı	87
3.16. (a) Krem preparatı (a) Klorzoksazon, b) DİF ve c) İZO	
(b) plasebo'nun YPSK kromatogramı	94

ÇİZELGELER

3.1. DİF ve İZO için TBR yönteminde kullanılan kalibrasyon seti	61
3.2. İZO ve DİF'in standart karışımları için TBR yöntemiyle elde edilen ortalama % geri kazanım sonuçları	62
3.3. DİF + İZO karışımı analizinde uygulanan TBR yöntemindeki parametreler	64
3.4. TRAVAZOL® (Batch no 6050058A) preparatına standart ilavesi sonucunda TBR yöntemi ile hesaplanan DİF ve İZO miktarları	66
3.5. TRAVOCORT® (Batch no 73316A) preparatına standart ilavesi sonucunda TBR yöntemi ile hesaplanan DİF ve İZO miktarları	67
3.6. TRAVAZOL® (Batch no 6050058A) preparatına TBR yöntemi uygulandığında DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO / 1 g krem)	69
3.7. TRAVOCORT® (Batch no 73316A) preparatına TBR yöntemi uygulandığında DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO / 1 g krem)	70
3.8. İZO ve DİF'in ¹ D yöntemi kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafikleri için hesaplanan istatistiksel sonuçlar	76
3.9. İZO ve DİF'in standart karışımlarında ¹ D yöntemi ile elde edilen ortalama % geri kazanım sonuçları	77
3.10. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına standart ilavesi sonucunda ¹ D ile hesaplanan DİF ve İZO miktarları	81
3.11. TRAVOCORT® (Batch no: 73316A) preparatına standart ilavesi	

sonucunda ¹ D ile hesaplanan DİF ve İZO miktarları	82
3.12. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına ¹ D yöntemi uygulandığında DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO/1 g krem)	84
3.13. TRAVOCORT® (Batch no: 73316A) preparatına ¹ D yöntemi uygulandığında DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO/1 g krem)	85
3.14. Önerilen yöntemler için DİF + İZO karışımlarında ANOVA testi sonuçları	86
3.15. Kromatografik koşullar optimize edildiğinde İZO ve DİF için regresyon sonuçları	
3.16. DİF and İZO için geliştirilen YPSK yönteminde sistem uygunluk testi sonuçları	90
3.17. Sentetik karışımlara YPSK yöntemi uygulandığında DİF ve İZO için elde edilen ortalama % geri kazanım sonuçları	92
3.18. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına standart ilavesi sonucunda YPSK yöntemi ile hesaplanan DİF ve İZO miktarları	95
3.19. TRAVOCORT® (Batch no: 73316A) preparatına standart ilavesi sonucunda YPSK yöntemi ile hesaplanan DİF ve İZO miktarları	96
3.20. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına YPSK yöntemi uygulandığında DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO / 1 g krem)	98

- 3.21. TRAVOCORT[®] (Batch no: 73316A) preparatına YPSK yöntemi
uygulandığında DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem)
(Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg
İZO / 1 g krem) 99
- 4.1. Sentetik karışımlara geliştirilen yöntemler uygulandığında elde
edilen ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri 107
- 4.2. TRAVAZOL[®] preparatına geliştirilen yöntemler uygulandığında
DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/ 1 g krem) (Preparat
üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO / 1 g krem) 111
- 4.3. TRAVOCORT[®] preparatına geliştirilen yöntemler uygulandığında
DİF ve İZO için elde edilen sonuçlar (mg/ 1 gram krem) (Preparat
üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO / 1 g krem) 112

1. GİRİŞ

1.1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diflukortolon valerat (**DİF**), enflamasyonlu deri hastalıklarında kullanılan bir kortikosteroiddir. İzokonazol nitrat (**İZO**) ise candida türleri ve dermatofitleri de kapsayan geniş etki spektrumlu imidazol türevi antifungal bir ilaçtır. **DİF + İZO** kombinasyonu ise genel olarak bakteri ve/veya mantarla enfekte olmuş deri hastalıklarında kullanılmaktadır.

Türkiye ilaç piyasasında **DİF + İZO** kombinasyonunu içeren iki adet krem preparatı, **DİF + klorkinaldol** kombinasyonu içeren iki adet preparat, **DİF**'i tek başına içeren iki adet merhem preparatı bulunmaktadır. **İZO**'nun ise **DİF** ile ikili kombinasyonundan başka **İZO**'yu tek başına içeren bir krem preparatı bulunmaktadır.

Bu sayılan formülasyonlar içinden iki adet krem preparatının içerisinde karışım halinde birlikte yer aldığı görülen **DİF** ve **İZO**'un aynı anda miktar tayinleri için rutin analizlerinde kullanılabilecek hızlı, kolay ve duyarlı analiz yöntemleri geliştirmek tez çalışmasının temel amacı ve başlığı olarak seçilmiştir. Türkiye dışında **DİF + İZO** kombinasyonunu içeren çok sayıda preparatın tedavide kullanıldığı da saptanmıştır. Bu nedenle de geliştirilecek yöntemlerin geniş bir alanda ilaç analizlerinde kullanımı sağlanmış olacaktır.

Yapılan literatür çalışmalarında kaynaklar bölümünde de gösterildiği şekilde **DİF ve İZO** için farmasötik preparatlarda tek başına bulunduklarında veya koruyucu maddeler yanında miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik (YPSK) yöntemlerin geliştirildiği gözlenmektedir.

Literatürlerde **DİF** ve **İZO**'nun birlikte bulunduğu farmasötik preparatlarda aynı anda miktar tayinleri için geliştirilmiş bir yöntem bulunmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla bu tez kapsamı içerisinde yapılacak çalışmalar tamamen orijinal olacaktır.

Seçilen formülasyonlar krem şeklinde olduğundan çalışma zorluğunu beraberinde getirmektedir. Bu preparatlar ile çalışılırken etken maddelerin içerisinde bulundukları krem bazının etkisinin de hesaba katılması ve dolayısıyla etken

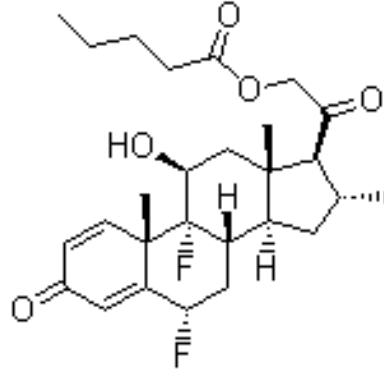
maddelerin ortamdan ekstre edilmeleri gerekebilmektedir. Bu işlem hem uzun hem de zahmetli bir işlem olup sonuçlar açısından hassasiyetin de düşmesine neden olmaktadır. Amacımız böyle bir ekstraksiyon işlemine gereksinim duyulmadan **DİF** ve **İZO**'un seçilen preparatlarda aynı anda miktar tayinlerinin yapılabilmesini sağlamaktır.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında ikili karışım halinde bulunan **DİF** ve **İZO**'nun aynı anda miktar tayinleri için yukarıda belirtilen amaca uygun olarak yapılacak çalışmalarda spektrofotometrik analizler temel alınmış ve gerek ölçülen absorbans değerlerini kemometrik teknikler ile değerlendirerek ve gerekse de türev spektrofotometri yardımıyla karışım içerisindeki bu iki etken maddenin hiçbir ayırma işlemi gerekmeksizin miktar tayinlerinin yapılabilmesi için yöntemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kemometrik yöntemler olarak; klasik en küçük kareler yöntemi (KLEK), ters en küçük kareler yöntemi (TEK), temel bileşen regresyonu (TBR) ve kısmi en küçük kareler (KEK) tekniklerinin uygulanması planlanmıştır. Elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla ayrıca bir YPSK yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilen tüm yöntemlerin **DİF** + **İZO** içeren seçilmiş farmasötik preparatlara uygulamasının sağlanması amaç olarak belirlenmiştir.

1.2. KİMYASAL VE FİZİKSEL ÖZELLİKLER

1.2.1. Diflukortolon valerat

Yapısı :



Kapalı formül : $C_{27}H_{36}F_2O_5$

Kimyasal yapısı :

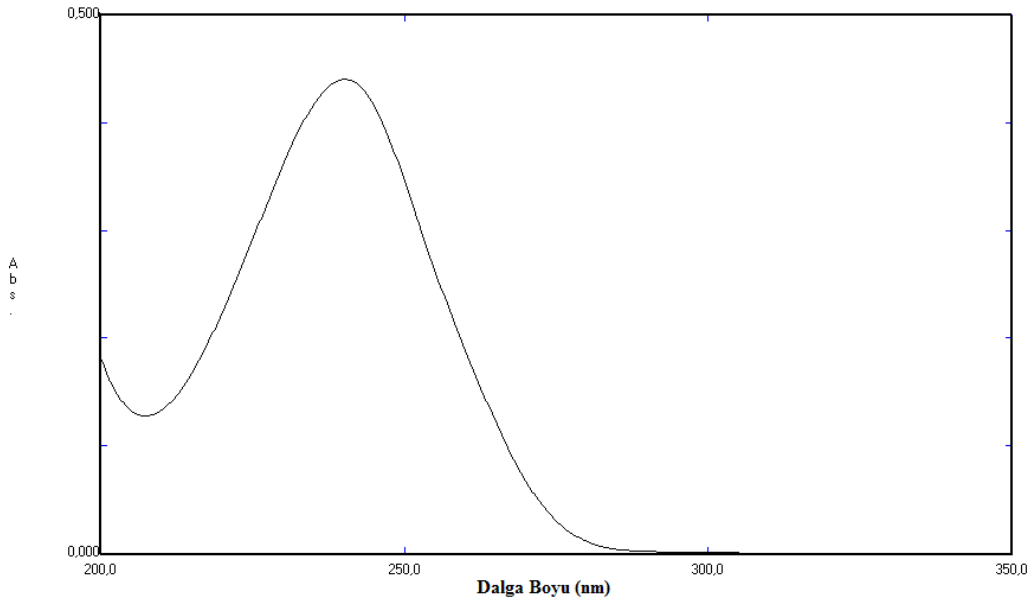
6a,9-Difloro-11b,21-dihidroksi-16a-metilpregna-1,4-dien-3,20-dion 21-valerat

Fiziksel özellikleri

DİF, beyaz renkte, kokusuz ve kristalize bir tozdur. Pratik olarak suda çözünmez. Diklorometan ve dioksan'da kolaylıkla çözünürken metanolde az, eterde çok zayıf çözünürlüğe sahiptir. Işıktan bozunur. Molekül ağırlığı 478.57 gram/mol'dür. Erime noktası 195 °C'dir.

UV spektrumu :

DİF'ın metanol - su (3:1 h/h) karışımındaki çözeltisinin UV spektrumunda 239.7 nm'de bir maksimum görülür. 12 µg/mL **DİF** çözeltisinin 239.7 nm'deki absorbansı 0.442'dir (Şekil 1.1).



Şekil.1.1. DİF'in metanol – su (3:1 h/h) içerisinde 12 µg/mL çözeltisinin UV spektrumu

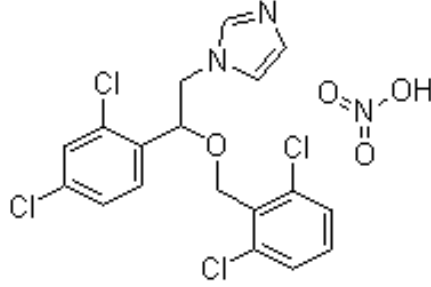
Farmakolojik etkileri :

DİF, bir topikal kortikosteroiddir. Lipokortin aracılığı ile fosfolipaz A2'yi inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterir. İltihabi ve alerjik deri hastalıklarındaki enflamasyonu önleyerek ağrı, yanma ve kaşıntı gibi şikayetlerin kesilmesini sağlar.

DİF'in emilimini etkileyen başlıca faktörler; ciltteki enflamasyonun derecesi, kapatma tedavisi ve uygulanan miktardır. Lokal uygulamadan sonra hızla deriye nüfuz eder ve 1 saat içinde stratum korneumda en yüksek konsantrasyona ulaşır. Sistemik dolaşıma geçişi % 2 kadardır. Ciltten emildikten sonra karaciğerde konjuge olmamış steroidler, glukokortikoidler ve sülfatlar şeklindeki metabolitlerine dönüşür. Yarılanma ömrü 4 saattir. Büyük bir kısmı idrarla, kalanı feçesle atılır.

1.2.2. İzokonazol nitrat

Yapısı:



Kapalı formül: C₁₈H₁₄Cl₄N₂O. HNO₃

Kimyasal yapısı:

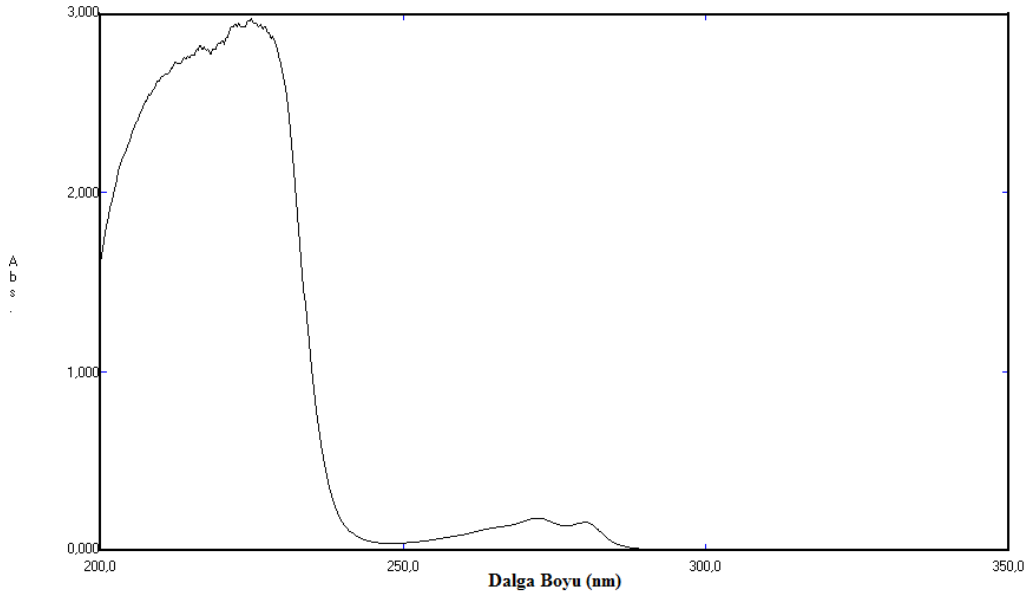
1-[2-(2,4-diklorofenil)-2-[(2,6-diklorofenil)metoksi]etil]-1H-imidazol mononitrat.

Fiziksel özellikleri

İZO, beyaz renkte, kokusuz bir tozudur. Pratik olarak suda çözünmez, metanolde kolaylıkla çözünür. Molekül ağırlığı 479.1 gram'dır. 178⁰C ile 182⁰C arasında erir.

UV spektrumu:

İZO'un metanol - su (3:1 h/h) içerisindeki çözeltisinin UV spektrumunda 280 nm ve 272.2 nm'de iki maksimum görülür. 120 µg/ml **İZO** çözeltisinin 280 nm'deki absorbansı 0.159, 272.2 nm'deki absorbansı ise 0.183'dür. (Şekil 1.2).



Şekil.1.2. İZO'un metanol – su (3:1 h/h) içerisindeki 120 µg/mL çözeltisinin UV Spektrumu

Farmakolojik etkileri :

İZO, imidazol grubundan geniş spektrumlu bir antifungaldır. Etkisini mantar hücre zarının bütünlüğünde ve fonksiyon görmesinde hayati rol oynayan ana sterol bileşiğı olan ergosterolün sentezini inhibe ederek gösterir. Bu inhibisyonu sitokrom P450'ye bağımlı 14 α -demetilazı inhibe ederek ve lanosterolün ergosterole dönüşmesini durdurarak gerçekleştirir.

Etki spektrumu candida türlerini, dermatofitleri ve Malassezia furfur'u kapsar. Ayrıca cildin mantar enfeksiyonlarında sekonder enfeksiyona yol açabilen streptokok, stafilokok, mikrokok gibi bazı gram (+) bakterilere karşı da antibakteriyel etki gösterir.

İZO ciltten hızla emilir ve yüzeysel mantar hastalıklarında etkenin yerleştiğı epidermiste 1 saat içinde en yüksek konsantrasyona ulaşır. Sistemik dolaşıma geçişi çok azdır, geçen etken madde metabolize olur ve 1/3'ü idrar, 2/3'ü safra olmak üzere hızla eliminasyona uğrar (Prospektüs bilgisi).

1.3. TÜRKİYE’DE DİF İÇEREN PREPARATLAR

- **TRAVAZOL[®]** Krem (Bilim)
 Diflukortolon valerat 1 mg
 İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

- **TRAVACORT[®]** Krem (Intendis)
 Diflukortolon valerat 1 mg
 İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

- **NERİSONA-C[®]** Krem (Intendis)
 Diflukortolon valerat ... 1 mg
 Klorkinaldol 10 mg / 1 gr krem

- **IMPETEX[®]** Krem (Roche)
 Diflukortolon valerat ... 1 mg
 Klorkinaldol 10 mg / 1 gr krem

- **TEMETEX[®]** Krem/Merhem (Roche)
 Diflukortolon valerat 1 mg / 1 gr krem

- **TEMETEX FORTE[®]** Merhem (Roche)
 Diflukortolon valerat 3 mg / 1 gr krem

1.4. TÜRKİYE’DE DİF ve İZO İÇEREN PREPARATLAR İLE İLGİLİ BİLGİLER

1.4.1. TRAVAZOL® Krem (Bilim)

Farmakolojik etkileri:

Travazol Krem hem antifungal hem de antienflamatuar etkilidir. İltihaplı ve ekzematöz yüzeysel cilt mantar enfeksiyonlarının tedavisinde endikedir.

Kullanılırken dikkat edilmesi gereken noktalar:

- Preparat herhangi bir maddeye karşı hassasiyeti olan kişilerde kullanılmamalıdır.
- Tedavi alanında tüberküloz, herpes grubu enfeksiyonlar, su çiçeği varlığında ve canlı virüs aşılarının uygulanması sırasında kontrendikedir.
- Perioral dermatit ve rozasea tedavisi için uygun değildir.
- Göze sürülmemelidir.

Yan etkileri:

Geniş alana ve uzun süreli uygulama sonucunda;

- Deride atrofi
- Telenjektazi hipertrikozis
- Hipopigmentasyon
- Akneiform döküntüler
- Perioral dermatit
- Sekonder bakteriyel enfeksiyon
- Çatlaklar ve isilik görülebilir.

Gebelikte ancak beklenen yararların muhtemel risklere ağır bastığı durumlarda kullanılabilir. Süte geçtiği tespit edildiğinden emziren kadınlarda kullanılmamalıdır. Çocukluk çağındaki hastalar erişkinlere göre steroidlere daha duyarlı olduğundan çok geniş yüzeylerde kullanılmamalıdır.

1.4.2. TRAVACORT® Krem (İntendis)

Farmakolojik etkileri :

Travacort Krem, hem şiddetli iltihabi veya ekzematö reaksiyonlar ile seyreden derinin yüzeysel mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır.

Kullanılırken dikkat edilmesi gereken noktalar :

- Göze kaçmamasına dikkat edilmelidir.
- Bakterilerle enfekte olmuş cilt hastalıklarında ayrıca spesifik bir tedavi gerektirebilir.
- Lokal kortikoidlerle kullanılması ile glokom gelişebilir.

Yan etkileri :

Geniş alana ve uzun süreli uygulama sonucunda;

- Deride atrofi, teleanjiyektaziler, striae, akne benzeri değişiklikler ve kortikoidin emilimine bağlı olarak sistemik etkiler.

Topikal uygulama için olan diğer kortikosteroidler gibi, nadir vakada;

- Follikülit
- Hipertrikoz
- Perioral dermatit
- Bileşenlere karşı alerjik reaksiyonlar oluşabilir.

.Gebelik ve süt verme döneminde uzun süre veya geniş alanda uygulandığında, yenidoğanlarda da bazı yan etkilerin oluşması mümkündür.

1.5. DÜNYADA DİF İÇEREN TİCARİ PREPARATLAR

Preparat	DİF ile birlikte bulunan etken madde	Bulunduğu ülke
Bi- nerisona	Klorkinaldol, DİF	Brezilya, Meksika, Şili
Binerisona	Klorkinaldol, DİF	İspanya
Claral	DİF	İspanya
Claral plus	Klorkinaldol, DİF	İspanya
Corti-fluoral	Josamisin, DİF	İtalya
Cortical	DİF	İtalya
Dermafllogil	Kanamycin, DİF	İtalya
Dermaval	DİF	İtalya
Dermobios	Polymyxin B, Tetrasiklin, DİF	İtalya
Dermobios oto	Polymyxin B, Tetrasiklin, DİF	İtalya
Dervin	DİF	İtalya
Dicortal	DİF	İtalya
Diflunazol	Econazole, neomisin, DİF	Arjantin
Flu-cortanest	DİF	İtalya
Impetex	Klorkinaldol, DİF	İtalya
Isocort	İzokonazol, DİF	İsrail
Isoradin	İzokonazol, DİF	Malezya
Multideerm	Klorkinaldol, DİF	İsrail
Neriderm	DİF	İsrail
Nerifort	DİF	Avusturya, İsvicre
Neriquinol	Klorkinaldol, DİF	Avusturya
Nerisalic	Salisilik asit, DİF	Fransa, Kanada
Nerisona	DİF	Meksika, Arjantin, Brezilya, İtalya, Portekiz,Almanya, Hollanda, Avusturya, İsvicre, Belcika, Danimarka
Nerisona c	Klorkinaldol, DİF	Almanya, Arjantin, İtalya, Portekiz
Nerisone	DİF	İngiltere, Yeni Zellanda, Fransa, Hongkong, İrlanda, Güney Afrika Cumhuriyeti, Singapur, Malezya, Kanada
Nerisone c	Klorkinaldol, DİF DİF	Yeni Zellanda, Fransa, Hongkong, Singapur
Scheriderm	İzokonazol, Neomisin, DİF	Meksika, Arjantin
Temetex	DİF	İtalya, İspanya, Almanya, İsvicre
Temetex c	Klorkinaldol, DİF	İsvicre
Temetex compositum	Klorkinaldol, DİF	İspanya
Tevaderm	İzokonazol, DİF	İsrail
Travacort	İzokonazol, DİF	İtalya, Portekiz, Almanya, Avusturya, İsvicre, Belcika, Yunanistan, Hongkong, İrlanda, Rusya, Güney Afrika Cumhuriyeti, Singapur, Tayland, Malezya

1.6. TÜRKİYE'DE İZO İÇEREN PREPARATLAR

- **TRAVAZOL[®]** Krem (Roche)

Diflukortolon valerat ... 1 mg

İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

- **TRAVACORT[®]** Krem (İntendis)

Diflukortolon valerat ... 1 mg

İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

- **TRAVOGEN[®]** Krem (Intendis)

İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

- **GYNO-TRAVOGEN[®]** Ovül (Schering Alman)

İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

- **TRAVOGEN[®]** Sprey (Intendis)

İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

- **GYNO-TRAVOGEN[®]** Tablet (Intendis)

İzokonazol nitrat 10 mg / 1 gr krem

1.7. DÜNYADA İZO İÇEREN TİCARİ PREPARATLAR

Preparat	İZO ile birlikte bulunan etken madde	Bulunduğu ülke
Bi-vaspit	Fluokortin, İZO	Almanya
Fazol	İZO	Fransa
Fazol G	İZO	Fransa
Gino Monipax	İZO	Brezilya
Gino- İsomax	İZO	Brezilya
Gino-Travogen	İZO	Portekiz
Gino-Trax	İZO	Brezilya
Gyno İcaden	İZO	Brezilya
Gyno- Mycel	İZO	Brezilya
Gyno-Travogen	İZO	Almanya, Hollanda, Avusturya
Gynoplus	İZO	Brezilya
İcaden	İZO	Meksika, Brezilya
İsocort	DİF, İZO	İsrail
İsogen	İZO	İsrail
İsogyn	İZO	İtalya
İsomax	İZO	Brezilya
İsoradin	DİF	Malezya
Mupaten	İZO	Arjantin
Mycel	İZO	Brezilya
Nacozil	İZO	Tayland
Neo İsocaden	İZO	Brezilya
Nocazin	İZO	Meksika
Scheriderm	Neomisin, DİF, İZO	Arjantin, Meksika
Tevaderm	DİF	İsrail
Travacort	DİF , İZO	İtalya, Portekiz, Almanya, Avusturya, İsviçre, Belcika, Yunanistan, Hongkong, İrlanda, Rusya, Güney Afrika Cumhuriyeti, Singapur, Tayland, Malezya
Travogen	İZO	Almanya, İtalya, Hollanda, Avusturya, İsviçre, Avustralya, Belcika, Yunanistan, Hongkong, İrlanda, Rusya, Güney Afrika Cumhuriyeti, Singapur, Tayland, Malezya, Yeni Zellanda
Travogyn	İZO	İngiltere
Ufarin	İZO	Şili

1.8. ÜZERİNDE ÇALIŞMA YAPILAN ETKEN MADDELERİN MİKTAR TAYİNLERİ KONUSUNDAKİ LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

1.8.1. DİF için yapılmış çalışmalar

Spektrofotometrik çalışmalar:

PALABIYIK ve arkadaşları (2007) yaptıkları bir çalışmada, DİF ve Klorkinaldol (KLO) içeren krem preparatında, bu iki maddenin aynı anda miktar tayinleri için spektrofotometrik yöntemlerden ve YPSK yönteminden faydalanmışlardır. Spektrofotometride; kemometrik teknik olan temel bileşen regresyonu (TBR) uygulanmıştır. Bu yöntemde, DİF ve KLO içeren ilaçların sentetik karışım çözeltileri metanol:su (3:1) içerisinde değişik konsantrasyonlarda hazırlanarak orjinal spektrumlarında okunan absorbans değerlerine göre bir matriks elde edilmiştir. Bu matriks 230-348 nm arasında, $\Delta\lambda=2$ nm olan 60 dalga boyunda absorbans okunarak hazırlanmıştır. TBR yöntemiyle bu iki maddenin aynı anda miktar tayinlerinin yapıldığı bu çalışmada, çalışma aralığı DİF için 0.88 – 3.0 µg/mL, KLO için 1.0 – 11.2 µg/mL olarak bulunmuştur.

YPSK ile yapılmış çalışmalar:

AMIN ve SCHNEIDER (1978) yaptıkları bir çalışmada DİF ve klokortolon kaproat içeren etanolik çözeltilerde aynı anda miktar tayinlerini yapabilmek için YPSK yönteminden yararlanmışlardır. Yöntemde Merckosorb Si60 (20 µm, 100 cm x 4 mm) kolonu ve hareketli faz olarak kloroform-sikloheksan (3:2 , h/h) sistemi kullanılmış, deteksiyon 254 nm’de yapılmıştır. Analizin yaklaşık 15 dakika içerisinde tamamlandığı çalışmada belirtilmektedir. Yöntemde bağıl standart sapma (BSS) değerlerinin % 3,2’den küçük olduğu ve bu tür preparatlara kolaylıkla uygulanabildiği çalışmada belirtilmektedir.

MAEDA ve arkadaşları (1987) yaptıkları bir çalışmada içerisinde **DİF**’de dahil olmak üzere 11 kortikosteroidin ve 4 parabenin karışımlarında aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. Yöntemde ters faz C-18 kolonu ve hareketli faz olarak da metanol-su (50:50, h/h) kullanılmış, deteksiyon 254 nm’de yapılmıştır. Yöntemde sekonder butil paraben iç standart olarak kullanılmıştır. Yöntemdeki doğrusal çalışma aralığının kortikosteroidler için 0.01-0.025 mg/ml ve parabenler

için ise 0.002-0.05 mg/ml olduğu bulunmuştur. Yöntemdeki BSS değerlerinin hem kortikosteroidler için hem de parabenler için %1.3'den daha küçük olduğu çalışmada belirtilmektedir. Ayrıca bu yöntemin alışlagelen yöntemlerden daha pratik olduğu ve rutin analizlerde kullanılabileceği de yine çalışmada anlatılmaktadır.

MAEDA ve arkadaşları (1988) yaptıkları bir başka çalışmada yine içerisinde DİF'inde bulunduğu 11 adet kortikosteroid ve metil-, etil-, propil- ve butil parabenin YPSK ile merhem preparatlarında aynı anda tayinlerinin yapılabileceğini göstermişlerdir. Yöntemde yağda çözünen yardımcı maddeler 10 ml hekzan-kloroform (70:30, h/h) kartuşundan geçirilerek öncelikle ayrılmışlar, daha sonra kortikosteroidler ve parabenlerin 10 ml etil asetatlı kartuştan elue edildikten sonra ve ters faz C18 kolonu üzerinde su-metanol (50:50, h/h) hareketli fazı geçirildikten sonra 240 nm'de deteksiyon yapılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemde iç standart olarak sekonder butil paraben kullanılmıştır. Yöntemin, içerisine kortikosteroid ve parabenlerin ilave edildiği merhem bazının analizinde başarı ile uygulandığı ve bu çalışmada ortalama % geri kazanımın %98.4 – 103.2 arasında, BSS' ların ise % 0.4 – 2.4 arasında olduğu çalışmada belirtilmektedir.

GAGLIARDI ve arkadaşları (2002) yaptıkları bir çalışmada içerisinde DİF'in de bulunduğu 51 adet kortikosteroidin kozmetik ürünlerde miktar tayini için ince tabaka kromatografisindeki ayırımın ardından YPSK ile çalışılabileceğini göstermişlerdir. Yöntemde, steroid bileşikleri öncelikle silika kaplı plaklar üzerinde etil asetat- n-hekzan (40:60, h/h) ile ayrılmış ve ayrılan bileşiklerin metanol ile ekstraksiyonu yapılmış sonra Purospher RP-18 kolonu ve asetonitril-su (60:40, h/h) ve elüsyon asetonitril-su (25:75, h/h)'dan oluşan hareketli faz ile 30 dakika içerisinde asetonitril miktarı % 90'a geçişecek biçimde gradient elüsyon ile analiz edilmiştir. Akış hızı 1.0 mL/dakika seçilmiş, deteksiyon ise 239 nm'de yapılmıştır. İnce tabaka kromatografisinde DİF için R_f değeri 0.21, YPSK yönteminde alıkonma zamanı (t_R) ise 23.3 dakika olarak bulunmuştur. Yöntem krem, şampuan ve losyon formülasyonlarına uygulanmış ve DİF için ortalama % geri kazanım ve BSS değerlerinin sırasıyla kremlerde % 91.8 ve % 3.2, şampuanlarda % 95.1 ve % 1.9, losyonlarda ise % 96.7 ve % 2.3 olarak hesaplandığı çalışmada belirtilmiştir.

1.8.2. İZO için yapılmış çalışmalar

YPSK ile Yapılan çalışmalar

CAVRINI ve arkadaşları (1992) içerisinde İZO'nun yer aldığı 8 adet imidazol türevi antimikotik etken maddeyi Hypersil C-18 (5 µm, 250x4.6 mm), Spherisorb-CN (5 µm, 250x4.6 mm), Chrompher-B (5 µm, 150x4,6 mm) ile doldurulmuş kolonlarda ayırarak aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. İZO ve ketokonazolün rutin analizlerinde Hypersil kolonları ve hareketli faz olarak metanol: 0.05 M trietilamin fosfat tamponu (pH = 7.0) (85:15, h/h) kullanılmış, akış hızı ise 1.0 ml/dakika seçilmiştir. Çalışmada iç standart olarak klotrimazol kullanılmıştır. Deteksiyon ise 230 nm'de yapılmıştır. Yöntemin krem prepratlarına başarıyla uygulandığı çalışmada belirtilmektedir. Seçilen ticari preparatdan İZO'nun ortalama % geri kazanımı, % 101.53 ve BSS değeri ise %1.0 olarak hesaplanmıştır. Yöntemdeki çalışma aralığının İZO için 20–70 µg/mL olduğu çalışmada belirtilmiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. KULLANILAN YÖNTEMLER

2.1.1. Türev spektrofotometri

Türev spektrofotometri, kalitatif ve kantitatif analiz için dalga boyuna karşı absorbansın birinci veya daha fazla türevini kullanır. Ancak bu teknik ilk bulunduğu çok fazla ilgi görmedi, çünkü o dönemki UV-Vis spektrofotometreleriyle türev spektrumu almak zordu. Deneysel eğrilerin ölçüm aletleri ile türevlerinin alınması oldukça eskiye dayanır ve 1920 lerde ilk defa Rutherford tarafından kütle spektrumlarının yorumlanmasında kullanılmıştır. Genel kullanma girmesi ise 1950 senelerini bulmuştur. Günümüzde mikro işlemcilerin yaygın olarak kullanılması bu yöntemin kolaylıkla analizlere uygulanmasına imkân tanımaktadır ve geliştirilen spektrofotometreler de bu şekilde donanmışlardır. Son senelerde yayınlanan ilaç analizleri araştırmaların çoğunda bu yöntemle ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

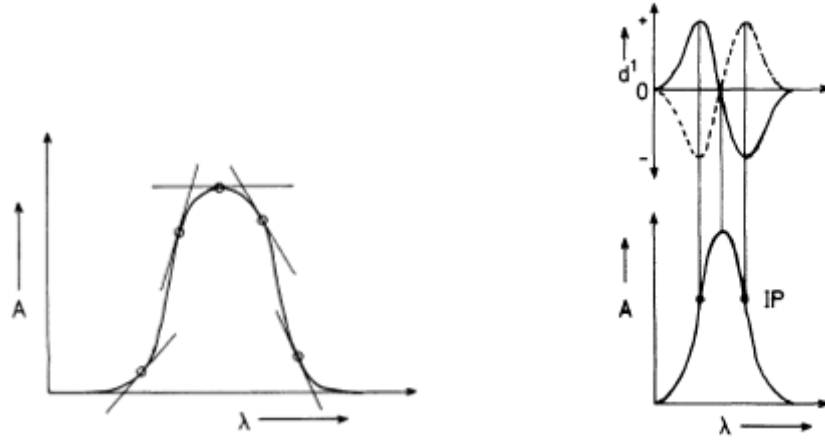
UV-görünür bölgedeki bir spektrum, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bu fonksiyonun her bir noktasındaki türevi hesaplanabilir ($dA/d\lambda$).

Eğer bu türev değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilecek olursa “türev spektrumu” meydana gelir ve 1 den n’e kadar derecede olabilir.

$$\frac{dA}{d\lambda} \quad \frac{d^2A}{d\lambda^2} \quad \dots \dots \dots \quad \frac{d^n A}{d\lambda^n}$$

Türev spektrofotometri ise türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir.

Esasında türev; eğrinin üzerine çizilen teğetin eğimidir yani tanjantıdır. (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Gauss tipindeki bir eğrinin belirli noktalardaki tanjantları ve karşılıkları

Buna göre gauss tipindeki bir eğride tanjantın en yüksek olduğu yarı yüksekliklerde maksimum veya minimumlar gözlenir.

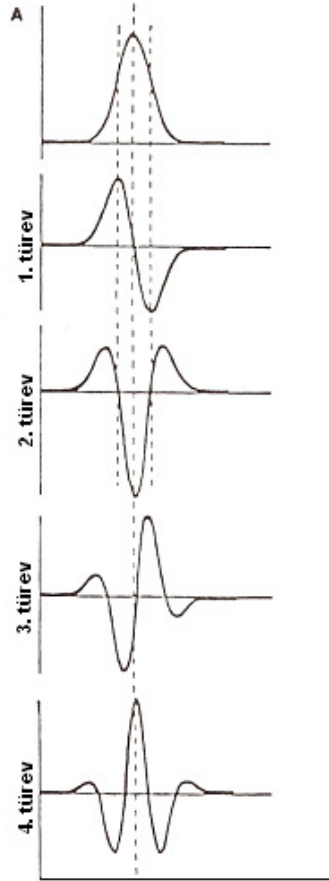
Türev Eğrilerinin Şekilleri:

Günümüzde 1. den 4. ye kadar türev eğrisi çizilmekte ve anlam kazanmaktadır. Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi 1. türev eğrisi orjinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Burada orjinal spektrumun maksimum noktası kaybolmuştur ve buna karşılık orjinal spektrumda absorbansın yükseldiği kısımlar için pozitif, azaldığı kısımlar için ise negatif değerler almaktadır. Türev eğrisi, orjinal spektrumdaki eğri üzerinde eğimin en büyük olduğu noktalara yani eğrinin yarı yüksekliklerine karşılık bir maksimum ve bir minimum göstermekte eğimin en düşük olduğu tepe noktasında ise sıfır olmaktadır. Buna göre gauss eğrisindeki maksimum noktasına 1. türev eğrisinde bir “kesim noktası (zero-crossing)” karşılık gelmektedir. Bu noktanın her iki tarafında pozitif ve negatif bantta absorbans eğrisinin eğim noktasında (inflection) maksimum ve minimum yapar. Bu iki kutuplu fonksiyon bütün tek sayılı türevlerin karakteristiğidir. 2. türev eğrisinde ise aynı işlemler sonucunda orjinal eğrinin maksimum noktasına karşılık gelen bir minimum görülmektedir. Ayrıca ana pikin iki tarafında ve pozitif bölgede iki adet uydu pik verir. Çift sayılı türevlerin karakteristik özelliği, absorbans spektrumunun maksimum yaptığı dalga boyunda, $\lambda_{\max}$, pozitif veya negatif bölgede güçlü bir maksimum veya minimum vermesidir. 3. türev eğrisinde orjinal eğrinin maksimum noktasına aynen 1. türev eğrisinde olduğu gibi bir kesim noktası karşılık gelmektedir. 4. türevde ise orjinal spektrumdaki maksimum noktaya yine bir

maksimum nokta karşılık gelmektedir. Bu nedenle tek maddenin kantitatif tayinlerinde 2. ve 4. türev eğrileri kullanılmaktadır. Ayrıca orjinal Gauss eğrisi tipindeki bir pik'e karşılık n . türevde $n + 1$ tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani 1. türevde 2, 2. türevde 3, 3. türevde 4 tane gibi maksimum ve minimum noktası gözlenmektedir (Şekil 2.2).

Önemli bir nokta ise, türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığı içerisinde alınması nedeniyle piklerin genişliğinin azalmasıdır. Bu azalma yaklaşık 1. türevde yarıya, 2. türevde üçte birine ve 4. türevde yüzde 40'ına inmektedir.

Türev spektrumlarında, kesim noktası çok önemlidir. Çünkü bu noktada pikin ait olduğu maddenin diğer madde veya maddelerin spektrumuna katkısı yoktur. Dolayısıyla karışım içerisinde herhangi bir ayırma işlemi gerekmeksizin bazı maddelerin diğerleri yanında miktar tayinlerinin yapılabilmesi mümkündür. Bu da özellikle karışım halinde maddeleri etken maddeler olarak içeren farmasötik preparatların analizi için yöntemin çok etkili ve kolay bir miktar tayini yöntemi olmasını sağlar.



Şekil 2.2. Türev eğrilerinin şekilleri

Bu yöntem, ikili karışımlarda olduğu kadar daha fazla sayıda bileşen içeren karışımlarda da uygun kesim noktaları bulunduğu uygulanabilir.

Şekil 2.2 türev alma basit Gauss absorbands eğrisinin görünümünde ne gibi değişiklikler yaptığını bilgisayar simülasyonları halinde göstermektedir. Türev spektrumu her zaman normal eğriden daha komplekstir.

Yöntemin Özellikleri:

— Avantajları:

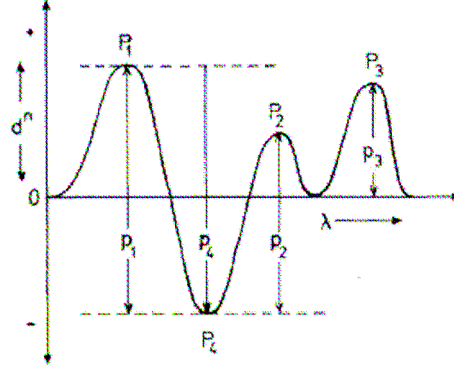
- a) Türev çalışması orjinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi verir ve omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve kesin olarak tanınabilir.
- b) Çoğunlukla orjinal spektrumda elde edilen eğriler birçok pikin üst üste gelmesi ile meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece birarada bulunan piklerin tek tek görülmesi sağlanır.
- c) Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışılırken çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir.
- d) Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi gibi herhangi bir ayırma işlemine başvurmaksızın tek tek miktarlar tayin edilebilir.
- e) Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesi sağlanır.

— Dezavantajları:

- a) Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelere ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.

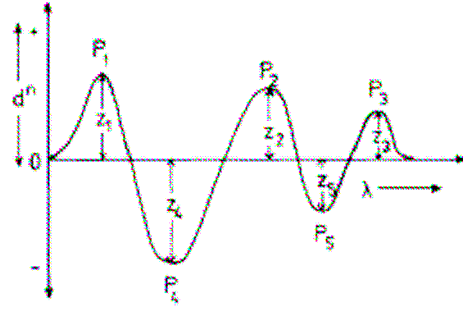
Türev Spektrometrisinde Ölçüm Yöntemleri

Pikten pike ölçüm: Bir spektrumda ard arda gelen maksimum ve minimum noktalar alınarak bu iki noktanın mutlak değer olarak farkı ölçülür. Birkaç nokta var ise, ordinat farkının en büyük olduğu bir bitişik çift seçilir. Bu ölçüm genelde çok bileşenli nicel analizlerde kullanılır.



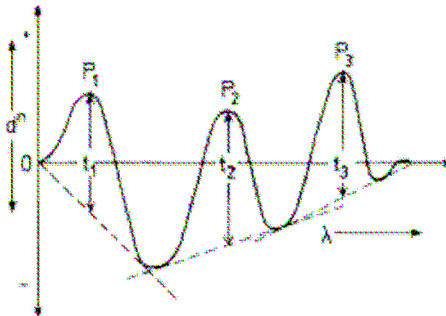
Şekil 2.3. Pikten pike ölçüm

Pikten sıfıra ölçüm: Ölçümü yapılacak pikin maksimum ya da minimumu ile sıfır arasındaki uzaklık ölçülür. Özellikle absise göre simetrik sinyaller içeren yüksek derece türevler için ve üst üste çıkışan eğrilerden biri sıfırdan geçtiğinde kullanılır.



Şekil 2.4. Pikten sıfıra ölçüm

Teğet yöntemi ile ölçüm: Bir spektrumda ard arda gelen iki maksimum üzerinden geçirilen teğetin aşağıdaki minimuma izdüşümü uzaklığı ölçülür. Bu yöntem doğrusal geri zemine çok rahat uygulanabilir. Özellikle zemin absorpsiyonunun belirlenemediği bulanık örnekler için uygulanır. Bulanık örneklerde, bulanıklık arttıkça spektrum daha kısa dalga boylarına kayar. Birinci derece ve ikinci derece türevleri alınarak bu etki ortadan kaldırılabilir.



Şekil 2.5. Teğet yöntemi ile ölçüm

Pik-pik oranı yöntemi: Pik-pik oranı yöntemi birbirine komşu bir pik çiftinin oranına dayanır. Eğer bu değerler fark gösterirse, o zaman background girişimi ve dolayısıyla numunenin düşük kalitede ölçülmesiyle sonuçlanır. Ayrıca Şekil 2.5’de gösterilen P_1 ve P_2 sinyalleri numunedeki farklı sinyallerden kaynaklanabilir. Konsantrasyonların oranı değişmediği sürece, p_1 ve p_2 yüksekliklerinin oranı her zaman sabit kalacaktır. Kesin konsantrasyonlar farklı olsa ve modifiye edilse bile bu değişmeyecektir. Diğer bir deyişle pik-pik oranı sadece saf maddeler için değil, karışımlar için de karakteristik bir niceliktir. Bu özellik analiste bir maddenin konsantrasyonu sabit tutulduğunda (standart olarak), ikinci maddenin konsantrasyonundaki değişimi tahmin edebilmesine olanak sağlar. Bu, özellikle karmaşık türev spektrumlarındaki küçük farklar araştırıldığında kullanışlıdır.

2.1.2. Kemometrik Yöntemler

1972’de ismi konulan kemometri, kimyasal verilerin analizlenmesi yardımıyla optimum ölçüm işlemleri ve yöntemlerinin seçimi ve tasarlanması ve maksimum kimyasal bilgi edinilmesi için matematik ve istatistik yöntemlerin kullanıldığı bir alan olarak tarif edilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle de analitik kimyada çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemometrinin en çok kullanıldığı analiz yöntemlerinin başında spektroskopi gelmektedir. Spektroskopik yöntemler ise günümüzde pek çok amaçla analizciler tarafından kullanılmaktadır. Özellikle UV-Visible spektroskopi çok fazla kullanım alanına sahip olup üzerinde çalışılan numune için hem kalitatif hem de kantitatif açıdan bilgiler elde etmemizi sağlar. Kantitatif analitik spektroskopi açısından önemli olan analiz edilecek maddenin miktarıdır. Miktar tayinleri için öncelikle kalibrasyon işleminin gerçekleştirilmesi gerekir. Kalibrasyon işlemlerinde cihazdan elde edilen analitik sinyallerin analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile orantılı olması esastır. Kalibrasyon işlemleri yıllardır kullanılmasına rağmen bilgisayar teknolojisinin ve gelişmiş cihazların kullanılmasıyla büyük bir atılım göstermiş (COWE ve McNICOL, 1985; FREDERICKS ve Ark., 1985; THOMAS, 1994) olup günümüzde ticari olarak satılan pek çok analiz cihazının içerisinde bunların çözümü için geliştirilen programlar standart olarak yer almaktadır.

Spektrokimyasal analizlerde değişik pek çok kalibrasyon yöntemleri geliştirilmiştir (ATKINSON, 1985; BEEBE ve KOWALSKI, 1987; BOOKSH ve KOWALSKI, 1994; BOX, 1980; COOK ve WEISBERG, 1982; GELADI ve KOWALSKI, 1986; HAALAND ve THOMAS, 1988; HAWKINS, 1993; MILLER, 1991; ROECKER, 1991; STROMBERG, 1993; WENTZELL ve Ark., 1997). Bu yöntemler içerisinde klasik olanı tek değişkenli kalibrasyondur, ki bunda basit lineer regresyon yöntemleri kullanılır ve ölçülen cevaplarda herhangi bir başka girişimin olmadığı kabul edilir. Bundan sonra pek çok girişimin hesaba katıldığı kompleks kimyasal karışımların analizi için çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Analiz edilecek madde ile elde edilen analitik sinyal arasındaki ilişkinin non-lineer olduğu (doğrusal olmayan) çok sayıda multivariate (çok değişkenli) kalibrasyon yöntemi de geliştirilmiştir (FRANK, 1990; DUTTER ve HUBER, 1981; LAWRENCE ve ARTHUR, 1990; RATKOWSKY, 1990; SEKULİÇ ve Ark., 1993; STROMBERG ve RUPPERT, 1989). Analiz için hangi kalibrasyon yönteminin seçileceği bu tekniklerin temeline göredir. Bu nedenle değişik tipteki kalibrasyon tekniklerinin teorik temelleri ve bunların avantaj ve dezavantajları aşağıda gösterilmiştir:

2.1.2.1. Tek Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Tek değişkenli kalibrasyon yöntemleri 0. derece kalibrasyon yöntemleri olarak sınıflandırılır (BOOKSH ve KOWALSKI, 1994) ve bu yöntemlerde spektrofotometre gibi cihazlarda spesifik bir dalga boyunda analiz edilecek maddenin konsantrasyonu için ölçüm yapılır. Tek değişkenli kalibrasyon tekniği cihazdan elde edilen cevabın hiçbir başka girişim olmaksızın sadece incelenen bileşieğe bağlı olmasını gerektirir. Burada miktar tayini iki basamaklı bir işlemdir. Bunlardan birincisi kalibrasyon, ikincisi tahmindir. Birinci basamakta konsantrasyonları belli bir numune serisi için ölçümler yapılır. Bu kalibrasyon serisi genellikle kalibrasyon seti veya çalışma seti olarak adlandırılır. Bu kalibrasyon serisi, cihazdan tayin edilecek maddenin konsantrasyonuna bağlı olarak alınan cevaplara göre bir kalibrasyon modelinin kurulması için kullanılır. İkinci basamak ise konsantrasyonu bilinmeyen numune için cihazdan alınan cevabın ölçülmesi ve daha önce kurulmuş olan kalibrasyon modeli yardımıyla numune konsantrasyonunun hesaplanmasıdır.

Aşağıdaki bölümde koyu alt harfler *vektörleri*, italik alt harfler *scaları* (sabit sayıları) ve koyu üst harfler ise *matrisleri* göstermektedir. Bütün vektörler kolon vektörleri olarak ifade edilmiştir.

Bir tek değişkenli kalibrasyon yöntemi için cihazdan sabit bir dalga boyunda alınan cevap r , c ile gösterilen analit konsantrasyonu ile orantılıdır ve bu aşağıdaki kalibrasyon fonksiyonu ile ifade edilir :

$$r = \mathbf{f}(\mathbf{c}) + e_r \quad (5)$$

Burada e_r ; cihazdan gelen cevap ile meydana gelen hatayı ifade eder. Spektroskopide $f(c)$ ile gösterilen bağıntı, c 'nin fonksiyonunu ifade eder ve Beer kanununa göre doğrusal olduğu kabul edilir ki maksimum absorpsiyon yapılan dalga boyunda analit için okunan cihaz cevabının analit konsantrasyonu ile doğrusal olarak orantılı olduğunu ifade eder. Burada cihazdan elde edilen cevap olarak absorbans ölçümleri anlaşılabacaktır. Kalibrasyon modeli seçiminde cihaz cevabı ile analit konsantrasyonunun arasında doğrusal bir ilişkinin olduğunu kabul eden iki bilinen yöntem vardır. Bunlar, klasik ve ters tek değişkenli kalibrasyon yöntemleri olarak adlandırılırlar.

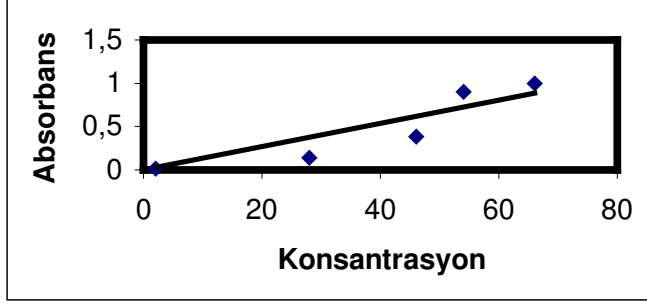
2.1.2.1.1. Klasik Tek Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Klasik tek değişkenli kalibrasyon yöntemi Beer kanununu temel alır ve istatistiksel model olarak aşağıdaki gibi ifade edilir :

$$a_i = b_0 + b_1 \cdot c_i + e_i \quad (6)$$

Burada a_i ve c_i , m sayıdaki kalibrasyon standardı için i . numunenin sırasıyla cihaz cevabı ve analit konsantrasyonlarıdır. a_i 'de meydana gelen ölçüm hatası ise e_i ile gösterilir. İdealde, cihaz cevabında hiç hata olmadığı kabul edilir ve bu durumda (6) denklemi bir doğru olur. b_0 ve b_1 , bu doğrunun sırasıyla kesim noktaları ve eğimidir. Fakat gerçek uygulamalarda her zaman cihaz cevabıyla ilgili veya konsantrasyon değerlerinden kaynaklanan değişik cinsten hatalar gelmektedir. Bu nedenle kantitatif spektrokimyasal analizdeki alışılmış işlemlerde cihaz cevabı analit konsantrasyonunun m kalibrasyon standart serisi için grafiğe geçirilir. En iyi doğru

en küçük kareler yöntemi kullanılarak b_0 ve b_1 'in hesaba katıldığı verilerin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Şekil 2.6 sentetik numunenin konsantrasyonuna karşı okunan absorbans ölçümlerinin grafiğe geçirilmesini göstermektedir



Şekil 2.6. Regresyon grafiği

Şekil 2.6'da doğrunun her noktasından düşeyssel sapmaların her bir analit için cihaz cevabında oluşan hatayla bağlantılı olduğu düşünülür ve **residual** olarak adlandırılır. En küçük kareler yöntemi, klasik tek değişkenli kalibrasyon yönteminde her noktadaki farkların (residuallerin) karelerinin toplamını (SS) minimize eder. Bu veri serisinin SS'sı, m sayıda kalibrasyon numunesi için (2) eşitliğinde yeniden bir düzenlemeyi getirir.

SS'yi minimize etmek için buradaki her iki parametreye göre kısmi türevi alınıp 0'a eşitlenmelidir ki bu işlemi yapmak ve sonra denklemi çözmekle SS otomatik olarak minimize olmaz, SS'nin kısmi ikinci türevinin matrisinin determinantının pozitif olması da gerekir böylece maksimum yerine minimum elde edilir.

$$\begin{pmatrix} n & \sum_{i=1}^m c_i \\ \sum_{i=1}^m c_i & \sum_{i=1}^m c_i^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum_{i=1}^m a_i \\ \sum_{i=1}^m c_i a_i \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} n & \sum_{i=1}^m c_i \\ \sum_{i=1}^m c_i & \sum_{i=1}^m c_i^2 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \sum_{i=1}^m a_i \\ \sum_{i=1}^m c_i a_i \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \end{pmatrix} = \frac{1}{n \sum_{i=1}^m c_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right)^2}$$

$$\begin{pmatrix} \sum_{i=1}^m a_i & \sum_{i=1}^m c_i^2 - \sum_{i=1}^m c_i & \sum_{i=1}^m c_i a_i \\ n \sum_{i=1}^m c_i a_i - \sum_{i=1}^m c_i & \sum_{i=1}^m a_i \end{pmatrix}$$

$$SS = \sum_{i=1}^m e_i^2 = \sum_{i=1}^m (a_i - b_0 - b_1 \cdot c_i)^2 \quad (7)$$

$$\sigma SS / \sigma b_0 = 2 \sum_{i=1}^m (a_i - b_0 - b_1 \cdot c_i) \cdot (-1) = 0 \quad (8.a)$$

$$\sigma SS / \sigma b_1 = 2 \sum_{i=1}^m (a_i - b_0 - b_1 \cdot c_i) \cdot (-c_i) = 0 \quad (8.b)$$

8.a ve 8.b 'den 2 ve -1'in düşürülmesi sonucunda b_0 ve b_1 aşağıdaki eşitliklerin çözümü ile elde edilebilir :

$$\sum_{i=1}^m (a_i - b_0 - b_1 \cdot c_i) = 0 \quad (9.a)$$

$$\sum_{i=1}^m (c_i \cdot a_i - c_i \cdot b_0 - b_1 \cdot c_i^2) = 0 \quad (9.b)$$

Bu eşitlikler şu hali alır :

$$mb_0 + b_1 \sum_{i=1}^m c_i = \sum_{i=1}^m a_i \quad (10.a)$$

$$b_0 \sum_{i=1}^m c_i + b_1 \sum_{i=1}^m c_i^2 = \sum_{i=1}^m c_i \cdot a_i \quad (10.b)$$

Bu eşitliklerin çözümü b_0 ve b_1 'in en küçük karelere göre değerlerinin bulunmasına yardım eder.

$$\sum_{i=1}^m c_i \cdot a_i - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \left(\sum_{i=1}^m a_i \right) / m$$

$$\hat{b}_1 = \frac{\sum_{i=1}^m c_i \cdot a_i - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \left(\sum_{i=1}^m a_i \right) / m}{\sum_{i=1}^m c_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right)^2 / m} \quad (11.a)$$

$$\sum_{i=1}^m c_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right)^2 / m$$

ve

$$\hat{b}_0 = \bar{a} - \hat{b}_1 \cdot \bar{c} \quad (11.b)$$

Burada $\bar{a}$ ve $\bar{c}$ cihaz cevapları ve analit konsantrasyonlarının m sayıdaki kalibrasyon numunesi için ortalama değerleridir. Buna göre kalibrasyon eşitliği aşağıdaki biçimde ifade edilir :

$$\hat{a} = \hat{b}_0 + \hat{b}_1 \cdot c \quad (12)$$

Buna göre bilinmeyen numunedeki konsantrasyon aşağıdaki eşitlikten çözülebilir:

$$c_u = (a_u - \hat{b}_0) / \hat{b}_1 \quad (13)$$

Burada c_u bilinmeyen analit konsantrasyonunu ve a_u ise bu numune için cihaz cevabını göstermektedir.

2.1.2.1.2. Matris Cebirin Basit Lineer Regresyonda Kullanılması

En küçük kareler yöntemi aynı zamanda matris cebir ile de ifade edilebilir. Klasik tek değişkenli kalibrasyon için tasarlanmış model matris notasyonuna göre aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$a = C\beta + e_a \quad (14)$$

Burada a , cihaz cevaplarının $m \times 1$ vektörü, C analit konsantrasyonunun $m \times 2$ matrisi, β ise regresyon parametrelerinin (b_0 ve b_1) 2×1 vektörü ve e_a ise a 'da meydana gelen veya modele uymayan residualdeki hataların $m \times 1$ matrisidir.

9.a. ve 9.b'de verilen normal eşitlikler aşağıdaki şekilde matris formunda ifade edilebilirler.

$$(C' \cdot C) \cdot \beta = C' \cdot a \quad (15)$$

16'nin en küçük karelere göre çözümü ise;

$$\hat{\beta} = (C' \cdot C)^{-1} \cdot C' \cdot a \quad (16)$$

Burada $\hat{\beta}$; modele uymayan residuallerin karelerinin toplamıyla birlikte b_0 ve b_1 parametrelerinin en küçük karelere göre tayin edilmiş değeridir. Bu parametreler tayin edildiğinde 13 eşitliği yardımıyla kolayca bilinmeyen numunenin konsantrasyonunu belirtir.

2.1.2.1.3. Ters Tek Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Ters tek değişkenli kalibrasyon yöntemi bir ters işlem olarak adlandırılır ve Beer kanununun tersini kabul eder. Buna göre istatistik modeli olarak aşağıdaki gibidir :

$$c_i = p_0 + p_1 \cdot a_i + e_i \quad (17)$$

Burada e_i ; referans değeri olan c_i 'deki hatayı kabul eder. Kalibrasyon basamaklarında model parametreleri (p_0 ve p_1) daha önceki bölümde açıklanan en küçük kareler yöntemi ile tayin edilir. Aşağıdaki eşitlikler, kalibrasyon doğrusundaki eğim ve kesim noktalarının tayini için kullanılır.

$$\hat{p}_1 = \frac{\sum_{i=1}^m c_i \cdot a_i - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^m a_i \right) / m}{\sum_{i=1}^m a_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m a_i \right)^2 / m} \quad (18)$$

$$\hat{p}_0 = \bar{c} + \hat{p}_1 \cdot \bar{a}$$

Burada $\bar{a}$ ve $\bar{c}$ ortalama, m sayıdaki kalibrasyon numunesi için cihaz cevabı ve analit konsantrasyonunun ortalama değerleridir. Buna göre kalibrasyon eşitliği aşağıdaki şekilde yazılabilir :

$$c = \hat{p}_0 + \hat{p}_1 \cdot a \quad (19)$$

Tahmin basamağında bilinmeyen numunenin konsantrasyonu aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir :

$$\hat{c}_u = \hat{p}_0 + \hat{p}_1 \cdot a_u \quad (20)$$

Burada $\hat{c}_u$ bilinmeyen analit konsantrasyonu, a_u ise bu numune için alınan cihaz cevabıdır.

Tek değişkenli kalibrasyon yöntemleri, seçici ölçümlerin bulunduğu veya analite hiçbir girişimin olmadığı hallerde büyük bir basitlik sağlar. Bununla birlikte

tek bir ölçüme dayalı analizlerin yetersizliği bunların kullanımını sınırlı hale getirir. Girişimin hiç olmadığı sistemlerle gerçek uygulamalarda çok nadiren karşılaşılır ve girişim yapan etkenlerin konsantrasyonu da genellikle bilinmez. En kötüsü ise numune içinde girişim yapan bileşiğin miktarı her zaman aynı değildir. Ayrıca küçük konsantrasyonlardaki veri ile hazırlanan kalibrasyonlar için seçilen dalga boylarında okunan cihaz cevapları içinde gürültü miktarı da büyük etkindir. Bir başka problem ise her ölçümde sabit bir baseline'nın olmamasıdır.

Klasik ve ters yöntemle elde edilen sonuçlar bir numune için birbirinden farklı olabilir. Ama bu fark çok anlamlı değildir. Bir tek değişkenli kalibrasyon yönteminin seçimi kalibrasyon standartlarının referans değerleri veya cihaz cevaplarının daha hassas olması durumuna göredir.

Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Modern spektroskopik cihazlar, içinde birden fazla bileşik içeren bir numune için bir dakika içinde yüzlerce spektrum alabilecek kadar hızlı hale getirilmişlerdir. Tek değişkenli kalibrasyon yöntemleri bu tip veriler için uygun değildir. Çok değişkenli analizler çok sayıdaki matematik işlemlerden meydana gelmiştir ve her numune için cihazdan bir veya daha fazla cevabın ölçüldüğü kimyasal analizlere uygulanabilir (BEEBE ve KOWALSKI, 1987; GNANADESIKAN, 1977; JOCHUM ve SCHROTT, 1984; KISNER ve Ark., 1983; MARDIA ve Ark., 1979; RENCHER, 1995) .

Spektroskopide çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, birden fazla bileşen içeren numunelerin çok sayıdaki dalga boyunda ölçülen cihaz cevaplarını içeren verilerle ilgilenir. Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri tek değişkenli kalibrasyon yöntemlerindeki problemleri yok edebilir. Çünkü verilen bir numune için analit konsantrasyonunun tahmininde verilerin pek çok parçası kullanılır. Örneğin; cihazdaki noise (gürültü) sinyallerinin ortalaması alınmak suretiyle azaltılabilir. Ayrıca çok değişkenli kalibrasyon yöntemiyle numunedeki girişim yapan maddelerin miktarı da tayin edilebilir.

Geçen son yıllarda kemometrideki gelişmeler kompleks kimyasal karışımların analizi için pek çok multivariate (çok değişkenli) kalibrasyon yönteminin gelişmesine yol göstermiştir. Günümüzde modern bilgisayarlar bu işlemi daha kolaylıkla yapabilir hale gelmiştir. Günümüzde spektrokimyasal analizde en çok kullanılan yöntemler klasik en küçük kareler, ters en küçük kareler, ki bunlar bazen çoklu lineer regresyon (MLR) olarak ifade edilir, kısmi en küçük kareler ve temel bileşen regresyonudur (BEEBE ve KOWALSKI, 1987; BOOKSH ve KOWALSKI, 1994; HAALAND ve THOMAS, 1988; LORBER ve Ark.,1987; MARTENS ve NAES, 1984; NAES ve MARTENS, 1984; SJOSTROM ve Ark., 1983; THOMAS, 1994) . Klasik en küçük kareler ve ters en küçük kareler yöntemleri univariate (tek değişkenli) kalibrasyonlarda kullanılan modellerin üzerine kurulmuştur ve genellikle **K** ve **P** matris yöntemleri olarak da adlandırılırlar. Bununla birlikte kısmi küçük kareler ve temel bileşen regresyonu yöntemleri cihaz cevap matrislerinin iki daha küçük matrise parçalandığı modelleme yöntemleridir.

2.1.2.2.1. Klasik En Küçük Kareler Yöntemi (KLEK)

Klasik en küçük kareler yöntemi spektroskopide klasik Beer kanununa uygulanır ki burada her bir dalga boyundaki absorbans değeri bileşenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Model hatalarının aynen klasik tek değişkenli yöntemde olduğu gibi ölçülen cihaz cevaplarından kaynaklandığı düşünülür. Matris notasyonunda; n dalga boyunda spektrumu bulunan l sayıda kimyasal bileşiği içeren m kalibrasyon numunesi için aşağıdaki biçimde ifade edilebilir.

$$A = CK + E_A \quad (21)$$

Burada A , kalibrasyon spektrumunun $m \times n$ matrisi; C , konsantrasyonların $m \times l$ matrisi; K , absorbtivitenin $l \times n$ matrisi ve E_A spektral hatalar veya modele uymayan residuallerin $m \times n$ matrisidir. Burada K matrisi birim konsantrasyon ve birim ışık yolunda saf bileşiğin 0. derece spektrumlarını ifade etmektedir. En küçük kareler yöntemi K matrisinin tayininde kullanılır. K 'nın en küçük karelere göre tayini aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$K = (C' C)^{-1} C' \cdot A \quad (22)$$

Bu şekilde K matrisi elde edildiğinde spektrumdan bilinmeyen numunenin konsantrasyonu aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir.

$$\hat{C} = (K K')^{-1} K a \quad (23)$$

Burada a, bilinmeyen numunenin spektrumu, $\hat{C}$ ise tahmin edilen bileşen konsantrasyonlarının vektörüdür.

Klasik en küçük kareler yöntemi'nin avantajları :

- a) Hesaplaması son derece hızlıdır.
- b) Az sayıdaki bileşenden meydana gelmiş karışımlar için uygun bir yöntemdir.
- c) Kalibrasyonda dalga boyu seçimi çok önemli değildir. Bileşenlerin sayısından daha fazla sayıda dalga boyunun seçilmesi yeterlidir. Tüm spektrumdaki dalga boylarının tamamı da seçilebilir.
- d) Mümkün olduğu kadar çok sayıda dalga boyunun yöntemde kullanılması spektrumdaki gürültü piklerinin minimuma indirilmesi için istenir.

Klasik en küçük kareler yöntemi'nin dezavantajları :

Kalibrasyon karışımları için mutlaka her bir bileşenin numunenin içerisinde yer alması ve konsantrasyonlarının bilinmesinin gerekli olmasıdır.

Birbirleriyle etkileşen bileşenleri içeren karışımlar için uygun değildir.

Cihazdan okunan cevapların miktarı belli bileşenlere ait olması nedeniyle baseline etkisi son derece önemlidir.

2.1.2.2.2. Ters En Küçük Kareler Yöntemi (TEK)

Klasik en küçük kareler yönteminin temel gereği, girişim yapan türlerin tümünün ve konsantrasyonlarının model içerisinde yer almasıdır. Bu ters en küçük kareler yöntemi ile, ki Beer kanununun tersini kullanır, elimine edilmiştir. Ters en küçük kareler yönteminde analitin konsantrasyonu absorbans ölçümlerinin

fonksiyonu olarak modellendirilmiştir. Modern spektroskopik cihazların çok stabil olması ve çok iyi sinyal/gürültü oranı sağlaması nedeniyle hataların büyük kısmının bunların spektrumlarındaki ölçümlerden değil, kalibrasyon numunelerinin hazırlanmasından kaynaklandığına inanılır. n dalga boyunda ölçümün yapıldığı m adet kalibrasyon numunesi için ters en küçük kareler modeli aşağıdaki şekilde ifade edilir :

$$C = AP + E_C \quad (24)$$

Burada C ve A klasik en küçük kareler yöntemindeki gibidir. P spektral şiddetlere göre l bileşen konsantrasyonlarının bilinmeyen kalibrasyon katsayılarının $n \times l$ matrisidir. E_C ise modele uymayan konsantrasyonlardaki hataların $m \times l$ matrisidir. Kalibrasyon basamağında ters en küçük kareler konsantrasyonlardaki residuallerin karelerinin toplamını minimize eder. Ters en küçük kareler yönteminin en büyük avantajı tek bir maddenin analizine indirgenebilmesidir. Çünkü ters en küçük kareler modeli analizde yer alan kimyasal bileşenlerin sayısına göre değişmez. Bu indirgenmiş model aşağıdaki gibi verilebilir:

$$C = AP + E_a \quad (25)$$

C analiz edilen analitin konsantrasyonlarının $m \times l$ vektörü, P kalibrasyon katsayılarının $n \times l$ vektörü ve e_c modele uymayan farkların (residual) $m \times l$ vektörüdür. Kalibrasyon basamağında P 'nin en küçük karelere göre tayini aşağıdaki şekilde olur :

$$P = (A' A)^{-1} A' . C \quad (26)$$

P tayin edilen kalibrasyon katsayılarıdır. P tayin edildiğinde analit konsantrasyonu aşağıdaki eşitlik yardımıyla tayin edilebilir:

$$\hat{C} = a' . P \quad (27)$$

Burada $\hat{C}$; tayin edilen konsantrasyonu, a bilinmeyen numunenin spektrumudur.

Girişim yapanların konsantrasyonunun bilinmediği durumda bir bileşenin miktar tayini için ters en küçük kareler yöntemi en tercih edilen yöntemdir.

Ters en küçük kareler yönteminin avantajları:

Hesaplaması oldukça hızlıdır.

Sadece bizim için önemli olan bileşenler hakkında bilgi sahibi olmamız çok kompleks karışımlarda çok değişkenli kalibrasyon yönteminin uygulanması için yeterlidir.

Ters en küçük kareler yönteminin dezavantajları:

Dalga boyu seçimi oldukça zor ve zaman alıcıdır.

Seçilecek dalga boyu sayısı kalibrasyon numunesi sayısı ile sınırlıdır.

İyi bir kalibrasyon yapabilmek için mümkün olduğu kadar çok sayıda standart çözelti kullanılması gereklidir.

Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması ve bu çözeltiler üzerinden kalibrasyon ölçümlerinin yapılması zor ve zaman alıcıdır.

Pek çok dalga boyu seçimi stratejisi örneğin, basamaklı dalga boyu seçimi veya uygun kombinasyonların seçimi ters en küçük kareler modelinde iyi verim alınmasını sağlar. Eğer dalga boyları iyi seçilmemişse üst üste oturan veriler iyi bir sonuç alınmasını engeller.

2.1.2.2.3. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi (TBR) ve Kısmi En Küçük Kareler

Yöntemi (KEK)

Temel bileşen regresyonu ve kısmi en küçük kareler modelleme tekniklerinde veriler orijinal verilerin lineer kombinasyonlarının yeni değişkenlerine parçalanır. Bu yeni değişkenler temel bileşenler veya faktörler olarak adlandırılırlar. Temel bileşen regresyonu basitçe temel bileşen analizinin (PCA) ardından regresyon uygulamasıdır. İçinde yeni değişkenlerin yaratılması iki boyutlu sistem ile gerçekleştirilebilir. Eğer cihaz cevabı iki dalga boyunda ($n=2$) m sayıdaki numune için birbirlerine karşı grafiğe geçirilirse, yeni bir aks meydana gelir ki bunun yönü verilerin maksimum

değişebilirliğini gösterir. Bu yeni aks, birinci temel bileşen veya birinci eigen (öz) vektör olarak adlandırılır. Eğer bütün numuneler bu yeni aksın üzerine düşüyorsa, bütün değişimler sadece bir eigen vektör kullanılarak ifade edilebilirler. Aksi takdirde; ikinci bir eigen vektör bulunabilir ki, bu birinci eigen vektöre diktir. İkinci eigen vektör veri seti içerisinde birinciye uymayan residuallerin maksimum miktarını ifade eder. Eğer iki dalga boyundan fazlası cihaz cevap matrisinin içerisinde yer alıyorsa; cismin yapıldığı uzay çok boyutlu olur ve çok sayıda eigen vektör bulunur. Her birisi kalan değişebilirliğin mümkün olan maksimumunu içerir veya her birisi diğerlerine ortogonal olur. Genel olarak numune sayısına eşit ya da ondan daha az sayıda temel bileşen veya faktör oluşturulabilir.

Temel bileşen regresyonu ve kısmi en küçük kareler teknikleri tüm spektrumu içeren yöntemler olduğu için klasik en küçük kareler yönteminin tüm spektrum avantajlarını da taşır. Bununla birlikte bütün bileşenlerin konsantrasyonlarının bilinmesi gerekmemektedir. Çünkü kısmi en küçük kareler yöntemi, temel bileşen regresyonu ve klasik en küçük kareler yöntemi dalga boyu seçme problemi olmaksızın bir bileşenin analizini yapabilir.

Kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen regresyonu spektrum matrisinin iki daha küçük matrise parçalanmasındaki teknik nedeniyle birbirlerinden ayrılırlar. Temel bileşen regresyonu yönteminde parçalanma analit konsantrasyonundan bağımsız olarak yapılır. Buna karşılık kısmi en küçük kareler yönteminde konsantrasyon bilgileri ekstraksiyon faktörleri için kullanılır.

Kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen regresyonu için model aşağıdaki gibi ifade edilir :

$$A = TB + E_A \quad (28)$$

Burada A önceki gibidir. B ise temel vektörlerin veya yüklenmiş (loaded) spektrumun $h \times n$ matrisi, T ise h yükleme vektörüyle tanımlanan yeni koordinat sisteminde absorpsiyon şiddeti ve skorların $m \times h$ matrisidir. E_A , faktör modeline uymayan spektral residuallerin $m \times n$ matrisidir. Klasik en küçük kareler yöntemi ile diğer faktör yöntemleri arasındaki fark yükleme vektörü B'nin içinde saf bileşenin

spektrumunun değil orijinal kalibrasyon spektrumlarının doğrusal kombinasyonlarının yer almasıdır. İlaveten yeni koordinat sistemindeki şiddetler klasik en küçük kareler yönteminde olduğu gibi doğrudan C ile sınırlandırılmamıştır. Fakat T 'deki skorlar bileşenlerin konsantrasyonlarıyla orantılıdır.

Bazı verilerin sayısı (h), kalibrasyon basamakları içerisinde bir algoritma kullanılarak tayin edilir. Yeni koordinat sistemindeki spektral şiddetler, ters en küçük kareler modelinde olduğu gibi analit konsantrasyonuna bağlanabilir:

$$C = TV + E_c \quad (29)$$

Burada C , bileşen konsantrasyonlarının $m \times I$ vektörü, V , bileşen konsantrasyonlarıyla spektral şiddetleri bir araya getiren katsayıların $h \times I$ vektörü ve E_c , analiz edilen bileşiğin referans değerindeki hataların $m \times I$ vektörüdür.

V 'ye göre en küçük kareler çözümü (27) eşitliğinin ters en küçük kareler yöntemindeki çözümüne benzer. Burada T matrisinin kolonları ortogonaldır. Diagonal ($T' T$) matrisi ihmal edilir ve v vektörü aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$\hat{v}_h = (T' T)^{-1} T' C \quad (30)$$

Burada $\hat{v}_h$, V 'nin en küçük kareler değeridir. T ve B matrisleri istenen model elde edilene kadar basamaklar halinde (her defasında bir vektör) hesaplanır. Daha öncede söylendiği gibi kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen regresyonu, T ve B matrislerinin yaratılması yönündeki farklılıklarla ayrılırlar. Temel bileşen regresyonu modelinde NIPALS (Non-linear Iterative Partial Least-squares) algoritması geliştirilir. Bu model WOLD (1966) tarafından kullanılmıştır.

Kısmi en küçük kareler yönteminin ve temel bileşen regresyonu gibi kalibrasyon yöntemlerine dayalı faktörlerin klasik en küçük kareler ve ters en küçük kareler gibi çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerindeki pek çok eksikliği gidermesine rağmen bu yöntemler matematik açıdan spektral matrisin çözümü ve baz vektörlerin elde edilmesi açısından çok karmaşıktır.

Temel bileşen regresyonu yönteminin avantajları :

Dalga boyu seçimi için özel kurallar gerekmez. Herhangi bir sayıdaki dalga boyu, genellikle spektrumun tamamı veya geniş bir bölgesi kullanılabilir.

Çok sayıda dalga boyu seçimi gürültü piklerinin etkisinin minimuma indirilmesi için yararlıdır.

Temel bileşen analizi (PCA) yöntemindeki veriler ile sadece bizi ilgilendiren bileşiğin kalibrasyonu için gerekli katsayıların hesaplanmasına imkan tanır.

Çok karmaşık karışımlar için uygulanabilir bir yöntemdir. Çünkü yalnızca ilgilenilen bileşen için gerekli bilgiler yeterlidir.

Bazen bu yöntem orijinal kalibrasyon karışımlarında var olmayan diğer bileşenlerin miktarlarının tayini için de kullanılabilir.

Temel bileşen regresyonu yönteminin dezavantajları:

Hesaplamalar klasik yöntemden çok yavaştır.

Hazırlanan modeller anlaşılır olmaları ve yorumlanabilmeleri bakımından oldukça karmaşıktır.

Temel bileşen analizinde elde edilen vektörler ilgilenilen bileşiğe tam karşı gelmeyebilir.

Genellikle doğru bir kalibrasyon elde edebilmek için çok sayıda standart numune gereklidir.

Kalibrasyon numunelerinin hazırlanması zordur ve bileşen konsantrasyonlarındaki ko-lineariteden kaçınmak gerekir.

2.1.2.3. İstatistiksel değerlendirme

Her ayrılan numunenin konsantrasyonu onun orijinal değeriyle karşılaştırılır ve tahmin hatası her ilave edilen faktör için THKT (Tahmin hatalarının karelerinin toplamı) tayin edilir. THKT, ölçümün kalibrasyon verilerine ne kadar uyduğunu ifade eder.

$$THKT = \sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2 \quad (31)$$

Burada c_i , i . numunenin referans (bilinen) konsantrasyonu; $\hat{c}_i$ ise i . numunenin m kalibrasyon standardı için tahmin edilen konsantrasyondur.

Mutlaka THKT değerin minimum olması gerekmez. Bununla birlikte bu değer kısmi en küçük kareler yöntemi faktörlerinin optimal seçimi için kullanılır. Çünkü minimum olursa sonuçların üst üste uyması, tahminde daha zayıf sonuçların elde edilmesine neden olur.

Kalibrasyondaki standart hata (KSH) uygunluk fonksiyonu olarak kullanılır ve en küçük kareler modelinde bilinen konsantrasyonlara göre hesaplanır. KSH, SE'nin bir türevidir.

$$SE = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2}}{Df} \quad (32)$$

$$KSH = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2}}{m - 2} \quad (33)$$

Burada c_i ve $\hat{c}_i$ sırasıyla bilinen ve bulunan analit konsantrasyonunu ifade eder. m ise numune sayısıdır. Eğer lineer bir model kabul ediliyorsa, burada iki parametre (eğim ve kesim) söz konusudur, bu durumda serbestlik derecesi (Df) m-2'ye eşit olur.

Yöntemlerin başarısı validasyon setlerindeki tahmin modellerine bağlıdır ve bu tahminin standart hatası (TSH) olarak verilir.

$$TSH = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2}}{m} \quad (34)$$

Burada m kalibrasyon numunelerinin sayısını ifade eder.

Kemometri teorik bölümü başlıca ÖZDEMİR, 1999 (DOKTORA TEZİ) olmak üzere HAALAND ve THOMAS, 1988; www.galactica.com/regression ve www.mathworld/wolfram.com/leastsquarefitting.html adresindeki bilgilerden yararlanılarak hazırlanmıştır.

2.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, karışım halinde bulunan bir örnekteki bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya süperkritik akışkanı olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz, numune bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağıtılacağı şekilde seçilir. Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden kalitatif veya kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar.

Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. İlk sınıflandırma, sabit fazın birbirleri ile temas ettirilmesi için uygulanan fiziksel şekle göre yapılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz dar bir kolon içinde tutulurken hareketli faz basınç altında veya yerçekimi etkisi ile sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide ise sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözeneklerine tutturulur. Burada hareketli faz, sabit faz boyunca kapiler etkisi veya yerçekimi etkisi ile hareket eder. Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması kullanılan durgun ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır. Bu sınıflandırma aşağıdaki gibidir.

1. Sıvı Kromatografi

Sıvı – sıvı veya dağılma

Sıvı – katı veya adsorbsiyon

İyon değişimi

Boyut eleme

2. Gaz Kromatografi

Gaz – sıvı

Gaz – katı

Sıvı kromatografi:

Daha önce de anlatıldığı gibi hareketli fazı sıvı olan kromatografi çeşitleri dağılma kromatografisi, adsorbsiyon kromatografisi veya sıvı – katı kromatografi, iyon değişimi kromatografisi ve boyut eleme veya jel kromatografisidir.

Tswett'in orijinal çalışmaları da dahil ilk sıvı kromatografi, çapı 1- 5 cm ve uzunluğu 50 – 500 cm olan cam kolonlarında uygulanmıştır. Uygun akış hızları temin etmek için, katı sabit fazı oluşturan partiküllerin çapı, genellikle 150 – 200 μm aralığındaydı. Bu durumda bile, akış hızları düşüktü. Ayırma zamanları çok uzundu ve çoğu zaman birkaç saat alıyordu. Bu klasik kromatografi işlemlerini hızlandırmak için vakum veya basınç uygulama girişimleri de ayırma veriminin düşmesinden dolayı yararlı olmadı. Sıvı kromatografinin geliştiği ilk yıllarda, bilim adamları, kolon veriminin dolguda kullanılan tanecik boyutunun azaltılması ile önemli ölçüde artacağını göstermişlerdir. Bu teknoloji, klasik yer çekimi – akışlı sıvı kromatografinin basit cam kolonlardaki durumun aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermekteydi. Böylece YPSK ismi, preparatif amaçla kullanılan temel yöntemlerden, daha yeni işlemleri ayırt etmek için kullanılmaya başlandı.

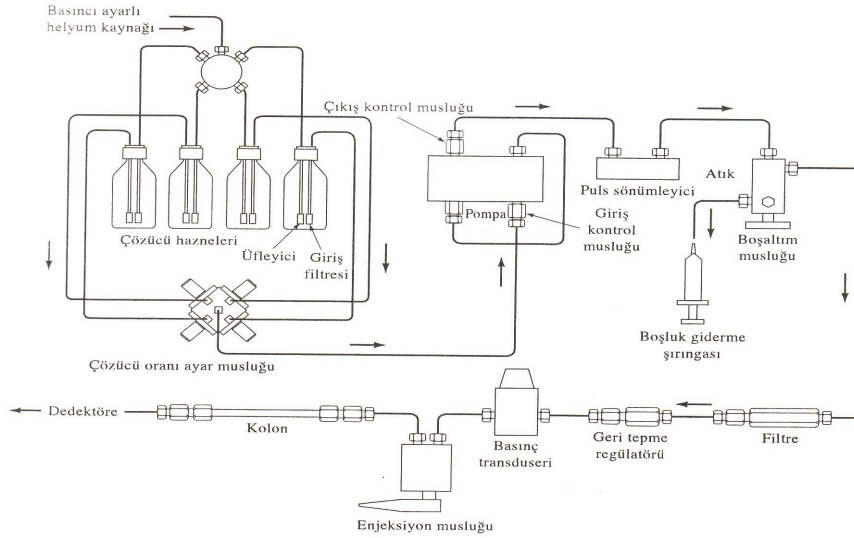
YPSK bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, kantitatif tayinlere uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği ilaçlar ve gıda bileşenleri gibi maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir.

Kolon teknolojisindeki gelişmeler, yüksek basınçlı pompa sistemleri ve hassas dedektörler sıvı kolon kromatografi yöntemini yüksek hızlı ve yüksek performanslı ayırma kapasitesine ulaştırmıştır. Kolon teknolojisinde 2-5 mm çapında kolonlar ve 3-5 μm çapında küçük tanecikler kullanılır. Böylece hareketli ve sabit faz arasında çok hızlı denge kurulur. Bu küçük tanecikli kolonlar içinden hareketli fazı ml/dk akış

hızında akıtabilmek için 300 atm basıncı sağlayabilen pompa sistemleri gerekir. Ayrıca μg seviyesinde analiz edilecek madde kullanıldığı için hassas dedektörlere gerek vardır. Bu teknoloji ile yüksek hızda ayırım sağlanabilir. Uçucu olmayan veya sıcakta bozulan maddelerin parçalanmadan veya bunların uçucu türevlerinin hazırlanmasına gerek kalmadan bu yöntemle analizi mümkündür. Bu da yöntemin gaz kromatografisine üstünlüğüdür. Ayrıca özel şartlarda preparatif olarak da çalışılabilir.

Sabit faz, sıvı veya polimerlerin katı tanecikler üzerine ince bir film tabakası olarak kaplanması veya kimyasal olarak bağlanması ile meydana gelir. Böylece sabit ve hareketli faz arasında kütle transferi direncini azaltarak hızlı bir dengenin meydana gelmesi sağlanır.

Sıvı kromatografisi cihazları



Şekil 2.7. Bir YPSK cihazının şeması (SKOOG, WEST, HOLLER, 1998)

Hareketli faz (hareketli faz) hazneleri ve çözücü muamele sistemleri

Modern bir YPSK cihazı, bir veya daha fazla her biri 200 – 1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğunlukla kolonda veya dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan

çözünmüş gazların giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Gradient elüsyonda ise polariteleri önemli derecede birbirinden farklı iki veya üç çözücü sistemi kullanılır. Modern YPSK ekipmanları çoğu zaman çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır.

Pompalama sistemleri

Bir YPSK pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır.

- 1) 400 atm'ye kadar basınç üretimi
- 2) Puls içermeyen basınç çıkışı
- 3) 0.1 – 10 mL/dakika aralığında akış hızları
- 4) % 0.5 veya daha iyi bir tekrarlanabilirlikle akış kontrolü
- 5) Korozyona dayanıklı parçalar

Üç tip pompa vardır:

- **Pistonlu pompalar:** Genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir.
- **Sürgülü pompalar:** Bir kademeli motordan güç olan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettir.
- **Pnömatik Pompalar:** Sıvı hareketli, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, portatif bir kap içine konur.

Birçok YPSK cihazı çözücünün bileşimini ya sürekli ya da basamaklı olarak değiştiren bir sisteme de sahiptir. Bu sistem de bilgisayarla kontrol edilen, pompa çıkışına yerleştirilmiş bir geri tepme tıkaçı boyunca basınç düşmesini belirleyerek akış hızını ölçen bir sistemle donatılmıştır.

Numune enjeksiyon sistemleri

Daha önceki şırınga ile basit bir enjeksiyon sistemini takiben oluşturulan akış durdurma enjeksiyonunda tekrarlanabilirliğin kötü olmasından dolayı, günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntem numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Bu sarımlar değiştirilebilir nitelikte olup 5 μL 'den 500 μL 'ye kadar değişen hacimlerde numune hacmi seçimine olanak tanımaktadır ve iyi bir tekrarlanabilirlik vermektedir.

Sıvı kromatografi kolonları

Sıvı kromatografi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır, ancak ara sıra kalın cidarlı cam borular da kullanılır. Sıvı kromatografi kolonlarının büyük bir çoğunluğu 10 – 30 cm arasındadır. Kolonların iç çapı çoğu zaman 4 – 10 mm ve yaygın olarak kullanılan birçok kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 5 – 10 μm arasındadır. Son yıllarda üreticiler iç çapı 1 – 4.6 mm ve 3 – 5 μm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu materyali ile doldurulmuş kolonlar üretmektedirler. Bu kolonların yüksek tabaka sayısı, hız ve minimum çözücü sarfıyatı gibi avantajları vardır.

Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Emniyet kolonu olarak da adlandırılan bu kolonların görevi sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. İlave olarak hareketli fazı sabit faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesini sağlar.

Gerekli durumlarda kolon sıcaklığının uygun olarak ayarlandığı zamanlarda daha iyi kromatogramlar elde edilmektedir. Birçok modern cihaz bu nedenden dolayı kolon sıcaklığını ayarlayabilecek kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır.

Sıvı kromatografide temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar film dolgular ve gözenekli dolgulardır. Film dolgular küresel, gözeneksiz, çapları 30 – 40 μm olan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Bazı uygulamalar için, bu yüzeye, absorpsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, durgun faz olarak ilave bir katman olarak kaplanır. Alternatif olarak, organik bir yüzey katman oluşturmak üzere kimyasal işleme tabi tutulur. Günümüzde, taneler, zarlı dolgular daha çok koruyucu

kolonlarda kullanılmakta, analitik kolonlarda kullanılmamaktadır. Gözenekli partiküller ise çapları 3 – 10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Partiküller silis, alumina, polistiren divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın kullanılan bir dolgu maddesidir ve elde edilen partiküller çoğu zaman, yüzeye kimyasal olarak veya fiziksel bağlanan, ince bir organik film ile kaplanır.

Dedektörler

Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Yığın özelliği dedektörleri hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti ve yoğunluğu gibi analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Bunun tersine analit özelliği dedektörleri, analitin UV absorbansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

- **Absorbans Dedektörleri:** Kromatografik kolondan çıkan elüentlerin absorbans ölçümü için içinden aktığı, Z şeklindeki tipik bir akış hücresinden ibarettir. Filtreli absorbans dedektörlerinin en basiti bir civa lambası kullanılan filtreli fotometrelerdir. Girişim filtresi bulunan döteryum veya tungsten telli ışın kaynakları da, bir kolondan elüe edilen absorblayıcı türlerin teşhisi için basit araçlardır. Monokromatörlü ultraviyole absorbans dedektörleri optik ağı spektrofotometreden oluşmaktadır. En güçlü ultraviyole spektrofotometrik dedektörler spektrumun tamamı için gerekli olan verileri yaklaşık bir saniyede toplayabilecek diyod serili cihazlardır. İnfrared absorpsiyon dedektörlerinden ilki, dalga boyu taraması üç tane yarı dairesel filtre kanalları ile yapılan cihazlardır. Diğerleri ise fourier dönüşümlü cihaza benzer olan infrared dedektörlerdir.

- **Floresans dedektörler:** Bunların çoğunda floresans, uyarıcı ışına 90 derecede yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir. En basit dedektörlerde uyarıcı ışık kaynağı olarak civa lambası ve yayılan ışınların belli bir bandını izole etmek için bir veya birkaç filtre kullanılır. Daha gelişmiş cihazlar, kaynak olarak ksenon lambası ve floresans ışımasını izole etmek için ise optik ağı monokromatör kullanır.

- **Kırılma indisi dedektörü:** Bu dedektörde çözücü kolonun yolu üzerinde bulunan hücrenin bir yarım bölmesinden geçer; elüat ise daha sonra diğer bölmenin içinden geçer. Bu iki bölme, iki çözeltinin kırma indisi birbirinden farklı ise, gelen ışın kırılacak şekilde uygun bir açıda yerleştirilmiş bir cam plaka ile ikiye ayrılmıştır.

Fotoduyarlı dedektörün yüzeyine gelen ışın demetinin yolundan sapması, çıkış sinyalinin değişmesine sebep olur, bu değişiklik yükseltilerek kaydedildiğinde kromatogram elde edilir.

- **Buharlaştırılmalı ışık saçma dedektörleri:** Kolondan çıkan çözelti, bir sisleştirici içinden geçirilmekte ve burada azot veya hava akımı ile çok ince sis haline dönüştürülmektedir. Küçük damlalar daha sonra, hareketli fazın buharlaştığı ve tayin edilecek maddenin çok küçük partiküllerinin olduğu sıcaklık kontrollü sürüklenme borusuna gönderilir. Tayin edilecek maddenin oluşturduğu partikül bulutu, daha sonra bir lazer ışın demetinin içinden geçirilir. Akış yönüne dik açıda saçılan ışınlar bir silisyum fotodiyod dedektör yardımıyla ölçülür.

- **Elektrokimyasal dedektörler:** Günümüzde çeşitli tipteki elektrokimyasal dedektörler amperometri, kulometri ve kondüktometri esasına göre çalışmaktadır. Bu dedektörler duyarlılık, basitlik, kullanışlılık ve yaygın kullanım alanı gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır.

- **Kütle spektrometrik dedektörler:** Kütle spektrometre dedektörleri son zamanlarda peptitler ve nükleotitler gibi uçucu olmayan ve termal olarak kararlı geniş bir madde grubu için spektrumlar veren dedektörlerdir. Bu dedektörler kullanıldığında gözlenebilme sınırının 1 – 10 pg'a kadar düştüğü rapor edilmiştir. Son zamanlarda hem elektron impakt hem de kimyasal iyonlaştırıcıları kullanarak kütle spektrumu elde etmeyi mümkün kılan yeni tip bağlantılar piyasaya çıkmıştır.

Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi dört ayrı tip sıvı kromatografi içinde en yaygın kullanılanıdır. Düşük ve orta mol kütleli iyonik olmayan polar moleküllerin bu yöntemle analizi yanında son yıllarda türevlendirme ve iyon çifti oluşturma gibi teknikler kullanılarak iyonların ayrılması için de yöntemler geliştirilmiştir. Dağılma kromatografisi sıvı – sıvı ve bağlı – faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Sıvı – sıvı kromatografide sıvı bir sabit faz dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutturulmuştur. Dezavantajlarından dolayı daha sonra bağlı faz dağılma kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Bağlı faz dolgu maddelerinin büyük bir kısmı için kullanılan destek katıları rijit silis veya silis esaslı bileşimlerden hazırlanmaktadır. En kullanışlı bağlı – faz kaplaması hidrolizlenmiş yüzeyin organoklorosilan ile reaksiyonundan meydana gelen siloksanlardır.

Dağılma kromatografisi, hareketli ve sabit fazların bağıl polarlığına bağlı olarak iki kısma ayrılır. Sıvı kromatografi ile yapılan ilk çalışmalarda, silika veya

alümina partiküller üzerine tutturulmuş su veya trietilenglikol gibi oldukça polar sabit faz ve heksan veya i-propil eter gibi nispeten az polar çözücüler kullanılmaktaydı. Bu tip kromatografi normal faz kromatografi olarak adlandırılmaktadır. Ters faz kromatografide sabit faz apolardır ve çoğu zaman bir hidrokarbondur. Hareketli faz ise su, metanol veya asetonitril gibi polar çözücülerden meydana gelmektedir. Ters faz kromatografide kaplamalardaki siloksandaki R grubu bir C₈ veya C₁₈ zinciridir. Piyasada bulunan normal – faz bağlı dolgu maddelerinde siloksan yapısındaki R, siyano, diol, amino ve dimetilamino gibi polar fonksiyonlu bir gruptur. Normal faz kromatografide en düşük polaritedeki bileşenler hareketli fazda nispeten çok çözündükleri için en önde elüe edilirler ve hareketli fazın polaritesindeki artış elüsyon zamanının azalması ile sonuçlanır. Bunun aksine ters – faz yönteminde en çok polar bileşenler en önde yürür ve hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon zamanını artırır.

Adsorbsiyon Kromatografisi

Adsorbsiyon veya sıvı – katı kromatografi yirminci yüzyılın başlarında Tswett tarafından ilk olarak ortaya atılan klasik bir sıvı kromatografi tipidir. Bu yöntemde kullanılan sabit fazlar sadece silis ve alüminadır. İlk sabit faz, yüksek numune kapasiteli ve kullanışlı değişik tipleri olduğu için uygulamaların çoğunda tercih edilmektedir. Bu kromatografi çeşidi mol kütlesi yaklaşık 5000'den küçük olan polar olmayan bileşikler için en uygundur. Genellikle polar olmayan çözücülerde çözülebilen ve ters – faz dağılma kromatografide kullanılan sulu çözücülerde sınırlı çözünürlüğü olan numuneler için en uygun yöntemdir. Adsorbsiyon kromatografinin diğer yöntemlerde görülmeyen özel bir gücü, izomerik karışımların bileşenlerini ayırma kabiliyetidir.

İyon – Değiştirme Kromatografi

Çoğu zaman iyon kromatografi olarak da adlandırılan bu kromatografi türü iyon değiştirici reçinelerin kullanımına dayanan iyonların ayrılması ve tayini için modern ve etkili bir yöntemdir. Daha önceden bu teknikte kullanılan stiren ve divinilbenzenin kopolimerizasyonu ile oluşan gözenekli polimerik taneciklerin, analit moleküllerin mikrogözeneklerden geçmesi, polimer matriksindeki difüzyonun yavaş olması ve matriksin sıkıştırılabilmesinden dolayı yeni tip dolgu maddeleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri yüzeyi bağıl olarak büyük, gözenekli olmayan küresel sentetik iyon değiştirici reçine ile kaplanmış cam veya polimer tanelerden meydana gelen zar kaplamalı yatak dolgusudur. İkinci bir tipteki dolgu maddesi, adsorbsiyon

kromatografide kullanılan silisten ibaret gözenekli mikropartiküllerin, iyon değiştiricinin ince bir filmi ile kaplanmasıyla hazırlanır. İyon değiştirme kromatografinin inorganik uygulamaları elüent baskılayıcı kolonlu iyon – değiştirme kromatografisi ve tek kolonlu iyon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilir. Bu kromatografisi çeşidi ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi çok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanmaktadır.

İyon eleme kromatografisi, iyonlardan çok nötral türlerin ayrılmasından dolayı tam bir iyon kromatografisi türü olmamasına rağmen, iyon – değiştirici kolonlar kullanılmaktadır. Bu kromatografisi çeşidi iyon – eleme kromatografisi süt, kahve, şarap ve diğer ticari ürünler gibi çok sayıdaki maddenin teşhisi ve tayini için kullanılabilir.

Boyut Eleme Kromatografisi

Jel geçirgenlik veya jel süzme kromatografisi adı da verilen bu kromatografisi türü özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen güçlü bir tekniktir. Dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde moleküller etkin bir şekilde yakalanır ve hareketli faz akımı ile uzaklaştırılır. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülünün etkin büyüklüğüne bağlıdır.

Jel süzme kromatografisinde sulu çözücüler ve hidrofilik dolgu maddeleri kullanılırken, jel süzme kromatografisinde polar olmayan organik çözücüler ve hidrofobik dolgu maddeleri kullanılır. Eleme sınırı birkaç bin olan bir jel, proteinleri, amino asitlerden ve düşük mol kütleli peptitlerden kolayca ayrılabilir. Diğer uygulamaları ise, homologların ve oligomerlerin ayrılması, büyük polimer veya doğal ürünlerin mol kütlelerinin veya mol kütlesi dağılımının hızlı bir şekilde tayin edilmesidir.

2.1.3.1. Sistem Uygunluk Testleri

Kromatografik yöntemlerin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirten Sistem Uygunluk Testleri (SUT) için gerekli işlem ve hesaplamalar yöntem geliştirilmesi ve validasyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra veya işlemler sırasında yapılır.

Avrupa Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri

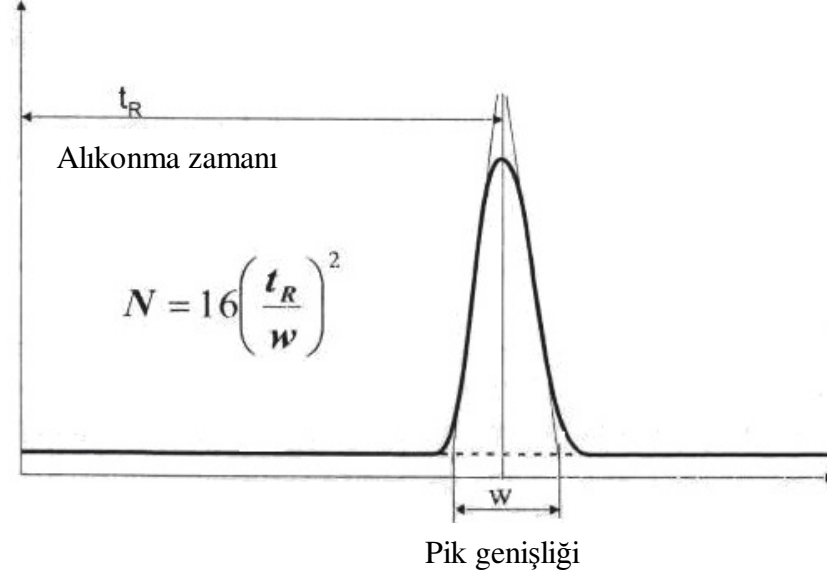
- Teorik Tabaka (Plaka) sayısı (N)

- Kuyruklanma Faktörü (T)
- Kapasite Faktörü (k)
- Seçicilik faktörü (α)
- Ayırım Gücü (Resolution) (R_s)
- Pik yüksekliği veya alanının % Bağlı standart sapması
- Cihaz tekrarlanabilirliği

Bu kriterlerden en az 2 tanesinin gerekli şartları sağlaması yöntemin sistem uygunluğunu göstermektedir.

Teorik Tabaka Sayısı (N)

Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N'in sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi ve dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ 'dir.



Şekil 2.8. Teorik tabaka sayısı hesabını gösterir kromatogram (KAZAKEVICH ve LoBRUTTO, 2007)

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$$

t_R : Maddenin alıkonma zamanı

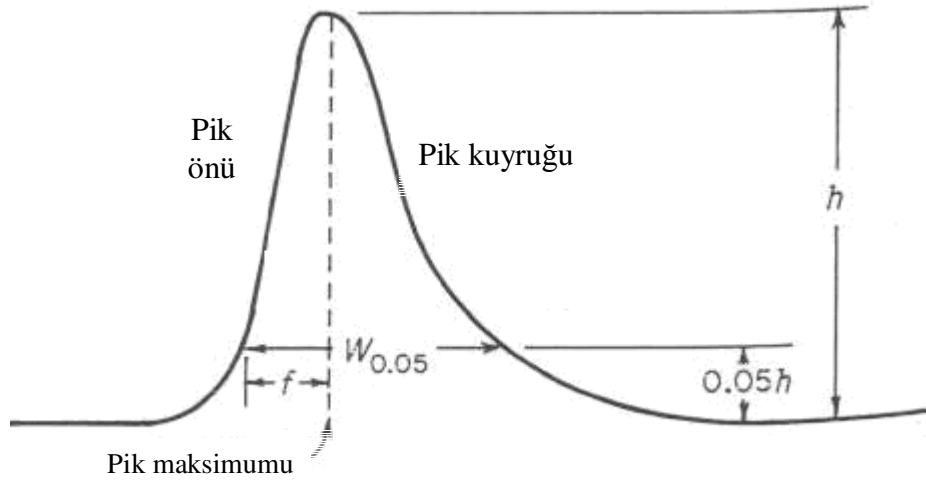
W : Elde edilen pikin taban genişliği

Kuyruklanma faktörü (T) ve Asimetri faktörü (A_s)

Bu faktör pikin simetrik olması ile ilgilidir. Çalışmalarda daima simetrik pikler seçilmelidir. Simetrik olmayan piklerde;

1. Doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları
2. Kararlı olmayan miktar tayinleri
3. Gözlemlenemeyen pik kuyruklanmaları
4. Alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılır.

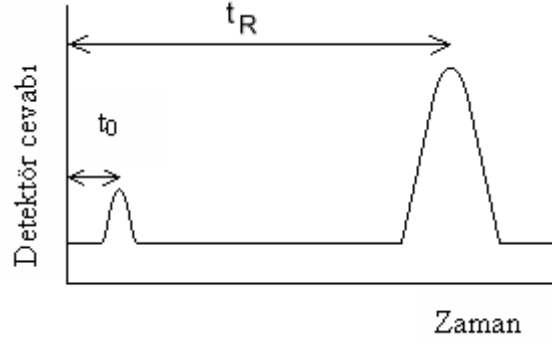
Pik asimetrisi taban yüksekliğinin % 10'u civarında, kuyruklanma faktörü ise % 5'i civarında ölçülür. Uygun değerler pik asimetrisi için 0.95 – 1.2 arasında, kuyruklanma faktörü için ise 2'nin altında olmasıdır.



Şekil 2.9. Pik asimetri faktörü ve kuyruklanma faktörü hesabını gösterir kromatogram (USP 23, NF 18, 1995)

Kapasite Faktörü (k')

Analizi yapılan maddelerin alıkonma zamanları veya alıkonma hacimleri yardımı ile hesaplanır. Kolonun performansı ve alıkonmanın uzun süreli tekrarlanabilirliği ile ilgilidir.



Şekil 2.10. Kapasite faktörü hesabını gösterir kromatogram (SKOOG, WEST, HOLLER, 1998)

t_r/V_r : Maddenin alıkonma zamanı / hacmi

t_0/V_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı / hacmi

Elde edilen bu değerin genel çalışmalarda 2 – 8 arasında, eser madde miktar tayininde 1 – 3 arasında, stabilite belirleyici çalışmalarda ise 4’ten büyük olması istenir.

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

Seçicilik Faktörü (α)

Bağıl alıkonmayı ifade eder.

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

t_1 : 1. maddenin alıkonma zamanı

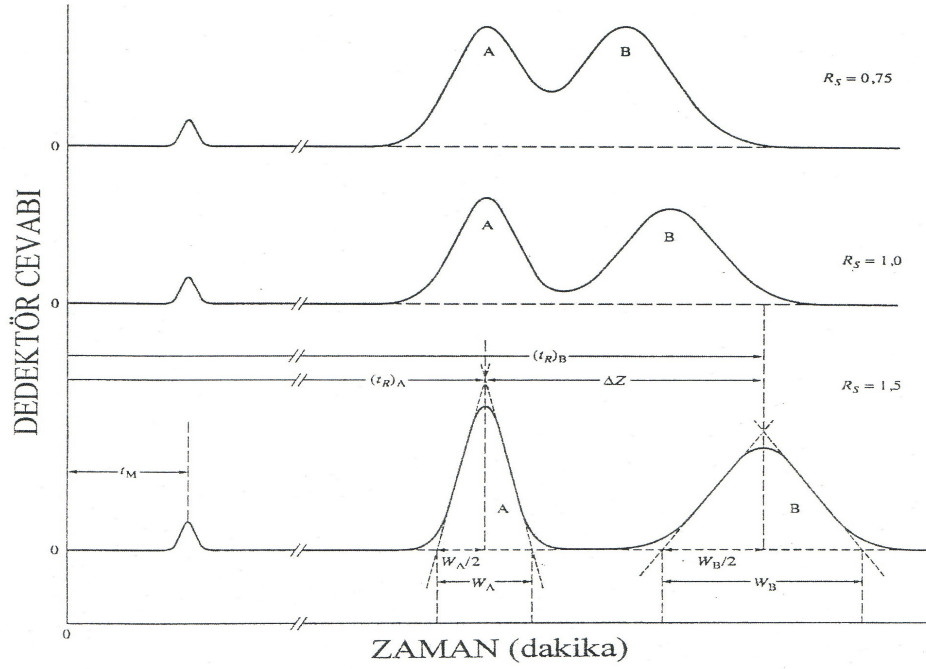
t_2 : 2. maddenin alıkonma zamanı

t_0 : Hareketli fazın alıkonma zamanı

2 pikin elde edildiği sistemlerde kullanılır. Genel olarak bu değerin 1’den büyük olması istenir.

Ayrım Gücü (Resolution (R_s))

Ayrım kantitatif kromatografi çalışmalarının başlıca gerekliliğidir. Genellikle 5 veya daha az madde içeren numunelerde bu değerin 1.5’den büyük olması kolaylıkla sağlanabilir. Bu sonuç, maksimum kesinliğin göstergesidir. Ayrım gücü, bir kolonun eskiliğini, günler arası ayırım şartlarındaki değişiklikleri gösterir.



Şekil 2.11. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi (SKOOG, WEST, HOLLER, 1998)

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

t_1 : 1. maddenin alıkonma zamanı

t_2 : 2. maddenin alıkonma zamanı

W_1 : 1. maddenin taban genişliği

W_2 : 2. maddenin taban genişliği

Genel ayırmalarda R_s 'nin 2'nin, miktar tayini çalışmalarında 1.5'un, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda 1.2'nin üstünde olması kabul edilebilir değerlerdir.

Cihaz, Pik Alanı veya Yüksekliğinin Tekrar Edilebilirliği

En az 6 defa tekrarlanan deneyler sonucu elde edilen pik alanı veya yüksekliklerinin bağıl standart sapmalarının hesaplanması ile elde edilir. Genel ayırmalarda % bağıl standart sapma değerinin 1.5'un, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda 5.0'ın altında olması ve eser madde miktar tayininde 5 – 15 arasında olması istenen değerlerdir. Cihaz tekrarlanabilirliği için alıkonma zamanlarının % bağıl standart sapmasının %5'den, daha çok sayıda tekrar edilen enjeksiyonlar için %1'den küçük olması istenir.

2.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ORİJİNLERİ

1. İzokonazol nitrat.....Bilim
2. Diflukortolon valerat.....Bilim
3. Metanol.....Merck

Bu etken maddeler ayrıca bir saflaştırma işlemi uygulamaksızın doğrudan deneylerde kullanılmıştır

2.3. KULLANILAN CİHAZLAR

1. UV-Visible spektrofotometre : SHIMADZU UV – 1601
2. Manyetik Karıştırıcı : IKAMAK RH Jonke & Kunkel IKA Labortechnik
3. IR spektrofotometre : JASCO FT/IR – 420
4. Erime noktası tayin cihazı : BUCHI SMP – 20
5. Terazî : SHIMADZU LIBROR AEG – 220

2.4. KULLANILAN BİLGİSAYAR PROGRAMLARI

1. Multivariate Analysis Add-in for MS Excel v1.3 software (Brereton, 2002)
2. UV-PC 1601
3. Microsoft Excel 2003
4. Microsoft Word 2003

2.5. KULLANILAN BİLGİSAYAR KONFIGÜRASYONU

512 MB 400 MHz DDR RAM Masaüstü Bilgisayar

2.6. ÜZERİNDE ÇALIŞMA YAPILAN FARMASÖTİK PREPARATLAR**2.6.1. TRAVAZOL® Krem (Bilim) (BATCH NO:6050058A)**

Diflukortolon valerat.....1 mg

İzokonazol nitrat10 mg / 1 gr krem

2.6.2. TRAVACORT® Krem (İntendis) (BATCH NO:73316A)

Diflukortolon valerat.....1 mg

İzokonazol nitrat10 mg / 1 gr krem

2.7. STANDART MADDELERİN STOK ÇÖZELTİLERİ

2.7.1. Türev spektrofotometride

Diflukortolon valerat: Metanol - su (3:1, h/h) içerisinde 100 mg/100 mL çözeltisi

İzokonazol nitrat: Metanol - su (3:1, h/h) içerisinde 250 mg /100 mL çözeltisi

2.7.2. Kemometrik yöntemlerde

Diflukortolon valerat: Metanol - su (3:1, h/h) içerisinde 100 mg/100 mL çözeltisi

İzokonazol nitrat: Metanol - su (3:1, h/h) içerisinde 250 mg/100 mL çözeltisi

2.7.3. YPSK da

Diflukortolon valerat: Metanol içerisinde 50 mg/100 mL çözeltisi

İzokonazol nitrat: Metanol içerisinde 200 mg/100 mL çözeltisi

Klorzoksazon (İç standart): Metanol içerisinde 50 mg/100 mL çözeltisi

3. BULGULAR

3.1. KULLANDIĞIMIZ ETKEN MADDELERİN SAFLIK KONTROLLERİ

Deneylerde kullanılan standart maddelerin saflık kontrolleri için erime noktaları, UV spektrumları ve IR spektrumları alınmış ve referanslarla karşılaştırılmıştır.

3.1.1. DİF için saflık kontrolü

Erime noktası : 195 °C. Bu değer referans değerle uyumludur (THE MERCK INDEX 30TH EDITION).

UV spektrumu : DİF'in metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltisinin 200 – 300 nm arasındaki spektrumu Şekil 3.1'de görülmektedir. Bu spektrumda 239 nm'de maksimum görülmektedir.

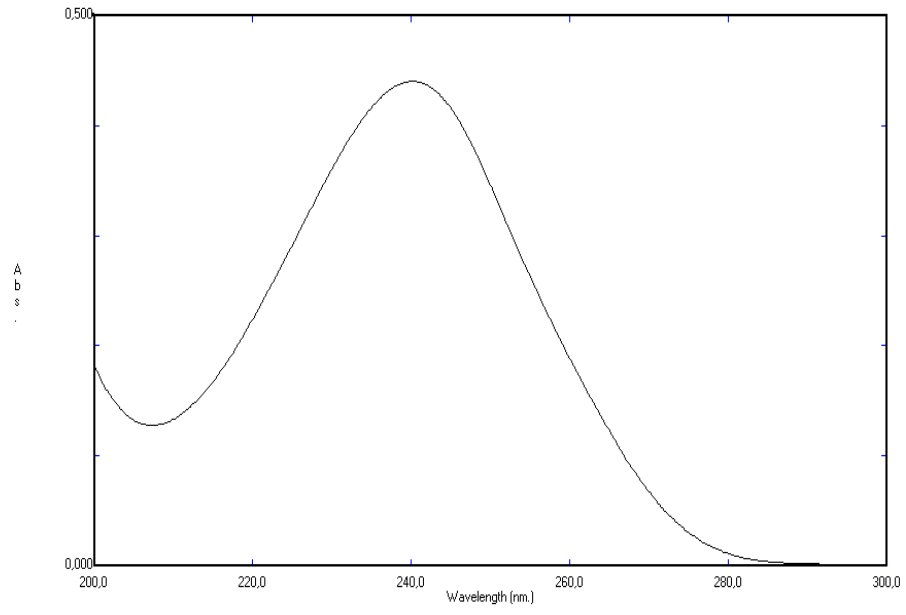
IR spektrumu : KBr diski halinde basılmış DİF'in 400 – 4000 cm^{-1} arasındaki IR spektrumunda 1748, 1666, 1624, 1608, 1213, 989, 916, ve 721 cm^{-1} 'de temel pikler görülmüş (Şekil 3.3) ve bu da referansla uyum göstermiştir (BRITISH PHARMACOPOEIA 1999 VOLUME I).

3.1.2. İZO için saflık kontrolü

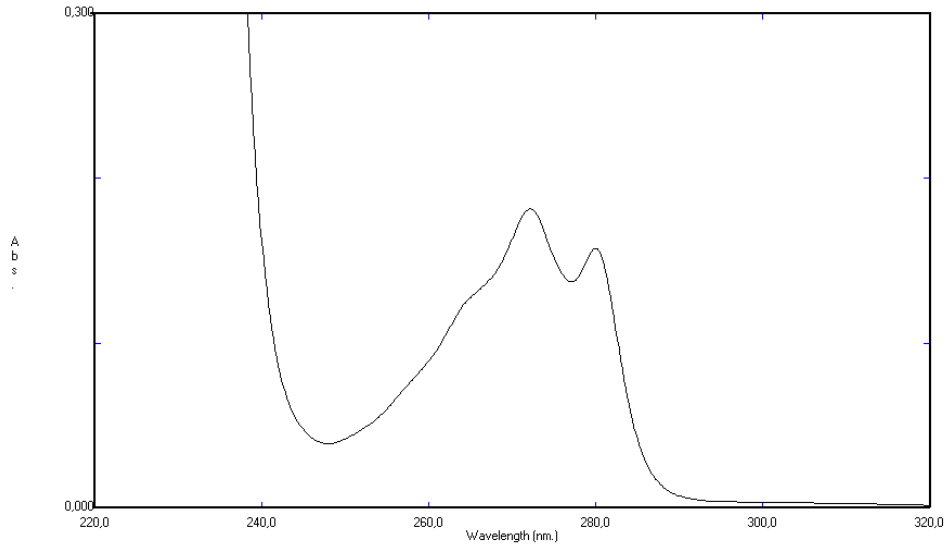
Erime noktası : 182°C olarak bulunmuştur ve bu değer referans değerle uyumludur (THE MERCK INDEX 12TH EDITION).

UV spektrumu : İZO'nun metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltisinin 200 -350 nm arasındaki spektrumu Şekil 3.2'de görülmektedir. Bu spektrumda 205, 250 ve 318 nm'lerde üç adet maksimum ve 231 nm'de bir adet minimum gözlenmektedir.

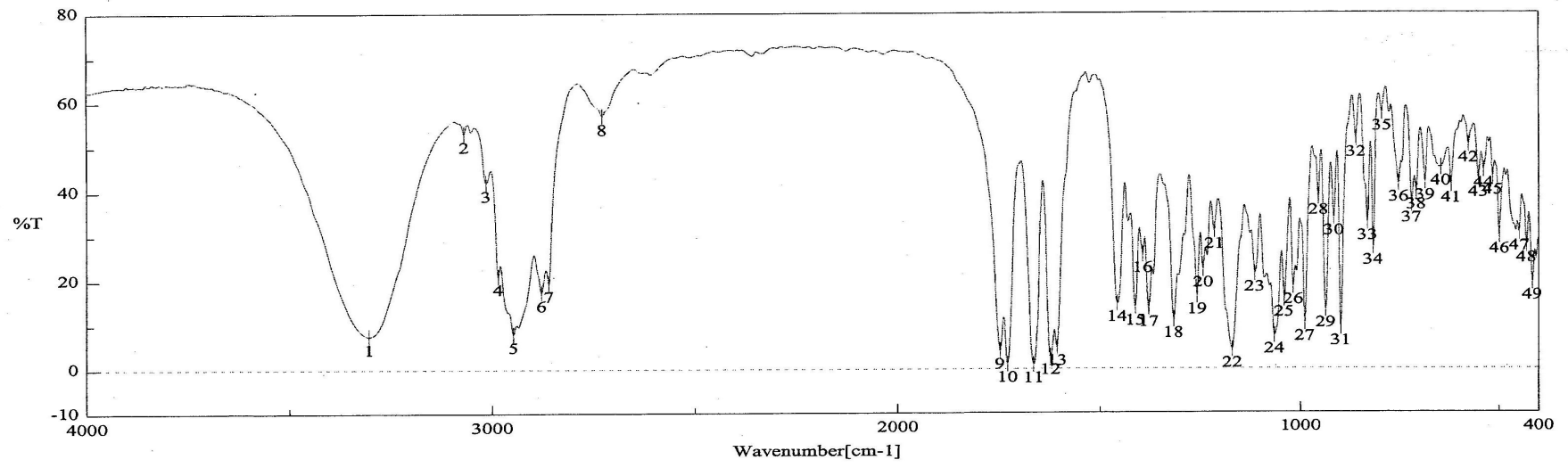
IR spektrumu : KBr diski halinde basılmış İZO'nun 400 – 4000 cm^{-1} arasındaki IR spektrumunda temel pikler görülmüştür (Şekil 3.4)



Şekil 3.1. Metanol - su (3:1) içerisinde 12 µg/mL **DİF** çözeltisinin 0. derece UV absorpsiyon spektrumu

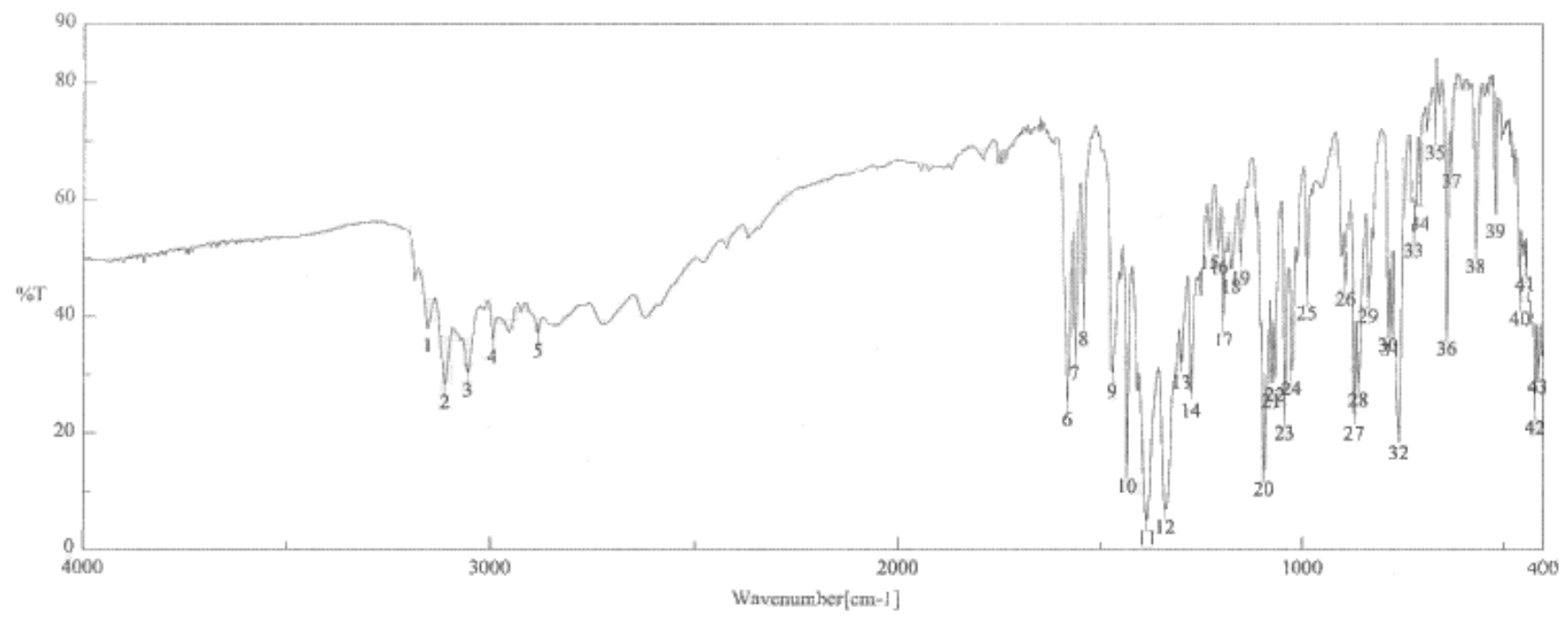


Şekil 3.2. Metanol - su (3:1) içerisinde 120 µg/mL **İZO** çözeltisinin 0. derece UV absorpsiyon spektrumu



1: 3301.54, 7.5929	2: 3068.19, 53.1563	3: 3015.16, 42.1495	4: 2985.27, 21.1316
5: 2947.66, 8.0379	6: 2878.24, 17.4252	7: 2860.88, 19.5559	8: 2729.74, 57.0448
9: 1748.16, 4.1395	10: 1729.83, 1.1789	11: 1666.20, 1.0300	12: 1624.73, 2.8506
13: 1608.34, 4.9257	14: 1457.92, 14.7905	15: 1412.60, 13.9392	16: 1394.28, 25.8193
17: 1378.85, 13.6575	18: 1316.18, 11.1276	19: 1257.36, 16.4519	20: 1241.93, 22.4646
21: 1213.97, 31.1517	22: 1168.65, 4.3054	23: 1113.69, 21.5118	24: 1065.48, 7.5158
25: 1041.37, 15.8394	26: 1018.23, 18.6187	27: 989.30, 10.3482	28: 955.56, 38.7337
29: 937.23, 13.4123	30: 916.99, 34.1505	31: 899.63, 9.3255	32: 862.02, 51.7386
33: 833.10, 33.0479	34: 818.63, 27.4989	35: 796.46, 57.6289	36: 754.03, 41.7040
37: 721.25, 37.0122	38: 709.68, 39.9665	39: 687.50, 42.0295	40: 647.96, 45.2772
41: 621.93, 41.4467	42: 578.54, 50.4382	43: 552.51, 42.7316	44: 539.01, 44.7500
45: 516.83, 43.2312	46: 499.47, 30.0265	47: 449.33, 30.6932	48: 431.01, 28.0298
49: 416.55, 19.6006			

Şekil 3.3. DİF'in IR spektrumu



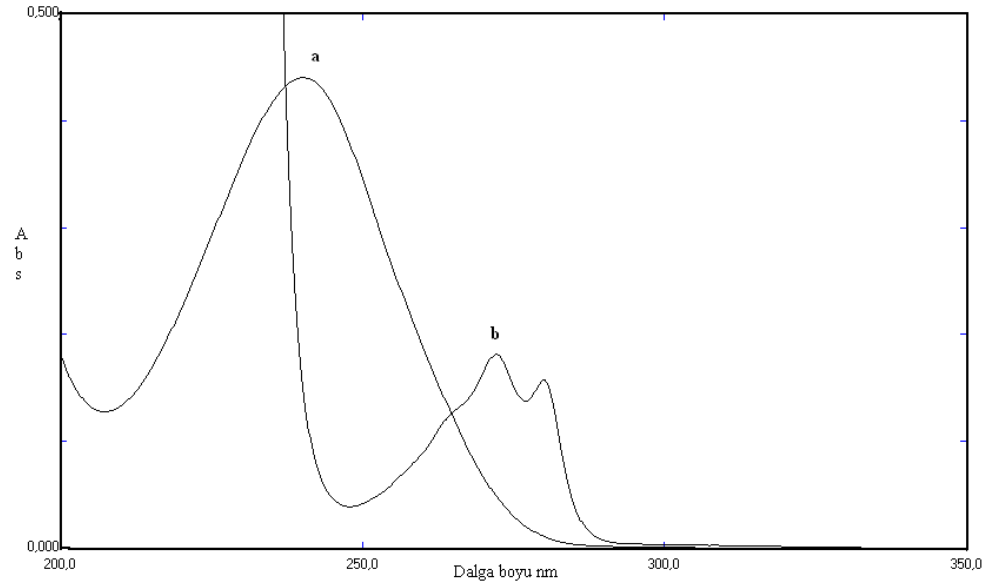
1: 3154.49, 38.0622	2: 3112.55, 28.4282	3: 3056.14, 30.4594	4: 2994.91, 36.2010
5: 2884.50, 37.2317	6: 1583.75, 25.4218	7: 1564.95, 33.4120	8: 1543.26, 39.2917
9: 1471.90, 30.2928	10: 1434.78, 13.9539	11: 1385.12, 5.0127	12: 1340.28, 6.9039
13: 1300.75, 31.8300	14: 1276.16, 28.9737	15: 1229.68, 52.3110	16: 1207.70, 51.5504
17: 1196.13, 39.1629	18: 1178.36, 48.2066	19: 1153.71, 49.6008	20: 1094.41, 13.4807
21: 1076.08, 28.5868	22: 1067.41, 29.6874	23: 1043.30, 23.1084	24: 1025.94, 30.7053
25: 988.34, 43.7041	26: 892.88, 46.0624	27: 871.18, 23.0715	28: 861.05, 28.8015
29: 836.47, 43.1854	30: 787.30, 38.2451	31: 780.06, 37.3601	32: 760.30, 19.6715
33: 722.69, 54.3569	34: 707.75, 58.9061	35: 669.18, 71.0913	36: 641.22, 37.5991
37: 629.16, 66.3247	38: 588.90, 51.6294	39: 519.72, 57.6934	40: 458.01, 42.7027
41: 444.03, 48.5161	42: 419.92, 24.0537	43: 413.17, 31.0359	

Şekil 3.4. İZO'nun IR spektrumu

3.3. KEMOMETRİK TEKNİKLERLE SPEKTROSKOPİK VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ YÖNTEMLERİ İLE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

3.3.1. Kemometrik çalışmalar

İzokonazol nitrat (**İZO**) ve diflukortolon valerat (**DİF**)'ın metanol – su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 200-400 nm arasındaki 0. derece UV spektrumları (Şekil 3.5) üst üste çizdirildiğinde 200-300 nm'ler arasında **İZO** ve **DİF**'in spektrumlarının birbirlerine girişim yaptığı görülmektedir. Dolayısıyla karışımlarda her iki etken maddenin hiçbir ayırma işlemi olmadan aynı anda miktar tayinlerinin doğrudan bu spektrum aralığında absorbans değerlerinin ölçülmesi ile yapılması mümkün değildir.



Şekil 3.5. Metanol - su (3:1) içerisinde a) 12 µg/mL **DİF** çözeltisinin, b) 120 µg/mL **İZO** çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

Bu nedenle karışımlarında **İZO** ve **DİF**'in, ki seçilen farmasötik preparat içerisinde karışım halinde bulunmaktadır, miktar tayinlerinin bu iki maddenin karışım çözeltilerinde okunan absorbans değerlerinin kemometrik yöntemler kullanılarak değerlendirilmesi ile yapılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla KLEK, TEK, TBR ve KEK yöntemleri uygulanmış ama yalnızca TBR yöntemi kullanılarak iyi sonuçlar alınmış, diğerlerinde ise anlamsız sonuçlar elde edilmiştir.

3.3.1.1. **DİF + İZO karışımında DİF ve İZO'nun TBR yönteminin spektrofotometrik analizlerde kullanılması ile miktar tayini**

Yapılan çalışmalara göre bu yöntemden iyi sonuç alabilmek için metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 0. derece (orijinal) UV absorpsiyon spektrumunda 242 - 298 nm aralığında $\Delta\lambda = 2$ nm olarak 29 dalga boyunda absorbans değerlerinin ölçülmesi gerektiği bulunmuştur.

Bu karışımında her iki maddenin de miktar tayini için bu maddelerin farklı konsantrasyonlarını içeren metanol - su (3:1) içerisindeki karışım çözeltilerinin çalışma setine (Çizelge 3.1) temel bileşen regresyonu yöntemi paket programlar kullanılmak suretiyle uygulanmıştır. Kalibrasyon seti hazırlanırken kullanılan karışım konsantrasyonları Çizelge 3.1'de görülmektedir.

Bu yöntemle en iyi sonuçların alınması için; **DİF** için 4 temel bileşenin, **İZO** için ise 5 temel bileşenin yeterli olduğu bulunmuş, Root-Mean-Squares Error (RMSE) değerinin **DİF** için 0.25, **İZO** için ise 2.87 olarak en az seviyede olduğu görülmüştür. Bu yöntemde çalışma aralığının **DİF** için 2.4 – 48.0 µg/mL, **İZO** için ise 60.0 – 260.0 µg/mL olduğu bulunmuştur.

Yöntemde tayin alt sınırı **DİF** ve **İZO** için sırasıyla 2.4 µg/mL ve 60 µg/mL, yakalama sınırı ise **DİF** için 0.28 µg/mL ve **İZO** için 4.03 µg/mL olarak bulunmuştur. LOD hesaplamasında RIBONE ve ark. 2001 in çalışmasındaki

işlemler temel alınmıştır. Bu işlemler: $LOD = 3 \sqrt{\frac{|\epsilon|}{|b|}}$ den hesaplanmıştır. Burada $|\epsilon|$ enstrumental gürültü ölçümü ve b ise tayin edilecek bileşiklerin saf haldeki regresyon katsayıları vektörüdür. $|\epsilon| = \sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2 + \epsilon_3^2 + \dots + \epsilon_n^2}$ dir.

Bu paket programlar içerisinde en iyi sonucu alabilmek için ortalama merkezli (mean center) ve standardize edilmiş veriler denenmiş, bunların içerisinde konulan konsantrasyona en uygun analiz sonuçlarının aşağıda gösterilen formüle göre standardize edilmiş verilerle ulaşıldığı gözlenmiştir:

$$Z = \frac{x - \bar{x}}{S_D}$$

Burada Z standardize edilmiş değer, x veri, $\bar{x}$ ortalama, S_D ise standart sapmadır. Yine kullandığımız paket programlarla çalışma (kalibrasyon) setindeki konsantrasyonlara (Çizelge 3.1) karşılık gelen score matrisleri ve okunan absorbanlara karşılık gelen loading (yükleme) matrisleri kurulmuştur. Sonra aynı işlem bilinmeyen konsantrasyonlarda bu iki etken maddeyi içeren karışımlara uygulanmış ve elde edilen veriler kalibrasyon regresyonu yardımıyla hesaplanmıştır.

Standart çözeltilerden hareketle hazırlanan sentetik karışımlara yöntem uygulandığında elde edilen ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma (% BSS) değerleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Buna göre ortalama % geri kazanım ve % BSS değerleri **İZO** için sırasıyla % 98.74 ve % 1.49, **DİF** için ise sırasıyla % 99.85 ve % 0.97 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.1. DİF ve İZO için TBR yönteminde kullanılan kalibrasyon seti

Karışım no	DİF µg/mL	İZO µg/mL
1	24	140
2	24	60
3	2.4	60
4	2.4	260
5	40	100
6	12	260
7	40	140
8	24	100
9	12	100
10	32	260
11	40	200
12	32	140
13	24	260
14	40	260
15	40	60
16	2.4	200
17	32	60
18	2.4	140
19	24	200
20	32	200
21	32	100
22	12	60
23	2.4	100
24	12	140

Çizelge 3.2. İZO ve DİF'in standart karışımları için TBR yöntemiyle elde edilen ortalama % geri kazanım sonuçları

KARIŞIM NO	Konulan $\mu\text{g/mL}$		Bulunan $\mu\text{g/mL}$		Geri Kazanım (%)	
	DİF	İZO	DİF	İZO	DİF	İZO
1	10.00	100.00	10.26	100.35	102.63	100.35
2	12.00	100.00	12.08	101.12	99.26	101.12
3	16.00	100.00	16.07	99.23	100.94	99.23
4	24.00	100.00	23.98	98.03	99.37	98.03
5	12.00	100.00	12.05	98.33	100.27	98.33
6	12.00	140.00	11.82	135.24	98.51	96.60
7	12.00	200.00	11.99	197.35	99.90	100.15
8	12.00	200.00	11.90	195.16	99.17	100.12
* $\bar{x}$					99.85	98.74
** SS					0.97	1.47
***BSS					% 0.97	% 1.49

* $\bar{x}$: Ortalama

** SS : Standart sapma

*** BSS : Bağlı standart sapma

3.2.1.2. Kemometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlara göre TSH, KSH, THKT, r, eğim ve kesim değerlerinin bulunması

Temel bileşen regresyonu yönteminde elde edilen veriler değerlendirilmiş ve aşağıdakiler hesaplanmıştır :

a) Tahmindeki Standart Hata (TSH)

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

formülü yardımıyla hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Burada c_i i. numunenin referans (bilinen) konsantrasyonu, $\hat{c}_i$ ise i. numunenin bulunan konsantrasyondur.

b) Kalibrasyondaki standart hata (KSH)

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

formülü yardımıyla hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Burada c_i i. numunenin referans (bilinen) konsantrasyonu, $\hat{c}_i$ ise i. numunenin m kalibrasyon standardı için tahmin edilen konsantrasyondur.

c) Tahmin hatalarının karelerinin toplamı (THKT)

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

formülü yardımıyla hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Burada c_i i. numunenin referans (bilinen) konsantrasyonu, $\hat{c}_i$ ise i. numunenin m kalibrasyon standardı için tahmin edilen konsantrasyondur.

Ayrıca, konulan ile bulunan değerler grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun korelasyon katsayısı (r), eğimi ve kesimi de aynı çizelgelerde gösterilmiştir.

Yöntemde hesaplanan TSH, KSH, r, kesim, eğim, RMSE ve THKT değerleri Çizelge 3.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. DİF + İZO karışımı analizinde uygulanan TBR yöntemindeki parametreler

	TSH	KSH	r	Kesim	Eğim	RMSE	THKT
İZO	0.4443	0.5712	0.9994	-2.0701	1.0314	0.25	0.4695
DİF	0.0403	0.0457	0.9994	-0.3737	1.0182	2.87	15.9890

r’nin 1’e yakın olması konulan ile bulunan miktarlar arasındaki doğrusal ilişkinin çok iyi olduğunu göstermektedir.

3.2.1.3. ANOVA testi

DİF + İZO karışımlarının metanol – su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin gün içi absorbands değerleri okunarak (3’şer saat aralıkla 3 kez) ve günler arası değerleri (3 gün boyunca) okunarak temel bileşen regresyonu yöntemleri uygulanmış ve bunların sonucunda **DİF + İZO** karışımlarında hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9’da gösterilmiştir. Bu çizelge sonuçlarına göre hesaplanan F değerlerinin serbestlik derecesi 2 ve 20’ye göre çizelge değeri olan 3.49 değerinden küçük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca **DİF** ve **İZO** için bulunan BSS değerleri sırasıyla, gün içi % 0.52 ve % 1.26, günler arası % 0.84 ve % 2.27’ dir.

3.2.1.4. TBR yönteminin farmasötik preparatlara uygulanması :

3.2.1.4.1. Seçicilik

Yöntemin içerisinde **DİF** ve **İZO** bulunan TRAVAZOL® krem ve TRAVACORT® krem preparatlarına uygulamasının yapılması için de çalışmalar yapılmıştır. Amacımız etken maddelerin miktarını tayin etmek olduğu için öncelikle bu preparatlardaki yardımcı maddelerin ve krem bazının yöntemi etkilemediğinin saptanması gerekir. Bu nedenle TRAVAZOL® krem ve TRAVACORT® krem preparatlarının hazırlanan çözeltilerine standart olarak ayrı ayrı **DİF**’ın preparat çözeltisinde bulunan miktarının % 25, % 50, % 75’i ve **İZO**’nun preparat çözeltilerinde bulunan miktarlarının % 5, % 10, % 15 i ilave edilerek miktar tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre yardımcı maddelerin yöntemi etkilemediği kanısına varılmıştır (Çizelge 3.4 ve çizelge 3.5).

Çizelge 3.4. TRAVAZOL® (Batch no 6050058A) preparatına standart ilavesi sonucunda TBR yöntemi ile hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları

KARIŞIM NO	KONULAN		BULUNAN		GERİ KAZANIM (%)	
	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF	İZO
1	5.00	10.00	4.91	9.94	98.29	99.39
2	5.00	10.00	4.89	9.99	97.71	99.91
3	5.00	10.00	4.89	9.93	97.66	99.33
4	10.00	20.00	9.91	20.27	99.14	101.33
5	10.00	20.00	9.85	20.03	98.54	100.16
6	15.00	30.00	14.66	29.05	97.72	96.84
7	15.00	30.00	14.22	28.94	94.83	96.49
				* $\bar{x}$	97.70	99.06
				SS	1.37	1.77
				BSS	% 1.41	% 1.79

Çizelge 3.5. TRAVACORT® (Batch no 73316A) preparatına standart ilavesi
sonucunda TBR yöntemi ile hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları

KARIŞIM NO	KONULAN		BULUNAN		GERİ KAZANIM (%)	
	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF	İZO
1	5.00	10.00	4.95	9.92	99.07	99.28
2	5.00	10.00	4.87	10.02	97.56	100.27
3	5.00	10.00	5.01	9.97	100.35	99.77
4	10.00	20.00	9.97	20.01	99.76	100.05
5	10.00	20.00	9.86	19.96	98.66	99.83
6	15.00	30.00	14.81	29.58	98.73	98.62
7	15.00	30.00	14.72	29.07	98.13	96.92
				* $\bar{x}$	98.90	99.25
				SS	0.94	1.16
				BSS	% 0.95	% 1.17

3.2.1.4.2.İşlem:

Yardımcı maddelerin etkisinin olmadığı anlaşıldıktan sonra seçilen 3 adet TRAVAZOL® krem ve TRAVACORT® krem içeriğinden ayrı ayrı 1'er gr tartılmış ve 50 mL'lik balon jode metanol - su (3:1) içerisinde çözülmüştür. 15 dakika karıştırıldıktan sonra süspansiyon, Whatman No:42 kağıdından süzölmüştür. Yöntem bu çözeltilere uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6 ve 3.7'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. TRAVAZOL® (Batch no 6050058A) preparatına TBR yöntemi uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem)
(Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg **DİF** + 10 mg **İZO** / 1 g krem)

DENEY NO	DİF (mg)	İZO (mg)
1	1.01	10.33
2	1.01	10.49
3	1.01	10.46
4	0.98	10.10
5	0.99	10.27
6	0.98	10.30
7	0.99	9.90
8	0.98	10.00
9	0.99	10.32
$\bar{x}$	0.99	10.24
SS	0.01	0.20
* G.A. (p=0.05 için)	0.99 ± 0.01	10.24 ± 0.15

GA = Güven aralığı ($\bar{x} \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$)

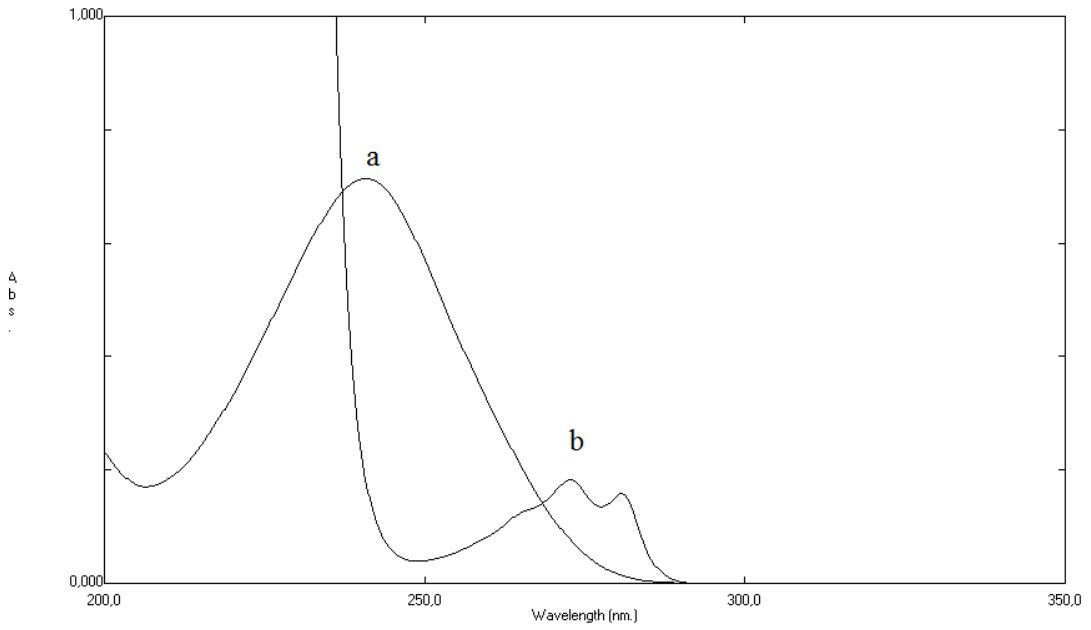
Çizelge 3.7. TRAVACORT® (Batch no 73316A) preparatına TBR yöntemi uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem)
(Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg DİF + 10 mg İZO / 1 g krem)

DENEY NO	İZO (mg)	DİF (mg)
1	9.50	0.99
2	9.47	0.99
3	9.37	0.99
4	9.59	0.97
5	9.69	0.98
6	9.83	0.99
7	9.80	1.00
8	9.85	0.98
9	9.65	0.97
* $\bar{x}$	9.64	0.98
SS	0.17	0.01
GA (p=0.05 için)	9.64 ± 0.14	0.98 ± 0.01

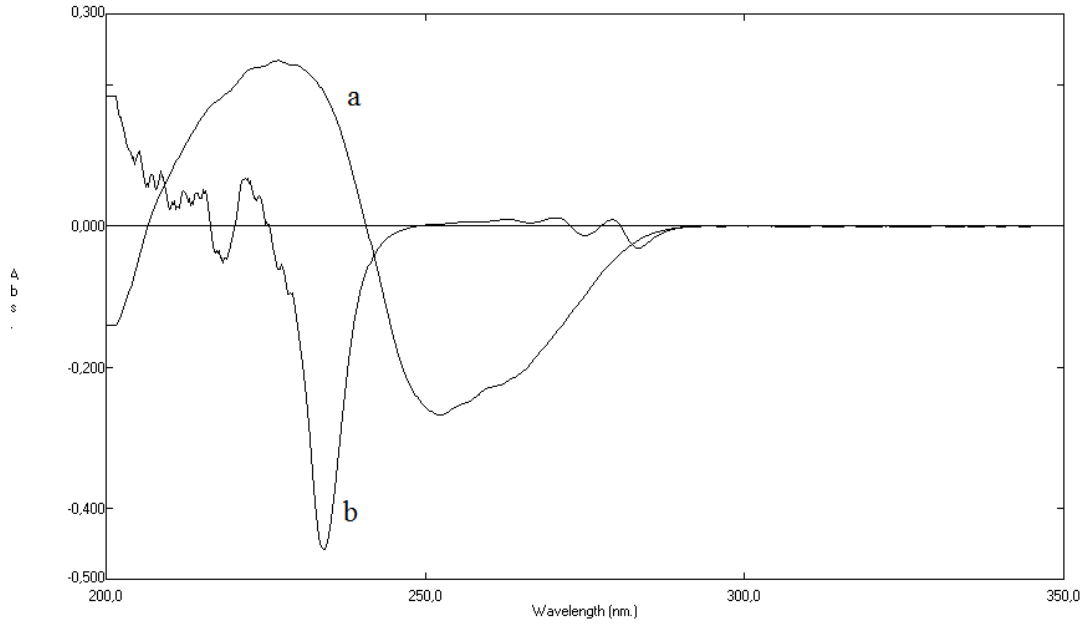
3.3. TÜREV SPEKTROFOTOMETRİ İLE YAPILAN MİKTAR TAYİNİ

ÇALIŞMALARI

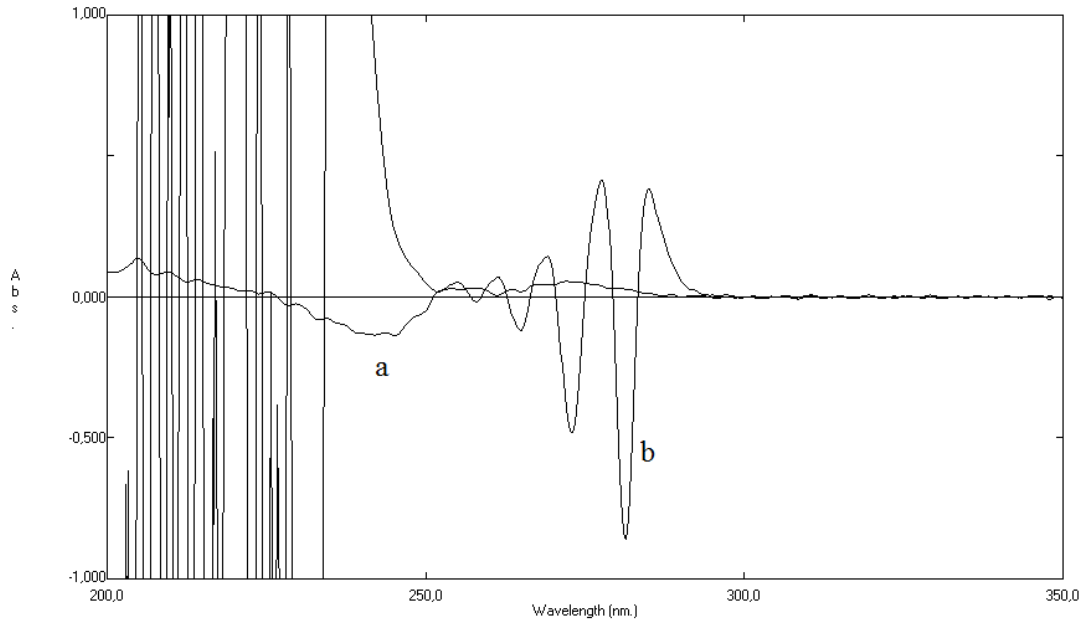
DİF + **İZO** karışımında **DİF** ve **İZO**'ün miktar tayinleri için çeşitli türev derecelerinde spektrumlar alınmış ve 1. türev spektrofotometri (¹D) yöntemi ile en iyi sonuçların alındığı görülmüştür (Şekil 3.6-3.10).



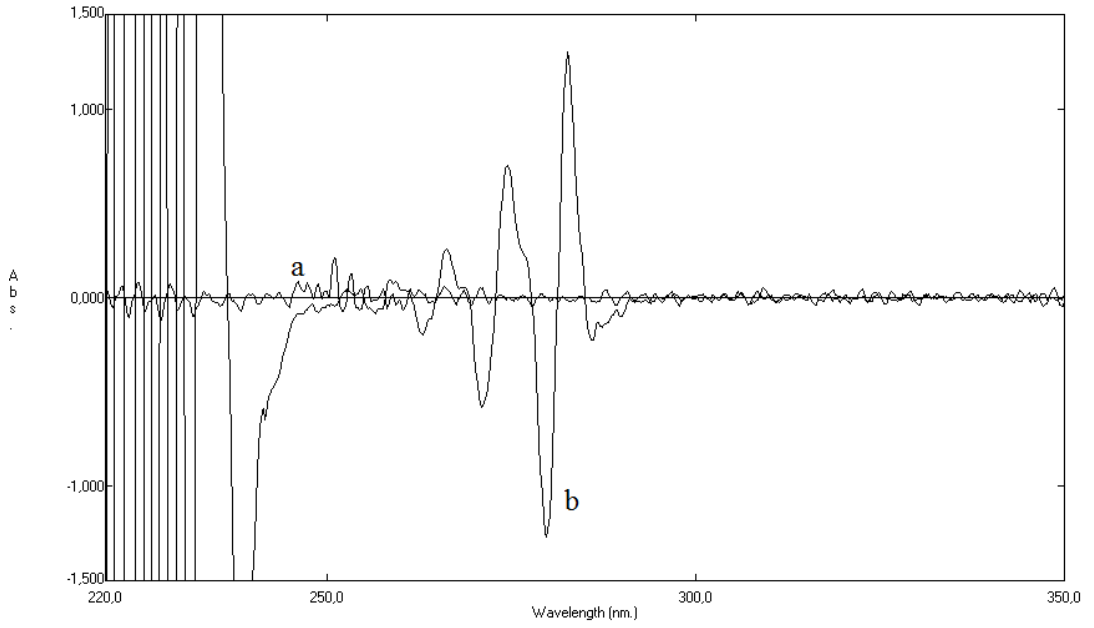
Şekil.3.6. Metanol - su (3 : 1) içerisinde **a)** 20 µg/mL **DİF** ve **b)** 120 µg/mL **İZO** çözeltilisinin 0° derece UV absorpsiyon spektrumu ($\Delta\lambda=2$ nm, skala faktörü=0)



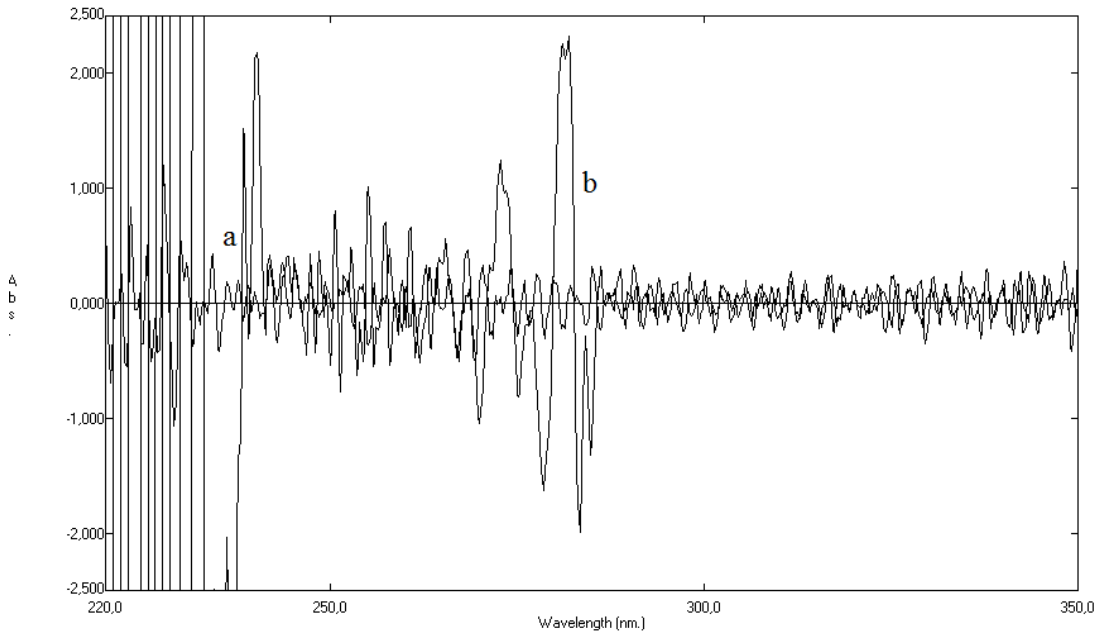
Şekil.3.7. Metanol - su (3 : 1) içerisinde **a)** 20 $\mu\text{g/mL}$ **DİF** ve **b)** 120 $\mu\text{g/mL}$ **İZO** çözeltisinin 1. türev spektrumları ($\Delta\lambda=2$ nm, skala faktörü =20)



Şekil.3.8. Metanol - su (3 : 1) içerisinde **a)** 20 $\mu\text{g/mL}$ **DİF** ve **b)** 120 $\mu\text{g/mL}$ **İZO** çözeltisinin 2. türev spektrumları ($\Delta\lambda=2$ nm, skala faktörü =50)



Şekil.3.9. Metanol - su (3 : 1) içerisinde **a)** 20 µg/mL **DİF** ve **b)** 120 µg/mL **İZO** çözeltisinin 3. türev spektrumlar ($\Delta\lambda= 2$ nm, skala faktörü =100)



Şekil.3.10. Metanol - su (3 : 1) içerisinde **a)** 20 µg/mL **DİF** ve **b)** 120 µg/mL **İZO** çözeltisinin 4. türev spektrumları ($\Delta\lambda= 2$ nm, skala faktörü =200)

3.3.1. DİF + İZO karışımında DİF'in miktar tayini :

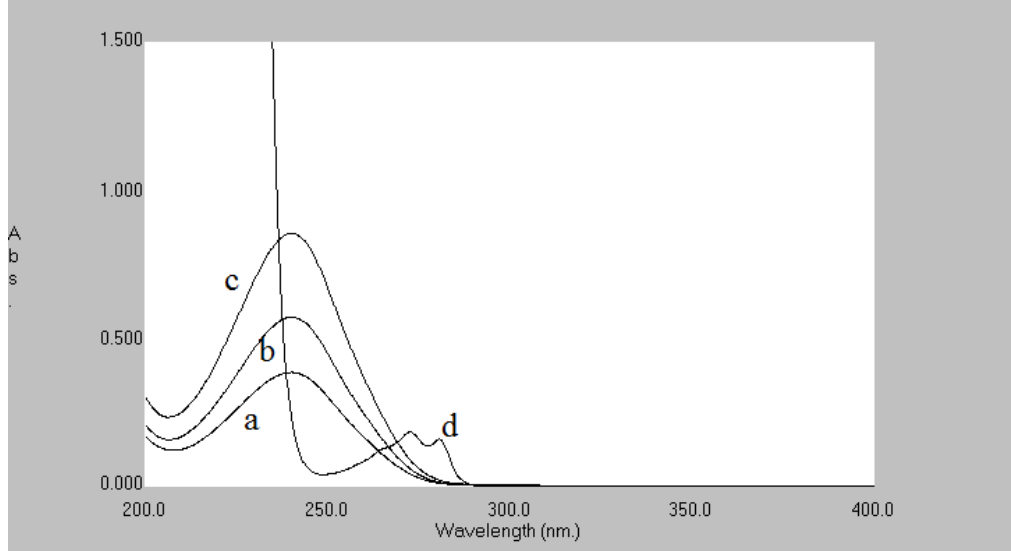
DİF + İZO karışımının metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 200 – 350 nm arasındaki 0. derece türevi yani orijinal absorpsiyon spektrumları Şekil 3.6'da görülmektedir. Yaptığımız çalışmalarda **DİF**'in bu karışımda miktar tayinini yapabilmek için **DİF + İZO** karışımlarının metanol - su (3:1) içerisindeki spektrumlarının 1. türev spektrumları çizilmiştir. Elde edilen 1. türev spektrumları Şekil 3.7'de görülmektedir. 1. türev spektrumlarını çizdirirken de çeşitli dalga boyu aralıkları denenmiş ve $\Delta\lambda = 2$ nm'de en iyi spektrumun alındığı bulunmuştur. 1. türev spektrumunda **İZO**'nun türev absorpsiyon değerinin sıfır olduğu dört adet dalga boyu (247.8 nm , 272.0 nm, 277.0 nm ve 279.8 nm) olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.12).

247.8 nm, , 272.0 nm, 277.0 nm ve 279.8 nm'de 1. türev spektrumunda değişik miktarda **DİF** içeren standart karışımlar için dA/d λ değerleri ölçülerek ve Çizelge 3.7'de gösterilen regresyon eşitlikleri kullanılarak yöntemdeki geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.8). Buna göre ortalama % geri kazanım değerinin 247.8 nm için % 101.31, % bağıl standart sapma değerinin de % 0.67 olduğu aynı çizelgede gözlenmektedir. Ortalama % geri kazanım değerinin 272.0 nm'de % 90.59, % bağıl standart sapma değerinin de % 4.60 olduğu görülmüştür. Ortalama % geri kazanım değerinin 277.0 nm ne 279.8 nm'de sırasıyla % 100.32 ve % 107.49, % bağıl standart sapma değerlerinin de sırasıyla % 1.44 ve % 14.74 olduğu görülmüştür.

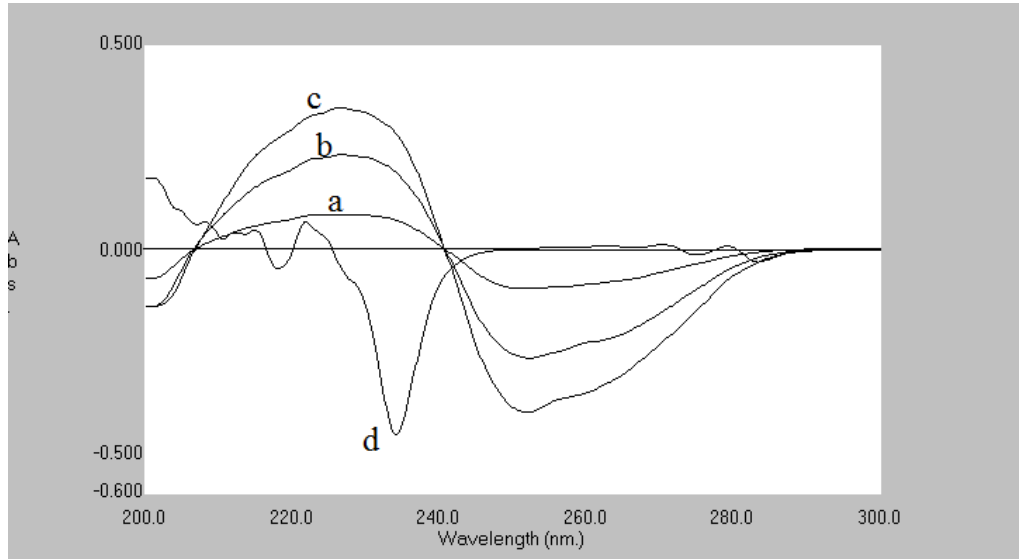
Yapılan çalışmalarda bu yöntemle **DİF + İZO** karışımı içerisinde **DİF**'in miktar tayini için 2.4 - 48 $\mu\text{g/mL}$ aralığında konsantrasyonla dA/d λ değerleri arasında doğrusal bir bağıntı olduğu saptanmıştır. Korelasyon katsayısının, bu 4 dalga boyu için hesaplanan regresyon eşitliği için 0.9999 olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.8) ki bu, konsantrasyon ile dA/d λ değerleri arasında iyi bir doğrusal bağıntının bulunduğunu göstermektedir.

Yöntemde **DİF** için 247.8 nm dalga boyunda tayin alt sınırı (TAS) 2.4 $\mu\text{g/mL}$ (doğrusal aralığın alt sınırı olarak alınmıştır), yakalama sınırı (YS) ise 0.08 $\mu\text{g/mL}$

olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı için 3 SS/m eşitliğinden yararlanılmıştır (SS = Standart sapma, m = kalibrasyon eğrisinin eğimi).



Şekil 3.11. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 7 µg/mL **DİF**, b) 20 µg/mL **DİF**, c) 30 µg/mL **DİF**, d) 120 µg/mL **İZO** çözeltilerinin orijinal absorpsiyon spektrumları



Şekil 3.12. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 7 µg/mL **DİF**, b) 20 µg/mL **DİF**, c) 30 µg/mL **DİF**, d) 120 µg/mL **İZO** çözeltilerinin 1. türev spektrumları ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü : 20)

Çizelge 3.8. İZO ve DİF'in ¹D yöntemi kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafikleri için hesaplanan istatistiksel sonuçlar

Bileşenler	λ (nm)	Regresyon Eşitlikleri		r	Konsantrasyon Aralığı (µg/mL)
		m (± SS)	n (± SS)		
DİF	247.8	$-2.29 \times 10^{-2} \pm 1.48 \times 10^{-3}$	$-1.19 \times 10^{-2} \pm 5.66 \times 10^{-4}$	0.9999	2.4 – 48
DİF	272.0	$-1.27 \times 10^{-2} \pm 4.24 \times 10^{-4}$	$-2.5 \times 10^{-3} \pm 8.48 \times 10^{-4}$	0.9999	2.4 – 48
DİF	277.0	$-6.6 \times 10^{-3} \pm 2.12 \times 10^{-4}$	$-1.8 \times 10^{-3} \pm 3.53 \times 10^{-4}$	0.9999	2.4 – 48
DİF	279.8	$-4.1 \times 10^{-3} \pm 1.41 \times 10^{-4}$	$-1.3 \times 10^{-3} \pm 3.53 \times 10^{-4}$	0.9999	2.4 – 48
İZO	240.2	$-9.0 \times 10^{-3} \pm 1.00 \times 10^{-4}$	$-2.21 \times 10^{-2} \pm 8.48 \times 10^{-3}$	0.9996	60 – 260

m = eğim. n = kesim. y = mx + n. r = korelasyon katsayısı. SS = standart sapma

Çizelge 3.9. İZO ve DİF'in standart karışımlarında ¹D yöntemi ile elde edilen ortalama % geri kazanım sonuçları

Karışım No	Konulan		DİF				İZO
	DİF µg/mL	İZO µg/mL	Geri Kazanım (%)				Geri Kazanım (%)
			247.8 nm	272.0 nm	277.0 nm	279.8 nm	
1	10.4	100.0	100.0	87.4	102.3	88.4	99.1
2	10.4	100.0	100.8	87.4	100.8	90.8	99.1
3	10.4	100.0	100.4	90.5	102.3	97.8	98.4
4	16.0	100.0	100.5	94.7	99.6	98.6	99.1
5	16.0	100.0	101.8	95.2	99.6	100.1	98.4
6	16.0	100.0	101.3	94.7	99.6	98.6	98.1
7	24.0	100.0	101.7	95.3	98.6	98.3	99.2
8	24.0	100.0	101.4	88.1	97.3	109.4	101.1
9	24.0	100.0	100.6	95.0	98.0	97.3	98.2
10	12.0	100.0	101.2	94.2	100.0	101.0	99.4
11	12.0	100.0	101.6	94.8	101.3	103.0	98.7
12	12.0	100.0	101.9	92.8	100.0	101.0	98.1
13	12.0	140.0	101.9	90.2	101.3	109.1	97.3
14	12.0	140.0	101.6	87.6	101.3	109.1	97.6
15	12.0	140.0	101.9	90.2	100.0	117.3	97.8
16	12.0	200.0	100.8	84.3	100.0	131.5	97.7
17	12.0	200.0	101.6	83.7	101.3	139.6	98.2
18	12.0	200.0	102.7	84.3	102.5	143.7	97.8
n = 18	x ⁻		101.31	90.59	100.32	107.49	98.53
	SS		0.68	4.17	1.44	15.84	0.91
	BSS		% 0.67	% 4.60	% 1.44	% 14.74	0.93
	GA (p=0.05 için)		x± 0.31	x± 1.92	x± 0.67	x± 7.32	x± 0.42

¹D = 1. türev UV spektrofotometri

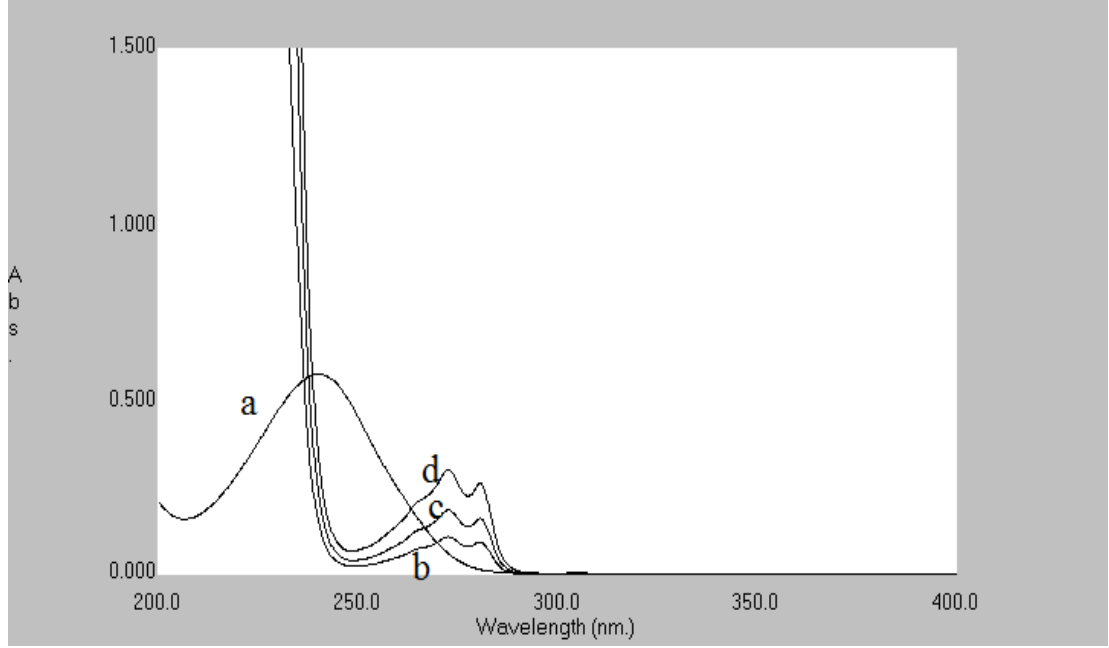
3.3.2. DİF + İZO karışımında İZO'nun miktar tayini:

DİF + İZO karışımının metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 200 – 350 nm arasındaki 0. derece türevi yani orijinal absorpsiyon spektrumları Şekil 3.6'da görülmektedir. Yaptığımız çalışmalarda **İZO**'ün bu karışımında miktar tayinini yapabilmek için **DİF + İZO** karışımlarının metanol - su (3:1) içerisindeki spektrumları **DİF**' in aynı çözücü içerisindeki spektrumları çizdirilmiştir. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.13'da görülmektedir. Daha sonra bu spektrumlarının 1., 2. ve 3. türev spektrumları çizdirilmiş ve spektrumlar karşılaştırıldığında 1. türev spektrumunda daha belirgin ve düzgün pikler görüldüğü için çalışmalar 1. türev spektrumlarında gerçekleştirilmiştir. Spektrumları çizdirirken çeşitli dalga boyları denenmiş ve $\Delta\lambda = 2$ nm'de en iyi spektrumun alındığı bulunmuştur. 1. türev spektrumunda **DİF**'in sıfır olduğu bir adet dalga boyu (240.2 nm) olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.14).

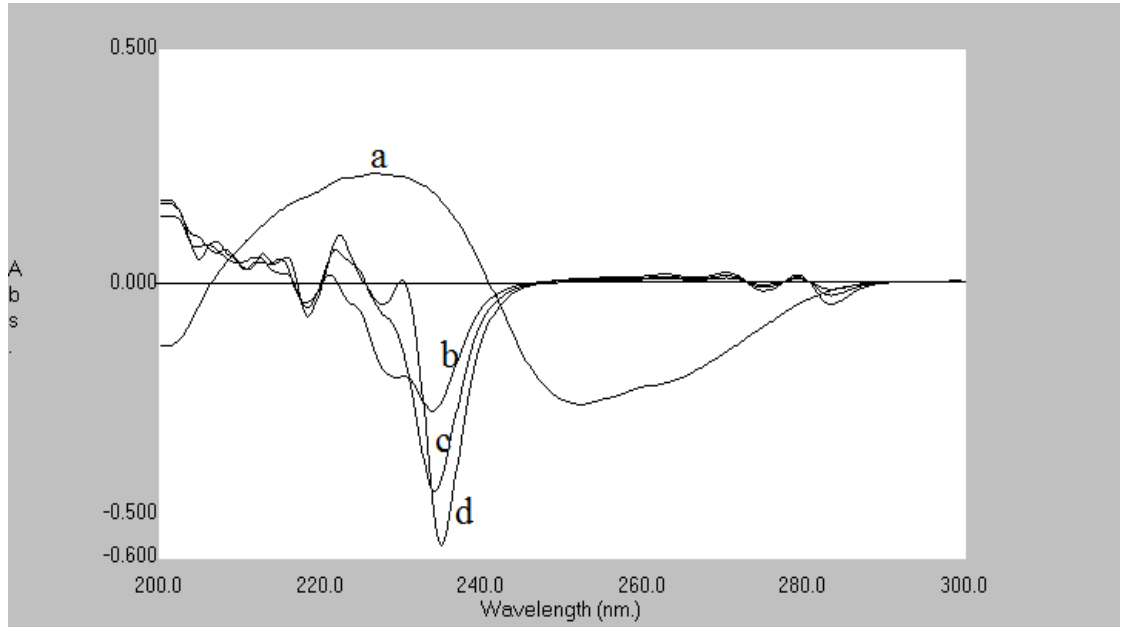
1. türev spektrumunda 240.2 nm'de değişik miktarda **İZO** içeren standart karışımları için $dA/d\lambda$ değerleri ölçülerek yöntemdeki geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.9). Buna göre 240.2 nm'deki ortalama yüzde geri kazanım değeri % 98.53 ve bağıl standart sapma değeri ise % 0.93 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda bu yöntemle **DİF + İZO** karışımı içerisinde **İZO**'nun miktar tayini için 60.0 – 260.0 $\mu\text{g/mL}$ aralığında konsantrasyonla $dA/d\lambda$ değerleri arasında doğrusal bir bağıntı olduğu saptanmıştır. Bu dalga boylarında yapılan ölçümlerdeki sonuçlara göre hazırlanan regresyon eşitlikleri Çizelge 3.8'de gösterilmiştir. Korelasyon katsayısının bu regresyon eşitliği için 0.9992 olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.8).

Yöntemde **İZO** için TAS 60 $\mu\text{g/mL}$ olarak alınmış, YS ise 2.86 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı için 3 SS/m eşitliğinden yararlanılmıştır (SS = Standart sapma, m = kalibrasyon eğrisinin eğimi).



Şekil 3.13. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 20 µg/mL **DİF**, b) 70 µg/mL **İZO**, c) 120 µg/mL **İZO**, d) 200 µg/mL **İZO** çözeltilerinin orjinal absorpsiyon spektrumları ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü : 20)



Şekil 3.14. Metanol - su (3 : 1) içerisinde a) 20 µg/mL **DİF**, b) 70 µg/mL **İZO**, c) 120 µg/mL **İZO**, d) 200 µg/mL **İZO** çözeltilerinin 1. türev spektrumları ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü : 20)

3.3.3. ANOVA testi

DİF + İZO karışımlarının metanol – su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin gün içi absorbans değerleri okunarak (3’şer saat aralıkla 3 kez) ve günler arası değerleri (3 gün boyunca) okunarak ¹D yöntemi uygulanmış ve bunların sonucunda **DİF + İZO** karışımlarında hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14’da gösterilmiştir. Bu çizelge sonuçlarına göre hesaplanan F değerlerinin serbestlik derecesi 2 ve 20’ye göre çizelge değeri olan 3.49 değerinden küçük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca **DİF** ve **İZO** için bulunan BSS değerleri sırasıyla, gün içi % 0.50 ve % 0.55, günler arası % 0.59 ve % 0.57’ dir.

3.3.4. ¹D yönteminin farmasötik preparatlara uygulanması:

3.3.4.1. Seçicilik

İçerisinde **DİF** ve **İZO** bulunan TRAVAZOL® krem ve TRAVACORT® krem preparatlarına uygulamasının yapılması için de çalışmalar yapılmıştır. Amacımız etken maddelerin miktarını tayin etmek olduğu için öncelikle bu preparatlardaki yardımcı maddelerin ve krem bazının yöntemi etkilemediğinin saptanması gerekir. Bu nedenle krem preparatlarının çözeltilerine standart olarak **DİF** ve **İZO** ayrı ayrı ilave edilerek miktar tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre yardımcı maddelerin yöntemi etkilemediği kanısına varılmıştır (Çizelge 3.10 ve çizelge 3.11).

Çizelge 3.10. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına standart ilavesi sonucunda ¹D ile hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları

Karışım No	Konulan		Bulunan		Geri Kazanım (%)	
	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF	İZO
1	5.00	20	4.98	19.98	99.57	99.88
2	5.00	20	4.98	20.09	99.57	100.47
3	5.00	20	4.98	20.45	99.57	102.23
4	15.00	24	14.95	24.08	99.66	100.34
5	15.00	24	15.11	23.96	100.71	99.85
6	15.00	24	14.79	24.43	98.61	101.81
7	20.00	30	20.30	29.99	101.52	99.97
8	20.00	30	19.12	30.03	95.61	100.12
9	20.00	30	19.83	30.03	99.15	100.12
				$\bar{x}$	99.83	100.53
				SS	1.63	0.87
				BSS	% 1.64	% 0.87

Çizelge 3.11. TRAVACORT® (Batch no: 73316A) preparatına standart ilavesi sonucunda ¹D ile hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları

Karışım No	Konulan		Bulunan		Geri Kazanım (%)	
	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF	İZO
1	5.00	20	5.04	19.89	100.82	99.46
2	5.00	20	5.02	20.14	100.45	100.69
3	5.00	20	5.07	19.86	101.50	99.29
4	10.00	24	9.96	23.90	99.58	99.59
5	10.00	24	9.97	23.78	99.75	99.08
6	10.00	24	10.03	23.93	100.27	99.69
7	15.00	30	14.99	29.75	99.91	99.17
8	15.00	30	15.20	29.82	101.36	99.41
9	15.00	30	15.20	29.81	101.36	99.37
				$\bar{x}$	100.56	99.53
				SS	0.74	0.47
				BSS	% 0.73	% 0.48

3.3.4.2. İşlem

Seçilen 3 adet TRAVAZOL[®] krem ve TRAVACORT[®] krem içeriğinden ayrı ayrı 1 gr tartılmış ve 50 mL'lik balon jojede metanol - su (3:1) içerisinde çözülmüştür. 15 dakika karıştırıldıktan sonra süspansiyon, Whatman No:42 kağıdından süzölmüştür. Yöntem bu çözeltilere uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlar Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına ¹D yöntemi uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg **DİF** + 10 mg **İZO**/1 g krem)

Deney No	İZO (mg)	DİF (mg)
1	9.83	1.01
2	9.90	1.02
3	9.96	1.02
4	9.81	1.01
5	10.19	1.00
6	10.17	1.01
7	10.24	1.02
8	9.86	1.02
9	10.21	1.02
* $\bar{x}$	10.05	1.0
SS	0.19	0.01
GA (p=0.05 için)	10.05 ± 0.14	1.02 ± 0.01

Çizelge 3.13. TRAVACORT® (Batch no: 73316A) preparatına ¹D yöntemi uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg **DİF** + 10 mg **İZO**/1 g krem)

Deney No	İZO (mg)	DİF (mg)
1	9.67	1.01
2	9.74	1.02
3	9.80	1.00
4	9.72	1.01
5	9.74	1.0
6	9.96	1.0
7	9.75	1.0
8	9.91	1.0
9	9.72	1.0
$\bar{x}$	9.76	1.0
SS	0.11	0.01
GA (p=0.05 için)	9.8 ± 0.08	1.0 ± 0.01

Çizelge 3.14. Önerilen yöntemler için **DİF** + **İZO** karışımlarında ANOVA testi sonuçları

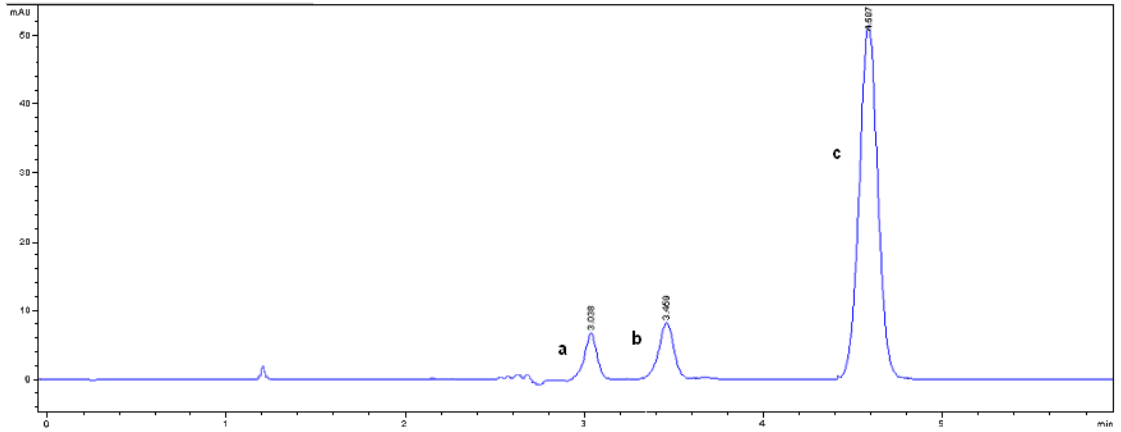
Parametreler	¹ D		TBR		YPSK	
	İZO	DİF	İZO	DİF	İZO	DİF
Günler arası varyans	1.29	0.05	5.32	0.01	2.33	0.04
Gün içi varyans	1.20	0.01	1.63	0.01	1.16	0.03
<i>F</i> oranı	1.08	3.19	3.26	2.70	2.02	1.14
Ortalama değer (µg/mL)	200.70	23.93	101.58	11.97	201.77	15.81
Günler arası BSS	% 0.57	% 0.90	% 2.27	% 0.84	% 0.75	% 1.21
Gün içi BSS	% 0.55	% 0.50	% 1.26	% 0.52	% 0.53	% 1.13

Günler arası ve gün içi sonuçları 2 ve 20 serbestlik derecesinde hesaplanmıştır. Bu serbestlik derecesinde ve %95 güven aralığında *F* oranı 3.49'dir.

Varyans: SS^2

3.4. YPSK İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Yöntemi optimize etmek için yapılan çalışmalar sonucunda, en iyi ayrımın ACE C18 ters faz kolonu (250 mm x i.d., 4.6 mm, 5 µm) üzerinde hareketli (hareketli) faz olarak metanol – su (95:5, v/v) ve 20 µL enjeksiyon hacmi kullanılarak 1 mL/dak. akış hızı ile elde edildiği saptanmıştır. Dedeksiyon 280 nm’de yapılmıştır. İç standart (IS) olarak çeşitli maddeler denemiş ve en uygun piki veren klorzoksazon seçilmiştir. Yöntemde alıkonma zamanları (retention time) klorzoksazon (iç standart) için 3.04 dakika, **DİF** için 3.46 dakika ve **İZO** için 4.59 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. a) 0.8 µg/mL Klorzoksazon (iç standart) b) 32 µg/mL **DİF** ve c) 260 µg/mL **İZO** nun geliştirilen YPSK yöntemindeki kromatogramı

Miktar tayini işlemlerinde kalibrasyon grafiklerinden yararlanılmıştır. Bu grafikler için pik alanları ölçülmüş ve kromatogramda etken maddeler için ölçülen pik alanları iç standart için ölçülen pik alanlarına bölündükten sonra elde edilen değerler konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir (N = 10). Böylece elde edilen doğrusal kalibrasyon eğrisinin denklemleri :

$$\text{İZO için } y = 0.0448 x + 0.3616 \text{ (} r^2 = 0.9996 \text{)}$$

$$\text{DİF için } y = 0.0459 x + 0.0563 \text{ (} r^2 = 0.9997 \text{) olarak bulunmuştur.}$$

(Burada x, µg/mL cinsinden konsantrasyonu, y ise pik alanı madde/pik alanı iç standart oranını göstermektedir.)

Yöntemde doğrusal çalışma aralıklarının **DİF** için 4 – 48 µg/mL. **İZO** için ise 50 – 400 µg/mL olduğu saptanmıştır. Yöntemde **İZO** için TAS, 50 µg/mL olarak alınmış, YS ise 0.22 µg/mL olarak hesaplanmıştır. **DİF** için ise TAS, 4 µg/mL olarak alınmış ve YS 0.76 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.15’da gösterilmiştir. Tayin alt sınırı doğrusal aralığın alt sınırı olarak alınmış, yakalama sınırı ise 3 SS/m formülünden hesaplanmıştır.

Çizelge 3.15. Kromatografik koşullar optimize edildiğinde **İZO** ve **DİF** için regresyon sonuçları

	DİF	İZO
Doğrusal çalışma aralığı (µg/mL)	4.0 – 48.0	50.0 – 400.0
Eğim	0.0459	0.0448
Kesim	0.0563	0.3616
r	0.9997	0.9996
TAS (µg/mL)	4	50
YS (µg/mL)	0.76	0.22

* YS : Yakalama Sınırı (LOD)

** TAS : Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Yöntemde sistem uygunluk testleri araştırılmış elde edilen sonuçlar Çizelge 3.16' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.16. DİF and İZO için geliştirilen YPSK yönteminde sistem uygunluk testi sonuçları

Parametreler	DİF	İZO	Olması gereken değerler
Teorik tabaka sayısı	19493	27030	$N > 2000$
Kapasite faktörü	2.87	2.82	$k' = 2 - 8$
Seçicilik faktörü	1.23	1.50	$\alpha > 1$
Ayrım gücü	3.73	10.36	$R > 1.5$
Asimetri faktörü	1.06	1.17	$A = 0.95 - 1.20$

Standart çözeltilerden hareketle hazırlanan sentetik karışımlara yöntem uygulandığında elde edilen ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.17’de gösterilmiştir. Buna göre ortalama % geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri sırasıyla **İZO** için % 99.82 ve % 1.04, **DİF** için % 100.45 ve % 1.98 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17. Sentetik karışımlara YPSK yöntemi uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen ortalama % geri kazanım sonuçları

Karışım No	Konulan		Bulunan		Geri Kazanım (%)	
	DİF (µg/mL)	İZO (µg/mL)	DİF (µg/mL)	İZO (µg/mL)	DİF	İZO
1	16.00	140.00	15.72	139.13	98.24	99.38
2	16.00	140.00	15.72	137.97	98.24	98.55
3	16.00	140.00	16.72	137.45	104.47	98.18
4	26.00	240.00	25.90	201.79	99.61	100.90
5	26.00	200.00	26.18	198.36	100.71	99.18
6	26.00	200.00	26.33	202.16	101.26	101.08
7	32.00	240.00	32.52	261.16	101.63	100.45
8	32.00	240.00	32.31	261.39	100.96	100.53
9	32.00	240.0	31.67	260.30	98.96	100.11
				* $\bar{x}$	100.45	99.82
				SS	1.98	1.04
				BSS	% 1.97	% 1.04

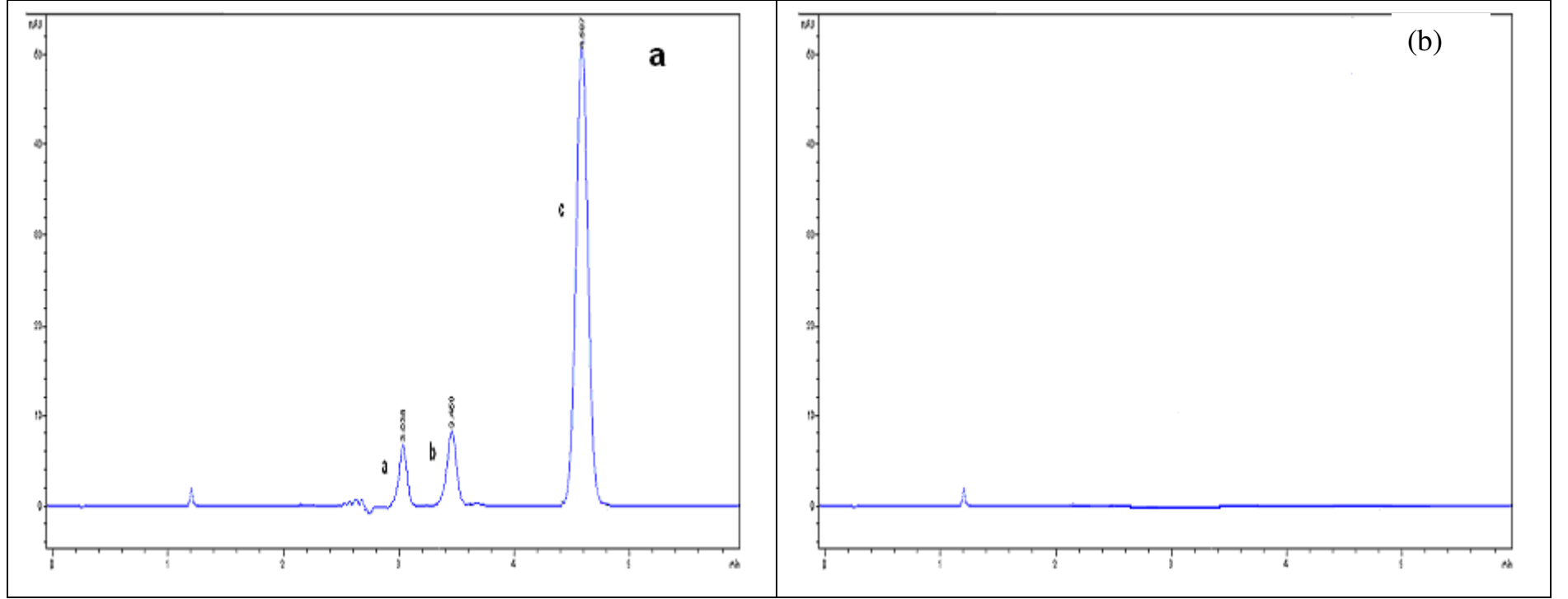
3.4.1. ANOVA testi

DİF + **İZO** karışımları için gün içi absorbands değerleri okunarak (3'şer saat aralıkla 3 kez) ve günler arası absorbands değerleri okunarak kromatografik yöntem uygulanmış ve bunların sonucunda **DİF** + **İZO** karışımları için 3 gün aynı saat aralıklarında karşılaştırılarak bulunan miktarlar ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14'de gösterilmiştir. Bu çizelge sonuçlarına göre hesaplanan F değerlerinin serbestlik derecesi 2 ve 20'ye göre çizelge değeri olan 3.49 değerine göre bulunan F değerleri daha küçük bulunmuştur. **DİF** ve **İZO** için bulunan BSS değerleri sırasıyla, gün içi % 0.53 ve % 1.13, günler arası % 1.21 ve % 0.75' dir.

3.4.2. YPSK yönteminin farmasötik preparatlara uygulanması :

3.4.2.1. Seçicilik

İçerisinde **DİF** ve **İZO** bulunan TRAVAZOL® krem ve TRAVACORT® krem preparatlarına uygulamasının yapılması için de çalışmalar yapılmıştır. Amacımız etken maddelerin miktarını tayin etmek olduğu için öncelikle bu preparatlardaki yardımcı maddelerin ve krem bazının yöntemi etkilemediğinin saptanması gerekir. Bu nedenle krem preparatlarının çözeltilerine standart olarak **DİF** ve **İZO** ayrı ayrı ilave edilerek miktar tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre yardımcı maddelerin yöntemi etkilemediği bulunmuştur (Çizelge 3.18 ve Çizelge 3.19). Ayrıca optimize edilen şartlarda **DİF**, **İZO** ve iç standardın piklerini etkileyecek piklere rastlanmamıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. (a) Krem preparatı (a) klorzoksazon, b) **DİF** ve c) **İZO** (b) plasebo'nun YPSK kromatogramı

Çizelge3.18. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına standart ilavesi sonucunda YPSK yöntemi ile hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları

Karışım No	Konulan		Bulunan		Geri Kazanım (%)	
	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF	İZO
1	5.00	50.00	5.01	49.66	100.26	99.32
2	5.00	50.00	4.83	49.84	96.66	99.66
3	5.00	50.00	5.01	50.30	100.26	100.61
4	8.00	80.00	7.87	79.90	98.46	99.88
5	8.00	80.00	7.73	80.34	96.66	100.43
6	8.00	80.00	8.02	80.00	100.26	100.00
7	10.00	100.00	9.84	100.41	98.46	100.41
8	10.00	100.00	9.66	99.69	96.66	99.70
9	10.00	100.00	9.66	99.51	96.66	99.51
				$\bar{x}$	98.26	99.95
				SS	1.67	0.45
				BSS	% 1.70	% 0.45

Çizelge3.19. TRAVACORT® (Batch no: 73316A) preparatına standart ilavesi sonucunda YPSK yöntemi ile hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları

Karışım No	Konulan		Bulunan		Geri Kazanım (%)	
	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF µg/mL	İZO µg/mL	DİF	İZO
1	5.00	50.00	4.83	49.85	96.66	99.70
2	5.00	50.00	4.92	49.94	98.46	99.88
3	5.00	50.00	4.83	49.20	96.66	98.41
4	8.00	80.00	7.59	78.87	94.86	98.59
5	8.00	80.00	7.88	78.87	98.46	98.59
6	8.00	80.00	7.73	79.02	99.66	98.77
7	10.00	100.00	9.67	99.70	96.66	99.70
8	10.00	100.00	9.84	99.33	98.46	99.33
9	10.00	100.00	9.50	99.51	94.86	99.51
				$\bar{x}$	96.86	99.16
				SS	1.41	0.57
				BSS	% 1.45	% 0.58

3.4.2.2. İşlem

Yardımcı maddelerin etkisinin olmadığı anlaşıldıktan sonra seçilen 3 adet TRAVAZOL[®] ve TRAVACORT[®] krem içeriğinden ayrı ayrı 1'er gr tartılıp 50.0 mL'lik balon jojede metanol içerisinde çözüldü. 15 dakika karıştırıldıktan sonra çözelti 0.45 µm milipore filtreden 50.0 mL'lik balonjojeye süzüldü. Bu süzüntüden alınan 10.0 mL'ye klorzoksazonun stok çözeltisinden 0.1 mL ilave edildikten sonra 25.0 mL'lik balon jojede aynı çözücü ile 25.0 mL'ye tamamlandı. Böylece **İZO**, **DİF** ve klorzoksazon (**IS**)'ün konsantrasyonları sırasıyla 80.0 µg/mL, 8.0 µg/mL ve 0.8 µg/mL olarak ayarlandı. Yöntemin son çözeltilere uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 3.20 ve 3.21'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. TRAVAZOL® (Batch no: 6050058A) preparatına YPSK yöntemi uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg **DİF** + 10 mg **İZO** / 1 g krem)

DeneyNo	DİF (mg)	İZO (mg)
1	1.05	10.00
2	1.06	10.17
3	1.06	10.19
4	1.01	10.16
5	1.01	10.00
6	1.02	9.98
7	1.01	10.23
8	1.03	10.01
9	1.03	10.00
$\bar{x}$	1.03	10.08
SS	0.02	0.10
G.A (p=0.05 için)	1.03 ±0.01	10.08 ±0.07

Çizelge 3.21. TRAVACORT® (Batch no: 73316A) preparatına YPSK yöntemi uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/1 g krem) (Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg **DİF** + 10 mg **İZO** / 1 g krem)

DENEY NO	DİF (mg)	İZO (mg)
1	0.99	10.17
2	1.00	10.11
3	0.99	9.96
4	0.99	10.05
5	0.99	10.02
6	1.00	9.99
7	0.99	10.03
8	0.98	9.97
9	0.99	10.01
$\bar{x}$	0.99	10.05
SS	0.01	0.08
G.A. (p=0.05 için)	0.99 ± 0.01	10.05 ± 0.06

4. TARTIŞMA

4.1. DİF + İZO KARIŞIMININ ANALİZİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

4.1.1. Kemometrik yöntemlerin kullanılışı

Kemometrik yöntemler esasında kendileri analitik yöntemler olmayıp matematiksel ve istatistiksel yöntemlerdir. Yani her türlü analitik veri için uygulanabilir. Biz çalışmalarımızda spektrofotometrik analizleri tez konumuz olarak seçtiğimiz ve ikili karışımlara uygulamayı amaçladığımız için spektrumlarda okunan absorbans değerleri bu kemometrik yöntemlerle değerlendirilerek karışımdaki etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda KLEK, TEK, TBR ve KEK teknikleri paket programlar kullanılarak **DİF + İZO** karışımında **DİF** ve **İZO**'nun miktar tayini için uygulanmış ve **3.2.1** bölümünde de belirtildiği gibi yalnızca TBR yöntemiyle tutarlı sonuçlar elde edilmiş diğer yöntemlerde ise birbirini tutmayan çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle tartışma bölümünde yalnızca TBR tekniği kullanılarak elde edilen sonuçlar yorumlanacaktır.

4.3.1.1. Temel bileşen regresyonu (TBR) yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalar

DİF + İZO karışımında bu iki etken maddenin de aynı anda miktar tayini için temel bileşen regresyonu yöntemi spektrofotometrik verilerin (absorbansların) değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Yöntemde bu iki maddenin karışımlarının metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 200 - 400 nm'ler arasındaki orijinal

UV absorpsiyon spektrumları kullanılmıştır (Şekil 3.6). Şekil 3.6’te görüldüğü gibi 200 - 350 nm’ler arasında her iki maddenin spektrumları girişim yapmaktadır. Dolayısıyla diğerinin etkisi olmaksızın **DİF** veya **İZO**’nun yalnızca absorbans değerlerini okuyarak bu karışımda seçici olarak miktar tayinlerini gerçekleştirmek imkansızdır. Hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın **DİF** ve **İZO** ’nun ikili karışımlarında miktar tayinlerinin yapılabilmesi için spektral verilerin temel bileşen regresyonu yöntemiyle analizinden yararlanılmıştır. Buna göre Şekil 3.5’teki spektrumun 242 - 298 nm’ler arasındaki bölümünün istenen amaç için yeterli olduğu yapılan analizler sonucunda bulunmuştur. 242 - 298 nm’ler arasındaki spektrumda hangi dalga boylarının seçilmesi gerektiği konusunda yapılan denemeler sonucunda 24 karışım numunesi için (kalibrasyon seti) (Çizelge 3.1) $\Delta\lambda = 2$ nm olarak 29 dalga boyunda absorbans değerlerinin okunmasının ve bu yöntemdeki hesaplamada kullanılmasının yeterli olduğu anlaşılmıştır. Sonra **3.2.1.1** bölümlerinde anlatıldığı gibi okunan absorbans değerlerine göre hazırlanan matris ve konsantrasyon matrislerini kullanarak önce kalibrasyon matrisi ve katsayıları hesaplanmış daha sonra bilinmeyen numune için belirlenen dalga boylarında yapılan ölçümler bu matris ve katsayılar yardımıyla analiz edilerek bilinmeyen numunedeki bileşenlerin konsantrasyonları hesaplanmıştır (Çizelge 3.2). Bu hesaplamada **2.4** bölümünde gösterilen paket programlardan yararlanılmıştır.

Yöntemde **3.2.1.1** bölümünde anlatıldığı gibi standardize edilmiş veriler kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edildiği saptanmıştır.

TSH ve KSH değerlerinin mümkün olduğu kadar düşük olması istenir. Çizelge 3.3’deki değerlere bakıldığında TSH ve KSH değerlerinin gerçekten küçük olduğu görülmektedir.

r değeri, konulan ile bulunan arasındaki korelasyonun ölçüsüdür. Bu değerin 1'e yakın olması çalışmanın hassasiyetinin yüksek olduğunu ifade eder ki Çizelge 3.3'deki verilere göre hesaplanan r değerlerinin 1'e çok yakın oldukları görülmektedir.

THKT değerleri ise her zaman minimum olması beklenmeyen değerlerdir. Hazırlanan standart karışımlara yöntem uygulanarak ortalama % geri kazanım değerleri ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.2). Çizelge 3.2'de görüldüğü gibi % geri kazanım değerleri **DİF** için % 99.85, **İZO** için % 98.74 olarak bulunmuştur ki bu değerler yöntemdeki doğruluğu göstermektedir. Yöntemdeki kesinliği göstermek için ise % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri hesaplanmış ve sırasıyla **DİF** ve **İZO** için % 0.97 ve % 1.49 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.2). Bulunan değerler tatmin edici olarak değerlendirilmiştir.

Yaptığımız çalışmalarda **DİF** + **İZO** karışımında temel bileşen regresyonu tekniğinin spektrofotometriye uygulanması ile **DİF** ve **İZO**'nun miktarının tayin edilmesi yönteminde çalışma aralığının **İZO** için 60 – 260 µg/mL, **DİF** için 2.4 – 48 µg/mL olduğu saptanmıştır. Bu çalışma aralıkları örnek için seçilen krem preparatındaki **DİF** ve **İZO**'ün aynı anda miktar tayinine imkan vermektedir.

Yöntemde tayin alt sınırı (TAS) **İZO** için 60 µg/mL, **DİF** için 2.4 µg/mL olarak alınmıştır. Yakalama sınırları (YS) ise **İZO** için 4.03 µg/mL, **DİF** için ise 0.28 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar da yöntemin oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. YS değerlerinin hesaplanmasında 3.2.1.1 bölümünde anlatıldığı gibi Ribone ve ark. (2001) tarafından önerilen yöntemden yararlanılarak hesap yapılmıştır.

DİF + İZO karışımlarının metanol – su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin gün içi absorbans değerleri okunarak (3'er saat aralıkla 3 kez) ve günler arası değerleri (3 gün boyunca) okunarak temel bileşen regresyonu yöntemleri uygulanmış ve bunların sonucunda **DİF + İZO** karışımlarında hesaplanan **DİF** ve **İZO** miktarları ANOVA testi ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14'da gösterilmiştir. Bu çizelge sonuçlarına göre hesaplanan F değerlerinin serbestlik derecesi 2 ve 20'ye göre çizelge değeri olan 3.49 değerinden küçük olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile, 3 gün içerisinde TBR yönteminin hazırlanan çözeltilere uygulanmasında elde edilen sonuçların ($p=0.05$ olarak) birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlı farkının bulunmadığını ve bu süre içerisinde yöntemin geçerli olduğunu göstermektedir. Bu aynı zamanda stabilitenin de göstergesidir.

4.1.2. Türev spektrofotometri ile yapılan çalışmalar

4.1.2.1. DİF'in miktar tayini

DİF + İZO karışımında bu iki etken maddenin aynı anda miktar tayini için 1. türev spektrofotometrisi yöntemi uygulanmıştır. **3.3.1**'de anlatıldığı biçimde **DİF**'in miktar tayini için bu karışımın metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 200–350 nm arasındaki orijinal absorpsiyon spektrumunun kullanılması çalışmalarımızda uygun bulunmuştur (Şekil 3.6). Daha sonra elde edilen spektrumun 1. derece türev spektrumları çizdirilmiştir (Şekil 3.7). 1. derece türev spektrumunda (Şekil 3.7) konsantrasyonla orantılı ve dalga boyu kaymayan minimum ve maksimumlar görülmüştür. Bu minimum ve maksimumlar içerisinde 247.8 nm'deki

dalga boylarında ölçülen $dA/d\lambda$ değerlerinden yararlanılarak miktar tayininin yapılabileceği kanısına varılmıştır, çünkü elde edilen sonuçlara göre en düşük BSS değeri bu dalga boyunda çalışıldığında elde edilmektedir. Elde edilen 1. türev spektrumunun daha iyi olabilmesi için yapılan çalışmalarda $\Delta\lambda=2$ nm olarak smoothing (düzleme) yapılmasının uygun olduğu saptanmıştır. 1. türev spektrumunda (Şekil 3.7) 247.8 nm’de ölçülen $dA/d\lambda$ değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek regresyon analizleri yapılmıştır. Elde edilen regresyon eşitlikleri yardımıyla (Çizelge 3.8) sentetik olarak hazırlanan **DİF** + **İZO**’nun standart karışımlarındaki **DİF**’ın miktarı hesaplanarak ortalama % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.9). Çizelge 3.9’de görüldüğü gibi, 247.8 nm’de çalışıldığında elde edilen ortalama % geri kazanım değerinin % 101.31 olduğu görülmektedir. Ayrıca yöntemdeki % bağıl standart sapma değerleri de hesaplanmış ve bu değer % 0.67 olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluğu ve kesinliğinin tatmin edici olduğunu göstermektedir.

Bu karışımda **DİF**’ın miktar tayininin yapılabilmesi için 247.8 nm seçilmiştir. Bu dalga boyu % bağıl standart sapmanın en düşük olması nedeniyle seçilmiştir (% 0.67) (Çizelge 3.9). Bu dalga boyundaki ortalama % geri kazanım değerinin % 101.31 olması da ayrıca tatmin edicidir. Yaptığımız çalışmalarda **DİF** + **İZO** karışımında spektrum oranları 1. türev spektrofotometri yöntemi ile **DİF**’ın miktarının tayin edilmesinde yönteminde çalışma aralığının **DİF** için 2.4 - 48 $\mu\text{g/mL}$ olduğu saptanmıştır.

Yöntemde **DİF** için TAS, 2.4 $\mu\text{g/mL}$ olarak alınmış, YS ise 0.08 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar yöntemin oldukça duyarlı olduğunu ifade etmektedir.

4.1.2.2. İZO'nun miktar tayini

DİF + İZO karışımında bu iki etken maddenin de aynı anda miktar tayini için 1. türev spektrofotometri yöntemi uygulanmıştır. **3.3.2'**de anlatıldığı biçimde **İZO**'nun miktar tayini için, bu karışımın metanol - su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 200–350 nm arasındaki orijinal absorpsiyon spektrumunun kullanılması çalışmalarımızda uygun bulunmuştur (Şekil 3.9). Daha sonra Şekil 3.9'daki spektrum elde edilen spektrumun 1. derece türevleri çizdirilmiştir (Şekil 3.11). Bu spektrumda **DİF**'in 1.türev spektrumunda absorpsiyon 0 olduğu bir adet dalga boyu (240.2 nm) görülmüştür. Bu dalga boyunda (240.2 nm) ölçülen $dA/d\lambda$ değerlerinden yararlanılarak miktar tayininin yapılabileceği kanısına varılmıştır. Elde edilen 1. türev spektrumunun daha iyi olabilmesi için yapılan çalışmalarda $\Delta\lambda = 2$ nm olarak smoothing (düzleme) yapılmasının uygun olduğu saptanmıştır.

1. türev spektrumunda (Şekil 3.11) 240.2 nm'de ölçülen analitik sinyaller konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek regresyon analizleri yapılmıştır. Elde edilen regresyon eşitlikleri yardımıyla (Çizelge 3.8) tarafımızdan hazırlanan **DİF + İZO** standart karışımlarındaki **İZO** miktarı hesaplanarak ortalama % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.8 ve Çizelge 4.1). Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi 240.2 nm'de çalışıldığında elde edilen ortalama % geri kazanım değeri % 98.53 olarak bulunmuştur. Ayrıca yöntemdeki % bağıl standart sapma değerleri de hesaplanmış ve bu değerin % 0.93 olduğu bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmalarda **DİF + İZO** karışımında 1. türev spektrofotometri ile **İZO**'nun miktarının tayin edilmesi yönteminde doğrusal çalışma aralığının 60 – 260 $\mu\text{g/mL}$ olduğu saptanmıştır.

Yöntemde **İZO** için TAS, 60 µg/mL olarak alınmış, YS ise 2.86 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar yöntemin oldukça duyarlı olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.1. Sentetik karışımlara geliştirilen yöntemler uygulandığında elde edilen ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri

	PCR		¹ D		YPSK	
	n = 8		n = 18		n = 9	
	İZO	DİF	İZO	DİF	İZO	DİF
Ortalama % geri kazanım (±SS)	98.74 (± 1.47)	99.85 (± 0.97)	98.53 (± 0.91)	101.31 (± 0.68)	99.82 (± 1.98)	100.45 (± 1.04)
% BSS	1.49	0.94	0.93	0.67	1.97	1.04
Çalışma aralığı (µg/ml)	60 – 260	2.4 - 48	60 - 260	2.4 – 48	50 - 400	4 - 48
TAS	60	2.4	60	2.4	50	2.4
YS	4.03	0.28	2.86	0.08	0.22	0.76

SS = standart sapma, BSS= bağıl standart sapma, TAS= Tayin alt sınırı, YS= Yakalama sınırı

4.1.3.YPSK ile yapılan çalışmalar

Yöntemi optimize etmek için yapılan çalışmalar sonucunda; en iyi ayrımın ACE C18 ters faz kolonu (250 mm x i.d. 4.6 mm. 5 µm) üzerinde hareketli (hareketli) faz olarak metanol – su (95:5, v/v) ve 20 µL enjeksiyon hacmi kullanılarak 1 mL/dak. akış hızı ile elde edildiği saptanmıştır. Dedeksiyon 280 nm’de yapılmıştır. İç standart (IS) olarak çeşitli maddeler denenmiş ve en uygun piki veren klorzoksazon seçilmiştir. Yöntemde alıkonma zamanları (retention time) klorzoksazon (IS) için sırasıyla 3.04 dakika, **DİF** için 3.46 dakika ve **İZO** için 4.59 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 3.12).

Yöntemdeki doğrusal çalışma aralıklarının **DİF** için 2.4 – 48.0 µg/mL, **İZO** için 50.0 – 400.0 µg/mL olduğu saptanmıştır.

Yöntemin validasyonu konusunda yapılan çalışmalarda; ortalama % geri kazanım değerleri **DİF** için %100.45, **İZO** için %99.82, %BSS değerleri ise sırasıyla **DİF** ve **İZO** için %1.04 ve %1.97 olarak bulunmuştur. Bu değerler yöntemin doğruluğu ve kesinliği açısından tatmin edicidir.

4.2. Yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanması

DİF + **İZO** karışımında her iki etken maddenin de miktar tayini için geliştirilen ¹D, spektrofotometrik verilerin kemometrik tekniklerle işlenmesi (TBR) ve YPSK yöntemlerinin bu iki etken maddeyi içeren farmasötik preparatlara uygulanabilirliği araştırılmıştır:

Bilindiği gibi farmasötik preparatların içerisinde etken maddelerin yanında çeşitli yardımcı maddeler de bulunmaktadır. Bizim seçmiş olduğumuz

preparatlardaki krem bazının yöntemi etkileyip etkilemediğinin öncelikle saptanması gerekir. Bunu yapabilmek için **DİF + İZO** karışımını içeren TRAVAZOL® krem ve TRAVACORT® krem içerisindeki (seçilen batch (üretimlerde) lerdeki) **DİF** ve **İZO**'nun miktarı önerilen tüm yöntemlerle tayin edilmiştir. Sonra tayin işleminde kullanılan preparata bilinen miktarda ayrı ayrı **DİF** ve **İZO** katılmış ve sonra bu miktarlar tayinde kullanılan çözücülerdeki çözeltileri seyreltilerek her iki maddenin konsantrasyonları yöntemdeki çalışma aralıklarına getirildikten sonra miktarları tayin edilmiştir. Hem standart ilavesinden önce hem de sonra tayin edilen **DİF** ve **İZO**'ün miktarlarının arasındaki farkın çok küçük olduğu saptanmıştır. Böylece bu krem preparatlarındaki yardımcı maddelerin yöntemi etkilemediği sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla 3.2.5, 3.3.4 ve 3.4.2 bölümlerinde anlatıldığı şekilde yöntemler TRAVAZOL® krem ve TRAVACORT® krem preparatlarının seçilen batch lerine uygulanmış ve çalışılan seriler için bulunan **DİF** ve **İZO**'nun miktar tayini sonuçları Çizelge 3.6, 3.17, 3.12, 3.13, 3.20 ve 3.21'da gösterilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin seçilen farmasötik preparata uygulanması konusunda ise

Herşeyden önce krem preparatları ile çalışmak tablet, kapsül veya damla gibi preparatlarda olduğundan daha zahmetli ve zor çalışmalardır. Çoğu zaman bu tür preparatlardaki krem bazı nedeniyle fazla miktarda girişim söz konusu olur ve bir ekstraksiyon işlemi gerekir ki bu işlem hem zaman alıcı hem pahalı hem de duyarlılığı düşürücü işlemlerdir. Bu nedenle bu tez kapsamı içerisinde geliştirilen yöntemler

seçilen krem preparatları içerisinde hiçbir ayırım yapmaksızın **DİF** ve **İZO**'nun aynı anda miktar tayinlerine olanak sağlamaktadır.

Tüm yöntemlerde bu farmasötik preparatlar içerisindeki **DİF** ve **İZO** için bulunan değerlerin ortalama miktarları, birbirleriyle student's *t* testi yardımı ile karşılaştırılmıştır (izelge 4.2 ve izelge 4.3) ve hesaplanan değerin $p = 0.05$ için izelge değerinden (bu çalışma için 1.96 dır) küçük olması nedeniyle (izelge 4.2) TRAVAZOL[®] krem ve TRAVACORT[®] krem'e uygulanan yöntemlerle **DİF** ve **İZO** için bulunan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı anlaşılmıştır.

Çizelge 4.2. TRAVAZOL® preparatına geliştirilen yöntemler uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/ 1 g krem)
(Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg **DİF** + 10 mg **İZO** / 1 g krem)

Kullanılan Yöntemler	İZO			DİF		
	$\bar{x} \pm SS$	Hesaplanan t değerleri	Hesaplanan F değerleri	$\bar{x} \pm SS$	Hesaplanan t değerleri	Hesaplanan F değerleri
¹D	10.05 ± 0.19	YPSK - ¹ D = 0.57 YPSK - TBR = 1.91 ¹ D – PCR = 1.68	YPSK - ¹ D = 1.14 YPSK - TBR = 1.31 ¹ D – PCR = 1.50	1.02 ± 0.01	YPSK - ¹ D = 1.53 YPSK - TBR = 1.68 ¹ D – TBR = 1.06	YPSK - ¹ D = 1.66 YPSK - TBR = 1.52 ¹ D – TBR = 2.52
TBR	10.24 ± 0.20			0.99 ± 0.01		
YPSK	10.08 ± 0.10			1.03 ± 0.02		

Gözlenen sonuçlar, 3 yöntem için 9 adet deneyin ortalama sonuçlarıdır.

p = 0.05 için Çizelge değeri $t = 1.96$

Çizelge değeri $F = 3.44$

Çizelge 4.3. TRAVACORT[®] preparatına geliştirilen yöntemler uygulandığında **DİF** ve **İZO** için elde edilen sonuçlar (mg/ 1 gram krem)
(Preparat üzerinde yazılı olan miktarlar : 1 mg **DİF** + 10 mg **İZO** / 1 g krem)

Kullanılan Yöntemler	İZO			DİF		
	$\bar{x} \pm SS$	Hesaplanan t değerleri	Hesaplanan F değerleri	$\bar{x} \pm SS$	Hesaplanan t değerleri	Hesaplanan F değerleri
¹D	9.76 ± 0.11	YPSK - ¹ D = 1.43 YPSK - TBR = 1.95 ¹ D – TBR = 1.91	YPSK - ¹ D = 2.17 YPSK - TBR = 3.35 ¹ D – TBR = 1.54	1.01 ± 0.01	YPSK - ¹ D = 1.10 YPSK - TBR = 1.46 ¹ D – TBR = 1.06	YPSK - ¹ D = 1.69 YPSK - TBR = 1.41 ¹ D – TBR = 1.20
PCR	9.64 ± 0.17			0.98 ± 0.01		
YPSK	10.05 ± 0.08			0.99 ± 0.01		

Gözlenen sonuçlar, 3 yöntem için 9 adet deneyin ortalama sonuçlarıdır.

p = 0.05 için Çizelge değeri $t = 1.96$

Çizelge değeri $F = 3.44$

4.3. Geliştirilen yöntemlerin birbirleriyle karşılaştırılmaları

Yaptığımız literatür taramasına göre **DİF** ve **İZO** içeren karışımlarda ve bu karışımları içeren farmasötik preparatlarda elde edilen verilere kemometrik teknikleri uygulayarak, YPSK ve ¹D ile veya başka bir analitik yöntemle **DİF** ve **İZO**'nun aynı anda miktar tayinlerinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla yapılan çalışmalar tamamen orijinaldir. Bu nedenle de geliştirilen yöntemler ne bir başka literatürdeki yöntemle ne de bir farmakope yöntemiyle karşılaştırılamamıştır. Ancak kendi aralarında karşılaştırılmışlardır. Buna göre; spektrofotometrik verilere kemometrik yöntem (TBR) uygulayarak geliştirdiğimiz miktar tayini işlemlerinde orijinal (0. derece) spektrumların kullanılabilmesi bir avantaj olurken hesaplamaların yapılması için mutlaka bilgisayarda matematik programlarının kullanılmasının gerekliliği bir dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır. ¹D yöntemi ise uzun bilgisayar işlemlerini gerektirmekte (bu işlem spektrofotometrelere yüklenen bilgisayar programlarıyla günümüzde çok hızlı olarak yapılmaktadır) ama oldukça duyarlı sonuçlar vermektedir. **DİF + İZO** karışımında **DİF** ve **İZO**'nun miktar tayini için TBR, ¹D ve YPSK yöntemleriyle elde edilen sonuçlar uyumludur ve her üç yöntemde de hiçbir ön ayırma işlemi gerekmez. Bu karışımında **DİF** ve **İZO**'nun aynı anda miktar tayinleri yapılabilmektedir. Seçilen preparatlara bu üç yöntemle elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında aralarında anlamlı bir farkın olmadığı yani elde edilen sonuçların p:005 için güven aralığı içerisinde birbirleri ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamı içerisinde **DİF** ve **İZO** içeren karışımlarda **DİF** ve **İZO**'nun aynı anda miktar tayinlerinin yapılabilmesi için 3 değişik yöntem geliştirilmiştir. Bunlar; spektrofotometrik verilere temel bileşen regresyonu (TBR) tekniğinin uygulanması, 1. türev spektrofotometri (¹D) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK)'dir.

TBR yönteminde; standart çözeltiler kullanılarak hazırlanan kalibrasyon matrisleri yardımıyla **DİF** ve **İZO** için 242 - 298 nm'ler arasında $\Delta\lambda = 2$ nm olarak 29 dalga boyunda okunan absorbansların değerlendirilmesi ile karışımdaki **DİF** ve **İZO**'ın aynı anda miktarı tayini gerçekleştirilmiştir.

¹D yönteminde; **DİF** ve **İZO**'nun metanol – su (3:1) çözeltisi içerisindeki karışım çözeltilerinin ayrı ayrı 1. türev spektrumları çizdirilerek bu spektrumlarda **DİF** ve **İZO**'nun türev absorbans değerinin sıfır olduğu dalga boyları bulunduktan sonra, o dalga boylarında diğer madde için $dA/d\lambda$ değerleri okunmuş ve konsantrasyona karşı $dA/d\lambda$ değeri olmak üzere göre hazırlanan kalibrasyon grafikleri yardımıyla, karışımdaki **DİF** ve **İZO**'ın aynı anda miktarı tayini gerçekleştirilmiştir.

YPSK'de ise; ACE C18 kolonu üzerinde metanol–su (95:5, h/h) hareketli fazı kullanılarak, 280 nm'de deteksiyon ile elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarının, iç standart olarak seçilen klorzoksazonın pik alanına bölünmesi ile elde edilen değerlerin, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmesi ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri yardımıyla, karışımdaki **DİF** ve **İZO**'nun aynı anda miktarı tayini gerçekleştirilmiştir.

Anılan üç yöntem de optimize edildikten sonra valide edilmişlerdir. Bu üç yöntemin Türkiye ilaç piyasasında bulunan iki adet krem preparatına uygulaması için optimal şartlar belirlenmiş ve hiçbir ön ayırma işlemi gerekmeden preparatın içerisinde bulunan **DİF** ve **İZO**'nun aynı anda miktarı tayini gerçekleştirilmiştir. Böylece tez çalışmalarımıza başlarken belirlediğimiz amaca ulaşılmıştır.

DİF + İZO karışımı içerisinde **DİF** ve **İZO**'nun miktar tayini için kapiler elektroforez yönteminin de uygulanabileceği düşünülmüş olup bu doğrultuda çalışma yapılması da planlanmaktadır.

ÖZET

Diflukortolon valerat ve izokonazol nitrat'ın farmasötik preparatlarda spektrofotometrik yöntemlerle aynı anda miktar tayinleri

Bu tez kapsamında; diflukortolon valerat (**DİF**) ve izokonazol nitrat (**İZO**) içeren bir karışımda her iki maddenin aynı anda miktar tayininin yapılabilmesi için yeni yöntemler geliştirilmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda spektrofotometrik yöntemler temel alınmış ve 1. türev spektrofotometri (¹D) ve spektrofotometrik verilerin temel bileşen regresyonu (TBR) yöntemleriyle analiz bu amaçla kullanılmıştır.

¹D yönteminde, **DİF** + **İZO** karışımının metanol – su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin 200 – 400 nm arasındaki spektrumlarının 1. türevinde, **DİF** için 247.8 nm' de, **İZO** için ise 240.2 nm'de analitik sinyaller okunmuştur ($\Delta\lambda = 2$ nm, skala faktörü = 20). TBR yönteminde ise, **DİF** ve **İZO** için metanol – su (3:1) içerisindeki çözeltilerinin orijinal UV spektrumlarının (0. derece) 242 - 298 nm'ler arasındaki bölgede $\Delta\lambda = 2$ nm olarak 29 adet dalga boyundaki absorbansları okunmuş ve TBR ile analizleri yapılmıştır. Yöntemlerdeki ortalama % geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri sırasıyla **DİF** için; ¹D'de % 101.31 ve % 0.67, TBR'de % 99.85 ve % 0.94, **İZO** için; ¹D'de % 98.53 ve % 0.93, TBR'de % 98.74 ve % 1.48 olarak bulunmuştur. Yöntemlerdeki çalışma aralıkları ¹D ve TBR'de **DİF** için 2.4 – 48.0 µg/mL, **İZO** için 60 – 260.0 µg/mL olduğu saptanmıştır. Geliştirilen bu iki spektrofotometrik yöntem Türkiye ilaç piyasasında bulunan 2 adet krem preparatına başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca yeni bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde kolon olarak ACE C18 ters faz kolonu, hareketli faz olarak metanol - su (95:5 h/h) kullanılmış ve deteksiyon 280 nm'de yapılmıştır. İç standart olarak klorzoksazon seçilmiştir. Yöntemde alıkonma zamanları klorzoksazon için 3.04 dakika, **DİF** için 3.46 dakika ve **İZO** için 4.59 dakikadır. Yöntemdeki ortalama % geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri sırasıyla **DİF** için % 100.45 ve % 1.04, **İZO** için % 99.82 ve % 1.97 olarak bulunmuştur. Yöntemdeki çalışma aralığının **DİF** için 4.0 – 48.0 µg/mL **İZO** için 50.0 – 400.0 µg/mL olduğu saptanmıştır. Geliştirilen YPSK yöntemi de aynı preparata uygulanmış ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Farmasötik preparat; Diflukortolon valerat; İzokonazol nitrat; Sıvı kromatografi; Türev spektrofotometri; Temel bileşen regresyonu.

SUMMARY

Simultaneous spectrophotometric determination of diflucortolone valerate and isoconazole nitrate in pharmaceutical preparations

In the scope of this thesis, studies were conducted in order to develop new methods for the simultaneous determination of diflucortolone valerate (**DIF**) and isoconazole nitrate (**IZO**) in their binary mixture. In the studies spectrophotometric analysis were essential and first derivative spectrophotometry (¹D) and principle component regression (PCR) methods were used for this purpose.

In ¹D method, analytical signals were measured at 247.8 nm for **DIF**, and 240.2 nm for **IZO** in the first derivative spectra of the solution of **DIF** + **IZO** mixture in methanol – water (3:1) in 200 – 400 nm range ($\Delta\lambda = 2$ nm, scaling factor = 20). In PCR method, absorbances were measured at 29 wavelengths between 242-298 nm ($\Delta\lambda = 2$ nm) for **DIF** and **IZO** in original absorption spectra of **DIF** + **IZO** mixture in methanol – water (3:1) and, PCR analysis was achieved. For **DIF** mean recoveries and relative standard deviations were found as % 101.31 and % 0.67 in ¹D; % 99.85 and % 0.95 in PCR methods respectively. They are % 98.53 and % 0.93 in ¹D; % 98.74 and % 1.48 in PCR for **IZO** respectively. Working ranges were 2.4 – 48.0 µg/mL in ¹D and PCR for **DIF**. The range is 60.0 – 260.0 µg/mL in ¹D and PCR for **IZO**. These two methods were successfully applied to two cream formulations marketed in Turkey. Moreover we developed an HPLC method in which ACE C18 reverse phase column and methanol - water (95:5 v/v) hareketli phase was used and 280 nm was selected for detection. Chlorzoxazone was chosen as internal standard. Retention times were 3.04 min. for chlorzoxazone, 3.46 min. for **DIF** and 4.59 min. for **IZO**. Mean recoveries and relative standard deviations are % 100.45 and % 1.04 for **DIF**; % 99.82 and % 1.97 for **IZO** respectively. In HPLC method, working ranges were found as 4.0 – 48.0 µg/mL for **DIF** and 50.0 – 400.0 µg/mL for **IZO**. HPLC method was also applied to the same formulation selected and the results were compared with each other statistically.

Keywords: Pharmaceutical preparation; Diflucortolone valerate; Isoconazole nitrate; Liquid chromatography; Derivative spectrophotometry; Principal component regression.

KAYNAKLAR

- AMIN, M., SCHNEIDER, P. W. (1978). Quantitative analysis of active substances in liquid pharmaceutical preparations using high-performance liquid chromatography. *Analyst* (Cambridge United Kingdom), 103 (1228), 728-33
- ATKINSON, A.C. (1985). *Plots, Transformation and Regression*. Oxford University THKT, New York
- BEEBE, K.R., KOWALSKI, B.R. (1987). An introduction to multivariate calibration and analysis. *Analytical Chemistry*, 59 : 1007 A – 1017 A
- BOOKSH, K.S., KOWALSKI, B.R. (1994). Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, 66 : 782 A – 791 A
- BOX, G.E.P. (1980). Sampling and Bayer inference in scientific modeling and robustness. *Journals of the Royal Statistical Society, Series A*. 143 : 383 – 404
- BRITISH PHARMACOPOEIA. Stationary Office Books; 2000 Edition., 2000 London
- CAVRINI, V., DI PIETRA, A.M., GATTI, R. (1992). HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 10 (10 - 12), 873 - 879.
- COOK, R.D., WEISBERG, S. (1982). *Residuals and influence in regression*. Chapman and Hill, New York
- COWE, I.A., McNICOL, J.W. (1985). The use of principal components in the analysis of near – infrared spectra. *Applied Spectroscopy*, 39 : 257 - 266
- DUTTER, R., HUBER, P.J. (1981). Numerical methods for the nonlinear robust regression. *Journal of Statistical Computation and Simulation*. 13 : 79 – 114
- FRANK, I.E. (1990). Nonlinear PLS model. *Chemometrics International Laboratory System*, 8 : 109 – 119

- FREDERICKS, P.M., LEE, J.B., DSBORN, P.R., SWINK, D.A. (1985). An excellent reference to PCR and PCA methods. *Applied Spectroscopy*, 39 : 303 – 310
- GAGLIARDI, L., DE ORSI, D., DEL GIUDICE, M.R., GATTA, F., PORRA, R., CHIMENTI, P. (2002). Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products. *Analytica Chimica Acta*, 457(2): 187-198
- GALBRAITH, A., SHANE, B., ELIZABETH M., BARRY H., ANN R. (2007). *Fundamentals of Pharmacology: An Applied Approach for Nursing and Health*. United Kingdom: Pearson Education LTD. pp. 632.
- GELADI, P., KOWALSKI, B.R. (1986). Partial least squares regression A: Tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185 : 1 - 17
- HAALAND D.M., THOMAS, E.V., (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1.Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Analytical Chemistry*, 60: 1193-1202.
- HAWKINS, D.M. (1993). The feasible set algorithm for least median of squares regression. *Computational Statistics and Data Analysis*. 16 : 81 – 101
- ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS, CLARKE'S. Littenhouse Book Distributions. Inc., 1986. Pennsylvania, USA.
- JOCHUM, P., SCHROT, E.L. (1984). Deconvolution of multicomponent ultraviolet and visible spectra. *Analytica Chimica Acta*, **157** : 211 - 216
- KAZAKEVICH, Y., LoBRUTTO, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientist*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA
- KISNER, H.J., BRIWN, C.W., KAVARNOS, G.I. (1983). Multiple analytical frequencies and standards for the least – squares spectrophotometric analysis of serum lipids. *Analytical Chemistry*, 55 : 1703 – 1707
- LAWRENCE, K.D., ARTHUR, J.L. (1990). Robust nonlinear regression. Analysis and Application. Marcel Dekker, New York. 59 – 86
- MAEDA, Y., OQADA, K., YAMAMOTO, M., SATO, S., MASUI, T. (1987). Simultaneous analysis of corticostreoids and parabens by reverse phase high performance liquid chromatography. *Shizuoka-ken Eisei Kankyo Senta Hokoku*, 30. 35-9.(*Chemical Abstracts*, Vol: 110, 69500v, 1989)

- MAEDA, Y., OQADA, K., YAMAMOTO, M., SATO, S., MASUI, T., NAKAZAWA, H. (1988). Simultaneous determination of corticostereoids and parabens in ointments by HPLC. *Bunseki Kagaku*, 37(12). 648-53. (Chemical Abstracts, Vol: 110, 63841k, 1989).
- MARTENS, L., NAES, T. (1984). Multivariate calibration. I. Concepts and distinction. *Trends in Analytical Chemistry*, 3: 204 – 211
- MILLER, J.N. (1991). Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2: Calibration and regression review. *Analyst*, 116 : 3 – 14
- NAES, T., MARTENS, L. (1984). Multivariate calibration. II. Chemometric methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 3: 266 - 271
- OWEN A. J., (1995). Uses of Derivative Spectroscopy; *UV-visible Spectroscopy, Application Note*, Agilent Technologies, Germany.
- ÖZDEMİR, D. “Multi-instrument calibration using genetic regression in UV-visible and near-infrared spectroscopy”. Doktora tezi, Mayıs 1999. Clemson University, South Carolina, USA.
- PALABIYIK, I.M., ASAN, D., ONUR, F. (2007). Liquid chromatographic and spectrophotometric determination of diflucortolone valerate and chlorquinaldol in creams. *JFDA*, 15 (12), 145-150.
- RATKOWSKY, D.A. (1990). *Handbook of nonlinear regression models*. Marcel Dekker. New York
- RENCER, A.C. (1995). *Methods of multivariate analysis*, John Wiley & Sons Inc. New York
- RILEY ve ROSANSKE, 1996; Development And Validation Of Analytical Methods, Tarrytown, N.Y., Pergamon, 1996.
- ROECKER, E.B. (1991). Prediction error and its estimation for subset – selected models. *Tecnometrics*. 33: 459 – 468
- RXMEDIAPHARMA® İNTERAKTİF İLAÇ BİLGİ KAYNAĞI, (2009), GEMAŞ GENEL MÜHENDİSLİK Mekanik Sanayi ve Tic. A.Ş., İzmir
- SEKULIC, S., SEASHOLTZ, M.B., WANG, Z., KOWALSKI, B.R., LEE, S.E., HOLT, B.R. (1993). Nonlinear multivariate calibration methods in analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, 65 : 835A – 845 A
- SJOSTROM, M., WOLD, S., LINDBERG, W., PERSSON, J.A., MARTENS, H. (1983). A multivariate calibration problem in analytical chemistry solved by partial least squares models in latent variables. *Analytica Chimica Acta*, 150 : 61 – 70

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. (1998). (Çeviri editörleri Prof. Dr. Esma KILIÇ, Prof. Dr. Fitnat KÖSEOĞLU, Doç Dr. Hamza YILMAZ) *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Birinci Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, Türkiye

STROMBERG, A.J. (1993). Computing the exact least median of squares estimate and stability diagnostics in multiple linear regression. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*, **14** : 1289 – 1299

STROMBERG, A.J., RUPPERT, D. (1989). Breakdown in nonlinear regression. *Journal of the American Statistical Association*, **87** : 991 – 997

THE MERCK INDEX. 12th Edition. *Merck & Co. Inc.* Whitehouse Station New Jersey 1996

THOMAS, E.V. (1994). A primer on multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, **66** : 795 A – 804 A

USP 23 - NF 18 (1994). *The United States Pharmacopeia & The National Formulary*, United States Pharmacopeial Convention, Inc, US Pharmacopeia, Washington

WENTZELL, P.D., ANDREWS, D.T., KOWALSKI, B.R. (1997). Maximum likelihood multivariate calibration. *Analytical Chemistry*, **69** : 2299 - 2311

ÖZGEÇMİŞ

I- BİREYSEL BİGİLER

Adı : Elif
 Soyadı : Karacan
 Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara / 30.09.1983
 Uyuđu : T.C.
 İletişim Adresi ve Telefonu :100. Yıl İşçi Blokları Mah.
 17/B Blok C Kanat No:5
 Çankaya / Ankara
 Tlf : 0 312 285 82 31
 0 539 781 96 67

II- EĞİTİMİ

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya	2007– 2009
Anabilim Dalı - Tezli yüksek lisans	
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2000 – 2006
Ankara Cumhuriyet Lisesi	1994 – 2000
Hamdullah Suphi İlköğretim Okulu	1989 – 1994

Yabancı dili: İngilizce

III- ÜNVANLARI

Kimyager 2006

IV- MESLEKİ DENEYİMİ

06.2004-09.2004	Ankara Üniversitesi SKSD Biyokimya Laboratuvarı (Stajer)
10.2005-06.2007	Ankara Ölçü Dersanesi – Kimya Öğretmeni