

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOMBİNE FARMASÖTİK PREPARATLARDAN
TELMİSARTAN VE HİDROKLOROTİYAZİD'İN
KEMOMETRİK KALİBRASYON YÖNTEMLERİYLE
AYNI ANDA MİKTAR TAYİNLERİ**

Beliz KAYA

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Erdal DİNÇ**

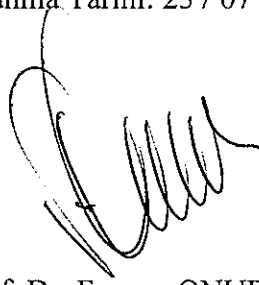
2007-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Yüksek Lisans **Programı**

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

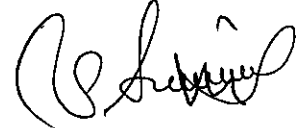
Tez Savunma Tarihi: 23 / 07 / 2007



Prof. Dr. Feyyaz ONUR
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Ali Osman SOLAK
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi



Doç. Dr. Erdal DİNÇ
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi



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

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler.....	iii
Önsöz.....	vii
Simgeler ve Kısaltmalar.....	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
 1.GİRİŞ.....	 1
 2. GENEL BİLGİLER.....	 3
1.1. Telmisartan.....	3
1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	3
1.1.2. Farmakolojik özellikleri.....	4
1.2. Hidroklorotiyazid.....	6
1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler.....	6
1.2.2. Farmakolojik özellikleri.....	7
1.3. Telmisartan ve Hidroklorotiyazid İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri	8
1.3.1. Telmisartanın Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler.....	8
1.3.1.1. Spektrofotometri	8
1.3.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK).....	9
1.3.1.3 Kapiller Elektroforez.....	9
1.3.1.4. Spektrofluorimetri.....	10
1.3.1.5. Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometrisi.....	11
1.3.2. Hidroklorotiazid Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemleri.....	11
1.3.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler.....	11
1.3.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi.....	15
1.3.2.3. Kemometri.....	21
1.3.2.4. Kapiller Elektroforez.....	21

1.3.2.5. Polarografi.....	21
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
2.1. Spektrofotometri.....	23
2.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi.....	29
2.2. Kemometri.....	32
2.2.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları (Multivariate Calibration Algorithms)	35
2.2.1.1. Klasik en küçük kareler yöntemi (Classical Least Squares (K-matris) method)	35
2.2.1.2. Ters en küçük kareler (P-matris) yöntemi..... (Inverse Least Squares method)	36
2.2.1.3. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi..... (Principal component regression method)	36
2.2.1.4. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Least Squares Regression Method)	39
2.2.1.5.Yapay Sinir Ağları (Artificial Neural Networks).....	41
2.2.1.5.1. Mcculloch-pitts'in Sinir (Neuron) Modeli.....	42
2.2.1.5.2. Sinir Modeli ve Ağ Mimarileri (Neuron Model and NetworkArchitectures)	44
2.2.1.5.2. 1. Basit sinir modeli (Simple Neuron model).....	44
2.2.1.5.3. Taşıma Fonksiyonları (Transfer Functions).....	45
2.2.1.5.4. ÇokTabakalı Sinir Ağ Mimarisi.....	45
2.2.2. Kalibrasyon (konsantrasyon) Setinin Tasarımı.....	46
2.2.3. Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-validation Procedure).....	46
2.3. Gereçler.....	47
2.3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler.....	47
2.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	47
2.3.3. Analiz edilen bileşiklerin ticari preaparatları.....	47
3.BULGULAR.....	48
3.1. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması	48

3.2. Spektral Koşulların Optimizasyonu	50
3.2.1. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi	53
3.2.1.1. Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu.....	53
(Principal Component Regression Calibration)	
3.2.1.2. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu.....	53
3.2.1.3. PCR Yöntemi için ANOVA Testi.....	57
3.2.1.4. PCR Yönteminde İstatistiksel Analiz.....	57
3.2.1.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası.....	57
3.2.1.4.2. Tayinin Standart Hatası.....	59
3.2.1.5. PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması.....	60
3.2.2. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi	62
3.2.2.1. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu	62
(Partial Least-Square Calibration)	
3.2.2.2. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu.....	62
3.2.2.3. PLS Yöntemi için ANOVA Testi.....	66
3.2.2.4. PLS Yönteminde İstatistiksel Analiz.....	67
3.2.2.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası.....	67
3.2.2.4.2. Tayinin Standart Hatası.....	68
3.2.2.5. PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması.....	70
3.2.3. Yapay Sinir Ağları Yöntemi.....	72
3.2.3.1. Yapay Sinir Ağları Yöntemi Kalibrasyonu.....	72
(Artificial Neural Networks Calibration)	
3.2.3.2. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu.....	72
3.2.3.3. ANN Yöntemi için ANOVA Testi.....	76
3.2.3.4. ANN Yönteminde İstatistiksel Analiz.....	77
3.2.3.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası.....	77
3.2.3.4.2. Tayinin Standart Hatası	78
3.2.3.5. ANN Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması.....	80
3.2.4. Türev Spektrofotometri (Karşılaştırma Yöntemi).....	82
3.2.4.1. Standart Çözeltiler.....	82
3.2.4.2. Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması.....	82

3.2.4.3. Türev Yönteminin Validasyonu.....	84
3.2.4.4. Türev Yöntemi için ANOVA Testi.....	88
3.2.4.5. Türev Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması.....	88
3.2.5. İstatiksel Analiz.....	90
 4. TARTIŞMA.....	 91
 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	 93
 ÖZET.....	 94
SUMMARY.....	96
KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÖNSÖZ

Bu tez kapsamında TEL ve HCT içeren farmasötik preparatların kantitatif analizi için üç yeni kemometrik yöntem geliştirildi ve elde edilen sonuçlar geliştirilen klasik türev yöntemiyle karşılaştırıldı. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, önerilen yöntemler, TEL ve HCT'nin kalite kontrol ve rutin analizleri için gerek ilaç sanayinde gerekse araştırmalarda ileriki çalışmalara basamak olacaktır.

Yüksek lisans tezindeki çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Erdal DİNÇ'e teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans programı ders döneminde teorik bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen, başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof.Dr.Feyyaz ONUR'a ve diğer anabilim dalımız öğretim üyelerine sonsuz teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca anabilim dalımız araştırma görevlilerine yakın ilgilerinden ve desteklerinden dolayı teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Kim. Gözde PEKTAŞ' a teşekkür eder herşeyin gönlünce olmasını dilerim.

Hayatım boyunca ve tezim sırasında desteklerini üzerimden eksik etmeyen aileme teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

HCT: Hidroklorotiyazid

TEL: Telmisartan

ANN: Artificial Neural Networks (Yapay sinir ağları yöntemi)

ANOVA: Varyans Analizi (Analysis of Variance)

BH: % Bağlı hata

BSS: % Bağlı standart sapma

CLS: Classical Least-Squares (Klasik en küçük kareler yöntemi)

DS: Türev spektroskopi yöntemi (Derivative Spectrophotometry)

GA: Güven aralığı

GK: % Geri kazanım

ILS: Inverse Least-Squares (Ters en küçük kareler yöntemi)

LOD: Yakalama sınırı

LOQ: Tayin sınırı

PCR: Principal Komponent Regression (Temel bileşen regresyonu yöntemi)

PLS: Partial Least-Squares (Kısmi en küçük kareler yöntemi)

PRESS: Predicted Residual Error Some of Squares (Tahmin edilen hataların karelerinin toplamı)

R: Korelasyon tanımlayıcı katsayısı

SEC: Standard Error of Calibration (Kalibrasyonun standart hatası)

SEP: Standard Error of Prediction (Tayinin standart hatası)

SH: Standart hata

SS: Standart sapma

YBSK = Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Telmisartanın açık formülü.....	3
Şekil 1.2. Telmisartanın (8 µg/mL) methanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu.....	4
Şekil 1.3. Hidroklorotiyazidin açık formülü.....	6
Şekil 1.4. Hidroklorotiyazid'in (9 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu.....	7
Şekil 2.1. Enerji seviyeleri arasındaki fark.....	24
Şekil 2.2. Moleküldeki enerji seviyeleri.....	24
Şekil 2.3. Sürekli spektrum (moleküldeki elektronik geçişler ve UV-görünür spektrum).....	26
Şekil 2.4. Numune üzerine gönderilen (I_0) ve çıkan (I) ışığın şiddeti.....	26
Şekil 2.5. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları.....	29
Şekil 2.6. Bir çift ışık yollu (double beam) spektrofotometrenin optik sistemi ve bileşenleri.....	31
Şekil 2.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler.....	34
Şekil 2.8. PLS2 kalibrasyonu.....	39
Şekil 2.9. Biyolojik sinirin (nöronun) yapısı.....	41
Şekil 2.10. Biyolojik ve yapay sinirler (neurons).....	42
Şekil 2.11. Doğrusal eşik fonksiyonu.....	43
Şekil 2.12. Doğrusal eşik fonksiyonu (Linear threshold function).....	43
Şekil 2.13. A) Sapmasız basit sinir modeli ve B) sapmalı basit sinir modeli.....	44
Şekil 2.14. Taşıma fonksiyonu modelleri (Transfer function models).....	45
Şekil 2.15. Taşıma fonksiyonu modelleri (Transfer function models).....	45
Şekil 3.1. Kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği.....	50
Şekil 3.2. TEL (8 µg/mL) (—) ve HCT (9 µg/mL) (----) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın (.....) absorpsiyon spektrumları (Metanol içerisinde).....	51

Şekil 3.3. TEL ve HCT için Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1. de verilen kalibrasyon setinin absorpsiyon spektrumları (Metanol içerisinde).....	52
Şekil 3.4. PCR kalibrasyon basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	58
Şekil 3.5. PCR kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	58
Şekil 3.6. PCR tayin basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	59
Şekil 3.7. PCR tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	59
Şekil 3.8. PLS kalibrasyon basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	67
Şekil 3.9. PLS kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	68
Şekil 3.10. PLS tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	69
Şekil 3.11. PLS tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	69
Şekil 3.12. ANN kalibrasyon basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	77
Şekil 3.13. ANN kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	78
Şekil 3.14. ANN tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	79
Şekil 3.15. ANN tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar.....	79
Şekil 3.16. TEL için 1-26 $\mu\text{g/mL}$ (—) ve HCT için 1-17 $\mu\text{g/mL}$ (—) konsantrasyon aralığında; A) absorpsiyon spektrumları, B) Birinci türev spektrumları ve C) Üçüncü türev spektrumları	83

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. TEL ve HCT analizi için kalibrasyon seti.....	49
Çizelge 3.2. TEL ve HCT yapay karışımlarına PCR kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.....	54
Çizelge 3.3. PCR kalibrasyon yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları.....	55
Çizelge 3.4. Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri....	56
Çizelge 3.4.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları.....	57
Çizelge 3.5. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına PCR yöntemiyle uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.....	61
Çizelge 3.6. TEL ve HCT yapay karışımlarına PLS kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.....	63
Çizelge 3.7. PLS kalibrasyon yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları.....	64
Çizelge 3.8. Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri....	65
Çizelge 3.8.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları.....	66
Çizelge 3.9. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına PLS yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.....	71
Çizelge 3.10. TEL ve HCT yapay karışımlarına ANN kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.....	73
Çizelge 3.11. ANN kalibrasyon yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları.....	74
Çizelge 3.12. Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri...	75
Çizelge 3.12.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları.....	76

Çizelge 3.13. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına ANN yöntemiyle uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.....	81
Çizelge 3.14. Lineer regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları.....	84
Çizelge 3.15. TEL ve HCT nin yapay karışımlarının analizine türev yönteminin uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım değerleri.....	85
Çizelge 3.16. Türev yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları.....	86
Çizelge 3.17. Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri.....	87
Çizelge 3.17.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları.....	88
Çizelge 3.18. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına türev yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.....	89
Çizelge 3.19. Yöntemlerin karşılaştırılmasında elde edilen t-test ve F-test sonuçları (MİCARDİS PLUS® Tablet için).....	90
Çizelge 3.20. Yöntemlerin karşılaştırılmasında elde edilen t-test ve F-test sonuçları (PRİTOR PLUS® Tablet için).....	90

1. GİRİŞ

Analitik çalışmalarda tek başına, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımların kantitatif analizi için spektrofotometri, spektroflorimetri, infrared spektrofotometrisi, voltametri (polorografi), kromatografi, kütle spektrometrisi ve bu yöntemlerin kombine şekilleri kullanılmaktadır. Analiz işlemlerinde daha doğru, daha kesin, daha ekonomik, daha hızlı ve daha güvenilir sonuçlara ulaşmak için yeni teknik ve yaklaşımlara ihtiyaç olduğu bir gerçektir. Günümüzde sayılan bu özellikleri sağlayan analitik yöntemler geliştirmek amacıyla, klasik analitik yöntemler ile birlikte değişik matematiksel algoritmalara dayanan hesaplama teknikleri kombine olarak uygulanmaktadır. Özellikle klasik analitik yöntemler ile kemometrik kalibrasyonların karışım analizlerinde başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle farmosötik preparatların analizinde de artan yoğunlukta kullanıldığı yapılan çalışmalardan gözlenmektedir.

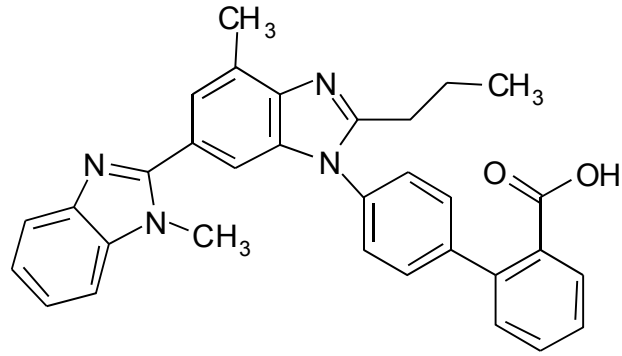
Farmosötik preparatlar, yardımcı maddelerden oluşan sabit matriks ve bir, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren numunelerdir. Analitik kimyada hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın veya bir ön ayırma işlemi kullanmaksızın kombine farmosötik preparatların aynı anda kantitatif analizi son derece önemlidir. Yapılan bilimsel çalışmalarda geliştirilecek analitik yöntemlerin, aktif bileşikler içeren farmosötik formülasyonların kalite kontrol ve rutin analizleri için ilaç sanayinde de kullanılabilir olması tez çalışmalarında da temel kriterlerden birisidir.

Bu tez kapsamında telmisartan ve hidroklorotiyazid içeren farmasötik preparatlarda bu etkin maddelerin miktar tayinleri için spektrofotometrik ölçümlere dayalı klasik en küçük kareler (classical least-squares), ters en küçük kareler (invers least-squares), temel bileşen regresyon (principle component regression), kısmi en küçük kareler (partial least-squares) ve yapay sinir ağları (artificial neural networks) yöntemleri geliştirilerek uygulanması planlanmaktadır.

Tez konusu telmisartan ve hidroklorotiyazid kombinasyonlarını içeren iki adet farmasötik preparat Türk ilaç piyasasında satılmaktadır. Bunlar Micardis Plus® (Boehringer Ingelheim) ve Pritor Plus® (GlaxoSmithKline) dır. Geliştirilecek yöntemler bu iki ticari preparatın analizine uygulanmıştır.

1.1. Telmisartan

1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 1.1. Telmisartanın açık formülü

Molekül Formülü: $C_{33}H_{30}N_4O_2$

Mol ağırlığı: 514,62

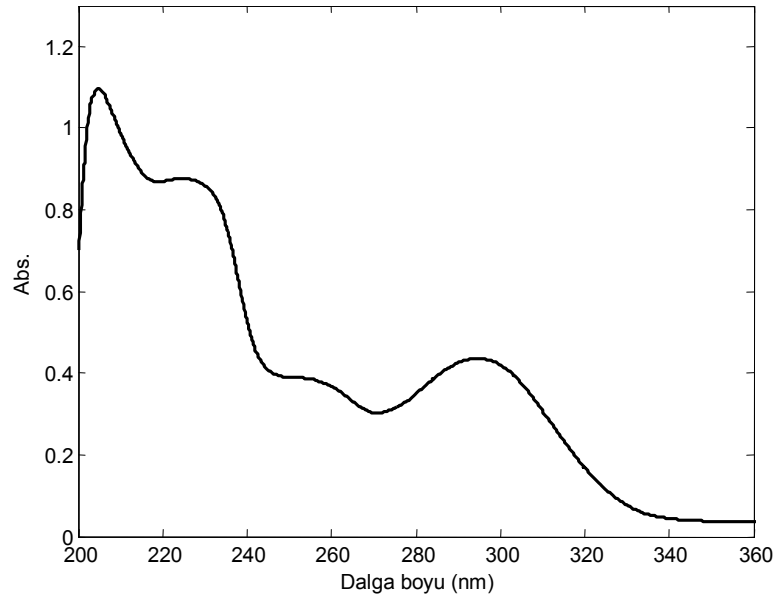
Açık Formülü: 4-((2-n-propil-4-metil-6-(1-metilbenzimidazol-2-il)- benzimidazol-1-il) metil) bifenil-2 karboksilik asit

Elementel Analizi: C %77.02 , H %5.88 , N%10.89 , O %6.22

Erime Noktası: 261-263 °C

Beyaz katı özellikte , alkolde çok, suda az çözünen bir tozdur.

UV max: 204.7 nm, 224.7 nm, 294.8 nm (Methanol içinde)



Şekil 1.2. Telmisartanın (8 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu.

1.1.2. Farmakolojik özellikleri

Proteinüri, böbrek hastalıklarının en sık rastlanan ve en önemli bulgularından birisidir. Proteinüriye sekonder gelişen farklı komplikasyonlar hastanın yaşamını tehdit edebilirler. Bu nedenle proteinüriyi azaltmaya yönelik yeni tedavi yaklaşımları arayışı günümüzde de devam etmektedir. Böbrek hastalığının ilerlemesinde rol oynayan mediyatörler arasında, anjiotensin H'nin (AH) glomerüler hemodinamik değişiklikleri ve permselektivite kaybını sürdürmede esas rol oynadığı görülmektedir. Renin angiotensin sistemi (RAS) aktivasyonu, arteriyel kan basıncı ve intraglomerüler basınç üzerine etkileri nedeniyle böbrek hastalığının ilerlemesine katkıda bulunabilir. Lokal ve sistemik hemodinamik regülasyona katılan vazoaaktif bir ajan olan AH'nin son zamanlarda renal ve kardiyovasküler patolojide gerçek bir sitokin gibi aktif rol oynadığı düşünülmektedir. Birkaç araştırmada AH'nin hücre büyümesini ve ekstraselüler matriks üretimini düzenleyen renal bir büyüme faktörü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca AH kemotaktik

faktörlerin sentezi vasıtasıyla böbrekte inflamatuvar cevaba da katılır. Kan basıncı regülasyonu ile su ve tuz homeostazisinde önemli fizyolojik işlevleri olan renin angiotensin sisteminin (RAS) temel peptidi olan Angiotensin II (AII), hipertansiyon, kalp ve böbrek yetersizliği, ateroskleroz gibi fizyopatolojik olayların gelişiminde önemli rol oynayarak kardiyovasküler sistemde anahtar bir görev üstlenir.

Angiotensin II (AII) reseptör antagonistleri (sartanlar): Angiotensin II hipertansif ve diğer olumsuz etkilerinin çoğunu AT1 reseptörleri aracılığıyla gösterirler. Angiotensin II reseptör antagonistleri AT1 reseptörlerini selektif olarak bloke eden güçlü ve uzun etkili nonpeptid ajanlardır. Losartan, valsartan, candesartan, eprosartan, irbesartan, tasosartan, telmisartan'dan oluşan ve sartan ailesi olarak da anılan bu ilaçlar etkilerini, ekstremsk AII dışında, intrinsik AII'nin de etkilerini bloke ederek gösterirler. RAS aktivitesini düşürücü etkileri yanı sıra sempatikolitik ve antiproliferatif etkileri de vardır. Aldosteron üzerine dolaylı etkileri nedeni natriüresis sağlarlar. Bu ajanlardan losartan'ın ürikozürük etkisi de vardır.

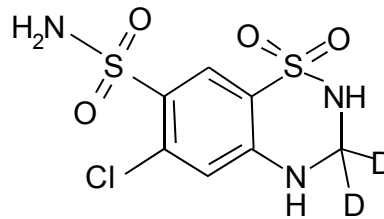
Ayrıca bu etkin maddelerle birçok farmasötik preparatta kombine olarak bulunan hidroklorotiazid; hipertansiyon tedavisinde ilk sıralarda tercih edilen tiazid diüretiklerdendir. Tiazid diüretikleri etkilerini özellikle distal tubul üzerinde göstermektedirler ve kan basıncını sodyum ve su atılımını artırarak düşürmektedirler. İleri yaştaki veya sıvı açığı olan hastalar dışında postural hipotansiyon nadiren ortaya çıkmaktadır. Tiazid diüretikler sodyum ve su tutulumuna neden olan diğer antihipertansiflerin (Örneğin hidralazin) bu etkilerini dengelemektedirler. Bu yüzden tiazidlerin β -blokerler ve ACE inhibitörleri gibi diğer antihipertansiflerle kullanılmaları yararlı olmaktadır.

Türk ilaç piyasasında; anjiyotensin II reseptör antagonistlerinden olan telmisartan'ın tek başına iki adet ve hidroklorotiazid ile ikili kombinasyonlarını içeren iki adet farmasötik preparat olarak Türkiye ilaç piyasasında satılmaktadır.

Telmisartan oral yolla etkili ve spesifik bir anjiyotensin II reseptör (tip AT₁) antagonistidir. Telmisartan, anjiyotensin II'nin bilinen etkilerinden sorumlu olan AT₁ reseptör alt tipine yüksek eğilim ile bağlanarak, anjiyotensin II'nin yerine geçer. Telmisartan AT₁ reseptöründe herhangi kısmi bir agonist aktivite göstermez. Telmisartan seçici olarak AT₁ reseptörünü bağlar. Bağlanma uzun sürelidir. Telmisartan AT₂ ve diğer AT reseptörlerine bağlanma eğilimi göstermez. Bu reseptörlerin fonksiyonel rolleri bilinmemektedir. Telmisartan, plazma aldosteron seviyelerini düşürür. Telmisartan insan plazma reninini inhibe etmez. İnsanda, 80 mg'lık telmisartan dozu anjiyotensin II tarafından uyarılmış kan basıncı artışını neredeyse tamamen inhibe eder. İnhibitör etki 24 saat korunur ve 48 saate kadar hala ölçülebilir. Telmisartanın ilk dozundan sonra, antihipertansif aktivite 3 saat içinde kademeli olarak görülebilir hale gelir. Antihipertansif etki doz sonrasındaki 24 saat boyunca sabit kalır ve ambülatör kan basıncı ölçümlerinden elde edilen bilgilere göre bir sonraki dozdan önceki 4 saati de kapsar. Hipertansiyonlu hastalarda telmisartan hem sistolik hem de diyastolik kan basıncını nabız hızını değiştirmeksizin düşürür.

1.2. Hidroklorotiyazid

1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler



Şekil 1.3. Hidroklorotiyazidin açık formülü

Molekül Formülü: C₇H₈ClN₃O₄S₄

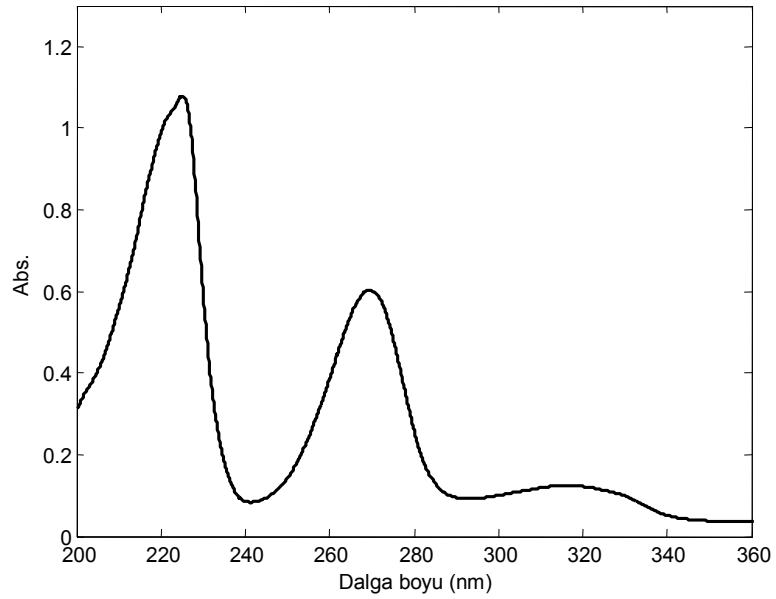
Molekül ağırlığı: 297.7

Açık formülü: 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,3-benzotiyadiazin-7-sülfonamit
1,1-dioksit

Elementel Analizi: %28.24 C, %2.71 H, %11.91 Cl, %14.11 N, %21.49 O, %21.54 S

Erime Noktası: 273-275 °C

Hidroklorotiyazid beyaz veya beyaza yakın renkte, kokusuz veya çok az kokulu kristalize bir tozdur. Suda hafif veya çok hafif çözünür; alkol, aseton, dimetilformamid, n-butilamin ve alkali hidroksitte çözünür; eter, kloroform ve seyreltik mineral asitlerde çözünmez.



Şekil 1.4. Hidroklorotiyazid'in (9 µg/mL) metanol içerisindeki absorpsiyon spektrumu.

1.2.2. Farmakolojik özellikleri

Hidroklorotiyazid bir tiazid diüretikidir. Tiazid diüretiklerinin antihipertansif etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Tiazidler elektrolit geri emiliminin renal tübüler mekanizmasını etkileyerek sodyum ve klorürün yaklaşık olarak eşit miktarlarda

atılmasını doğrudan etkilerler. Hidroklorotiyazidin diüretik etkisi plazma hacmini düşürür, plazma renin aktivitesini arttırır, ardından üriner potasyum ve bikarbonat kaybında artışlara yol açarak aldosteron salgılanmasını arttırır ve serum potasyumu düşürür.

1.3. Telmisartan ve Hidroklorotiyazid İçin Yapılmış Analiz Yöntemleri

1.3.1. Telmisartanın Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemler

1.3.1.1. Spektrofotometri

Bebawy ve ark. (2005) farmasötik preparatlardaki telmisartan ve hidroklorotiyazidin miktar tayinleri için dört analitik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemler türev spektrofotometri, spektrum oranları türev yöntemi, ince tabaka kromatografi (İTK) ve spektrofotometridir. Türev yöntemiyle karışımdaki telmisartan ve hidroklorotiyazid analizi için sırasıyla 241.6 ve 227.6 nm dalga boylarındaki türev absorbans değerlerinin ölçümleri kullanılmıştır. Spektrum oranları türev yönteminde telmisartan için 242.7 nm’de ve hidroklorotiyazid için 274.9 nm’deki sinyal genlikleri kullanılarak kalibrasyonlar elde edilmiştir. İki etkin maddenin İTK ile ayrımından sonra sırasıyla telmisartan ve hidroklorotiyazid için 295 ve 225 nm’deki dansiyometrik ölçümler ile miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik olarak yalnızca karışımdaki telmisartan’ın analizi gerçekleştirilmiştir.

Mısırlıoğlu (2006), yaptığı yüksek lisans tez çalışmasında telmisartan ve hidroklorotiyazidin aynı anda miktar tayinleri için türev ve spektrum oranları türev yöntemlerini uygulamıştır. Çalışmada yapay karışımlarda başarılı sonuçlar elde edildiği halde yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulamasında yapay karışımlar için elde edilen sonuçlar kadar başarılı sonuçlar alınamadığı belirtilmektedir.

1.3.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Nie, J., ve ark (2005), insan plazması ve idrarında anjiotensin II reseptör antagonistlerinin katı faz mikroekstraksiyon için bir poli monolitik kapiler (metakrilik acit-etilen glikol dimetakrilat, MAA-EGDMA) kullanmışlardır. YBSK yöntemi floresans dedeksiyon ile kandesartan, losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan miktar tayinlerin uygulanmıştır. Bu bileşikler için yakalama sınırı sırasıyla insan plazmasında ve idrarda 0.1-15.3 ng/mL and 0.1-15.2 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin uygulamasında doğrusal konsantrasyon çalışma aralığı telmisartan için 0.5-200 ng/mL, kandesartan ve irbesartan için 5-2000 ng/mL, valsartan için 10-2000 ng/mL ve losartan için 50-5000 ng/mL olarak verilmiştir.

Shen, J., ve ark (2005), insan plazmasındaki telmisartan miktarının tayini için YPSK yöntemi geliştirmişler, iç standart olarak Naproksen kullanmışlardır. Yöntemin uygulamasında çalışma aralıkları 0.5-1000.0 ng/ml olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntemin farmakokinetik çalışmalara içinde başarıyla uygulanmıştır.

Torrealdy, N., ve ark (2003), tarafından yapılan bir çalışmada telmisartanın idrarda miktar tayini için kromatografik şartların optimize edildiği YBSK yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada Novopak C₁₈ kolonu, hareketli faz olarak asetonitril-fosfat tamponu (45:55, h/h) ve akış hızı 0.5 ml/dk olarak verilmektedir. Kromatografik tayin floresans detektör ile 305 nm deki uyarma ve 365 nm deki emisyon ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

1.3.1.3 Kapiller Elektroforez

Hillaert ve ark (2003) telmisartan ile birlikte altı anjiyotensin-II-reseptör antagonistleri (ARA-II) ve hidroklorotiyazidin (HCT) miktar tayinleri için kapiler zon elektroforez (KZE) ve misel elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKK) yöntemleri

geliştirmişlerdir. Çalışmada MEKK yönteminin HCT ve ARA-II karışımlarının analizinde daha başarılı sonuçlar verdiği ifade edilmektedir. Her iki yöntemin uygulamasında validasyon parametreleri kullanılarak yöntemler valide edilmiştir.

Zhang, M., ve ark (2006), yaptıkları bir çalışmada insan idrarlarındaki anjiotensin II reseptör antagonistlerin kantitatif analiz için Kapiller zon elektroforez yöntemi uygulamışlardır. Yöntemde poli monolitik kapiller kullanmışlardır. Yöntemde alt tayin sınırını 15-20 ng/ml olarak saptamışlardır. Doğrusal çalışma aralığı 0.08-3.00 µg/ml olarak verilmektedir.

Hillaert, S., ve ark. (2002) , kandesartan, irbesartan, losartan, telmisartan , eprosartan ve valsartan gibi anjiotensin II reseptör antagonistleri için kapiller zon elektroforez yöntemiyle optimizasyon ve validasyon işlemleri yapmışlardır. Yöntemde 60 mM sodyum fosfat tamponu (pH=2) kullanmışlardır.

Gonzales, L., ve ark. (2002), telmisartan ile birlikte losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan ve eprosartan (anjiotensin II reseptör antagonistler) ve metabolitleri için kapiller zon elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin uygulamasında optimal koşulların saptanması için kesirli faktöriyel tasarım ve merkezi bileşen tasarımı kullanılmıştır. Yöntemde uygulanmasında % 5 metanol varlığında 5 mM 'lar potasyum di hidrojen fosfat ve borik asit (25:75 h/h) (pH=5) kullanmışlardır.

1.3.1.4. Spektrofluorimetri

Cagigal E., ve ark. (2001), tarafından losartan, irbesartan, valsartan, kandesartan, telmisartan ve kandesartan metaboliti olan kandesartan M1 'in asit-baz denge sabitleri (pKa) spektrofluorimetrik olarak tayin edilmiştir.

1.3.1.5. Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometrisi

Chen ve ark. (2005) insan plazmasında telmisartanın hızlı tayini için sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada 0.1 mL plazmadaki proteinler önce metanol ile çöktürülmüştür. Sonra santrifüj ederek plazma proteinlerini ayırmışlardır ve metanol kuruluğa kadar uçurulmuştur. Numune tekrar hareketli faz olarak kullanılan asetonitril, 10 mM amonyum asetat (42:58, h/h) ve % 0.2 asetik asit karışımında çözölmüştür. Telmisartan ve internal standart olarak kullanılan valsartan'ın kromatografik ayrımı, Hypersil-Keystone C₁₈ ters faz kolonu ve 0.2 mL / dak akış hızı ile yukarıda belirtilen hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ölçümler, pozitif seçici iyon gösterim modunda elektrosprey iyon kaynağıyla yapılmıştır. Telmisartan için tayin sınırı olarak 1 ng/mL bulunmuştur.

1.3.2. Hidroklorotiazid Miktar Tayini İçin Uygulanan Yöntemleri

1.3.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Salem ve ark. (1991) hidroklorotiazid-spironolakton, hidroklorotiazid-kaptopril, hidroklorotiazid-furosemid karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin aynı anda miktar tayinlerini türev spektrofotometrisi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu tayinde 1. ve 2. türev yöntemleri kullanılmıştır.

Belal ve ark. (1986) altı benzotiadiazini tayin etmek için (klorotiazid, hidroklorotiazid, triklorometiazid, benztiazid, bendroflumetiazid, metilklotiazid) bu maddeleri hidroliz ederek kuvvetli alkali ortamda etilasetoasetat ile çiftleştirmişler ve sarı renkli bileşikler oluşturmuşlardır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan renkli bileşiklerin maksimum absorbans verdikleri dalga boyunda adı geçen etken maddelerin spektrofotometrik tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Bebawy ve ark. (1997) yaptıkları bir çalışmada farmasötik tabletlerde bulunan hidroklorotiazid'in bozunma ürünleri yanında miktar tayini için spektrofotometrik olarak 278.8 nm'de 1. ve 254.4 nm'de 2. türev yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Prasad ve ark. (1997) metoprolol–hidroklorotiazid ve propranolol karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin miktar tayinlerini 1. ve 2. türev yöntemlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada bileşenlerin türev spektrumlarında sıfır noktaları birbirine çok yakın olduğundan bu durumu ortadan kaldırmak için kompensasyon tekniği kullanmışlardır. Bu tayinlerde çalışma aralığı 1. seri hidroklorotiazid için 5–10 µg/mL, propranolol için 5–15 µg/mL, 2. seride 6,25 µg/mL hidroklorotiazid sabit olmak kaydıyla propranolol için 5–15 µg/mL aralığındadır. Bu iki serinin türev absorptans değerleri kullanılarak hidroklorotiazid ve propranololün miktarlarını tayin edilmişlerdir. Hidroklorotiazid ve metoprolol karışımında ise hidroklorotiazid için 5–10 µg/mL ve metoprolol için 40–60 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışmışlardır.

Banoğlu ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada tabletlerdeki benazepril hidroklorür ve hidroklorotiazidin spektrofotometrik olarak miktar tayinlerini yapmışlardır ve sonuçları YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu çalışmada 249 nm'ye karşılık gelen dalgaboyunu absorptans oranları metodunda izosbestik nokta olarak seçmişler, 239/249 nm'deki absorptans oranını benazepril için ve 269/249 nm'deki absorptans oranlarını hidroklorotiazidin regresyon denklemlerinin hesaplanması için kullanmışlardır. Kullandıkları diğer spektrofotometrik yöntem 236 ve 269 nm'de her iki etken madde için Vierordt yöntemidir.

Kartal ve Erk (1999) yaptıkları bir spektrofotometrik çalışmada hidroklorotiazid ve amiloridi tayin etmek için spektrum oranları türev yöntemini kullanmışlardır. Bu analizde spektrum oranlarının 1. türevinde karışımdaki hidroklorotiazid için 285,7

nm'de ve amilorid için 302,5 nm'deki analitik sinyalleri kullanarak maddelerin tayini yapılmıştır. Ayrıca bu etken maddelerin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır.

Erk ve Onur (1997) tabletlerdeki benazepril ve hidroklorotiazidin miktar tayinleri için iki spektrofotometrik yöntem kullanmışlardır. Bunlardan birincisi olan 1. türev spektrofotometride benazepril hidroklorür için 260,7 nm'deki ve hidroklorotiazid için 239,8 nm'deki türev absorbans değerlerini ölçerek bu etken maddelerin miktarlarını tayin etmişlerdir. İkinci yöntem olarak absorbans oranları yöntemini 264, 258,3, ve 236,4 nm'ye karşılık gelen dalga boylarını kullanarak benazepril.HCl ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

El-Yazbi ve ark. (1999) yaptıkları bir çalışmada hidroklorotiazid ve benazeprili içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin miktar tayinlerini türev spektrofotometri yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada geri kazanım değerleri hidroklorotiazid için 0,84 standart sapma ile % 100,2 ortalama ve benazepril için 0,78 standart sapmayla % 99 ortalama bulmuşlardır.

Panderi (1999) farmasötik tabletlerdeki hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürün aynı anda miktarlarını tayin etmek için 2. dereceden türev spektrofotometriyi kullanmıştır. Bu çalışmada hidroklorotiazid varlığında benazepril hidroklorürün miktar tayinini 253,6 ve 282,6 nm'deki 2. dereceden türev absorbans değerlerini ölçerek, hidroklorotiazidin miktar tayinini ise 282,6 nm'deki 2. dereceden türev absorbans değerlerini kullanarak gerçekleştirmiştir. Doğrusal çalışma aralığı, benazepril hidroklorür için 14,8–33,8 µg/mL ve hidroklorotiazid için 18,50–42,20 µg/mL'dir. Bu tayinlerde bağıl standart sapma değeri % 1,43'den düşük bulunmuştur.

Erk (1999) iki bileşenli karışımlarda hidroklorotiazid, spironolakton, ramiprilin miktar tayinlerini spektrum oranları türev ve Vierordt yöntemleri ile yapmıştır. Hidroklorotiazid–ramipril karışımını içeren tabletlerde hidroklorotiazid için 0,8 ve ramipril için 0,7 standart sapma ile Vierordt yöntemini, hidroklorotiazid için 0,3 ve ramipril için 0,9 standart sapma ile spektrum oranları türev yönteminin uygulanabildiği görülmektedir. Hidroklorotiazid–spironolakton karışımını içeren tabletlerde Vierordt yöntemi ile hidroklorotiazid için 0,7, spironolakton için 1,1 standart sapma ve spektrum oranları türev spektrofotometrisi ile hidroklorotiazid için 0,5 ve spironolakton için 0,9 standart sapma ile tayinleri gerçekleştirmiştir.

Abdine ve ark. (1978) hidroklorotiazid ve rezerpini içeren kombinasyonlarda bu maddeleri tayin etmek için iyot ile bir yük transferi yöntemini ve diferansiyel spektrofotometrik yöntemleri kullanmışlardır.

Carlucci ve ark. (1993) yaptıkları bir çalışmada tabletlerdeki enalapril maleat ve hidroklorotiazidin aynı anda miktar tayinini türev spektrofotometrisi ile yapmışlardır. Tayinlerini yaklaşık % 2 bağıl standart sapma ile gerçekleştirmişlerdir ve elde ettikleri sonuçları YBSK yöntemi ile karşılaştırmışlardır.

Bedair ve ark. (1986) hidroklorotiazidi hidralazin hidroklorür ve propranolol ile birlikte içeren formülasyonlardaki miktar tayinlerini 2. türev spektrofotometri yöntemi ile yapmışlardır. Bu tayinde hidroklorotiazid için 2. türev absorbans değerlerinin 250 nm’de ve hidralazin hidroklorür için 317 nm’deki 2. türev absorbans değerlerinin ölçümü ile elde edilen kalibrasyonlar kullanılmıştır. Bu çalışmada iki ayrı karışım için geri kazanım değerleri sırasıyla hidralazin hidroklorür için % 0,8 bağıl standart sapma ile % 100,6, hidroklorotiazid için % 0,4 bağıl standart sapma ile % 100,6 ve propranolol için % 0,6 bağıl standart sapma ile % 99,4 değerlerini elde etmişlerdir.

Erk ve Onur (1996) tabletlerdeki silazapril ve hidroklorotiazidi iki spektrofotometrik yöntem ile tayin etmişlerdir. Türev spektrofotometrisinde 242,8 nm’de ölçülen türev absorbans değerlerini silazaprilin tayini için ve 282,8 nm’de ölçülen türev absorbans değerlerini hidroklorotiazidin tayini için kullanmışlardır. Bu metodun uygulanmasında bağıl standart sapma değerleri silazapril için % 0,77 ve hidroklorotiazid için % 0,24 olarak hesaplamışlardır. Absorbans oranları yönteminde bu maddelerin tayini için 210,4 nm, 250,2 nm ve 270,6 nm dalga boylarını kullanmışlardır.

Sağlık ve ark. (2001) tabletlerde bulunan hidroklorotiazid ve fosinoprilin 4. türev spektrofotometrisi ile tayin ederek sonuçları YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu çalışmada fosinoprilin için 217,7 nm’de ve hidroklorotiazid için 227,9 nm’de ölçülen 4. türev absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlamışlardır.

Magri ve ark. (1995) yaptıkları bir çalışmada hidroklorotiazid ve fosinoprilin aynı anda miktar tayinlerini multiwavelength UV spektrofotometri yöntemi ile yapmışlardır. Bu çalışmada optimum dalga boyu aralığı olarak 210-240 nm aralığını seçmişlerdir.

Şatana ve ark. (2001) tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini 1. türev spektrofotometri ile gerçekleştirerek YBSK yöntemi ile doğrulamışlardır. Bu yöntemde valsartan ve hidroklorotiazid için sırasıyla 270,6 nm ve 335 nm’deki türev absorbans değerlerini kullanmışlardır.

1.3.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Christophersen ve ark. (1977) hidroklorotiazidin miktar tayinini serumda % 15 metanol çözeltisini hareketli faz olarak ve Sephadex G-15 kolonunu kullanarak gerçekleştirmiştir.

Papadoyannis ve ark. (1998) hidroklorotiazid içeren farmasötik preparatlarda ve insan serumunda bu etken maddenin miktarının tayinini katı faz ekstraksiyonundan sonra asetonitril ve asetik asit (% 1'lik) (20:80) mobil fazını kullanarak UV - görünür alan dedektörü ile 270 nm'de gerçekleştirmişlerdir.

Azuyama (1990) yaptığı çalışmada insan plazmasındaki hidroklorotiazidin miktar tayinini % 1'lik glasiyal asetik asit ve % 0,035'lik trietilen amin içeren asetonitril ve 0,07 M heptan sülfonik asitin sodyum tuzunu (18:82) karışımını hareketli faz olarak, 2 cm X 4,6 mm I.D C₁₈ kolonunu kullanarak başarmışlardır.

Koopmans (1984) çalışmasında plazma ve idrarda bulunan hidroklorotiazidin miktar tayinini 0,01024 M tetrabütil amonyum hidrojen sülfat ve 0,00976 M hidroksimetil aminometan içeren metanol-su (20:80) karışımını hareketli faz olarak kullanarak paslanmaz çelik (15 cm X 4,6 mm I.D) kolon ve UV dedektör ile 272 nm'de yapmışlardır.

Ouyang ve ark. (1998) hidroklorotiazidi farmasötik preparatlarda tek başına ve amilorid ve lisinopril ile birlikte karışımlarında bu etken maddeleri tayin etmek için Ce (IV)'ün kimyasal ışık veren reaksiyonunu takiben fluoresans dedektör kullanarak YBSK ile tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Weinberger ve Pietrantonio (1983) Amerika'da yaptıkları bir çalışmada kan serumunda hidroklorotiazidi tayin etmek için pH: 5 olan 0,05 M tetrabütil amonyum hidroksit ile 0,01 M fosfat tamponda % 20 asetonitrili çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmışlardır. 50-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kalibrasyon grafiği ile bu etken maddenin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Shaikh ve ark. (1998) dana sütünde bulunan klorotiazid ve hidroklorotiazidin miktar tayini için 0,05 M ve pH: 3 olan potasyum fosfat tamponunda (1:1, h/h) ile asetonitril tetrahidrofurandan ibaret olan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmıştır. Bu etken maddelerin miktar tayini 225 nm'de dalga boyu değişebilen dedektör yardımı ile hidroklorotiazid ve klorotiazid için korelasyon katsayısının karesi 0,995 olan lineer regresyon denklemleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir.

Cooper ve ark. (1976) insan serumu ve idrardaki hidroklorotiazidin miktarını tayin etmek için Bondapak C₁₈ kolonu ve metanol - 0,01 M sodyum dihidrojen fosfatı hareketli faz olarak ve 271 nm'de UV dedektörü kullanmışlardır.

Richter ve ark. (1996) 1996'da Almanya'da yaptıkları bir çalışmada insan serumundaki hidroklorotiazidi ters faz C₁₈ kolonu ve fosfat tamponu-asetonitril (90:10) çözücü sisteminden meydana gelen hareketli faz ile ayırarak miktarını tayin etmişlerdir.

Shiu ve ark. (1986) idrarda bulunan hidroklorotiazidin miktar tayinini YBSK yöntemiyle yapmışlardır. Bu miktar tayininde deiyonize su-metanol-tetrahidrofur (88:10:2) karışımından oluşan çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanılmıştır.

Alton ve ark. (1986) insan idrarında bulunan hidroklorotiazidin miktar tayinini triklorometiazidi iç standart olarak ve 280 nm'de μ Bondapak Phenyl kolonu kullanarak hidroklorotiazidin 0,5-50 μ g/mL çalışma aralığında 5 μ g/mL triklorometiazid varlığında (iç standart) başarmışlardır.

1983 yılında Japonya'da yapılan bir çalışmada (1984) diüretik tiazidlerin biyofarmasötik çalışmaları kapsamında plazmada, idrarda, kan hücrelerinde ve safrada hidroklorotiazidin miktarı YBSK yöntemiyle tayin edilmiştir.

Hitscherich ve ark. (1987) yaptıkları bir çalışmada tabletlerdeki hidroklorotiazidi ve propranololu YBSK yöntemiyle tayin etmişlerdir. Bu maddelerin miktar tayini için siyanopropil silan kolon ve asetonitril - 0,05 M pH: 3 olan amonyum fosfat (15:85, h/h) taşıyıcı fazı ve 280 nm’de UV dedektörü kullanılmıştır.

Domingo ve ark. (1992) Spherisorb ODS-2 analitik C₁₈ kolonunu ve hareketli faz olarak pH: 6,9 olan 0,05 M SDS (sodyum dodesil sülfat) - % 5 metanol karışımını kullanarak hidroklorotiazid başta olmak üzere diüretiklerin idrarda miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir.

Fett ve ark. (1991) yaptıkları bir çalışmada biyolojik sıvılarda hidroklorotiazidin tayinini PinkertonTM ISRP, HisepTM ve Hypersil C₁₈ YBSK kolonlarını kullanarak YBSK ile başarmışlardır. Üç kolon için de 0,3 – 100 µg/mL çalışma aralığında iyi bir doğrusallık ve % 98 - % 102 geri kazanımla üreden ilacın tayinini yapmışlardır.

De Croo ve ark. (1985) tabletlerdeki hidroklorotiazid ve amilorid hidroklorürün aynı anda miktar tayinlerini C₁₈ kolonunu kullanarak YBSK ile başarmışlardır. Bu çalışmada 50 µM propilamin içeren asetonitril – 0,1 M fosfat tamponunu (pH: 3) (15:85) çözücü sistemini hareketli faz olarak kullanmışlardır. Yaptıkları geri kazanım çalışmasında amilorid hidroklorür için % 100,9 ve % 1,6 bağıl standart sapma, hidroklorotiazid için % 101,9 ve % 0,9 bağıl standart sapma ile elde etmişlerdir.

Panderi ve ark. (1999) farmasötik preparatlardaki hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürün miktarlarını tayin etmek için yaptıkları bir kromatografik çalışmada C₁₈ mikro – bore analitik kolonunu ve 0,025 M NaH₂PO₄ (pH: 4,8) ile asetonitril (55:45) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır. Bu etken maddelerin tayininde kalibrasyon grafiklerinin benazepril hidroklorür için 5 – 20 µg/mL ve hidroklorotiazid için 6,2 – 25 µg/mL aralığında doğrusal olduğunu bulmuşlardır. Bu analiz işleminde

tayin limitleri benazepril hidroklorür için 0,88 µg/mL ve hidroklorotiazid için 0,58 µg/mL'dir.

Shetkar ve Shinde'nin (1997) yaptıkları çalışmada hidroklorotiazid ve enalapril maleat içeren karışımlarda bu etken maddelerin miktar tayinlerini µ Bondapak C₁₈ kolonu, 1 mL/dak akış hızında 0,025 M fosforik asit (pH: 3)-asetonitril (84:16) karışımını hareketli faz olarak kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu tayinde geri kazanım değerleri enalapril maleat için % 99,74 ve hidroklorotiazid için %99,69 olarak hesaplanmıştır.

Stewart ve Clark (1986) yaptıkları çalışmada guanetidin ve hidroklorotiazid karışımlarında bu iki etken maddeyi tayin etmek için 0,02 M sodyum pentan sülfonat içeren asetonitril ve 0,05 M NaH₂PO₄ (30:70) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır. Analizi oktadesilan kolonu ve elektrokimyasal dedektör ile gerçekleştirmişlerdir.

Carlucci ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini 5-10 µg/mL valsartan için ve 0,5-2,0 µg/mL hidroklorotiazid için kullanılan çalışma aralıklarında YBSK yöntemi ile yapmışlardır. Bu analizde ters faz Hypersil ODS kolonu ve asetonitril-asetat tamponu (0,1 M, pH: 4,9) (40:60) karışımını taşıyıcı faz olarak kullanmışlardır.

Sasa ve ark. (1988) tablet formülasyonlarında atenololün hidroklorotiazid ve klortalidonla olan iki bileşenli karışımlarında bu etken maddeleri YBSK yöntemi ile tayin etmişlerdir. Bu yöntemde 1 mM amonyum asetat ve 2 mM oktansülfonik asitin sodyum tuzunun asetonitrildeki çözeltisini hareketli fazı ve LC-8-DB kolonunu kullanmışlardır.

Argekar ve Sawant (2000) yaptıkları bir çalışmada hidroklorotiazid ve losartan potasyumu tabletlerden analiz etmek için ters faz ve seçimli YBSK yöntemini kullanmışlardır.

Fatmi ve ark. (1990) farmasötik preparatlarda bulunan hidralazin hidroklorür ve hidroklorotiazidin miktar tayinini 254 nm’de UV dedektör ve su-dibutilamin fosfatı hareketli faz olarak kullanarak yapmışlardır. Yaptıkları geri kazanım çalışmasında hidralazin hidroklorür için % 1,3 bağıl standart sapma ile % 98,9 ve hidroklorotiazid için % 1,1 standart sapma ile % 98,8 değerlerini bulmuşlardır.

Atay ve ark. (2001) farmasötik preparatlarda bulunan hidroklorotiazid ve silazaprilin miktar tayinini YBSK yöntemi ile yapmışlardır. Bu çalışmada metanol-fosfat tamponundan ibaret hareketli fazında seçimli olarak bu etken maddelerin ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Sabit faz olarak Lichrospher 100 RP-18e kolonunu kullanmışlardır.

Özkan (2001) yaptığı bir kromatografik çalışmada tabletlerde ve insan serumunda bulunan losartan potasyum ve hidroklorotiazidin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile yapmıştır. Bu çalışmada ters faz C₁₈ kolonunun ve 0,01 M KH₂PO₄–asetonitril (65:35) karışımını pH’sını H₃PO₄ ile 3’e ayarlayarak hareketli faz olarak kullanmıştır. Uygulanan yöntemin yakalama limiti ve tayin limitlerini sırasıyla losartan potasyum için 1,02 ng/mL ve 3,39 ng/mL ve hidroklorotiazid için 4,49 ng/mL ve 14,96 ng/mL olarak bulmuştur.

Özkan ve ark. (2001) hidroklorotiazid ve fosinopril sodiyumu içeren tabletlerde bu etken maddelerin miktar tayinlerini YBSK yöntemi ile başarmışlardır. Bu analiz yönteminde ters faz C₁₈ kolonu, % 10’luk fosforik asit çözeltisiyle pH’sı 4’e ayarlanmış metanol–su karışımını (40:60) hareketli faz olarak kullanmışlardır.

1.3.2.3. Kemometri

Dinç (2002) yaptığı kemometrik çalışmada farmasötik tabletlerdeki hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürü tayin etmek için üç kemometrik kalibrasyon yöntemi (CLS, ILS, PCR) kullanmıştır. Bu kalibrasyonlar için çalışma aralığı 0 – 22 µg/mL hidroklorotiazid ve 0–36 µg/mL benazepril hidroklorürü içeren farklı konsantrasyonlarda kalibrasyon seti hazırlanarak 220–350 nm spektral aralıkta 24 noktada (dalga boyunda) absorpsiyon ölçümleri ile hazırlanmıştır. Kalibrasyonları hidroklorotiazid ve benazepril hidroklorürün karışımlarına uygulamıştır.

Dinç ve Baleanu (2002) yaptıkları bir çalışmada tabletlerdeki hidroklorotiazid ve silazaprilin miktar tayinini CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri ile gerçekleştirmişlerdir. Bu miktar tayininde 210–290 nm aralığında 4'er nm aralıklarla 15 dalga boyunda hazırlanan kalibrasyon seti için ölçümler alarak oluşturulan kemometrik yöntemler yapay karışımlara ve tabletlere uygulanmıştır. Analiz sonuçlarında hidroklorotiazid için 0,20 ve silazapril için 0,15'den daha küçük standart sapma ile sonuçlar bulunmuştur.

1.3.2.4. Kapiller Elektroforez

Gonzalez ve ark. (1996) karışımlardaki beş diüretik ilaç maddesinin (amilorid, triamteren, bendroflumetiazid, bumetanid) miktar tayinini kapiller elektroforez yöntemiyle başarmışlardır. Bu çalışmada dört ilacın ayrımı pH: 5'de gerçekleştirilerek floresans dedektör kullanmışlardır.

1.3.2.5. Polarografi

Martin ve ark. (1999) farmasötik formülasyonlarda amilorid ve hidroklorotiazid'in miktar tayinlerini diferansiyel puls polarografi yöntemini kullanarak kısmi en küçük

kareler metodu ile hazırladıkları kalibrasyonlar ile yapmışlardır. Bu yöntemin uygulamasında doğrusal çalışma aralığını amilorid için $2,4 \times 10^{-5} - 8,0 \times 10^{-5}$ M ve hidroklorotiazid için $8,0 \times 10^{-5} - 3,2 \times 10^{-4}$ M olarak bulmuşlardır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Spektrofotometri

Spektrofotometrik yöntemler madde ile ışığın etkileşmesine dayanmaktadır. Işık ile madde arasındaki etkileşmeden yararlanılarak gerçekleştirilen analiz yöntemleri, az analiz materyali gerektirmesi, seçiciliği ve doğruluk derecesinin yüksek oluşu nedeniyle analitik amaçlar için sıkça kullanılmaktadır .

Bu yöntemlerden biri olan spektrofotometri, ışık enerjisinin absorpsiyonuna dayalı bir yöntemdir. Işık ise elektromanyetik bir radyasyondur ve frekansı (ν) veya dalga boyu (λ) ile karakterize edilir. Enerji ise:

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

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

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

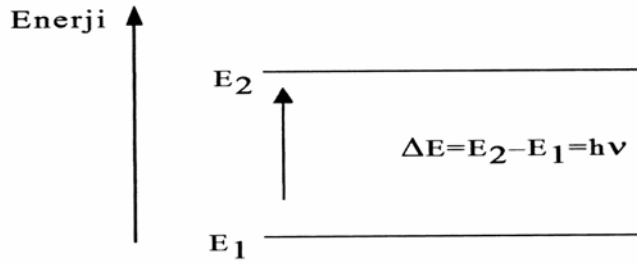
Işık; atom ve moleküller tarafından absorbe edilebilir. UV ve görünür alandaki ışığın absorpsiyonu molekülü oluşturan atomların bağ elektronları ile ilgilidir.

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

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

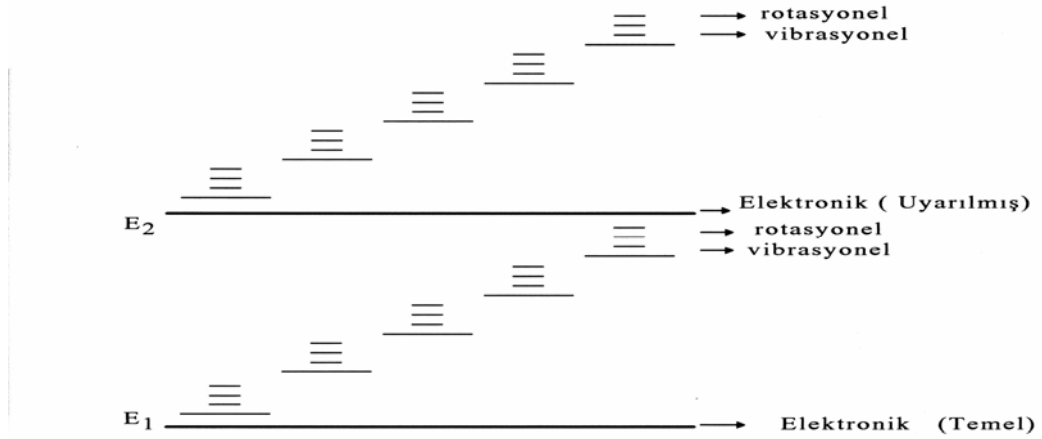
$$E_{\text{toplam}} = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}} + E_{\text{ötelenme}}$$

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



Şekil 2.1. Enerji seviyeleri arasındaki fark

Elektronik enerji diğer enerjilerden büyüktür. Bu nedenle elektronik uyarılma sırasında titreşim ve dönme enerji seviyelerinde de değişme olur. Titreşim ve dönme enerjiler moleküldeki atomların titreşmesi ve molekülün dönmesi ile ilgilidir. Ötelenme enerjisi molekülün bütününe ötelenme hareketi ile ilgilidir ve en düşük enerjili harekettir.



Şekil 2.2. Moleküldeki enerji seviyeleri.

İki temel tip moleküler enerji çeşidi vardır:

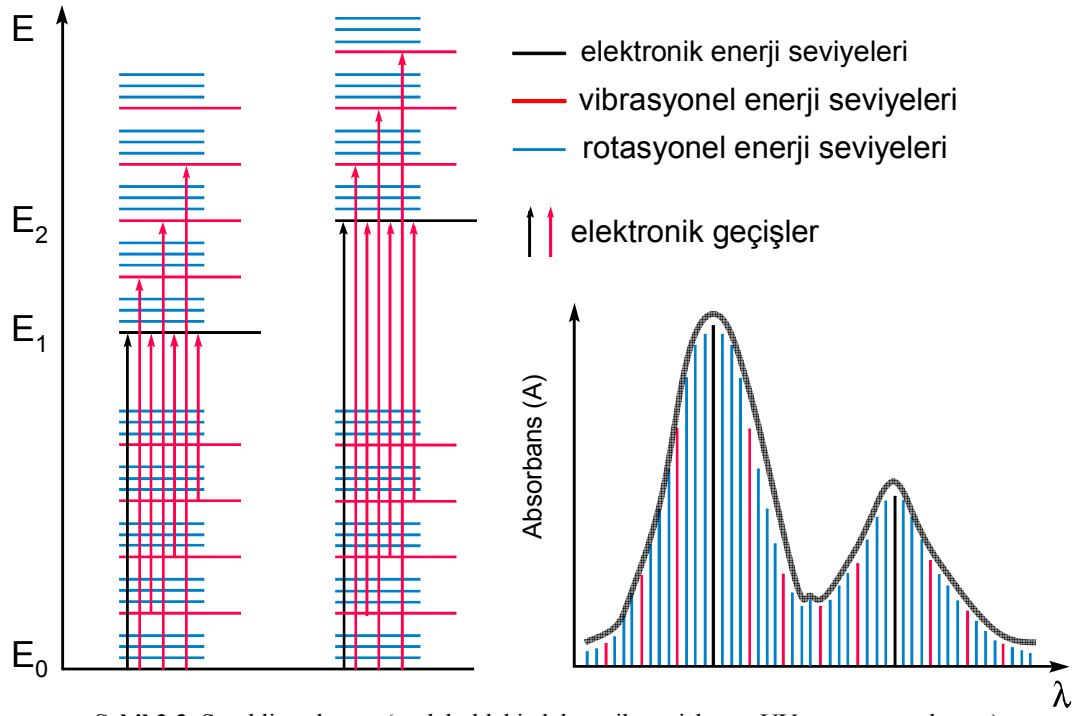
i-Elektronik uyarılma: 35–150 Kcal/mol, yani kimyasal bağlar seviyesinde bir enerji (200–800 nm'deki ışık) ile gerçekleşebilir. Bu olay sonucunda elektronlar daha yüksek enerjili orbitallere (antibağ orbitalleri) çıkarlar. Bu geçişler sırasında UV ve görünür alan spektrumu meydana gelir.

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

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

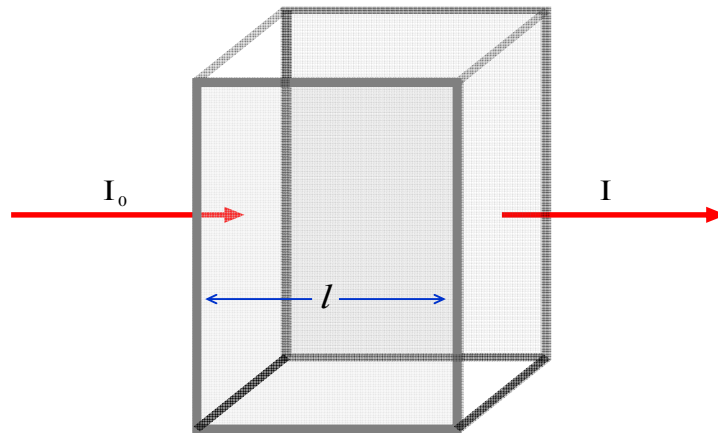
Atomların elektronik uyarılmaları sonucunda her bir yüksek enerjili atomik orbitale geçişe karşılık fotoğraf plağında bir çizgi gözlenir. Bir atomda da birden çok fazla sayıda atomik orbital olduğu için bu tür uyarılma için çok sayıda çizgiden meydana gelen “çizgi spektrumu” görülür (atomik absorpsiyon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

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



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

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



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

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

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

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

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

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

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

(l = çözeltinin derinliği)

Yukarıda açıklanan iki kanun birleştirilerek,

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

denklemini elde edilir.

Burada: I = Numuneyi terk eden ışığın şiddeti,

I_0 = Numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti,

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı,

C = Absorpsiyon yapanın konsantrasyonu,

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

Eşitliğin eksi logaritması alınır,

$$\log I_0 / I = \epsilon.l.C \quad (6) \quad \text{olur.}$$

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

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

Bu eşitlik kısaca,

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

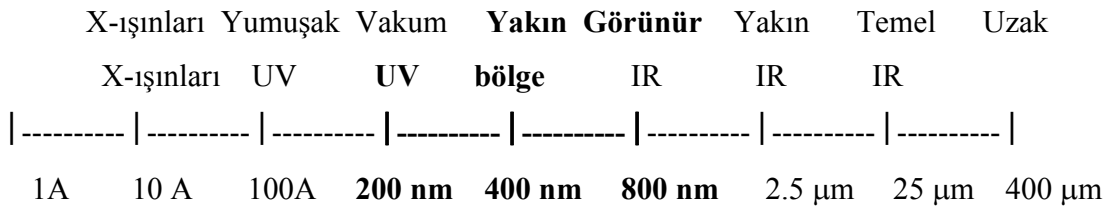
şeklinde verilir ve bu eşitlikten konsantrasyon (C) hesaplanabilir.

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

- i) *Cihazdan kaynaklanan sapmalar*: Cihazdaki hatalar şunlar olabilir: Cihaza gelen potansiyelin düzgün olmaması, ışın kaynağının iyi çalışmaması, dedektör sisteminin iyi çalışmaması, kaçak ışınların olması, monokromatörün (dalga boyu seçicisi) hatalı olması, slit ayarının iyi ayarlanmaması vb.
- ii) *Kimyasal maddelerden kaynaklanan sapmalar*: Ölçüm yapılan çözeltide meydana gelen iyonlara ayrışma, birleşme, kompleks oluşumu, fosforesans ve floresans olayları, çözeltinin pH'sı ve ortam ısısı gibi olaylar nedeniyle sapmalar gözlenir.
- iii) *Analizci hatasından ileri gelen sapmalar*: Analizcinin dikkatsizliği ve bilgisizliğinden ileri gelen uygun olmayan çözücülerle çalışmak, yüksek absorblama konsantrasyonlarında çalışmak, çözelti içinde kabarcıklar ve asılı parçacıkların bulunması, çözeltinin ölçüldüğü kabın kirli ve çizik olması gibi sebeplerden ötürü sapmalar olabilir (DINC, 1996; USTUNDAG , 2003; KAYAPINAR, 2007).

2.1.1. UV ve Görünür Alan Spektrofotometrisi

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



Şekil 2.5. Elektromanyetik radyasyonun spektral alanları.

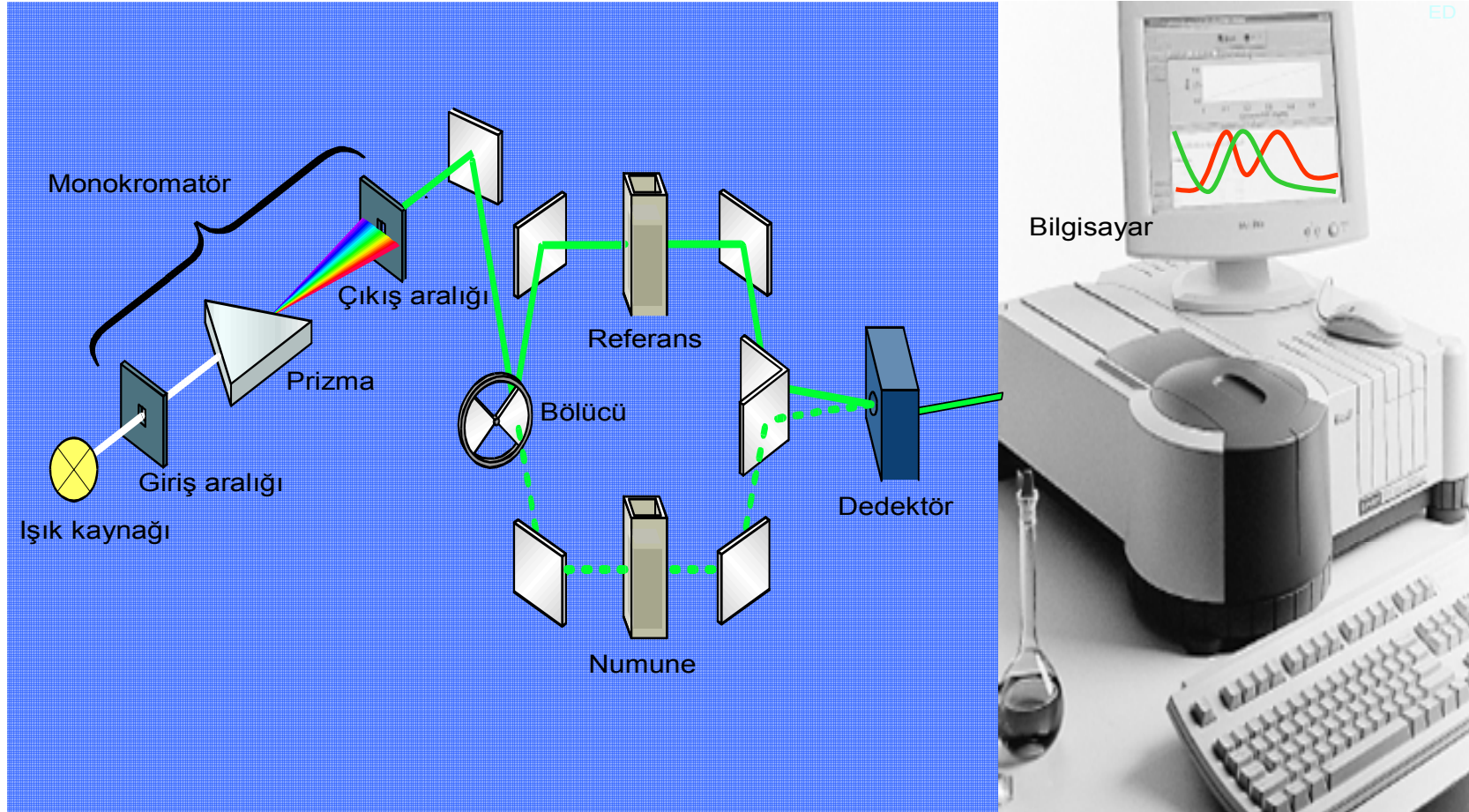
Moleküllerin elektromanyetik dalgalarla, özellikle ultraviyole, görünür alan ve enfraruj ışınları ile uyarılması sonucu meydana gelen absorpsiyondan, molekül hakkında kalitatif ve kantitatif bilgi edinmek mümkündür (Absorpsiyon spektroskopisi). UV ve görünür alandaki ışık kullanıldığında bileşiklerdeki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

UV–Görünür alan absorpsiyon spektroskopisi, kantitatif amaçlarla en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hem organik hem de inorganik maddelerin tayininde kullanılabilmesi, son zamanlardaki gelişmelerle 10^{-6} – 10^{-7} M civarına kadar duyarlı

olması bu yöntemi çekici hale getirmektedir. Yine bu yöntemle iyi bir kesinlik ve doğruluk sağlamak mümkündür. Zira yöntemin bağıl doğruluktan sapmasının % 1–3 arasında olduğu, bazı tedbirler alınarak bu belirsizliğin çok daha aşağı düşürülebildiği belirtilmiştir. Bunlardan başka yöntemin kolay veri elde etmede fark edilir bir üstünlüğünün olduğunu belirtmek gerekir.

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

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



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

2.2. Kemometri

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

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

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

Massart ve ark.,1997; Meloun ve ark., 1992; Miller ve ark.,1993; Otto,1998; Vandeginste ve ark., 1998; Dinç, 2007)

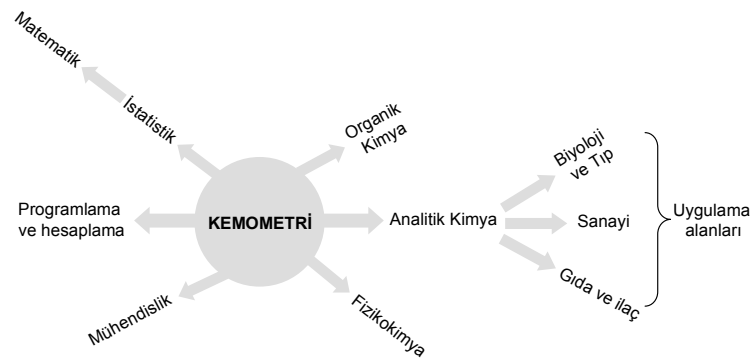
Bu kemometrik yöntemlere rağbet edilmesi, kimya ve de analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunmasına bağlanabilir. Yapılan bilimsel çalışmaların sonucu yayınlanan makaleler göstermiştir ki son 15 yıl içinde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

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

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

olarak yapay sinir ağıları yöntemleri, kemometrik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

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



Şekil 2.7. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler

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

Kemometri, analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacıların da, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasötik kimyacılar, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda deneysel

tasarım ve ilaç tasarımında yapı etki ilişkisi çalışmalarında kemometrinin araçlarını kullanmaktadırlar.

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

2.2.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları (Multivariate Calibration Algorithms)

2.2.1.1. Klasik en küçük kareler yöntemi (Classical least squares (K-matris) method)

Klasik en küçük kareler kalibrasyon yöntemi, spektrofotometrik veya diğer analitik cihazlardan elde edilen ölçüm verilerinden oluşan doğrusal denklem sistemlerine, Beer–Lambert yasasına uygulanmasıdır. Bu yöntem K-matris yöntemi olarak da belirtilmektedir. Burada CLS algoritmasıyla ilgili açıklamalar spektrofotometrik çalışmalar için yapılmaktadır. $A = K \times C$ (Lambert-Beer yasasına göre)'dir.

$$A_{p \times q} = K_{p \times j} \cdot C_{j \times q} \quad (9)$$

$$K = (A_{p \times j} C_{q \times j}^T)^{-1} C_{q \times j}^T \quad (10)$$

$$K^* = (K_{j \times p}^T K_{p \times j})^{-1} K_{j \times p}^T \quad (11)$$

$$C_{j \times p} = K^* \cdot A_{\text{sample}} \quad (12)$$

Burada A = absorbans, K = kalibrasyon katsayısı, K^* = CLS kalibrasyon katsayısı, C = analiz edilen bileşiğin konsantrasyonu.

2.2.1.2. Ters en küçük kareler (P-matris) yöntemi (Inverse Least Squares method)

P-matris yöntemi olarakda ifade edilen ILS yöntemi, doğrusal denklemler sisteminin spektrofotometride Beer-Lambert yasasının ters ifadesine uygulanmasını içerir:

$$C = P \times A \quad (13)$$

$$C_{k \times q} = P_{k \times p} A_{p \times q} \quad (14)$$

$$P = (C_{k \times q} A_{p \times q}^T (A_{p \times q} A_{p \times q}^T)^{-1})^{-1} \quad (15)$$

$$C_{\text{sample}} = P_{k \times p} \cdot A_{p \times q} \quad (16)$$

Yukarıdaki denklemler sisteminde A = ölçülen absorbans değeri, P = kalibrasyon katsayısıdır, C = bileşenin konsantrasyonudur.

PCR ve PLS algoritmalarında CLS ve ILS işlemleri kullanıldığı için K - ve P -matris algoritmaları kısaca açıklanmıştır.

2.2.1.3. Temel bileşen regresyon yöntemi

(Principal component regression method, PCR)

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden birisi olan temel bileşen regresyon yöntemi, konsantrasyon seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir.

Burada açıklanan PCR algoritması Martens ve Naes (1984) tarafından verilen şemaya göre açıklanmaktadır. PCR kalibrasyonu kurulmasındaki basamaklar aşağıdaki biçimdedir:

Analiz edilecek maddenin konsantrasyon ve absorban verilerinin varyans-kovaryansı bulunur. Varyans-kovaryans saçılma matrisinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

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

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

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

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

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

Burada D diagonal matris olup her bir öz değer tersine eşittir. t_1 sayı matrisi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir :

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

Ortalanmış absorbans ve konsantrasyon, A_0 ve C_0 ile gösterilebilir. Burada a sabiti genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir :

$$a = C_0 - A_0^T \cdot b \quad (21)$$

Herbir aşamada elde edilen değerler 16 no'lu denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

a) Yöntemin avantajları; i) dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir, ii) çok bileşen analiz için kullanılabilir, iii) PCR data işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına olanak tanır. iv) analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir, v) bazen orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, vi) kalibrasyon için ölçülen absorbansların dekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdan ve ölçüm aletlerinden gelen gürültünün eliminasyonuna olanak tanır.

b) Yöntemin dezavantajları; i) hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır, ii) yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için), iii) kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere karşılık gelmeyebilir, iv) genellikle çok sayıda kalibrasyon numunesinin kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, v) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

2.2.1.4. Kısmi en küçük kareler yöntemi

(Partial least squares regression method, PLS)

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

PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X - ve Y -blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezleştirilmiş X -değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y -değişkeninin parçalanması aşağıdaki biçimde verilir.

$$\begin{array}{c}
 \xrightarrow{J} \\
 \downarrow I \\
 \boxed{X} \\
 \downarrow I
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \xrightarrow{A} \\
 \downarrow I \\
 \boxed{T} \\
 \downarrow I
 \end{array}
 \cdot A \downarrow
 \begin{array}{c}
 \xrightarrow{J} \\
 \boxed{P} \\
 \downarrow I
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \xrightarrow{J} \\
 \boxed{E} \\
 \downarrow I
 \end{array}$$

$$\begin{array}{c}
 \xrightarrow{N} \\
 \downarrow I \\
 \boxed{Y} \\
 \downarrow I
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \xrightarrow{A} \\
 \downarrow I \\
 \boxed{U} \\
 \downarrow I
 \end{array}
 \cdot A \downarrow
 \begin{array}{c}
 \xrightarrow{N} \\
 \boxed{Q} \\
 \downarrow I
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \xrightarrow{N} \\
 \boxed{F} \\
 \downarrow I
 \end{array}$$

Şekil 2.8.. PLS2 kalibrasyonu

$$\begin{aligned}
X &= T P^T + E \\
Y &= U Q^T + F \\
Y &= X B + F \\
B &= W (P^T W)^{-1} Q^T
\end{aligned} \tag{22}$$

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

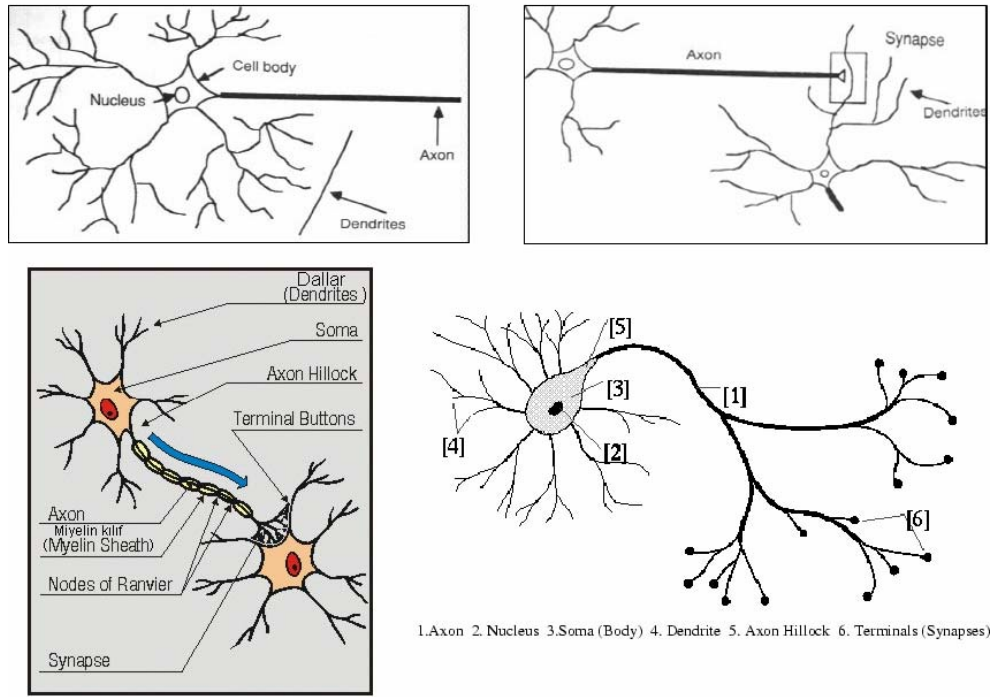
PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorbands değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanır .

a) Yöntemin avantajları; i) PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır, ii) tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir, iii) kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik konsantrasyonlarını yansıtmaları daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır, iv) yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir, v) bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, vi) bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS'nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR'den daha iyi sonuçlar verir.

b) Yöntemin dezavantajları; i) PLS hesaplamaları klasik metodlardan daha yavaştır, ii) PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur, iii) genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir, iv) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

2.2.1.5.Yapay sinir ağıları yöntemi (Artificial Neural Networks, ANN)

En genel anlamda yapay sinir ağıları, insan beynindeki sinirlere (nöronlara) benzer yapay sinirlerin (nöronların) değişik bağlantı geometrisi ile birbirlerine bağlanmasıyla oluşan kompleks sistemlerdir.

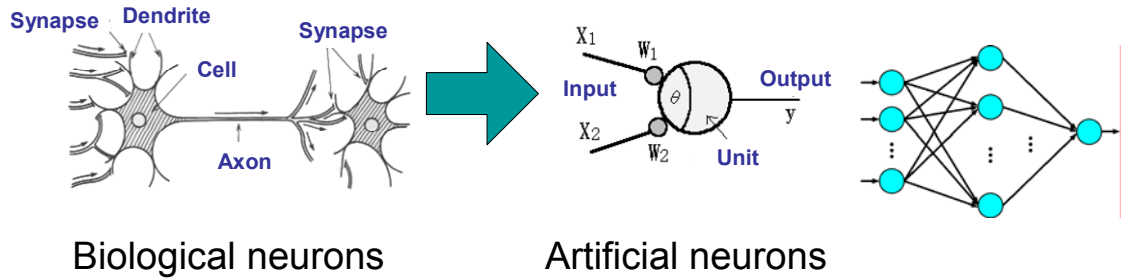


Şekil 2.9. biyolojik sinirin (nöronun) yapısı

Şekil 2.9.'da bir biyolojik sinir hücresi görülmektedir. Biyolojik nöron, bir çekirdek, gövde ve iki türlü uzantıdan oluşmaktadır. Bunlardan kısa ve dallanmış olan Dendrit giriş bilgilerini alır, uzun ve tek olan akson ise çıkış bilgilerini diğer nöronlara taşır. Akson ve Dendritin birleşim yerine Sinaps adı verilir. Bunlar nöronlardan aldığı sinyalleri değerlendirirler ve eşik değeri üzerinde bir giriş varsa bir sonraki hücreye iletirler.

Yapay sinir ağı teknolojisi, hesaplamalarda tamamen farklı bir yaklaşım getirmektedir. Yapay sinir ağları, paralel hesaplama tekniğinin bütün avantajlarını kullanabilen ve algoritmik olmayan bir metottur. Nöronlar belirli bir problemi, programlama yerine direkt olarak mevcut örnekler üzerinden eğitilerek öğrenirler. Yapay sinir ağları, klasik bilgisayar belleği gibi belirli bilgileri belirli yerlerde saklama yerine, öz şeklindeki bilgileri nöronlar arasındaki bağlantılar üzerindeki ağırlık (w) değerleri ile ağ üzerine dağıtarak saklarlar. Bunlar ağın her bir işlem birimini temsil ederler ve birbirleriyle bağlanarak ağı oluştururlar. Her bir nöron basit bir anahtar görevi yapar ve şiddetine göre gelen sinyali ya sönmümlendirir ya da iletir. Böylece ağ içerisindeki her bir nöronun belli bir yükü olur.

Biyolojik bir nöron hareketle matematiksel olarak modellendirilmiş yapay nöron Şekil 2.10'da görülmektedir.



Şekil 2.10. Biyolojik ve yapay sinirler (neurons)

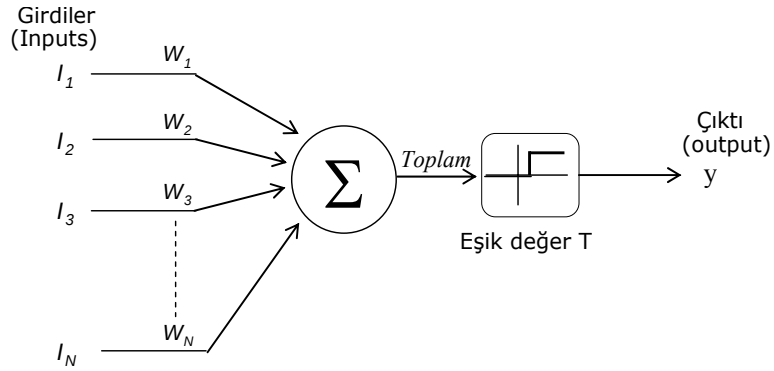
2.2.1.5.1. Mcculloch-pitts'in Sinir (Neuron) Modeli

İlk yapay sinir ağı modeli 1943 yılında, bir sinir hekimi olan Warren McCulloch ile bir matematikçi olan Walter Pitts tarafından gerçekleştirilmiştir. McCulloch ve Pitts, insan beyninin hesaplama yeteneğinden esinlenerek, elektrik devreleriyle basit bir sinir ağı modellemişlerdir.

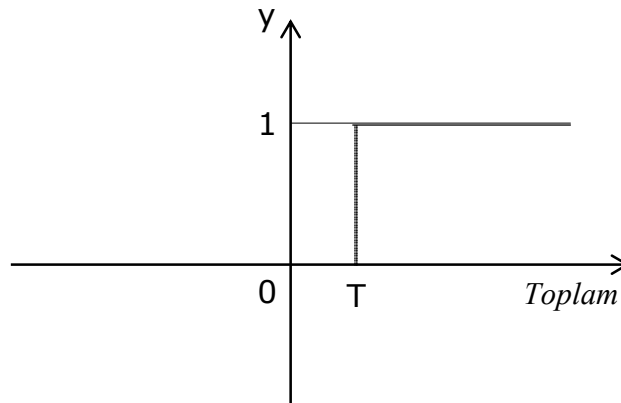
McCulloch-Pitts sinir (neuron) modeli, doğrusal eşik geçidi (linear threshold gate) olarak bilinir. Bu modeleden, $I_1, I_2, I_3, \dots, I_m$ girdiler (inputs) ve bir “y” çıktısı (output) dizisinden oluşan bir sinir (neuron) dir (Şekil 2.11.). Doğrusal eşik geçidi (linear threshold gate) basit olarak girdileri (inputs) seti farklı iki grup içerisinde sınıflandırılır. Böylece çıktı (y) bir ikiliye karşılık gelir. Böyle bir fonksiyon aşağıda verilen denklemlerle açıklanabilir :

$$\text{Toplam} = \sum_{i=1}^N I_i W_i \quad (23)$$

$$Y = f(\text{Toplam}) \quad (24)$$



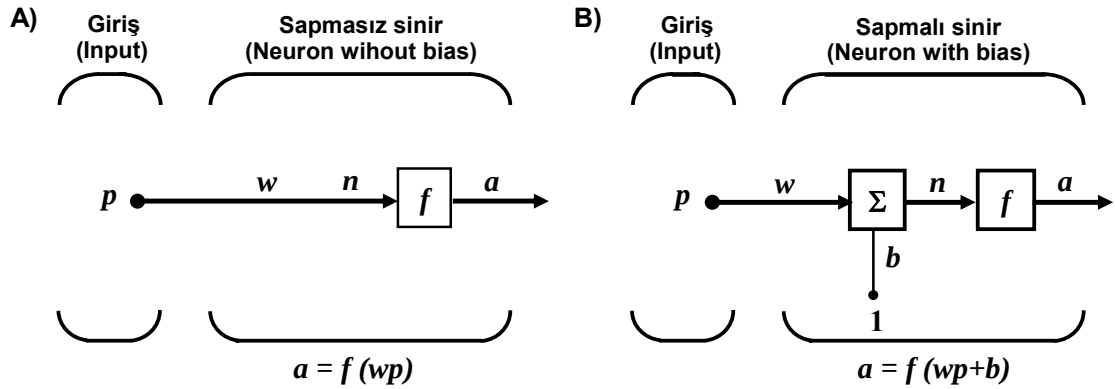
Şekil 2.11. Doğrusal eşik fonksiyonu



Şekil 2.12. Doğrusal eşik fonksiyonu (Linear threshold function)

2.2.1.5.2. Sinir Modeli ve Ağ Mimarileri (Neuron Model and Network Architectures)

2.2.1.5.2.1. Basit sinir modeli (Simple Neuron model)

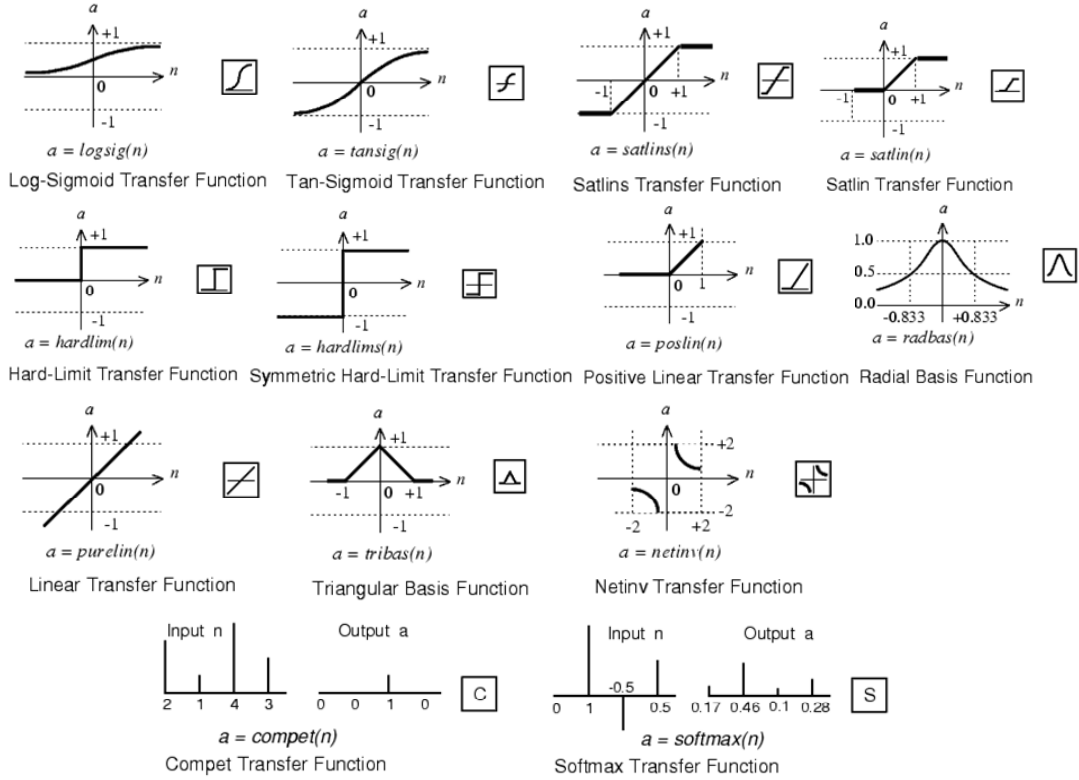


Şekil 2.13. A) Sapmasız basit sinir modeli ve B) sapmalı basit sinir modeli

Tek sayılı bir girdi ile ve sapmasız bir sinir (neuron) şekil 2.13.A da görülmektedir. Şekil 2.13.B’de ise sayısal girdi p ile çarpımı bir sayı olan wxp elde edilir. Burada ağırlıklandırılmış girdi (weighted input) wxp sayısal çıktı, sayısal çıktı a ’yı oluşturan taşıma fonksiyonunun değişkenidir. Şekil 5B daki sinir (neuron) bir sayısal sapma b (bias)’ya sahiptir. Bu sapma (bias) değeri wxp çarpımına ilave edilir. Sapma (bias) değeri 1 olan bir girdi (input) sabitine sahip olmaktan ziyade bir ağırlık gibidir.

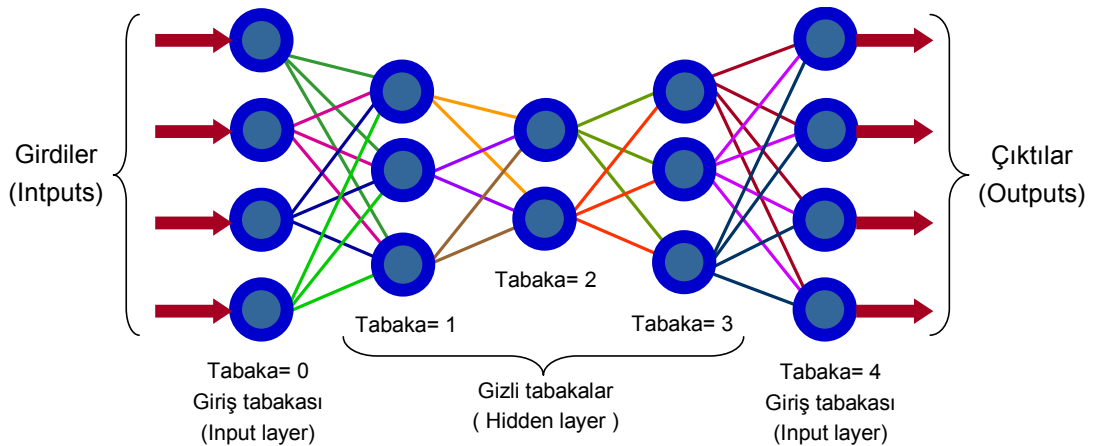
Burada f bir taşıma fonksiyonudur olup genel anlamda akıl yürütücüsünün (n) kullandığı bir basamak fonksiyon ya da bir sigmoid fonksiyondur ve a çıktısını oluşturur.

2.2.1.5.3. Taşıma Fonksiyonları (Transfer Functions)



Şekil 2.14. Taşıma fonksiyonu modelleri (Transfer function models)

2.2.1.5.4. ÇokTabakalı Sinir Ağ Mimarisi



Şekil 2.15. Taşıma fonksiyonu modelleri (Transfer function models)

2.2.2. Kalibrasyon (Konsantrasyon) Setinin Tasarımı

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

2.2.3. Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-validation Procedure)

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (standard error of calibration → SEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (standard error of prediction → SEP) gibi parametreler kullanılmaktadır. SEC ve SEP değerlerinin minimum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır. Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen konsantrasyon değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı (r), doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır (1-22).

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemi (cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için tahmin edilen (tayin) hataların karalarının toplamı (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) hesaplanır. Optimal faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler minimum PRESS değeri ve F-istatistidir.

2.3. Gereçler

2.3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre (UV/ VIS): Shimadzu UV- 1601

Hassas terazi: Shimadzu Libror AEG-220

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

Magnet

Pipet (1-10 mL)

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

Balon joje (25-250 mL)

Beher

2.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol (Merck)

Telmisartan (Merck)

Hidroklorotiazid (Merck)

2.3.3. Analiz edilen bileşiklerin ticari preaparatları

PRİTOR PLUS® (Tablet) GlaxoSmithKline:

Telmisartan:..... 80 mg

Hidroklorotiazid:.....12.5 mg

MİCARDİS PLUS® (Tablet) Boehringer Ingelhiem:

Telmisartan:..... 80 mg

Hidroklorotiazid:.....12.5 mg

3. BULGULAR

Kemometrik kalibrasyonların TEL ve HCT bileşiklerinin analizine uygulamasında üç farklı kemometrik yöntem geliştirildi. Bunlar PCR, PLS ve ANN kalibrasyon yöntemleridir. Kemometrik yöntemlerin uygulaması için spektral koşullar optimizasyonu ve optimal kalibrasyon setinin hazırlanması için ön çalışmalar yapıldı. Saptanan spektral koşullarda kalibrasyon setinin ve numunelerin 200-350 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı ve kemometrik kalibrasyonlar 250-330 nm dalga boyu bölgesindeki bütün absorbans değerlerinin vektörel ölçümleri kullanılarak elde edildi. Kemometrik algoritmalarla hesaplanan PCR, PLS ve ANN kalibrasyonları yapay ve farmosötik numunelerin analizine uygulandı.

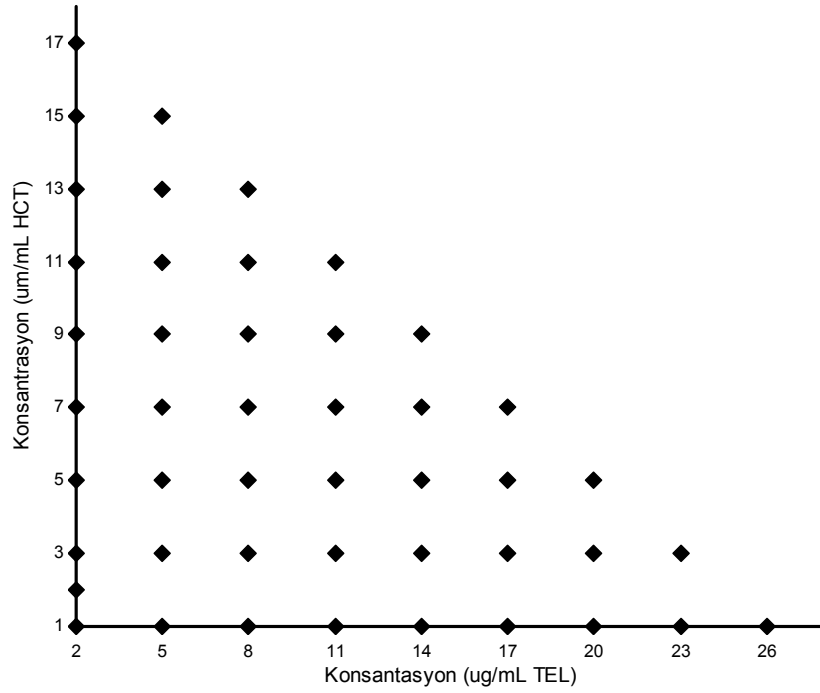
3.1. Kalibrasyon Setinin Hazırlanması

Kemometrik kalibrasyonlar için metanol içerisinde TEL için 1-26 µg/mL ve HCT için 1-17 µg/mL konsantrasyon aralığında her iki bileşiği içeren 45 değişik kompozisyonda simetrik bir kalibrasyon seti hazırlandı. Çizelge 3.1. de hazırlanan kalibrasyon seti sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. TEL ve HCT analizi için kalibrasyon seti

Kalibrasyon seti								
Konsatrasyon ($\mu\text{g/mL}$)			Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)			Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)		
No.	TEL	HCT	No.	TEL	HCT	No.	TEL	HCT
1	2.0	1.0	16	5.0	13.0	31	14.0	1.0
2	2.0	3.0	17	5.0	15.0	32	14.0	3.0
3	2.0	5.0	18	8.0	1.0	33	14.0	5.0
4	2.0	7.0	19	8.0	3.0	34	14.0	7.0
5	2.0	9.0	20	8.0	5.0	35	14.0	9.0
6	2.0	11.0	21	8.0	7.0	36	17.0	1.0
7	2.0	13.0	22	8.0	9.0	37	17.0	3.0
8	2.0	15.0	23	8.0	11.0	38	17.0	5.0
9	2.0	17.0	24	8.0	13.0	39	17.0	7.0
10	5.0	1.0	25	11.0	1.0	40	20.0	1.0
11	5.0	3.0	26	11.0	3.0	41	20.0	3.0
12	5.0	5.0	27	11.0	5.0	42	20.0	5.0
13	5.0	7.0	28	11.0	7.0	43	23.0	1.0
14	5.0	9.0	29	11.0	9.0	44	23.0	3.0
15	5.0	11.0	30	11.0	11.0	45	26.0	1.0

Kalibrasyonlar için rastgele kalibrasyon seti yerine simetrik kalibrasyon seti tercih edilmiştir. Bunun sebebi analiz esnasında meydana gelebilecek kalibrasyon hatalarını minimize etmektir. Çizelge 3.1. deki simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki projeksiyon grafiği Şekil 3.1 de görülmektedir.



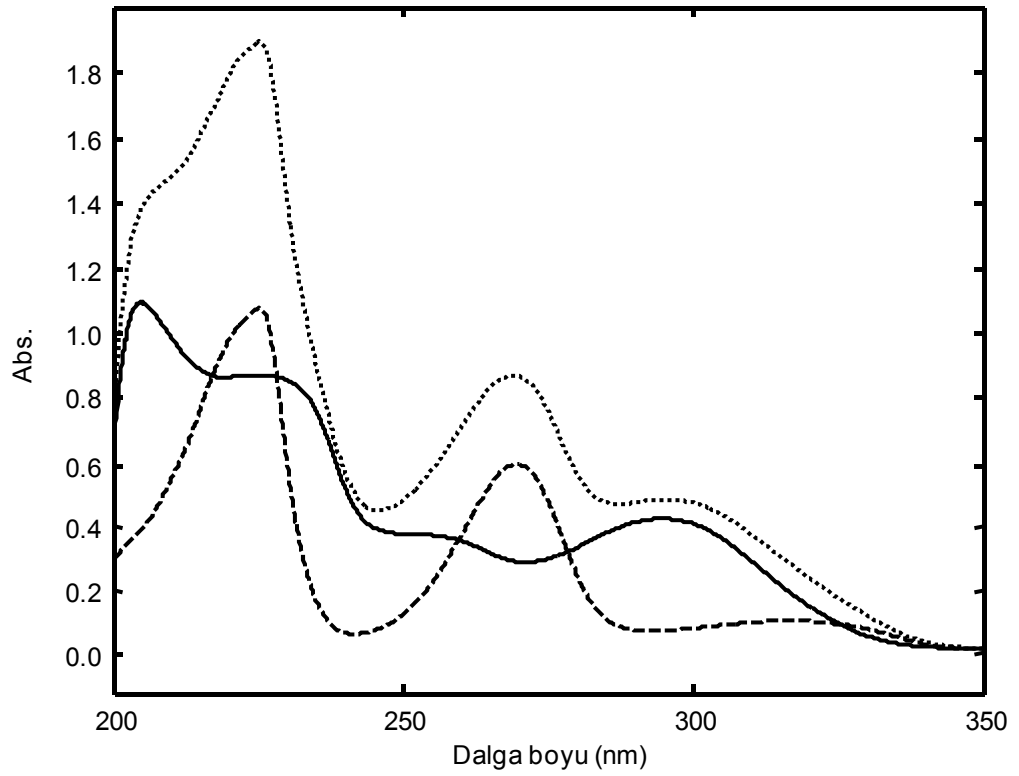
Şekil 3.1. Simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği

3.2. Spektral Koşulların Optimizasyonu

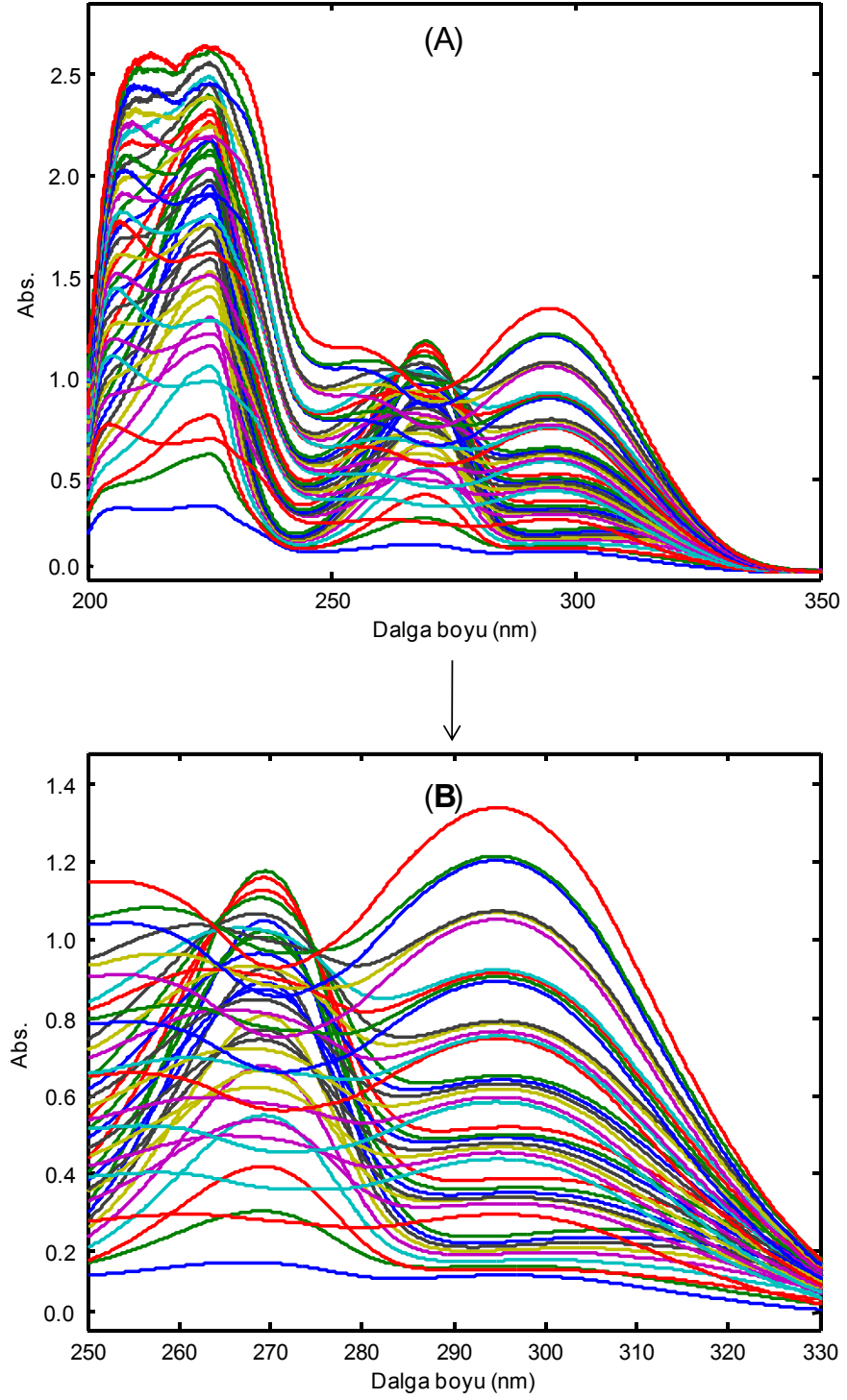
Spektrofotometrik çalışmalarda TEL ve HCT için metanolün uygun çözücü olduğu saptandı. Metanol içerisinde TEL ve HCT bileşikleriyle karşılık gelen karışımının 200-350 nm dalga boyu aralığında spektrumları alındı (Şekil 3.2.). Şekil 3.2. den de görüldüğü gibi her iki bileşik aynı dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır. Bu nedenle klasik spektroskopik yaklaşımlarla her iki bileşiğin aynı anda miktar tayinleri mümkün değildir.

Geliştirilen kalibrasyon modelleri için bölüm 3.1. deki kalibrasyon seti hazırlandı ve bu kalibrasyon setinin 200-350 nm dalga boyu aralığındaki spektrumları çizdirildi (Şekil 3.3A.). Aynı spektral işlemler yapay ve gerçek numuneler için de uygulandı. Kemometrik PCR, PLS ve ANN kalibrasyonlarının hesaplanmasında hazırlanan kalibrasyon seti için 250-330 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla ölçülen

absorbans değerleri kullanıldı (Şekil 3.3B). Kalibrasyon işlemlerinde 200-250 nm dalga boyu aralığındaki absorbans ölçümlerinin, spektrofotometrenin ölçüm sınırlarının üstünde absorbans değerleri vermesi ve ticari preparatlardaki yardımcı maddelerin girişim yapması nedeniyle doğru sonuçlar elde edilemediği için kullanışlı olmadığı saptanmıştır.



Şekil 3.2. TEL (8 µg/mL) (—) ve HCT (9 µg/mL) (-----) ile iki bileşige karşılık gelen karışımın (.....) absorpsiyon spektrumları (Metanol içerisinde).



Şekil 3.3. TEL ve HCT için Çizelge 3.1. ve Şekil 3.1. de verilen kalibrasyon setinin absorpsiyon spektrumları (Metanol içerisinde).

3.2.1. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi (PCR)

PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbands matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 2.2.1.3. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.2.1.1. Temel Bileşen Regresyonu Kalibrasyonu (Principal Component Regression Calibration)

PCR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 250-330 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0,1$ nm aralıklarla 801 noktada absorbands değerleri okundu (Şekil 3.3B). Bölüm 2.2.1.3. de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbands ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbandsların varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra konsantrasyonlar arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kuruldu. TEL ve HCT içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbands değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirildi.

3.2.1.2. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

PCR yöntemini valide etmek için metanol içerisinde TEL için 1-26 $\mu\text{g/mL}$ ve HCT için 1-17 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 18 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım (GK) değerleri . TEL için % 100.1, HCT için % 100.7 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri . TEL için % 2.78 ve HCT için %1.52 olarak hesaplandı. PCR kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2. de gösterildi.

Çizelge 3.2. TEL ve HCT yapay karışımlarına PCR kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

No.	Karışım ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)	
	TEL	HCT	TEL	HCT	TEL	HCT
1	2.0	3.5	2.10	3.57	102.0	105.0
2	5.0	3.5	5.18	3.64	103.9	103.7
3	8.0	3.5	8.02	3.55	101.3	100.2
4	11.0	3.5	10.95	3.54	101.0	99.6
5	14.0	3.5	13.90	3.44	98.2	99.3
6	17.0	3.5	16.76	3.36	96.0	98.6
7	20.0	3.5	20.24	3.53	100.8	101.2
8	23.0	3.5	23.04	3.35	95.7	100.2
9	26.0	3.5	25.79	3.54	101.2	99.2
10	22.4	1.0	22.60	1.07	107.2	100.9
11	22.4	3.0	22.65	2.88	96.1	101.1
12	22.4	5.0	22.49	5.04	100.8	100.4
13	22.4	7.0	22.46	7.02	100.2	100.3
14	22.4	9.0	22.53	9.01	100.2	100.6
15	22.4	11.0	22.56	10.91	99.2	100.7
16	22.4	13.0	22.65	13.04	100.3	101.1
17	22.4	15.0	22.41	14.88	99.2	100.0
18	22.4	17.0	22.67	16.79	98.7	101.2
				$\bar{X}$	100.1	100.7
				SS	2.79	1.53
				% BSS	2.78	1.52

PCR yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (TEL için 2.0, 14.0 ve 23.0 $\mu\text{g/mL}$ ve HCT için 2.0, 10.0 ve 15.0 $\mu\text{g/mL}$) ve her derişim için altı farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.3. PCR kalibrasyon yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
2.0	2.0	2.05	2.42	102.4	0.38	0.37	2.05	2.27	102.3	1.18	1.15
14.0	10.0	14.24	1.74	101.7	1.91	1.88	10.00	-0.02	100.0	0.32	0.32
23.0	15.0	23.42	1.84	101.8	0.92	0.90	14.96	-0.23	99.8	0.31	0.31
			$\bar{x}$	102.0				$\bar{x}$	100.7		
			SS	0.37				SS	1.39		
			BSS	0.36				BSS	1.38		
Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
2.0	2.0	2.02	0.79	100.8	2.42	2.40	2.04	2.15	102.1	1.01	0.99
14.0	10.0	14.19	1.39	101.4	2.56	2.52	10.08	0.77	100.8	0.25	0.25
23.0	15.0	23.37	1.61	101.6	1.12	1.11	15.02	0.14	100.1	0.81	0.81
			$\bar{x}$	101.3				$\bar{x}$	101.0		
			SS	0.43				SS	1.03		
			BSS	0.42				BSS	1.02		

GK: % Geri kazanım

BSS: % Bağlı standart sapma

SS: Standart sapma

BH: % Bağlı hata

PCR kalibrasyon yöntemi gerçek ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce TEL ve HCT içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 2.5 µg/mL TEL ve 16.0 µg/mL HCT 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 3.0, 6.0 ve 9.0 µg/mL TEL ve 2.5, 7.5 ve 10.0 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **MİCARDİS PLUS®** Tablet (I) ve **PRİTOR PLUS®** Tablet (II) için ayrı ayrı yapıldı. Analiz sonucunda preparattan gelen TEL ve HCT miktarları

düşülerek ilave edilen standartlar içindeki TEL ve HCT için geri kazanım ve diğer hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. PCR yöntemin (I) durumundaki uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PCR kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 100.5 ve % 2.26 ve HCT için % 98,8 ve % 2.10 olarak bulundu. Yöntemin (II) durumundaki uygulamasında ise % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri PCR kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 101.5 ve % 1.09 ve HCT için % 103.9 ve % 0.53 olarak hesaplandı. PCR yöntemi için başarılı kesinlik ve doğruluk gözlemlendi.

Çizelge 3.4. Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri

(I) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)
3.0	2.5	3.09	0.05	1.63	3.04	103.0	2.52	0.07	2.66	0.76	100.8
6.0	7.5	5.92	0.10	1.64	-1.26	98.7	7.43	0.37	4.96	-0.99	99.0
9.0	10.0	8.97	0.27	3.03	-0.37	99.6	9.66	0.46	4.74	-3.37	96.6
		$\bar{X}$ 100.5					$\bar{X}$ 98.8				
		SS 2.27					SS 2.08				
		% BSS 2.26					% BSS 2.10				

(II) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)
3.0	2.5	3.05	0.2	5.38	1.57	101.6	2.60	0.12	4.74	3.99	104.0
6.0	7.5	6.02	0.3	5.15	0.37	100.4	7.83	0.11	1.39	4.35	104.4
9.0	10.0	9.23	1.0	10.93	2.59	102.6	10.33	0.05	0.47	3.26	103.3
		$\bar{X}$ 101.5					$\bar{X}$ 103.9				
		SS 1.11					SS 0.55				
		% BSS 1.09					% BSS 0.53				

GK: % Geri kazanım
SS: Standart sapma

BSS: % Bağıl standart sapma
BH: % Bağıl hata

3.2.1.3. PCR Yöntemi için ANOVA Testi

PCR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için üç farklı konsantrasyonda (TEL için 2.0, 14.0 ve 23.0 µg/mL ve HCT için 2.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim ve altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin aynı gün ve farklı günlerde hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=30$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.53 olmasına karşılık TEL için hesaplanan F-test değeri 0.71 ve p-değeri 0.62, HCT için hesaplanan F-test değeri 2.20 ve p-değeri 0.08 olarak bulunmuştur. Sonuçlar çizelge 3.4.1 de sunulmuştur. ANOVA testinde $F\text{-hesaplanan} < F\text{-tablo}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Çizelge 3.4.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

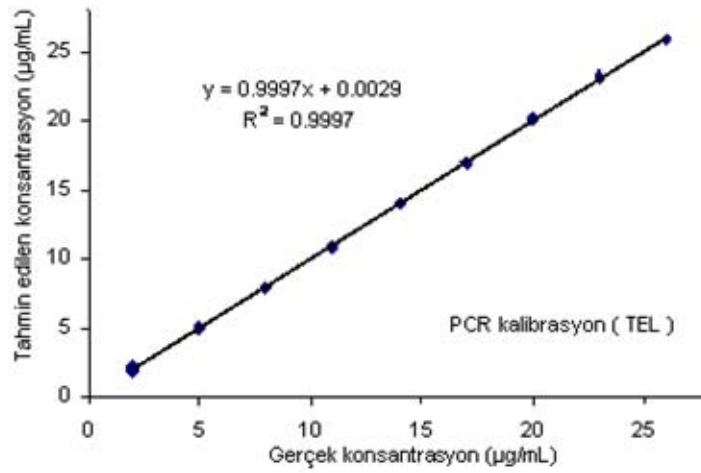
Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
TEL	Gruplar arası	8.66	5	1.73	0.71	0.62	2.53
	Grup içi	73.14	30	2.44			
	Toplam	81.79	35				
HCT	Gruplar arası	25.11	5	5.02	2.20	0.08	2.53
	Grup içi	68.49	30	2.28			
	Toplam	93.60	35				

3.2.1.4. PCR Yönteminde İstatistiksel Analiz

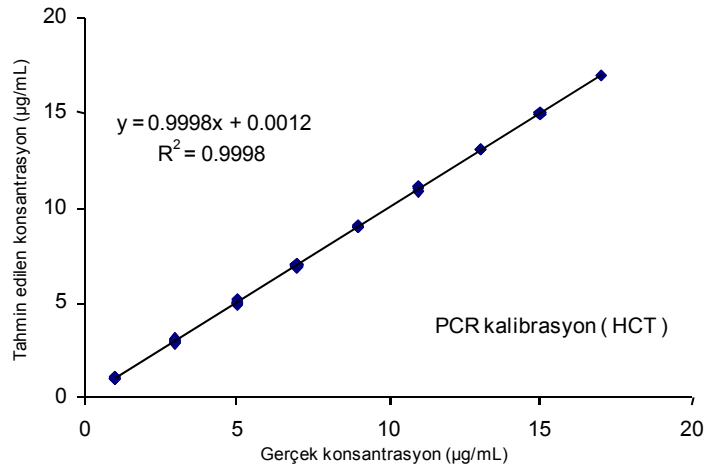
3.2.1.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası

TEL ve HCT içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PCR kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde üç faktör kullanımında tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS)

minimal değerleri elde edilmiştir. TEL ve HCT için kurulan üç faktörlü PCR kalibrasyonunda PRESS değeri TEL ve HCT için sırasıyla 0.5571 ve 0.1741 olarak hesaplandı. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), güncel ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve TEL ve HCT için sırasıyla 0.1125 ve 0.0629 olarak bulundu. Güncel ve tahmin edilen konsantrasyon için lineer regresyon analiz sonuçları TEL için Şekil 3.4. de ve HCT için Şekil 3.5. de sunulmaktadır.



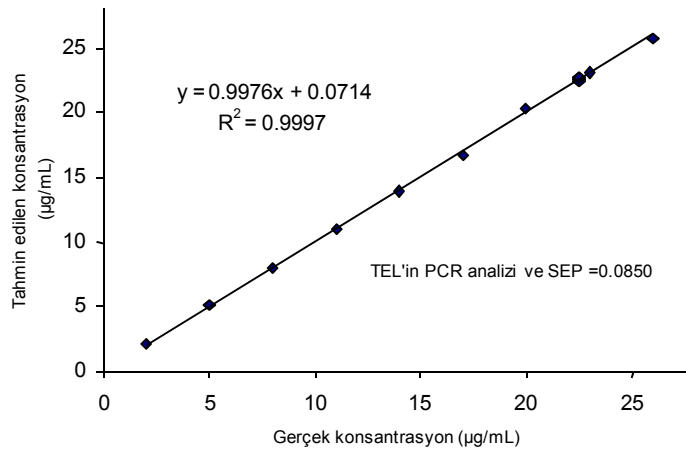
Şekil 3.4. PCR kalibrasyon basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



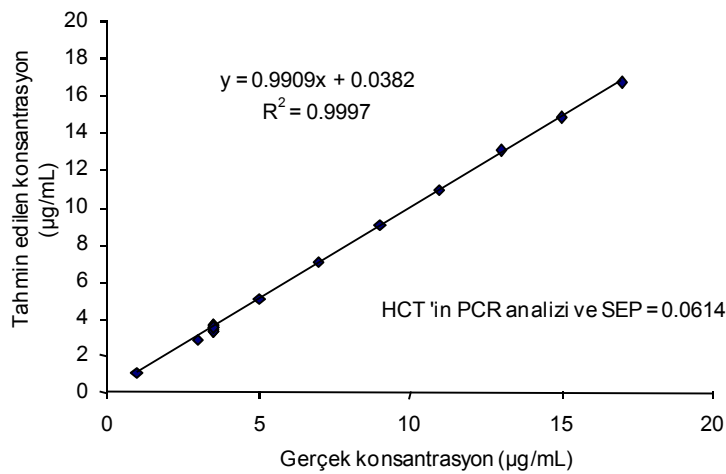
Şekil 3.5. PCR kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar

3.2.1.4.2. Tayinin Standart Hatası

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay telmisartan ve hidroklorotiyazid içeren karışımlarda bu maddelerin gerçek ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ile korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar ve SEP değerleri sırasıyla TEL ve HCT için Şekil 3.6. ve Şekil 3.7. de verildi.



Şekil 3.6. PCR tayin basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 3.7. PCR tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar

3.2.1.5. PCR Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

PCR yönteminin veteriner preparatına uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözeltiden 1.00 mL'lik bir miktar 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve aynı çözücüyle hacim 100 ml'ye tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 250-330 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0,1 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbands değerleri Bölüm 2.2.1.3. de açıklanan PCR algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki TEL ve HCT hesaplandı. Bu işlem için $n = 10$ tekrar yapıldı.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **PRİTOR PLUS[®]** Tablet ve **MİCARDİS PLUS[®]** Tablet preparatları için ayrı ayrı tekrar edildi. **PRİTOR PLUS[®]** Tablet ve **MİCARDİS PLUS[®]** Tablet sonuçları Çizelge 3.5 de sunuldu.

Çizelge 3.5. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına PCR yöntemiyle uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar. ((I) ve (II) preparat etiketindeki miktar: 80 mg TEL/tablet ve 12.5 mg HCT/tablet).

Deney No.	mg/tablet (I)		mg/tablet (II)	
	TEL	HCT	TEL	HCT
1	81.88	12.44	78.45	12.35
2	81.99	12.87	81.47	12.72
3	80.22	12.67	80.73	13.06
4	82.06	13.02	81.41	12.00
5	82.33	12.97	81.94	12.23
6	80.64	12.23	81.55	12.29
7	79.57	12.01	80.92	12.39
8	80.41	12.27	82.12	12.57
9	79.85	12.46	81.58	11.99
10	80.35	12.43	81.51	13.27
$\bar{X}$	80.93	12.54	81.17	12.49
SS	1.03	0.34	1.04	0.42
BSS	1.27	2.69	1.28	3.40
SH	0.32	0.11	0.33	0.13
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.64$	$\bar{X} \pm 0.21$	$\bar{X} \pm 0.64$	$\bar{X} \pm 0.26$

(I) = MİCARDİS PLUS® Tablet

(II) = PRİTOR PLUS® Tablet

GA: Güven aralığı

3.2.2. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyon Yöntemi (PLS)

PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 2.2.1.4. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.2.2.1. Kısmi En Küçük Kareler Kalibrasyonu (Partial Least-Square Calibration)

PLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 250-330 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla 801 noktada absorbans değerleri okundu (Şekil 3.3B). Bölüm 2.2.1.4. de açıklanan PLS algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbansların varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra konsantrasyonlar arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kuruldu. TEL ve HCT içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PLS kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirildi.

3.2.2.2. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

PLS yöntemini valide etmek için metanol içerisinde TEL için 1-26 $\mu\text{g/mL}$ ve HCT için 1-17 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 18 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri . TEL için % 100.2, HCT için % 100.7 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri . TEL için % 2.76 ve HCT için 1.45 olarak hesaplandı. PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6. da gösterildi.

Çizelge 3.6. TEL ve HCT yapay karışımlarına PLS kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri.

Kar.No.	Karışım ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)	
	TEL	HCT	TEL	HCT	TEL	HCT
1	2.0	3.5	2.09	3.57	102.0	104.5
2	5.0	3.5	5.19	3.63	103.8	103.7
3	8.0	3.5	8.02	3.54	101.1	100.2
4	11.0	3.5	10.95	3.54	101.2	99.6
5	14.0	3.5	13.90	3.43	98.1	99.3
6	17.0	3.5	16.76	3.38	96.6	98.6
7	20.0	3.5	20.24	3.52	100.7	101.2
8	23.0	3.5	23.03	3.34	95.6	100.1
9	26.0	3.5	25.79	3.55	101.3	99.2
10	22.4	1.0	22.60	1.08	107.5	100.9
11	22.4	3.0	22.65	2.89	96.5	101.1
12	22.4	5.0	22.49	5.04	100.8	100.4
13	22.4	7.0	22.46	7.02	100.3	100.3
14	22.4	9.0	22.53	9.01	100.1	100.6
15	22.4	11.0	22.56	10.91	99.2	100.7
16	22.4	13.0	22.66	13.04	100.3	101.1
17	22.4	15.0	22.41	14.88	99.2	100.1
18	22.4	17.0	22.68	16.78	98.7	101.2
X					100.2	100.7
SS					2.77	1.46
% BSS					2.76	1.45

PLS yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (TEL için 2.0, 14.0 ve 23.0 $\mu\text{g/mL}$ ve HCT için 2.0, 10.0 ve 15.0 $\mu\text{g/mL}$) her derişim için 6 farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7. de sunulmaktadır.

Çizelge 3.7. PLS kalibrasyon yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
		Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
TEL	HCT										
2.0	2.0	2.03	1.27	101.3	0.63	0.62	2.03	1.74	101.7	0.96	0.94
14.0	10.0	14.11	0.80	100.8	0.28	0.28	10.04	0.35	100.4	0.89	0.89
23.0	15.0	23.39	1.71	101.7	0.46	0.45	15.09	0.60	100.6	1.68	1.67
			$\bar{x}$	101.2				$\bar{x}$	100.9		
			SS	0.46				SS	0.74		
		%	BSS	0.46			%	BSS	0.73		
Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
		Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
TEL	HCT										
2.0	2.0	2.04	2.02	102.0	1.48	1.45	2.04	1.95	101.9	0.88	0.87
14.0	10.0	14.35	2.50	102.5	2.32	2.27	10.11	1.13	101.1	2.28	2.25
23.0	15.0	23.46	2.01	102.0	1.50	1.47	14.98	-0.16	99.8	1.41	1.41
			$\bar{x}$	102.2				$\bar{x}$	101.0		
			SS	0.28				SS	1.06		
		%	BSS	0.27			%	BSS	1.05		

GK: % Geri kazanım
SS: Standart sapma

BSS: % Bağlı standart sapma
BH: % Bağlı hata

PLS kalibrasyon yöntemi gerçek ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce TEL ve HCT içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun içinde standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlarda ki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 2.5 µg/mL TEL ve 16.0 µg/mL HCT 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 3.0, 6.0 ve 9.0 µg/mL TEL ve 2.5, 7.5 ve 10.0 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **MİCARDİS PLUS®** Tablet (I) ve **PRİTOR PLUS®** Tablet (II) için ayrı ayrı yapıldı. Analiz sonucunda preparattan gelen TEL ve HCT miktarları

düşölerek ilave edilen standartlar içindeki TEL ve HCT için geri kazanım ve diğler hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. PLS yöntemin (I) durumundaki uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değlerleri PLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 100.2 ve % 3.15 ve HCT için % 100.6 ve % 2.11 olarak bulundu. Yöntemin (II) durumundaki uygulamasında ise % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değlerleri PLS kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 101.2 ve % 2.10 ve HCT için % 103.4 ve % 1.24 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.8. Standart ekleme tekniğı kullanılarak elde edilen geri kazanım değlerleri

(I) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)
3.0	2.5	3.11	0.06	1.95	3.66	103.7	2.56	0.04	1.59	2.5	102.5
6.0	7.5	5.85	0.03	0.43	-2.54	97.5	7.56	0.26	3.50	0.8	100.8
9.0	10.0	8.96	0.27	3.03	-0.47	99.5	9.83	0.33	3.34	-1.7	98.3
		X̄ 100.2					X̄ 100.6				
		SS 3.15					SS 2.12				
		% BSS 3.15					% BSS 2.11				

(II) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)
3.0	2.5	3.10	0.15	4.78	3.38	103.4	2.55	0.06	2.28	2.0	102.0
6.0	7.5	5.95	0.24	4.10	-0.86	99.1	7.77	0.02	0.27	3.6	103.6
9.0	10.0	9.10	0.20	2.24	1.08	101.1	10.46	0.43	4.10	4.6	104.6
		X̄ 101.2					X̄ 103.4				
		SS 2.12					SS 1.29				
		% BSS 2.10					% BSS 1.24				

GK: % Geri kazanım
SS: Standart sapma

BSS: % Bağıl standart sapma
BH: % Bağıl hata

3.2.2.3. PLS Yöntemi için ANOVA Testi

PLS kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için üç farklı konsantrasyonda (TEL için 2.0, 14.0 ve 23.0 µg/mL ve HCT için 2.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=30$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.53 olmasına karşılık TEL için hesaplanan F-test değeri 1.77 ve p-değeri 0.15, HCT için hesaplanan F-test değeri 2,41 ve p-değeri 0.06 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.8.1 de sunulmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

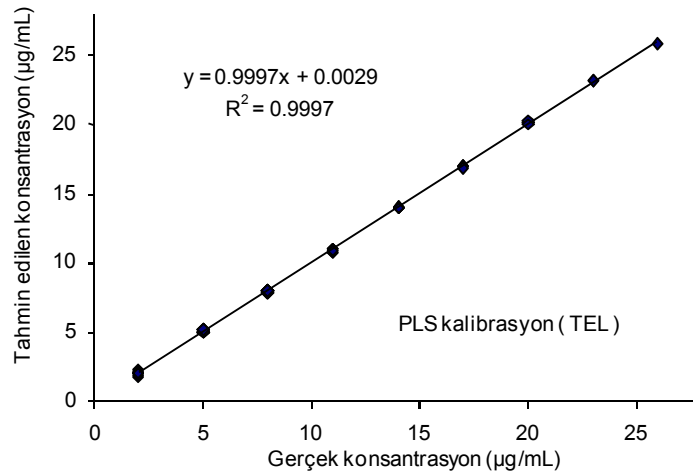
Çizelge 3.8.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
TEL	Gruplar arası	12.01	5	2.40	1.77	0.15	2.53
	Grup içi	40.75	30	1.36			
	Toplam	52.76	35				
HCT	Gruplar arası	20.10	5	4.02	2.41	0.06	2.53
	Grup içi	49.99	30	1.67			
	Toplam	70.10	35				

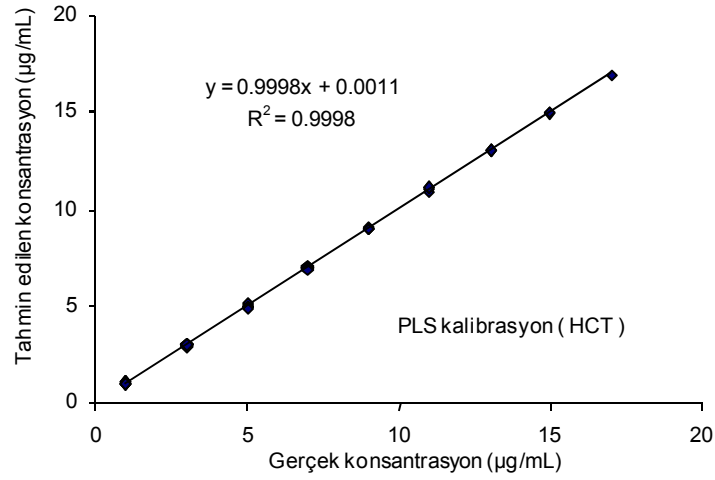
3.2.2.4. PLS Yönteminde İstatistiksel Analiz

3.2.2.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası

TEL ve HCT içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonunun kurulmasında çapraz validasyon işleminde üç faktör kullanımında tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. TEL ve HCT için kurulan üç faktörlü PCR kalibrasyonunda PRESS değeri TEL ve HCT için sırasıyla 0.5599 ve 0.1639 olarak hesaplandı. Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), güncel ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve TEL ve HCT için sırasıyla 0.1128 ve 0.0610 olarak bulundu. Güncel ve tahmin edilen konsantrasyon için lineer regresyon analiz sonuçları TEL için Şekil 3.8 de ve HCT için Şekil 3.9 da sunulmaktadır.



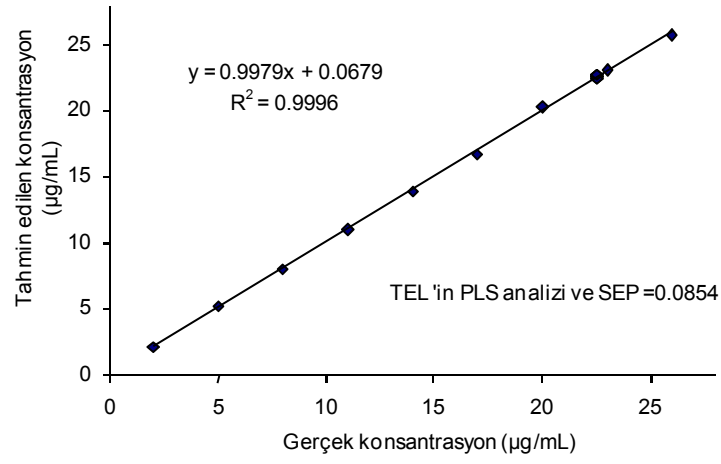
Şekil 3.8. PLS kalibrasyon basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



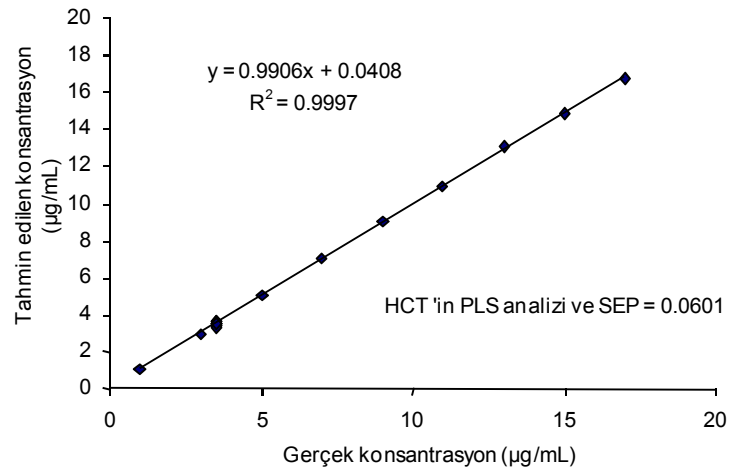
Şekil 3.9. PLS kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar

3.2.2.4.2. Tayinin Standart Hatası

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay telmisartan ve hidroklorotiyazid içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Preiction→SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ile korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar ve SEP değerleri sırasıyla TEL ve HCT için Şekil 3.10. ve Şekil 3.11. da verildi.



Şekil 3.10. PLS tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 3.11. PLS tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar

3.2.2.5. PLS Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

PLS yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözeltiden 1.00 mL'lik bir miktar 100 mL'lik balon jojeye transfer edildi ve aynı çözücüyle hacim tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 250-330 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbans değerleri Bölüm 2.2.1.4. de açıklanan PLS algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki TEL ve HCT hesaplandı. Bu işlem için $n = 10$ tekrar yapıldı.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **PRİTOR PLUS[®]** Tablet ve **MİCARDİS PLUS[®]** Tablet preparatları için ayrı ayrı tekrar edildi. **PRİTOR PLUS[®]** Tablet ve **MİCARDİS PLUS[®]** Tablet sonuçları Çizelge 3.9 de sunuldu.

Çizelge 3.9. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına PLS yöntemiyle uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar. (I) ve (II) preparat etiketindeki miktar: 80 mg TEL/tablet ve 12.5 mg HCT/tablet).

Deney No.	mg/tablet (I)		mg/tablet (II)	
	TEL	HCT	TEL	HCT
1	82.80	12.85	79.04	12.71
2	81.92	12.43	78.85	12.38
3	80.15	11.99	80.60	12.49
4	82.00	12.60	81.29	12.75
5	82.27	12.49	81.81	12.29
6	80.56	12.52	81.43	12.66
7	79.49	12.63	80.80	12.43
8	80.32	12.45	82.00	12.71
9	79.77	12.41	81.46	12.45
10	80.27	11.99	81.39	12.60
$\bar{X}$	80.95	12.44	80.87	12.55
SS	1.18	0.27	1.09	0.16
BSS	1.45	2.14	1.35	1.26
SH	0.37	0.08	0.35	0.05
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.73$	$\bar{X} \pm 0.16$	$\bar{X} \pm 0.68$	$\bar{X} \pm 0.10$

(I) = MİCARDİS PLUS® Tablet

(II) = PRİTOR PLUS® Tablet

GA: Güven aralığı

3.2.3. Yapay Sinir Ağları Yöntemi (ANN)

ANN yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 2.2.1.5.de ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.2.3.1. Yapay Sinir Ağları Yöntemi Kalibrasyonu (Artificial Neural Networks Calibration)

ANN kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 250-329.9 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.1$ nm aralıklarla 801 noktada absorbans değerleri okundu (Şekil 3.3B). Bölüm 2.2.1.5. de açıklanan ANN algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve konsantrasyon değerleri girdiler (inputs) olarak ANN kalibrasyonu için kullanıldı. ANN kalibrasyonunda 40 birinci tabaka, gizli tabakalardan ilkinde 20 gizli tabaka ve ikincisinde 10 gizli tabaka ile çıktı tabakasında 2 tabakadan oluşan sırasıyla logaritmik sinyal fonksiyonu dört kez herbir tabaka için kullanıldı. Kalibrasyon için tahmini ortalama karelerin hatası 3.50×10^{-6} olarak alındı ve 3.48×10^{-6} hata ile 70 devir sonucunda kalibrasyon hesaplandı. TEL ve HCT içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri girdiler olarak sisteme girildi ve ANN kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirildi.

3.2.3.2. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

ANN yöntemini valide etmek için metanol içerisinde TEL için 1-26 $\mu\text{g/mL}$ ve HCT için 1-17 $\mu\text{g/mL}$ çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 18 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir validasyon seti hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti kullanılarak kurulan ANN kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri . TEL için % 101.8 , HCT için % 100.6 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri . TEL için % 2.15 ve HCT için 3,62 olarak hesaplandı.

PLS kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10. da gösterildi.

Çizelge 3.10. TEL ve HCT yapay karışımlarına ANN kalibrasyon yönteminin uygulanması ile elde edilen geri kazanım değerleri

No.	Karışım ($\mu\text{g/mL}$)		Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)		Geri kazanım (%)	
	TEL	HCT	TEL	HCT	TEL	HCT
1	2.0	3.5	2.08	3.56	104.1	101.8
2	5.0	3.5	5.02	3.56	100.3	101.6
3	8.0	3.5	8.04	3.60	100.5	102.8
4	11.0	3.5	11.03	3.62	100.3	103.4
5	14.0	3.5	14.00	3.47	100.0	99.2
6	17.0	3.5	16.87	3.37	99.2	96.3
7	20.0	3.5	20.03	3.50	100.2	100.0
8	23.0	3.5	23.02	3.49	100.1	99.7
9	26.0	3.5	25.89	3.69	99.6	105.4
10	22.4	1.0	22.36	0.92	99.8	91.5
11	22.4	3.0	22.37	2.86	99.8	95.2
12	22.4	5.0	22.76	5.27	101.6	105.3
13	22.4	7.0	23.51	7.04	104.9	100.6
14	22.4	9.0	23.44	9.10	104.7	101.2
15	22.4	11.0	23.10	10.75	103.1	97.7
16	22.4	13.0	23.32	13.44	104.1	103.4
17	22.4	15.0	23.38	15.66	104.4	104.4
18	22.4	17.0	23.52	17.12	105.0	100.7
$\bar{X}$					101.8	100.6
SS					2.19	3.64
% BSS					2.15	3.62

ANN yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları kalibrasyon setinin içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (TEL için 2.0, 14.0 ve 23.0 $\mu\text{g/mL}$ ve HCT için 2.0, 10.0 ve 15.0 $\mu\text{g/mL}$) her derişim için 6 farklı çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11. da sunulmaktadır.

Çizelge 3.11. ANN kalibrasyon yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
		Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
TEL	HCT										
2.0	2.0	1.99	-0.26	99.7	2.44	2.45	1.98	-1.18	98.8	1.93	1.95
14.0	10.0	14.85	-1.02	99.0	0.69	0.70	9.75	-2.54	97.5	2.29	2.35
23.0	15.0	23.31	1.36	101.4	0.34	0.34	15.07	0.44	100.4	2.43	2.42
			$\bar{x}$	100.0				$\bar{x}$	98.9		
			SS	1.22				SS	1.49		
		%	BSS	1.21			%	BSS	1.51		

Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
		Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
TEL	HCT										
2.0	2.0	1.98	-1.16	98.8	2.48	2.51	2.00	0.21	100.2	2.33	2.33
14.0	10.0	14.91	-0.59	99.4	2.33	2.35	9.87	-1.28	98.7	2.50	2.53
23.0	15.0	23.11	0.50	100.5	2.42	2.41	15.16	1.06	101.1	2.50	2.48
			$\bar{x}$	99.6				$\bar{x}$	100.0		
			SS	0.84				SS	1.19		
		%	BSS	0.85			%	BSS	1.19		

GK: % Geri kazanım
SS: Standart sapma

BSS: % Bağlı standart sapma
BH: % Bağlı hata

ANN kalibrasyon yöntemi gerçek ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce TEL ve HCT içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun içinde standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlarda ki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 2.5 µg/mL TEL ve 16.0 µg/mL HCT 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 3.0, 6.0 ve 9.0 µg/mL TEL ve 2.5, 7.5 ve 10.0 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **MİCARDİS PLUS®** Tablet (I) ve **PRİTOR PLUS®**

Tablet (II) için ayrı ayrı yapıldı. Analiz sonucunda preparattan gelen TEL ve HCT miktarları düşülerek ilave edilen standartlar içindeki TEL ve HCT için geri kazanım ve diğer hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. ANN yöntemin (I) durumundaki uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri ANN kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 100.4 ve % 4.01 ve HCT için % 99.9 ve % 2.36 olarak bulundu. Yöntemin (II) durumundaki uygulamasında ise % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri ANN kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 101.1 ve % 1.37 ve HCT için % 102.0 ve % 1.86 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.12. Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri

(I) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)
3.0	2.5	2.97	0.08	2.61	-0.93	99.1	2.45	0.13	5.33	-2.08	97.9
6.0	7.5	5.83	0.13	2.31	-2.76	97.2	7.69	0.08	1.03	2.52	102.5
9.0	10.0	9.45	0.45	4.80	4.95	105.0	9.93	0.48	4.88	-0.70	99.3
		$\bar{X}$ 100.4 SS 4.03 % BSS 4.01					$\bar{X}$ 99.9 SS 2.36 % BSS 2.36				
(II) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	% BSS	% BH	GK (%)
3.0	2.5	3.01	0.1	3.12	0.22	100.2	2.52	0.09	3.39	0.84	100.8
6.0	7.5	6.03	0.2	3.32	0.47	100.5	7.57	0.06	0.76	0.96	101.0
9.0	10.0	9.25	0.0	0.12	2.73	102.7	10.42	0.03	0.29	4.19	104.2
		$\bar{X}$ 101.1 SS 1.38 % BSS 1.37					$\bar{X}$ 102.0 SS 1.90 % BSS 1.86				

GK: % Geri kazanım
SS: Standart sapma

BSS: % Bağıl standart sapma
BH: % Bağıl hata

3.2.3.3. ANN Yöntemi için ANOVA Testi

ANN kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için üç farklı konsantasyonda (TEL için 2.0, 14.0 ve 23.0 µg/mL ve HCT için 2.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=30$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.53 olmasına karşılık TEL için hesaplanan F-test değeri 2.29 ve p-değeri 0.07, HCT için hesaplanan F-test değeri 2.48 ve p-değeri 0.05 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.12.1 de sunulmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arsında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

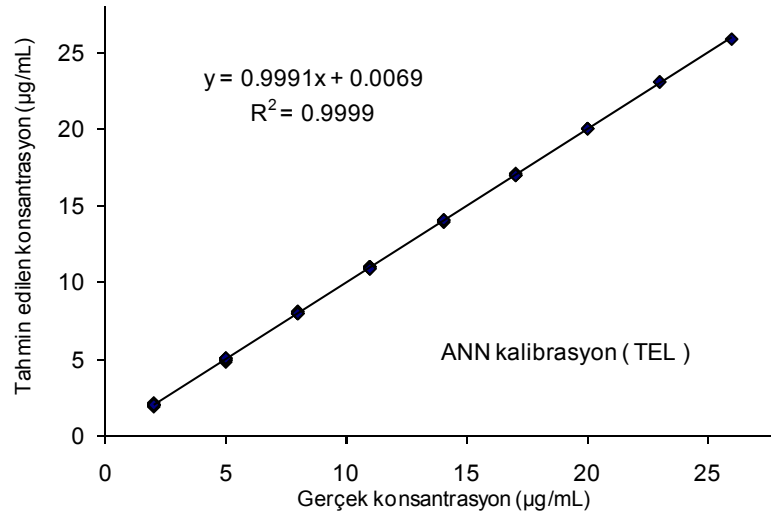
Çizelge 3.12.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
TEL	Gruplar arası	48.33	5	9.67	2.29	0.07	2.53
	Grup içi	126.74	30	4.22			
	Toplam	175.08	35				
HCT	Gruplar arası	54.28	5	10.86	2.48	0.05	2.53
	Grup içi	131.33	30	4.38			
	Toplam	185.60	35				

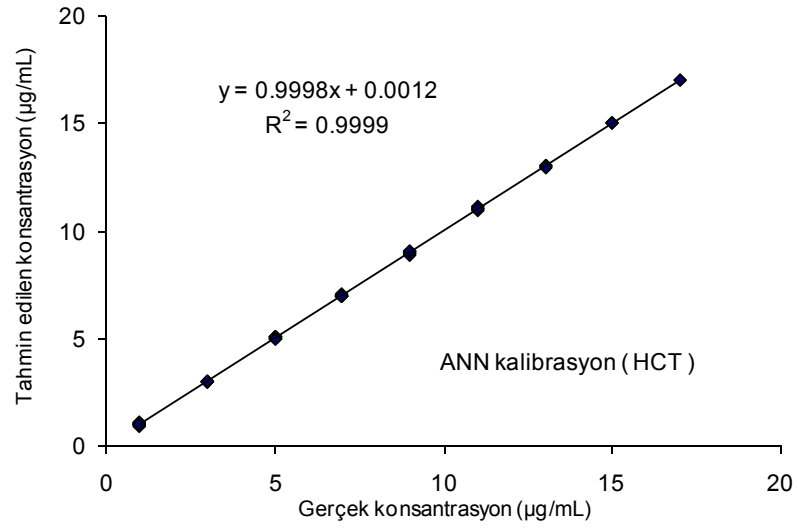
3.2.3.4. ANN Yönteminde İstatistiksel Analiz

3.2.3.4.1. Çapraz Validasyon ve Kalibrasyonun Standart Hatası

TEL ve HCT içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için ANN kalibrasyonunda kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration →SEC), güncel ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve TEL ve HCT için sırasıyla 0.0557 ve 0.0412 olarak bulundu. Güncel ve tahmin edilen konsantrasyon için lineer regresyon analiz sonuçları TEL için Şekil 3.12 de ve HCT için Şekil 3.13. de sunulmaktadır.



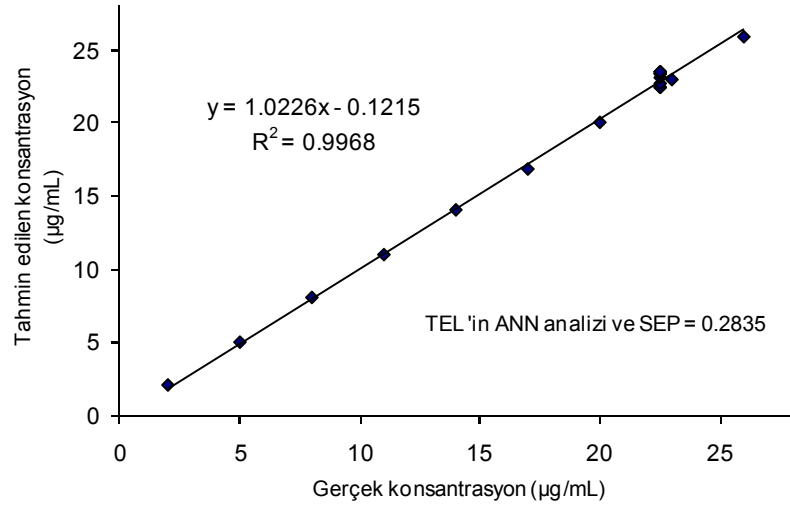
Şekil 3.12. ANN kalibrasyon basamağında TEL için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



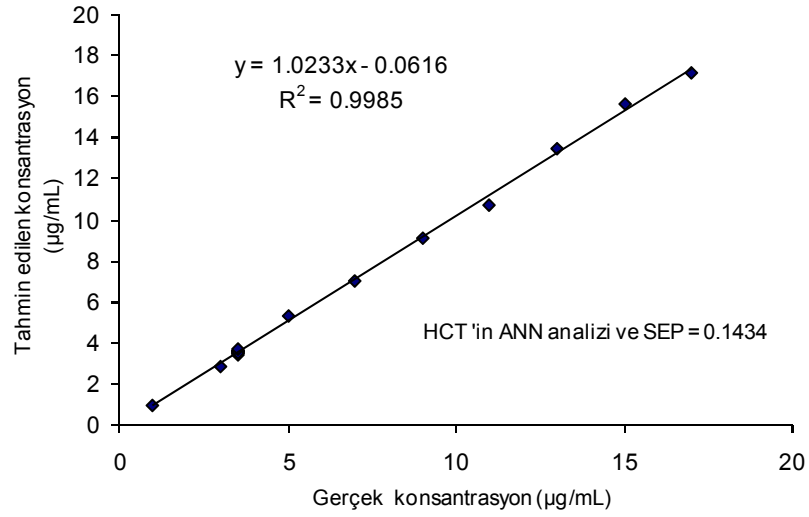
Şekil 3.13. ANN kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar

3.2.3.4.2. Tayinin Standart Hatası

Validasyon seti olarak hazırlanan yapay telmisartan ve hidroklorotiyazid içeren karışımlarda bu maddelerin konulan ve hesaplanan verilerinden PCR kalibrasyonu için tayinin standart hatası (Standard Error of Prediction→SEP), validasyon setinin konsantrasyonuna karşılık hesaplanan konsantrasyonların lineer regresyon analizi ile korelasyon katsayısı (r) için istatistiksel sonuçlar ve SEP değerleri sırasıyla TEL ve HCT için Şekil 3.14 ve Şekil 3.15 de verildi.



Şekil 3.14. ANN tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar



Şekil 3.15. ANN tayin basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen konsantrasyonların lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar

3.2.3.5. ANN Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

ANN yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra 1 tablete karşılık gelen miktar 100 mL'lik balonjojede metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi = 0,45 \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözeltilerden 1.00 mL'lik bir miktar 100 mL'lik balonjojeye transfer edildi ve aynı çözücüyle hacim tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 250-330 nm dalga boyu bölgesinde $\Delta\lambda = 0.1 \text{ nm}$ aralıklarla ölçülen absorbans değerleri Bölüm 2.2.1.5.de açıklanan ANN algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki TEL ve HCT hesaplandı. Bu işlem için $n = 10$ tekrar yapıldı.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **PRİTOR PLUS[®]** Tablet ve **MİCARDİS PLUS[®]** Tablet preparatları için ayrı ayrı tekrar edildi. **PRİTOR PLUS[®]** Tablet ve **MİCARDİS PLUS[®]** Tablet sonuçları Çizelge 3.13. de sunuldu.

Çizelge 3.13. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına ANN yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar. (I) ve (II) preparat etiketindeki miktarlar: 80 mg TEL/tablet ve 12.5 mg HCT/tablet.

Deney No.	mg/tablet (I)		mg/tablet (II)	
	TEL	HCT	TEL	HCT
1	83.77	12.63	79.79	12.82
2	83.96	12.89	79.50	12.44
3	81.27	12.56	82.38	12.39
4	82.57	12.14	83.57	12.62
5	82.68	12.85	82.24	12.35
6	81.75	12.01	82.34	12.64
7	80.15	12.54	82.97	12.83
8	81.55	12.45	82.17	12.10
9	80.52	12.69	82.43	12.69
10	81.36	12.56	80.49	12.28
$\bar{X}$	81.96	12.53	81.79	12.51
SS	1.27	0.28	1.37	0.24
BSS	1.55	2.22	1.68	1.94
SH	0.40	0.09	0.43	0.08
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.79$	$\bar{X} \pm 0.17$	$\bar{X} \pm 0.85$	$\bar{X} \pm 0.15$

(I) = MİCARDİS PLUS® Tablet

(II) = PRİTOR PLUS® Tablet

GA: Güven aralığı

3.2.4. Türev Spektrofotometri (Karşılaştırma Yöntemi)

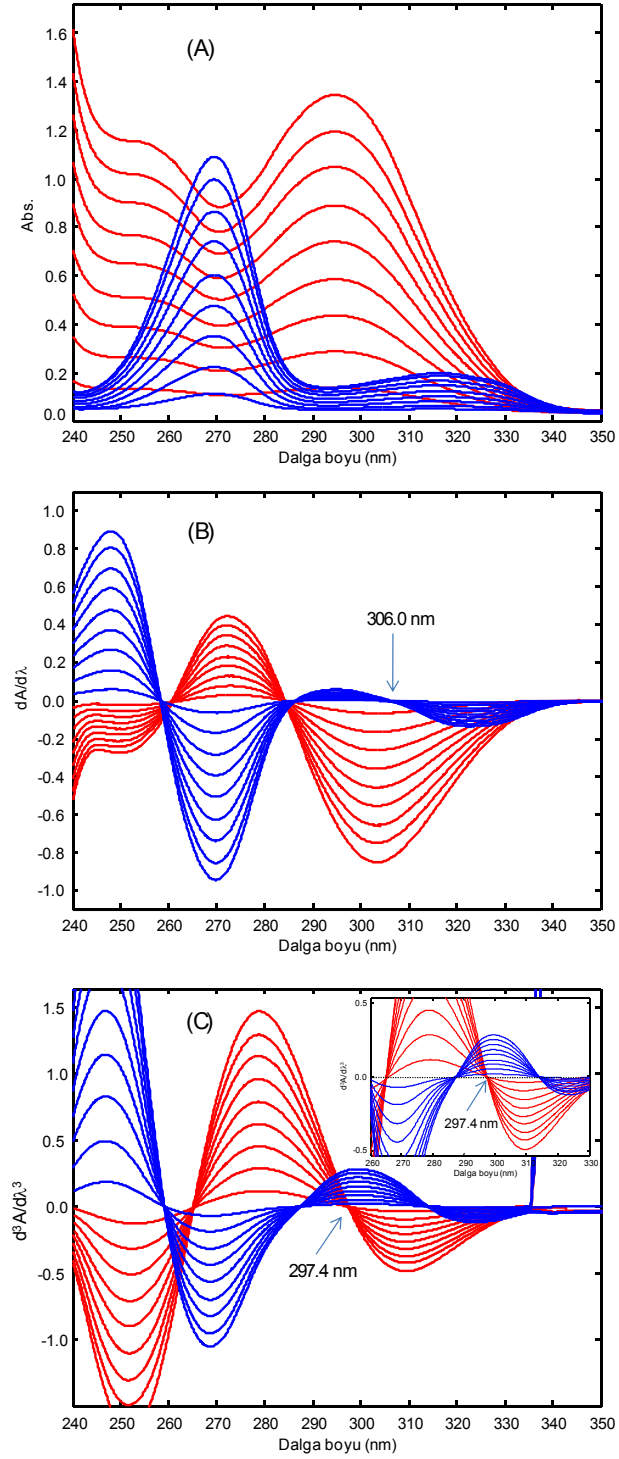
Türev spektrofotometrisi, karışım analizinde orijinal absorpsiyon eğrilerinin türevlerinin alınması ve bileşiklerden birisinin sıfır kesim noktasına karşılık diğer bileşiğin türev absorbans değerinin ölçümüyle hesaplanan kalibrasyon denklemlerinin kullanımıyla karışımların analizine dayanır. Spektrofotometrik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

3.2.4.1. Standart Çözeltiler

- Metanol içerisinde TEL ve HCT'in 25 µg/mL stok çözeltileri hazırlandı.
- TEL için 1.0-26.0 µg/mL ve HCT için 1.0-17.0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltiler hazırlandı.
- TEL için 1.0-26.0 µg/mL ve HCT için 1.0-17.0 µg/mL çalışma aralıkları içinde bu iki bileşiği içeren 18 değişik konsantrasyonlarda validasyon seti hazırlandı.

3.2.4.2. Kalibrasyon Denklemlerinin Hesaplanması

Türev yönteminin uygulamasında, TEL için 1.0-26.0 µg/mL ve HCT için 1.0-17.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin 240-350 nm dalga boyu aralığında spektrumları alındı ve bilgisayarın hafızasına kaydedildi. Şekil 3.16A da orijinal absorpsiyon spektrumları sunulmaktadır. Analiz edilen TEL ve HCT bileşiklerinin absorpsiyon spektrumlarının birden dörde kadar değişik $\Delta\lambda$ aralıkları, değişik skala faktörleri ve değişik $\Delta\lambda$ aralıkları düzeltirme fonksiyonları kullanılarak türev spektrumları hesaplandı. Aynı spektral işlemler yapay ve farmasötik preparatlar içinde gerçekleştirildi. Bu denemelerden sonra $\Delta\lambda=20$ nm aralıklarla ve skala faktörü =20 ile birinci türev spektrumlarında 306.0 nm'de TEL'in analiz için ve $\Delta\lambda= 20$ nm aralıklarla, skala faktörü = 20 ve $\Delta\lambda= 5$ nm aralıklar ile düzeltirme fonksiyonu ile üçüncü türev spektrumlarında 297.4 nm de HCT'in analizi için optimal spektral koşullar olduğu saptandı.



Şekil 3.16. TEL için 1-26 $\mu\text{g/mL}$ (—) ve HCT için 1-17 $\mu\text{g/mL}$ (—) konsantrasyon aralığında; A) absorpsiyon spektrumları, B) Birinci türev spektrumları ($\Delta\lambda=20$ nm aralıklarla ve skala faktörü = 20) ve C) Üçüncü türev spektrumları ($\Delta\lambda=20$ nm aralıklarla , skala faktörü = 20 ve düzeltme = 5 nm aralıklarla).

Bu yöntem literatürlerde verilen spektral koşullardan farklı uygulanmıştır (Bebawy ve ark.(2005), Mısırlıoğlu (2006).)

Karışımlardaki TEL miktar tayini için 1-26 µg/mL doğrusal çalışma aralığında kalibrasyon çözeltilerinin 306.0 nm deki birinci türev absorbans değerleri ölçülerek lineer regresyon analiziyle hesaplanan doğru denklemi elde edildi (Şekil 3.16B).

Aynı karışımdaki HCT'in kantitatif analizi için HCT için 1.0-17.0 µg/mL doğrusal çalışma aralığındaki kalibrasyon çözeltilerinin 297.4 nm deki üçüncü türev absorbans değerlerinin ölçümüyle kalibrasyon için doğru denklemi hesaplandı (Şekil 3.16C).

Çizelge 3.14. Lineer regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları

Parametreler	TEL	HCT
m	-3.20×10^{-2}	1.62×10^{-2}
n	-8.67×10^{-4}	1.32×10^{-4}
r	1.0000	0.9997
SH(m)	9.95×10^{-5}	1.43×10^{-4}
SH(n)	1.59×10^{-5}	1.49×10^{-5}
SH(r)	2.31×10^{-3}	2.22×10^{-3}
LOD (µg/mL)	0.45	0.08
LOQ (µg/mL)	1.49	0.28

3.2.4.3. Türev Yönteminin Validasyonu

Türev yöntemini valide etmek için metanol içerisinde TEL için 1-26 µg/mL ve HCT için 1-17 µg/mL doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 18 adet yapay karışım çözeltilerinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon seti kullanılarak kurulan türev yöntemi kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım değerleri . TEL için % 100.1, HCT için % 100.6 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri . TEL için % 1.14 ve HCT için % 2,60 olarak hesaplandı. Türev

yöntemi kalibrasyon yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.15. de gösterildi.

Çizelge 3.15. TEL ve HCT nin yapay karışımlarının analizine türev yönteminin uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım değerleri.

No.	Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
	TEL	HCT	TEL	HCT	TEL	HCT
1	2.0	3.5	2.06	3.47	103.2	99.2
2	5.0	3.5	5.03	3.44	100.6	98.2
3	8.0	3.5	7.96	3.47	99.6	99.1
4	11.0	3.5	10.87	3.55	98.8	101.3
5	14.0	3.5	13.80	3.35	98.6	95.6
6	17.0	3.5	16.71	3.39	98.3	96.8
7	20.0	3.5	20.14	3.46	100.7	98.8
8	23.0	3.5	22.98	3.38	99.9	96.6
9	26.0	3.5	25.66	3.60	98.7	102.9
10	22.4	1.0	22.48	1.03	100.4	103.1
11	22.4	3.0	22.54	3.06	100.6	102.1
12	22.4	5.0	22.42	5.08	100.1	101.7
13	22.4	7.0	22.36	7.34	99.8	104.9
14	22.4	9.0	22.48	9.19	100.4	102.1
15	22.4	11.0	22.48	11.17	100.4	101.6
16	22.4	13.0	22.54	13.48	100.6	103.7
17	22.4	15.0	22.36	15.24	99.8	101.6
18	22.4	17.0	22.67	17.21	101.2	101.3
$\bar{X}$					100.1	100.6
SS					1.14	2.62
% BSS					1.14	2.60

Çizelge 3.16. Türev yönteminin TEL ve HCT analizi için kesinlik ve doğruluk test sonuçları

Gün içi (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
2.0	2.0	1.99	-0.58	99.4	2.18	2.19	2.02	0.96	101.0	1.80	1.78
14.0	10.0	14.72	-1.84	98.2	0.57	0.58	10.08	0.84	100.8	1.27	1.26
23.0	15.0	22.89	-0.49	99.5	1.64	1.65	14.91	-0.63	99.4	1.03	1.04
			$\bar{x}$	99.0				$\bar{x}$	100.4		
			SS	0.75				SS	0.89		
			% BSS	0.76				% BSS	0.88		

Günler arası (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS	Bulunan (µg/mL)	% BH	% GK	% SS	% BSS
2.0	2.0	1.98	-0.76	99.2	2.44	2.46	2.01	0.41	100.4	2.13	2.12
14.0	10.0	14.68	-2.10	97.9	2.37	2.42	10.04	0.41	100.4	1.95	1.94
23.0	15.0	23.12	0.51	100.5	1.71	1.70	14.81	-1.29	98.7	1.10	1.11
			$\bar{x}$	99.2				$\bar{x}$	99.8		
			SS	1.31				SS	0.99		
			% BSS	1.32				% BSS	0.99		

GK: % Geri kazanım
SS: Standart sapma

BSS: % Bağlı standart sapma
BH: % Bağlı hata

Türev spektrofotometrisinin ticari farmasötik preparatlara uygulamadan önce TEL ve HCT içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerinin girişiminin olup olmadığı kurulan kalibrasyon için test edildi. Bunun içinde standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlarda ki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 2.5 µg/mL TEL ve 16.0 µg/mL HCT 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 3.0, 6.0 ve 9.0 µg/mL TEL ve 2.5, 7.5 ve 10.0 µg/mL HCT olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem **MİCARDİS PLUS®** Tablet (I) ve **PRİTOR PLUS®** Tablet (II) için ayrı ayrı yapıldı. Analiz sonucunda preparattan gelen TEL ve HCT miktarları

düşülerek ilave edilen standartlar içindeki TEL ve HCT için geri kazanım ve diğer hesaplamalar yapıldı. Bu denemeler üç farklı konsantasyon seviyesinde altı tekrar yapılarak gerçekleştirildi. Türev yönteminin (I) durumundaki uygulamasında % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri türev kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 100,3 ve % 2,14 ve HCT için % 100,2 ve % 0,98 olarak bulundu. Yöntemin (II) durumundaki uygulamasında ise % ortalama geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri türev kalibrasyon yöntemi kullanıldığında TEL için % 101,2 ve % 0,78 ve HCT için % 102,4 ve % 1,38 olarak hesaplandı.

Çizelge 3.17. Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen geri kazanım değerleri

(I) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	(%) BSS	(%) BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	(%) BSS	(%) BH	GK (%)
3.0	2.5	3.05	0.05	1.76	1.64	101.6	2.55	0.07	2.59	1.20	101.2
6.0	7.5	5.87	0.05	0.92	-2.19	97.8	7.52	0.29	3.85	0.23	100.2
9.0	10.0	9.13	0.28	3.09	1.40	101.4	9.92	0.30	3.02	-0.76	99.2
		$\bar{X}$ 100.3					$\bar{X}$ 100.2				
		SS 2.14					SS 0.98				
		% BSS 2.14					% BSS 0.98				
(I) (n=6)											
Konulan (µg/mL)		TEL					HCT				
TEL	HCT	Bulunan (µg/mL)	SS	(%) BSS	(%) BH	GK (%)	Bulunan (µg/mL)	SS	(%) BSS	(%) BH	GK (%)
3.0	2.5	3.01	0.1	2.72	0.30	100.3	2.54	0.06	2.39	0.81	100.8
6.0	7.5	6.09	0.1	2.05	1.48	101.5	7.72	0.07	0.85	2.93	102.9
9.0	10.0	9.16	0.2	2.47	1.80	101.8	10.35	0.28	2.67	3.50	103.5
		$\bar{X}$ 101.2					$\bar{X}$ 102.4				
		SS 0.79					SS 1.42				
		% BSS 0.78					% BSS 1.38				

GK: % Geri kazanım
SS: Standart sapma

BSS: % Bağıl standart sapma
BH: % Bağıl hata

3.2.4.4. Türev Yöntemi için ANOVA Testi

Türev yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için üç farklı konsantrasyonda (TEL için 2.0, 14.0 ve 23.0 µg/mL ve HCT için 2.0, 10.0 ve 15.0 µg/mL) ve her derişim için altı farklı numune için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulandı. Yöntemin gün içi ve günler arası hazırlanan karışımlara uygulamasında $n_1=5$ ve $n_2=30$ için % 95 güven aralığında F-tablo değeri 2.53 olmasına karşılık TEL için hesaplanan F-test değeri 1.87 ve p-değeri 0.13, HCT için hesaplanan F-test değeri 2.30 ve p-değeri 0.07 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 3.17.1 de sunulmuştur. ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0.05$ olduğu için % 95 güven aralığında gün içi ve günler arasında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Çizelge 3.17.1. Gün içi ve günler arası sonuçların karşılaştırılması için ANOVA test sonuçları

Bileşik	Değişimin kaynağı	Karelerin toplamı	Serbestlik derecesi	Karelerin ortalaması	F-hesaplanan	P-değeri	F-tablo
TEL	Gruplar arası	27.72	5	5.54	1.87	0.13	2.53
	Grup içi	89.02	30	2.97			
	Toplam	116.74	35				
HCT	Gruplar arası	23.75	5	4.75	2.30	0.07	2.53
	Grup içi	61.94	30	2.06			
	Toplam	85.69	35				

3.2.4.5. Türev Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Türev yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen tablet miktarı 100 mL’lik balonjojede metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart $\phi=0,45\ \mu\text{m}$) yardımı ile süzüldü. Analiz için süzülen çözeltiden 1.40 mL’lik bir miktar 50 mL’lik balon jojeye transfer edildi ve metanol ile hacim tamamlandı. Bu analiz çözeltilerinin 240-350 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları çizdirildi. Absorpsiyon spektrumlarının

birinci türev spektrumunda 306.0 nm de TEL ve üçüncü türev spektrumunda 297.4 nm de HCT Bölüm 3.2.4.2 de hesaplanan kalibrasyon fonksiyonları kullanılarak TEL ve HCT miktarları hesaplandı. Bu işlem için n = 10 tekrar yapıldı.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi **PRİTOR PLUS®** Tablet ve **MİCARDİS PLUS®** Tablet preparatları için ayrı ayrı tekrar edildi. **PRİTOR PLUS®** Tablet ve **MİCARDİS PLUS®** Tablet sonuçları Çizelge 3.18. de sunuldu.

Çizelge 3.18. MİCARDİS PLUS® Tablet ve PRİTOR PLUS® Tablet preparatlarına türev yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar. (I) ve (II) preparat etiketindeki miktarlar: 80 mg TEL/tablet ve 12.5 mg HCT/tablet.

No.	mg/tablet (I)		mg/tablet (II)	
	TEL	HCT	TEL	HCT
1	84.27	12.40	79.92	12.29
2	83.71	12.49	79.59	12.16
3	82.37	12.00	81.48	12.86
4	83.49	12.71	81.93	12.39
5	83.38	12.18	82.93	12.44
6	82.93	12.41	82.15	12.24
7	81.82	12.25	81.71	12.18
8	82.49	12.54	83.04	12.64
9	82.26	12.37	82.15	12.32
10	82.37	12.40	82.26	12.03
X	82.91	12.38	81.72	12.35
SS	0.78	0.20	1.14	0.24
BSS	0.94	1.58	1.40	1.97
SH	0.25	0.06	0.36	0.08
GA (p=0.05)	$\bar{X} \pm 0.48$	$\bar{X} \pm 0.12$	$\bar{X} \pm 0.71$	$\bar{X} \pm 0.15$

(I) = **MİCARDİS PLUS®** Tablet

(II) = **PRİTOR PLUS®** Tablet

GA: Güven aralığı

3.2.5. İstatiksel Analiz

Tez çalışmasında geliştirilen PCR, PLS ve ANN yöntemlerinin ticari farmasötik preparatlara uygulamasından elde edilen sonuçlar, türev spektrofotometri (DS) sonuçlarıyla istatiksel olarak karşılaştırıldı. İstatiksel karşılaştırmada t-testi ve f-testi uygulandı. Yöntemlerin MİCARDİS PLUS® tablet (I) ve PRİTOR PLUS® tablet (II) ticari preparatlara uygulamasında n=10 deneme için serbestlik derecesi = 9 için % 95 güven aralığında (p = 0.05) t-tablo değeri (t_{teorik}) ve F-tablo değeri (F_{teorik}) sırasıyla 2.26 ve 3.13 olmasına karşılık hesaplanan t-test ve F-test sonuçları Çizelge 3.19 ve Çizelge 3.20 de görüldüğü gibi bulunmuştur. Geliştirilen kemometrik yöntemlerin tek tek türev yöntemiyle karşılaştırılmasında t-hesaplanan < t_{teorik} ve F-hesaplanan < F_{teorik} olduğu için yukarıda ifade edilen güven aralığında yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.19. Yöntemlerin karşılaştırılmasında elde edilen t-test ve F-test sonuçları

(I)								
	TEL				HCT			
	DS	PCR	PLS	ANN	DS	PCR	PLS	ANN
$\bar{x}$	82.91	80.93	80.95	81.96	12.38	12.54	12.44	12.53
t-testi	$t_{\text{teorik}}=2.26$	1.49	1.49	1.44	2.26	1.39	0.74	1.42
F-testi	$F_{\text{teorik}}=3.13$	1.75	2.30	2.69	3.13	2.96	1.84	2.01

t_{teorik} (p=0.05 ve n=10) =2.26 ve F_{teorik} =3.13 (p=0.05 ve n=10)

Çizelge 3.20. Yöntemlerin karşılaştırılmasında elde edilen t-test ve F-test sonuçları

(II)								
	TEL				HCT			
	DS	PCR	PLS	ANN	DS	PCR	PLS	ANN
$\bar{x}$	81.72	81.17	80.87	81.79	12.35	12.49	12.55	12.51
t-testi	$t_{\text{teorik}}=2.26$	1.19	1.49	0.22	2.26	0.87	2.15	1.26
F-testi	$F_{\text{teorik}}=3.13$	0.83	0.92	1.44	3.13	3.06	0.42	0.99

t_{teorik} (p=0.05 ve n=10) =2.26 ve F_{teorik} =3.13 (p=0.05 ve n=10)

(I) = MİCARDİS PLUS® tablet ve (II)= PRİTOR PLUS® tablet analiz sonuçları

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında TEL ve HCT içeren farmasötik tablet preparatlarındaki bu iki aktif bileşiğin hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın ve aynı anda kantitatif analizleri için üç farklı kemometrik kalibrasyon yöntemi geliştirildi. Geliştirilen PCR, PLS ve ANN kalibrasyon yöntemlerinin sonuçları spektrofotometrik türev yöntemiyle karşılaştırıldı.

Karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan türev yönteminin literatürdeki uygulamasında TEL ve HCT in aynı anda miktar tayinlerinin 1. türev yöntemiyle başarıldığının belirtilmesine rağmen aynı yöntem tez kapsamında verilen deneysel koşullarda yaptığımız uygulamalarda analiz için başarılı sonuçlar vermedi. Bu nedenle türev yöntemiyle her iki bileşiğin aynı anda miktar tayinleri için değişik türev dereceleriyle farklı $\Delta\lambda$ 'lar kullanılarak uygulandı. Sonuç olarak 1. türev yöntemiyle ($\Delta\lambda=20$ nm) 306 nm'de elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak TEL ve 3.türev yöntemiyle ($\Delta\lambda=20$ nm ve skala faktörü =20) 297.4 nm'de HCT' in miktar tayinleri başarıyla gerçekleştirildi. Literatürde verilen türev yöntemi yapay karışımlarda başarılı sonuçlar vermesine rağmen tabletlerin analizinde başarılı sonuçlar vermemiştir.

Kemometrik yöntemler olarak CLS, ILS, PCR, PLS ve ANN yöntemleri spektral veriler kullanılarak TEL ve HCT 'nin hiçbir ayırma ve grafik işlemi kullanmaksızın ve de aynı anda miktar tayinleri için uygulandı. Literatürde verilen türev yönteminde olduğu gibi CLS ve ILS kalibrasyonları ile başarılı sonuçlar elde edilemedi. Aksine PCR, PLS ve ANN kalibrasyon yöntemleriyle TEL ve HCT içeren yapay numunelerin ve gerçek numunelerin (Farmasötik tabletlerin) analizinde son derece başarılı sonuçlar elde edildi.

PCR, PLS ve ANN kalibrasyonlarının uygulamasında spektral ve kemometrik parametrelerin optimizasyonu için ön çalışmalar yapıldı ve tez kapsamında yöntemler için verilen koşullar bu yöntemlerin TEL ve HCT'nin analizi için optimal

uygulanabileceği koşullardır. Kemometrik kalibrasyonların kurulmasında TEL için 1-26 (mg/mL) ve HCT için 1-17 (mg/mL) çalışma aralığında hazırlanan kalibrasyon seti ve bu kalibrasyon setine karşılık 250- 330 nm dalga boyunda $\Delta\lambda = 0,1$ nm aralıklarla 801 noktada ölçülen absorbans değerleri kullanıldı.

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin validasyonu için geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu validasyon çalışmaları, kalibrasyon setinde bağımsız olarak hazırlanan yapay karışımların analizine, standart ilavesi yapılan preparatların analizine ve yine yapay olarak hazırlanan karışımlar için gün içi ve günler arası analizlerine yöntemlerin uygulamasını kapsamaktadır. PCR, PLS ve ANN yöntemlerin yapay karışımlara uygulamasında elde edilen ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri sırasıyla Çizelge 3.2., Çizelge 3.6., Çizelge 3.10. da görülmektedir. Standart ilavesi yönteminde % ortalama geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri PCR, PLS ve ANN yöntemleri için sırasıyla Çizelge 3.4, Çizelge 3.8, Çizelge 3.12' de gösterilmektedir. Yöntemler için gün içi ve günler arası ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri ise Çizelge 3.3., Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.11. de gösterilmektedir. PCR, PLS ve ANN için bu elde edilen sonuçlar karşılaştırma yönteminin sonuçlarıyla (Çizelge 3.19 ve Çizelge 3.20) karşılaştırıldığında geliştirilen kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin başarılı olduğu görülmektedir.

PCR, PLS, ANN ve karşılaştırma yöntemlerinin iki farklı ticari farmasötik tablet preparatlarının kantitatif analizlerine uygulamasında karşılaştırılabilir ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu tez kapsamındaki sonuçlar göstermiştir ki geliştirilen PCR , PLS ve ANN kalibrasyon yöntemleri TEL ve HCT içeren farmasötik preparatların rutin kalite kontrol analizlerinde kullanılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Analitik çalışmalarda iki ya da daha fazla aktif bileşiği içeren kombine farmosötik formülasyonların hiçbir ayırma işlemi yapmaksızın ve aynı anda kantitatif analizleri için geliştirilen yöntemler araştırmalar ve ilaç sanayi açısından son derece önemlidir. Kombine preparatların analizinde genellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve bu yöntemin değişik kombine versiyonlarını kapsayan pahalı ve yüksek teknoloji kullanan cihaz veya yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin kombine preparatların analizinde uygulamalarında deneysel koşulların optimizasyonundaki zorluklar ve uzun analiz süreleri nedeniyle bıkırtıcı olmaları, analizcileri daha hızlı, daha kolay ve daha ekonomik yöntemler geliştirmeye itmektedir.

Tez kapsamında geliştirilen ve başarılı bir şekilde TEL ve HCT içeren tabletlerin analizine uygulanan PCR, PLS ve ANN kemometrik kalibrasyon yöntemleriyle son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen PCR, PLS ve ANN yöntemleriyle elde edilen sonuçlar için tatmin edici kesinlik, doğruluk ve seçicilik gözlenmiştir.

Tez kapsamında hiçbir ön ayırma işlemin kullanmaksızın PCR, PLS ve ANN yöntemleri TEL ve HCT'nin aynı anda kantitatif analizine uygulanmıştır. Bu bizim geliştirdiğimiz yöntemlerin avantajıdır. Genellikle kombine preparatların analizine uygulanan kromatografik yöntemler mutlak bir ön ayırma işlemi gerektirir.

Kemometrik yöntemler ile elde edilen sonuçlar, türev yönteminin sonuçlarıyla t- ve f- testleri yapılarak karşılaştırılmıştır. Bu istatistiksel test sonuçları, yöntemlerden elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Geliştirilen PCR, PLS ve ANN yöntemlerinin, TEL ve HCT içeren farmasötik preparatların kalite kontrol ve rutin analizlerinde kullanılabileceği bu tez çalışmasıyla ispat edilmiştir.

ÖZET

Kombine Farmasötik Preparatlardan Telmisartan ve Hidroklorotiyazid'in Kemometrik Kalibrasyon Yöntemleriyle Aynı Anda Miktar Tayinleri

Bu tez çalışmasında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri (temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR), kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ve yapay sinir ağları (ANN)), iki farklı farmasötik preparattaki telmisartan (TEL) ve hidroklorotiyazid (HCT)'in aynı anda miktar tayinlerine hiç bir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulandı.

Bu kemometrik yöntemler için, TEL için 1-26 µg/mL konsantrasyon aralığında ve HCT için 1-17 µg/mL konsantrasyon aralığında bileşikler içeren 45 adet karışımdan oluşan kalibrasyon (konsantrasyon) seti, metanol içerisinde hazırlandı. Kalibrasyon setinin 200-350 nm aralığında absorpsiyon spektrumu kaydedildi. Kalibrasyon seti ve bu sete karşılık 250-300 nm aralığında elde edilen absorpsiyon verileri arasındaki ilişkiden yararlanılarak üç kemometrik kalibrasyon oluşturuldu. PCR PLS ve ANN yöntemlerinin validasyonu, TEL ve HCT içeren sentetik karışımlar analiziyle gerçekleştirildi. Buna ilave olarak, gün içi-günler arası analiz ve standart ekleme teknikler gibi diğer validasyon işlemleri de kullanıldı. PCR, PLS and ANN yöntemlerinin TEL ve HCT karışımlarının analizinde uygulanmasında, % geri kazanım sonuçları ile karşılık gelen bağıl standart sapma değerleri sırasıyla TEL için % 100.1 ile % 2.78 ve HCT için % 100.7 ile % 1.52 (PCR); TEL için % 100.2 ile % 2.76 ve HCT için % 100.7 ile 1.45 (PLS); TEL için % 101.8 ile % 2.15 ve HCT için % 100.6 ile % 3.62 (ANN) olarak bulundu. Sonraki basamakta PCR, PLS and ANN yöntemler, iki farklı ticari farmasötik preparattaki TEL ve HCT'in aynı anda miktar tayinlerine uygulandı.

Ayrıca karşılaştırma yöntemi olarak türev spektrofotometrisi geliştirildi. Bu türev yönteminde, yapay karışımlardan ve farmasötik preparatlardan TEL analizi için birinci türev ve HCT analizi için üçüncü türev yöntemlerinin uygun olduğu saptanmıştır.

PCR, PLS and ANN kalibrasyon yöntemleriyle hesaplanan deneysel verilerin, karşılaştırma yöntem olarak kullanılan türev spektrofotometrisiyle elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve sonuçlar arasında iyi bir uyum gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler : Hidroklorotiyazid, kantitatif analiz, kemometrik yöntem, tablet, telmisartan,

SUMMARY

Simultaneous Determination of Telmisartan and Hydrochlorothiazide in Combined Pharmaceutical Preparations by Chemometric Calibration Methods

In this thesis, three different chemometric calibration methods (principle component regression (PCR), partial least square (PLS) and artificial neural network (ANN)) were successfully applied to the simultaneous determination of telmisartan (TEL) and hydrochlorothiazide (HCT) in two different pharmaceutical preparations without using any separation step.

For the chemometric methods , a calibration (concentration) set of 45 binary mixtures containing compounds in the working range of 1-26 $\mu\text{g/mL}$ for TEL and 1-17 $\mu\text{g/mL}$ for HCT was symmetrically prepared in methanol. The absorption spectra of the above calibration set were recorded in the spectral region of 200-350 nm. Three chemometric calibrations were constructed by using the relationship between the calibration set and its corresponding absorption data obtained in the range 250-350 nm. The validation of PCR, PLS and ANN was carried out by analyzing the synthetic mixtures of TEL and HCT compounds. In addition to that, other validation procedures such as intra day-inter day and standard addition technique were used. Percent mean recoveries with their corresponding relative standard deviations in the application of PCR, PLS and ANN methods to the synthetic binary mixtures containing both compounds were found to be 100.1 % with 2.78 % for TEL ; 100.7 % with 1.52 % for HCT and 100.2 % with 2.76 % for TEL; 100.7 % with 1.45 % for HCT and 101.8 % with 2.15 % for TEL; 100.6 % with 3.62 % for HCT, respectively. In the next step, the PCR, PLS and ANN methods were applied to the simultaneous determination of TEL and HCT in two different commercial pharmaceutical preparations and successful results were obtained.

In addition, derivative spectrophotometry was developed as a comparison method. In this derivative method, first and third order derivative methods were found suitable for the determination of TEL and HCT in their synthetic mixtures and pharmaceutical samples, respectively.

The experimental results provided by PCR, PLS and ANN were statistically compared with those obtained by derivative spectrophotometry and a good agreement was observed between the results.

Key Word : Chemometric method, hydrochlorotiazide, quantitative analysis, tablet telmisartan.

KAYNAKLAR

- ABDINE, H., ELSAYED, M.A.H., ELSAYED, Y.M. (1978). Spectrophotometric determination of hydrochlorothiazide and reserpine in combination. *Analyst*. **103**: 354-358.
- ALTON, K.B., DESRIVIERES, D., PATRICK, J.E. (1986). High-performance liquid chromatographic assay for hydrochlorothiazide in human urine. *J. Chromatogr.* **374**: 103-110.
- ARGEKAR, A.P., SAWANT, J.G. (2000). A gradient reversed phase high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of hydrochlorothiazide (HCT) and losartan potassium (LOS) from tablets. *Anal. Lett.* **33(5)**: 869-880.
- ATAY, O., TAMER, U., ARIKAN, D. (2001). Determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* **34(7)**: 1153-1161.
- AZUYAMA, C.T. (1990). Sensitive liquid chromatographic method for the determination of hydrochlorothiazide in human plasma. *J. Chromatogr.* **532**: 168-174.
- BANOGLU, E., OZKAN, Y., ATAY, O. (2000). Dissolution tests of benazepril-HCl and hydrochlorothiazide in commercial tablets: comparison of spectroscopic and high-performance liquid chromatography methods. *IL Farmaco*. **55**: 477-483.
- BEBAWY L.I., ABBAS, S.S., FATTAH, L.A., REFAAT,H.H. (2005). Application of first-derivative spectrophotometry, TLC- densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and human plasma. *Farmaco*, **60(10)**: 859-67.
- BEBAWY, L.I., EL KOUSY, N. (1997). Stability-indicating method for the determination of hydrochlorothiazide, benzydamine hydrochloride and clonazepam in the presence of their degradation products. *Anal. Lett.* **30(7)**: 1379-1397.
- BEDAIR, M., KORANY, M.A., EL-YAZBI, F.A. (1986). UV-derivative spectrophotometric determination of hydralazine hydrochloride in combination with hydrochlorothiazide or propranolol hydrochloride. *Sci. Pharm.* **54**: 31-36.
- BEEBE , K. R., PELL, R. J. AND SEASHOLTZ , M. B. (1998). *Chemometrics: a Practical Guide*, Wiley, New York.
- BELAL, F., AL-ZAAGI, I.A., GADKARIEM, E.A., ABOUNASSIF, M.A. (2001). A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24(3)**: 335-342.
- BELAL, F., RIZK, M., IBRAHIEM, F., EL-DIN, M.S. (1986). Spectrophotometric determination of benzothiadiazines in dosage forms. *Talanta*. **33(2)**: 170-172.
- BRERETON, R. G. (Editor), (1992). *Multivariate Pattern Recognition in Chemometrics, Illustrated by Case Studies*, Elsevier, Amsterdam.
- BRERETON,R. G. (2003). *Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, University of Bristol, UK , John Wiley & Sons Ltd .

- BRERETON, R. G., SCOTT, D. R., MASSART, D. L., DESSY, R. E., HOPKE, P. K., SPIEGELMAN, C. H. AND WEGSCHEIDER W. (Editors), (1992). *Chemometrics Tutorials II*, Elsevier, Amsterdam.
- CAGIGAL, E., GONZALES, L., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M. (2001). pK determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **26(3)** : 477-86.
- CARDA-BROCH, S., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C., SIMO-ALFONSO, E.F., ESTEVE-ROMERO, J.S. (1997). Micellar liquid chromatographic determination of diuretics by diazotization and coupling with the Bratton-Marshall reagent. *Anal. Chim. Acta.* **353**: 215-226.
- CARLUCCI, G., DI CARLO, V., MAZZEO, P. (2000). Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* **33(12)**: 2491-2500.
- CARLUCCI, G., DI GIUSEPPE, E., MAZZEO, P. (1993). Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* **93**: 245-248.
- CAULCUTT, R. AND BODDY, R. (1983). *Statistics for Analytical Chemists*, Chapman and Hall, London.
- CHEN BM, LIANG YZ, WANG YL, DENG FL, ZHOU P, GUO FQ, HUANG LF. (JUN 1 2005). Development and validation of liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of telmisartan in human plasma. *Analytica Chimica Acta.* **540 (2)**: 367-373.
- CHRISTOPHERSEN, A.S., RASMUSSEN, K.E., SALVESEN, B. (1977). Determination of hydrochlorothiazide in serum by high – pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **132**: 91-97.
- COOPER, M.J., SINAIKO, A.R., ANDERS, M.W., MIRKIN, B.L. (1976). High pressure liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide in human serum and urine. *Anal. Chem.* **48**: 1110-1116.
- CORNELL, J. A. (1990) *Experiments with Mixtures: Design, Models, and the Analysis of Mixture Data*, Wiley, New York, 2nd edn.
- DE CROO, F., VAN DEN BOSSCHE, W., DE MOERLOOSE, P. (1985). Simultaneous quantitative determination of amiloride hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* **20(8)**: 477-481.
- DE VRIES, J.X., VOSS, A. (1993). Simple determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **7**: 12-14
- DINC, E. (1996) Atropin sülfat içeren karışımlarda bileşenlerin spektrofotometrik yöntemlerle miktar tayinleri ve bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanması. *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- DINC, E. (2002). Spectral analysis of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by three chemometric techniques. *Anal. Lett.* **35(6)**: 1021-1039.
- DINC, E., BALEANU, D. (2002). Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **30**: 715-723.

- DINC, E. (2007). Kemometri; Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi (baskıda)*
- DOMINGO, E.B., HERNANDEZ, M.J.M., RAMOS, G.R., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C. (1992). High-performance liquid chromatographic determination of diuretics in urine by micellar liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **582**: 189-194.
- EL-YAZBI, F.A., ABDINE, H.H., SHAALAN, R.A. (1999). Spectrophotometric methods for the determination of benazepril hydrochloride in its single and multi-component dosage forms. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **20**: 343-350.
- ERK, N. (1999). Ratio-spectra zero-crossing derivative spectrophotometric determination of certain drugs in two-component mixtures. *Anal. Lett.* **32(7)**: 1371-1388.
- ERK, N., ONUR, F. (1996). Simultaneous determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by spectrophotometric methods. *Anal. Lett.* **29(11)**: 1963-1974.
- ERK, N., ONUR, F. (1997). Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by spectrophotometric methods. *Analysis.* **25**: 161-163.
- ERK, N., ONUR, F. (1997). Three new spectrophotometric methods for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride in sugar-coated tablets. *Anal. Lett.* **30(8)**: 1503-1515.
- FATMI, A.A., WILLIAMS, G.V. (1990). Determination of hydralazine hydrochloride and hydrochlorothiazide in dosage forms by high performance liquid chromatography. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **16(5)**: 779-789.
- FETT, J.J., HISCHAK, F., CLINE LOVE, L.J. (1991). Mobile phase versus stationary phase approaches to the direct injection of biological fluids in liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **5**: 14-18.
- GANS, P. (1992). *Data Fitting in the Chemical Sciences: by the Method of Least Squares*, Wiley, Chichester.
- GONZALES, E., BECERRA, A., LASERNA, J.J. (1996). Direct determination of diuretic drugs in urine by capillary zone electrophoresis using fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* **687**: 145-150.
- GONZALES, L., AKESOLO, U., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M. (2002). Application of capillary zone electrophoresis to the screening of some angiotensin II receptor antagonists. *Electrophoresis*, **23(2)** : 223-9.
- HILLAERT, S., VAN DEN BOSSCHE, W. (2002). Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the analysis of several angiotensin II receptor antagonists. *J Chromatogr.A.*, **979 (1-2)** : 323-33
- HITSCHERICH, M.E., RYDBERG, E.M., TSILIFONIS, D.C., DALY, R.E. (1987). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **10(5)**: 1011-1021.
- HILLAERT S, VAN DEN BOSSCHE W. (2003). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis, *Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **31 (2)**: 329-339.

- JANSSON, P. A. (Editor), (1984). *Deconvolution: with Applications in Spectroscopy*, Academic Press, New York.
- JOLIFFE , I. T. (1987). *Principal Components Analysis*, Springer-Verlag, New York.
- KARTAL, M., ERK, N. (1999). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and amiloride hydrochloride by ratio spectra derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **19**: 477-485
- KAYAPINAR, R. (2007). Spektrum oranları türev yöntemi ve ilaç analizlerindeki uygulamaları. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
- KOOPMANS, P.P, TAN, Y., VAN GINNEKEN, C.A.M., GRIBNAU, F.W.J. (1984). High performance liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide in plasma and urine. *J. Chromatogr.* **307**: 445-450.
- KOWALSKI B.R. (Editor) (1984), *Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry*, Reidel, Dordrecht.
- KRAMER,R. (1998). *Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York.
- LORIES I. BEBAWY, SAMAH S. ABBAS, LAILA A. FATTAH, HEBA H. REFAAT (2005). Application of first-derivative, ratio derivative spectrophotometry, TLC-densitometry and spectrofluorimetry for the simultaneous determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and plasma. *Il Farmaco*. **60**:859-867
- M. MELOUN, J. MILITKY AND M. FORINA (1992). *Chemometrics for Analytical Chemistry*, Vol. 1, Ellis Horwood, Chichester.
- MAGRI, A.L., BALESTRIERI, F., MAGRI, A.D., MARINI, D. (1995). Determination of fosinopril in pharmaceutical formulations containing hydrochlorothiazide by multiwavelength UV spectrophotometry. *Talanta*. **42**: 1719-1723.
- MALINOWSKI, E. R. (1991). *Factor Analysis in Chemistry*, Wiley, New York, 2nd edn.
- MARTENS, H., NAES, T. (1984). Multivariate calibration by data compression. *Report from Norwegian Food Research Institute. Aas-NHL, Norway*.
- MARTENS, H. AND NÆS, T. (1989) *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester.
- MARTENS,H. AND . MARTENS , M. (2000) *Multivariate Analysis of Quality*, Wiley, Chichester.
- MARTIN, M.E., HERNANDEZ, O.M., JIMENEZ, A.I., ARIAS, J.J., JIMENEZ, F. (1999). Partial least-squares method in analysis by differential pulse polarography. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. *Anal. Chim. Acta*. **381**: 247-256.
- MASSART ,D. L., BRERETON, R. G., DESSY,R. E., HOPKE , P. K., SPIEGELMAN,C. H. AND WEGSCHEIDER ,W. (Editors) (1990), *Chemometrics Tutorials*, Elsevier, Amsterdam.
- MASSART ,D. L., VANDEGINSTE ,B. G. M., BUYDENS, L. M. C., DE JONG S., LEWI, P. J. AND SMEYERS-VERBEKE, J. (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam.

- MISIRLIOGLU, E. K. (2006). Telmisartan içeren preparatlarda spektrofotometrik analizler. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
- MILLER, J. N. AND MILLER, J. (1993). *Statistics for Analytical Chemistry*, Prentice-Hall, Hemel Hempstead.
- NIE, J., ZHANG, M., FAN, Y., WEN, Y., XIANG, B., FENG, Y.Q. (2005). Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of anjiotensin II reseptor antagonists in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed. Life Sc.i*, **828 (1-2)**: 62-9.
- OTTO, M. (1998). *Chemometrics: Statistics and Computer Applications in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim.
- OUYANG, J., BAEYENS, W.R.G., DELANGHE, J., VAN DER WEKEN, G., CALOKERINOS, A.C. (1998). Cerium(IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide. *Talanta*. **46**: 961-968.
- OZKAN, S.A. (2001). Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide from tablets and human serum by RP-HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **24(15)**: 2337-2346.
- OZKAN, S.A., AKAY, C., CEVHEROGLU, S., SENTURK, Z. (2001). Rapid and accurate simultaneous determination of fosinopril sodium and hydrochlorothiazide in tablets by HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **24(7)**: 983-991.
- PANDERI, I.E. (1999). Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by second-order derivative spectrophotometry. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **21**: 257-265.
- PANDERI, I.E., PARISSI-POULOU, M. (1999). Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide by micro-bore liquid chromatography. *J.Pharm. Biomed. Anal.* **21(5)**: 1017-1024.
- PAPADOYANNIS, I.N., SAMANIDOU, V.F, GEORGA, K.A., GEORGARAKIS, E. (1998). High pressure liquid chromatographic determination of hydrochlorothiazide (HCT) in pharmaceutical preparations and human serum after solid phase extraction. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **21(11)**: 1671-1683
- PRASAD, C.V.N., BHARADWAJ, V., NARSIMHAN, V., CHOWDHARY, R.T., PARIMOO, P. (1997). Simultaneous determination of metoprolol-hydrochlorothiazide and propranolol-hydrochlorothiazide in combined formulations by derivative spectroscopy. *J. AOAC Int.* **80**: 325-330.
- RAPADO-MARTINEZ, I., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C., VILLANUEVA-CAMANAS, M. (1996). Performance of micellar mobile phase in reversed-phase chromatography for the analysis of pharmaceuticals containing β -blockers and other antihypertensive drugs. *Analyst*. **121**: 1677-1682.
- RICHTER, K., OERTEL, R., KIRCH, W. (1996). New sensitive method for the determination of hydrochlorothiazide in human serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*. **729**: 293-296.
- SAGLIK, S., SAGIRLI, O., ATMACA, S., ERSOY, L. (2001). Simultaneous determination of fosinopril and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic methods. *Anal. Chim. Acta*. **427**: 253-257.

- SALEM, H., EL-MAAMLI, M., EL-SADEK, M., KHEIR, A.A. (1991). U.V. and U.V. derivative spectrophotometric determination of two-component mixtures. *Spectr. Letters.* **24(3)**:451-470.
- SASA, S.I., JALAL, I.M., KHALIL, H.S. (1988). Determination of atenolol combinations with hydrochlorothiazide and chlorthalidone in tablet formulations by reverse-phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **11(8)**: 1673-1696.
- SATANA, E., ALTINAY, S., GÖGER, N.G, OZKAN, S.A., SENTURK, Z. (2001). Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and LC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **25(5-6)**: 1009-1013.
- SHAIKH, B., RUMMEL, N. (1998). Liquid chromatographic determination of chlorothiazide and hydrochlorothiazide diuretic drugs in bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 1039-1043.
- SHEN, J., JIAO, Z., LI, Z.D., SHI, Z.J., ZHONG, M.K. (2005). HPLC determination of telmisartan in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Pharmazie*, 60(6): 418-20.
- SHETKAR, P.B., SHINDE, V.M. (1997). Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by reversed phase HPLC. *Anal. Lett.* **30(6)**: 1143-1152.
- SHIU, G.K., PRASAD V.K., LIN, J., WORSLEY, W. (1986). Simple and selective high-performance liquid chromatographic method for the determination of hydrochlorothiazide in urine. *J. Chromatogr.* **377**: 430-435.
- STEWART, J.T., CLARK, S.S. (1986). Liquid chromatographic determination of guanethidine salts and hydrochlorothiazide using electrochemical detection and ion-pair techniques. *J. Pharm. Sci.* **75(4)**: 413-415.
- TORREALDAY, N., GONZALES, L., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M., ORTIZ, LASTRA, E. (2003). Experimental design approach for the optimisation of a HPLC- fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin I receptor antagonist telmisartan in urine. *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **32(4-5)** : 847-57.
- USTUNDAG, O. (2003). Hidroklorotiazid içeren farmasötik preparatlardaki etken maddelerin kemometrik yöntemlerle miktar tayini. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
- VAN DER MEER, M.J., BROWN, L.W. (1987). Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **423**: 351-357.
- VANDEGINSTE, B.M.G., MASSART, D.L. , BUYDENS, L.M.C. , DE JONG, S., LEWI P.J. AND SMEYERS-VERBEKE, J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part B*, Elsevier, Amsterdam.
- WEINBERGER, R., PIETRANTONIO, T. (1983). Fully automated liquid chromatographic system for the determination of hydrochlorothiazide in blood plasma and sera. *Anal. Chim. Acta.* **146**: 219-226.
Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- ZHANG,M., WEI,F., ZHANG,Y.F., NIE,J., FENG,Y.Q. (2006). Novel polymer monolithic microextraction using a ploy (methacrylic acid ethylene glycol dimethacrylate) monolithic and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr.A.*, **1102 (1-2)** : 294-301.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı: Beliz

Soyadı: Kaya

Doğum yeri: Ankara

Doğum tarihi: 05.05.1981

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Eğitimi:

Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (1998-2002)

Ankara Kocatepe Mimar Kemal Lisesi (1995-1998)

Ankara Kocatepe Mimar Kemal Lisesi Orta Bölümü (1992-1995)

Mimar Kemal İlköğretimokulu (1987–1992)

Yabancı Dil: İngilizce

Ünvanlar: Kimyager

Mesleki Deneyimi: Bankacı