

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

**MOKSİFLOKSASİN VE METRONİDAZOL TÜRÜ İLAÇLARIN
KEMOMETRİK ANALİZİ**

Ümit Murat ÇELİK

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Güzide ERTOKUŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2018**

TEZ ONAYI

Ümit Murat ÇELİK tarafından hazırlanan "Moksifloksasin ve Metronidazol Türü İlaçların Kemometrik Analizi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman Dr.Öğr.Üyesi Güzide ERTOKUŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi Dr.Öğr.Üyesi Tuğba SARDOHAN KÖSEOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem KARABACAK ATAY
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

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


Ümit Murat ÇEDİK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antibiyotiğin Tanımı.....	3
1.1.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi	3
1.1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	4
1.2. Moksifloksasinin Genel Özellikleri	5
1.3. Moksifloksasin İle İlgili Bilgiler	5
1.3.1. Moksifloksasin özellikleri ve yapısı	6
1.3.2. Moksifloksasinin tayin yöntemleri	8
1.3.2.1. Kromatografik yöntemler	8
1.3.2.2. Kapiler elektroforez yöntemi	8
1.3.2.3. Elektrokimyasal yöntemler	9
1.3.3. Yan etkiler	10
1.4. Metronidazol	11
1.4.1. Voltametik Tekniklerle Yapılmış Bazı İlaç Analizleri.....	12
1.4.1.1. Metronidazol'un Aktifleştirilmiş Camsı Karbon Elektrotta Elektrokimyasal İndirgenmesi ve İlaçlarda Tayini	12
1.4.1.2. Metronidazol'un Karbon Fiber Mikrodisk Elektrotta Elektrokimyasal İndirgenmesi	18
1.5. Kemometrik Yöntemler.....	18
1.5.1. Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları (Multivariate calibration algorithms).....	21
1.5.1.1. Klasik en küçük kareler yöntemi (Classical LeastSquares (Kmatris) method).....	21
1.5.1.2. Ters en küçük kareler (P-matris) yöntemi (Inverse Least Squares method)	22
1.5.1.3. Temel bileşen regresyon yöntemi (Principal component regression (PCR) method).....	23
1.5.1.4. Kısmi en küçük kareler yöntemi (Partial least squares regression method)	26
1.5.2. Kalibrasyon (konsantrasyon) setinin tasarımı	28
1.5.3. Çapraz validasyon işlemi (Cross-validation procedure).....	28
1.5.4. Varyans analizi (ANOVA)	28
1.5.5. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları.....	30
1.5.5.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları	30
1.5.5.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis).....	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38

3.1. Materyal	38
3.2. Kullanılan Cihazlar	38
3.2.1. UV-görünür spektrofotometre cihazı.....	38
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.3.1. Kullanılan çözeltiler	39
3.3.1.1. Moksifloksasin Çözeltisi	39
3.3.1.2. Metronidazol Çözeltisi.....	39
3.3.1.3. 0,1 M HCl Çözeltisi	39
3.4. Yöntem	39
3.4.1. UV/VIS spektroskopisi yöntemi.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. UV Spektroskopisi	41
4.2. Saf halde etken maddelerinden elde edilen spektrumlar	41
4.3. Kalibrasyon yönteminin validasyonu	42
4.4. Temel bileşen analizi (PCA)	44
4.5. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS).....	45
4.6. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi.....	46
4.7. Kalibrasyon Yönteminin Analitik Parametrelerde Değerlendirilmesi	46
4.8. PLS yöntemi için ANOVA testi.....	50
4.9. PCR yöntemi için ANOVA testi	51
4.10. PLS ve PCR yönteminde istatistiksel analiz	52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
6. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	59

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MOKSİFLOKSASİN VE METRONİZADOL TÜRÜ İLAÇLARIN KEMOMETRİK ANALİZİ

Ümit Murat ÇELİK

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Güzide ERTOKUŞ

Bu tez çalışmasında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri (temel bileşen analizi yöntemi (PCA), temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR), kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS), iki bileşenli ilaç maddesinden Moksifloksasin ve Metronidazolün aynı anda miktar tayinlerine hiç bir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulanmıştır ve bu yöntemler UV Görünür Alan Spektroskopisi yöntemlerinden elde edilen veriler Minitab 17, Panorama, XLSTAT adı verilen kemometrik programlar ile değerlendirilmiştir.

Kalibrasyon setinin 200-700 nm aralığında absorpsiyon spektrumu kaydedildi. Kalibrasyon seti ve bu sete karşılık 200-450 nm aralığında elde edilen absorpsiyon verileri arasındaki ilişkiden yararlanılarak üç kemometrik kalibrasyon oluşturuldu. PCA, PCR ve PLS yöntemlerinin geçerliliği, Moksifloksasin ve Metronidazol içeren sentetik karışımların analiziyle gerçekleştirildi. PCR ve PLS yöntemlerinin Moksifloksasin ve Metronidazol karışımlarının analizine uygulamasında, PCR ve PLS için % geri kazanım sonuçları ile karşılık gelen standart sapma değerleri sırasıyla Parasetamol için % değerleri bulundu.

Sonraki basamakta PCA, PCR ve PLS yöntemleri, Moksifloksasin ve Metronidazol ticari farmasötik preparattaki Moksifloksasin ve Metronidazol'ün aynı anda miktar tayinlerine uygulandı.

Anahtar Kelimeler: Moksifloksasin, Metronidazol, PCA, PCR, PLS.

2018, 59 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOXIFLOXASINE AND METRONIDAZOLE TYPE DRUGS OF CHEMOMETRIC ANALYSIS

Ümit Murat ÇELİK

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

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Güzide ERTOKUŞ

In this thesis study, chemometric calibrations (PCA), basic component regression method (PCR), partial least squares method (PLS), Moxifloxacin and Metronidazolone from two component drugs The data obtained from UV Visible Field Spectroscopy methods were evaluated using chemometric programs called Minitab 17, Panorama, XLSTAT.

The absorption spectrum was recorded at a range of 200-700 nm of the calibration set. Three chemometric calibrations were made using the correlation between the calibration set and the absorbance data obtained at a range of 200-450 nm versus this set. The validity of the PCA, PCR and PLS methods was assessed by analysis of synthetic mixtures containing Moxifloxacin and Metronidazole. In applying PCR and PLS methods to the analysis of mixtures of Moxifloxacin and Metronidazole, the% recovery results for PCR and PLS and the corresponding standard deviation values for paracetamol were%, respectively.

In the next step PCA, PCR and PLS methods, Moxifloxacin and Metronidazole were applied to the same quantitative determinations of Moxifloxacin and Metronidazole in commercial pharmaceutical preparation.

Keywords: Moxifloxacin, Metronidazole, PCA, PCR, PLS.

2018, 59 pages

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűresince, değerli bilgilerini bizlerle paylaőan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygı değer danıőman hocam; Dr. Öğr. Üyesi Güzide ERTOKUŐ'a sonsuz saygı ve őukranlarımı sunarım.

Tez çalıőmalarım boyunca laboratuvarda ve çalıőmalarımda beni destekleyen ve yardımcı olan sevgili yüksek lisans arkadaőlarım Ayőe Merve AKKAYA ve Ziya MERMERTAŐ'a, ayrıca çalıőmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen canım annem, babam ve kardeőlerime teőekkürű bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, baőarılarımdan kıvanç duyan, zor anlarımda maddi manevi her zaman yanımda olan canım annem ve babama, sevgili eőim Nurcan ÇELİK'e sonsuz teşekkür ederim.

49-YL1-17 No `lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Sűleyman Demirel Ūniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Yönetim Birimi Baőkanlıęı'na teőekkür ederim.

Ūmit Murat ÇELİK
ISPARTA, 2018

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması.....	5
Çizelge 1.2. Metronidazol'un miktarını belirlemek için belirlenen analitik tayin parametreleri	17
Çizelge 1.3. HPLC sistemi ile desteklenmiş voltametrik sonuçlar	17
Çizelge 1.4. Geri kazanım çalışmaları	18
Çizelge 1.5. Varyans analizi çizelgesi (Anova testi çizelgesi: analysis of variation).....	30
Çizelge 4.1. Etken maddelerinin spektroskopik özellikleri	41
Çizelge 4.2. Moksifloksasin ve Metronidazol içeren kalibrasyon seti.....	43
Çizelge 4.3. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki ilaç maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçlar.	47
Çizelge 4.4. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki ilaç maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları	49
Çizelge 4.5. Moksifloksasin Maddesinin PLS yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları.....	51
Çizelge 4.6. Metronidazol Maddesinin PLS yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları.....	51
Çizelge 4.7. Moksifloksasin Maddesinin PCR yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları.....	52
Çizelge 4.8. Metronidazol Maddesinin PCR yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları.....	52
Çizelge 4.9. PLS ve PCR yöntemleri ile hesaplanan istatistiksel parametreler	53
Çizelge 4.10. İlaç numunesindeki sonuçlar.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Moksifloksasinin yapısı	7
Şekil 1.2. Metronidazol'ün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.3. Metronidazol'ün indirgenme mekanizması.	14
Şekil 1.4. Doğrusal taramalı voltametri ile elde edilmiş voltamogramlar: (–) aktifleştirilmiş ve (---) aktifleştirilmemiş camı karbon elektrot ile. 4×10^{-4} M BR tamponu (pH 10), tarama hızı 100 mv/S.....	15
Şekil 1.5. 4×10^{-4} M metronidazol'ün BR tamponu (pH 10) ortamında CV voltamogramı.	16
Şekil 1.6. Kemometrinin ilişkili olduğu alanlar	20
Şekil 1.7. PLS2 kalibrasyonu	26
Şekil 4.1. Moksifloksasin etken maddesinin absorpsiyon spektrumu.....	41
Şekil 4.2. Metronidazol etken maddesinin absorpsiyon spektrumu.....	42
Şekil 4.3. Sentetik karışımın absorpsiyon spektrumu.	43
Şekil 4.4. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri.....	44
Şekil 4.5. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği	45
Şekil 4.6. PLS kalibrasyon basamağında Moksifloksasin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları.....	48
Şekil 4.7. PLS kalibrasyon basamağında Metronidazol için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları.....	48
Şekil 4.8. PCR kalibrasyon basamağında Moksifloksasin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları.....	50
Şekil 4.9. PCR kalibrasyon basamağında Metronidazol için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	Varyans analizi (Analysis of variance)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MLRC	Multilinear regression kalibrasyon
PCA	Temel bileşen analizi yöntemi (Principal component analysis)
PCR	Temel bileşen regresyon yöntemi (Principal component analysis)
PLS	Kısmi en küçük kareler yöntemi (Partial least squares regression)
PRESS	Prediction errors sum of squares
SEC	Standard error of calibration
SEP	Standard error of prediction
UV-VİS	Ultra viyole görünür bölge spektroskopisi



1. GİRİŞ

İlaç, canlı hücre üzerinde meydana getirdiği tesir ile bir hastalığın teşhisini iyileştirmesi veya semptomlarının azaltılması amacıyla tedavisini veya bu hastalıktan korunmayı mümkün kılan, canlılara değişik uygulama yöntemleri ile verilen doğal, yarı sentetik veya sentetik preparatlara denir.

İlaçlar iki kısımda incelenir;

1. Etkin Madde: Canlıda fizyolojik değişikliklere neden olan bir ya da birden fazla kimyasal madde içeren kısım
2. Taşıyıcı: Kimyasal maddenin hasta tarafından kolay alınması için ilaçlara konulan fakat herhangi bir fizyolojik etki göstermeyen kimyasalların bulunduğu kısımdır.

İlk ilaç ile ilgili çalışmalar,

İlaçlara dair bilinen ilk kayıt M.Ö.3000 yılında Sümerlilere aittir. Eski Mısır ve Çin'de de birçok hastalığın tedavisinde tedavi yöntemlerinin uygulandığı bilinmektedir. Antik Yunanlılarda ise şifalı otlar hasta tedavisinde savaşıları boyamak ve zehir üretmek amacıyla kullanılmaktaydı. O dönemlerde bitkilerin yararları daha çok deneme yanılma yöntemiyle bulunurdu.

Katı İlaç Şekilleri

1. Toz: Öğütülüp toz haline getirilerek kullanılan ilaçlara denir.
2. Hap: Toz halindeki ilacın hamur haline getirilerek yuvarlak şekiller verilmesiyle yapılan ilaçlara denir.
3. Kapsül: Jelatinden yapılmış bir muhafaza içinde bulunan ilaçlara denir.
4. Tablet: Toz halindeki ilaçların küçük ve yassı yuvarlaklar şeklinde tazyik edilmesiyle yapılan ilaçlara denir.
5. Draje: Tabletlerin üzerinin şeker ile kaplanmasıyla hazırlanan bir ilaç şeklidir.

6. Merhem: İlaçların domuz yağı, vazelin veya diğer bazı yağlar içersine katılması ile hazırlanan şekline denir.
7. Fitol: İlaçların kakao yağı veya gliserin ile karıştırılarak hamur haline getirildikten sonra koni şeklinde hazırlanan şeklidir.

Sıvı İlaç Şekilleri

1. Tentür: Herhangi bir ilacın alkoldeki eriyiğidir. Yani ilacı alkol içinde eritmek suretiyle hazırlanan bir ilaç şeklidir. Mesela: Tentürdiyot, İyodun alkol içindeki eriyiğidir.
2. Sulu Mahsuller (Solüsyonlar): İlacın suda eritilmiş şeklidir.
3. Şurup: İlacın koyu şekerli suda eritilmiş şeklidir.
4. Ampul: Ampul adı verilen kapalı cam bir muhafaza içersinde saklanan steril ve sıvı halde olan bir ilaç şeklidir.

İlaç analizlerinin yapılabilmesi için, önemli olan öncelikle analiz için kullanılacak aletler ve elde edilecek verilerin anlaşılabilir hale getirilebileceği matematiksel yöntemlerdir. Analitik çalışmalarda tek başına, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımların kantitatif analizi için spektrofotometri, spektroflorimetri, infraredspektrofotometrisi, voltametri (polorografi), kromatografi, kütle spektrometresi ve bu metotların kombine şekilleri kullanılmaktadır (Kaya, 2007).

Günümüzde analiz için kullanılan UV/Görünür Bölge spektrofotometreler ucuz ve hassas olmakla birlikte karmaşık sonuçlar vermektedir. UV/Görünür aletlerinin kullanılması tek etken madde içeren ilaçların analizinde herhangi bir sorun oluşturmazken birbiri ile çakışan spektrum veren ilaç karışımları analizinde sorunlar oluşabilmektedir. Analiz işlemlerinde daha kesin, daha doğru, daha hızlı, daha ekonomik ve daha güvenilir sonuçlara ulaşmak için yeni teknik ve yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Çetin, 2008).

Analitik kimyada hiçbir ön ayırma işlemi yapmaksızın kombine ilaç numunelerinin aynı anda kantitatif analizi son derece önemlidir. Analitik yöntemler geliştirmek amacıyla, klasik analitik yöntemler ile birlikte değişik matematiksel algoritmalara

dayanan hesaplama teknikleri kombine olarak uygulanmaktadır. Klasik analitik yöntemler ile kemometrik kalibrasyonların karışım analizlerinde başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle ilaç numunelerinin analizinde artan yoğunlukta kullanılmaktadır (Kaya, 2007).

Bu çalışmada ilaç etken maddelerinden Moksifloksasin ve metranidazol türü ilaçlarını UV/VIS spektroskopisi yöntemiyle tayin edip elde edilen verilerin kemometrik yöntemlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu bölümde analizi yapılacak bu etken maddeler ve uygulanan metotlar hakkında bilgi verilecektir.

1.1. Antibiyotiğin Tanımı

Sözlüklere göre Yunanca anti (karşı) ve bios (yaşam) sözcüklerinden türetilen antibiyotik sözcüğü, yine sözlüklerdeki tanımlamasıyla “Bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak ismidir”. Antibiosis sözcüğü ise, yine sözlüklerdeki tanımlamasına göre, “mikroorganizmalar arasındaki karşıtlık” demektir.

1.1.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi

Mikrobiyolojinin en büyük atılımını yaptığı 19. yüzyılın ikinci yarısında, mikroorganizmaların sağaltımda yararlanılabilecek potansiyele sahip olabileceklerini ilk düşünen bilim adamları Pasteur ve Joubert olmuştur. Steril idrarda iyi üreyen şarbon basillerinin diğer bakterilerle kirlenmiş idrarda türeyemediklerini ve sonunda öldüklerini saptayan araştırmacılar, bu gözlemlerinin nedenlerini deneysel olarak ortaya çıkartmak istemişlerdir.

1935 yılında Domagh enfeksiyon hastalıklarının modern kemoterapisini sulfonamidlerle başlatmış ve prontosil üzerinde yaptığı çalışmalardan ötürü 1938 yılında Nobel ödülünü kazanmıştır. Penisilin klinikte ilk denendiği 1942 yılına kadar sulfonamidler antibakteriyel kemoterapinin en etkili ilacı olarak yaygın biçimde kullanılmışlardır. 1939 yılından başlayarak 1943 yılına kadar Actinomyces türleri üzerinde çalışmalar yapan Waksman ve arkadaşları, sonunda, Streptomyces

griseus kültürlerinden streptomisin adını verdikleri bir madde bulmuşlardır. 1944 yılında sağaltım alanına giren bu antibiyotik, birçok gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizma yanında Mycobacterium'lara karşı da çok etkili olmuştur. Uzun ve yıpratıcı II. Dünya Savaşı'nın geniş insan kitlelerine yaydığı tuberküloz hastalığının denetim altına alınmasında büyük katkısı olan streptomisin, özellikle gram-negatif mikroorganizmalarda ve Mycobacterium'larda giderek artan direnç gelişmelerine yol açmıştır. Sonuçta, etkinliğini giderek yitirmiş ve daha dar alanlarda daha bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır. II. Dünya Savaşı'nın sonlarına doğru Streptomisin, Kloramfenikol ve Klortetrasiklin bulunmuş ve günümüze kadar yüzlerce antimikrobiyal ajan literatüre kazandırılmıştır.

1.1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür. Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre bakteriyostatikler ve bakterisidler olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır (Çizelge 1.1). Enfeksiyonların antimikrobiyallerle tedavisinde başarı uygun ilaç seçimi ve kullanımına bağlıdır. Tedavi planlanırken hastalığa sebep olan patojeni ve onun ilaç duyarlılığını gösteren in vitro veriler de önem taşır ancak ilacın yapısı ve etki mekanizmaları ile ilgili bilgi olmaksızın sadece in vitro verilere dayandırılan tedavi başarısızlıkla neticelenir. Bu nedenle antimikrobiyal ilaç seçiminde etki mekanizması (farmakodinamik) ve ilacın vücuttaki hareketi (farmakokinetik) kritik önem sahiptir.

Farmakokinetik özellikler antibiyotiğin emilim, biyoyararlanım, dağılım, proteine bağlanma oranı, metabolizma ve eliminasyonunu belirtir. Farmakodinamik özellikler ise antibiyotiğin etki-zaman ilişkisini yansıtır ve etki alanındaki konsantrasyonu ile antimikrobiyal etki veya istenmeyen etki arasındaki ilişkinin belirli bir zaman içinde incelemesini ifade eder (Abdel-Rahman S.M. 2004).

Çizelge 1.1. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması

BAKTERİSİDLER	BAKTERİYOSTATİKLER
Penisilinler	Tetrasiklinler
Sefalosporinler	Kloramfenikol
Aminoglikozidler	Sülfonamidler
Vankomisin	Eritromisin
Rifampisin	Klindamisin
Florokinolonlar	Mikonazol
Polimiksinler	Etambutol
Teikoplanin	

1.2. Moksifloksasinin Genel Özellikleri

Tıptaki gelişmelere paralel olarak, ilaç sanayi de gelişme göstermiştir. Son yıllarda tıbbi, kimyasal, biyolojik ve farmakolojik araştırmalara özellikle önem verilmiş ve bunun sonucunda yeni ve etkili ilaç aktif maddeleri dolayısıyla da etkili ilaçlar bulunmuş ve geliştirilmiştir. Moksifloksasin de kinolonlar grubuna giren bir ilaç aktif maddesidir.

Moksifloksasin sentetik antibakteriyel bir maddedir ve Aveloks ® adlı ilacın etken maddesini oluşturur. Bu ilaç, kronik bronşit, sinüzit ve akciğer hastalıkları gibi bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yüzden moksifloksasinin kanda ve idrar gibi biyolojik sıvılardaki miktarlarının tayin edilmesi klinik açıdan oldukça öneme sahiptir.

Moksifloksasinin ilaç tabletlerinde kan serumu ve idrar gibi biyolojik sıvılardaki tayini için çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemler arasında kromatografi ve elektroforez yöntemleri sayılabilir. Voltametik açıdan ise moksifloksasinin yükseltgenme çalışmaları yapılmıştır.

1.3. Moksifloksasin İle İlgili Bilgiler

Bu kısımda moksifloksasin ile ilgili genel bilgiler yer alacak olup, özellikleri ve yapısı ile tayin yöntemleri hakkında bilgi verilecektir.

1.3.1. Moksifloksasin özellikleri ve yapısı

Moksifloksasin kinolonlar grubunda yer almaktadır. Kinolonların tarihçesine bakıldığında; bu grup antibakteriyel maddelerin ilk üyesi olan nalidiksik asit 1960'lı yıllarda antimalaryal bir ilaç olan klorokinin saflaştırılması sırasında elde edilen bir ara üründen üretilmiştir. Daha sonra 1980'li yıllarda florlanmış kinolonlar, 4-kinolonlar, kinolon karboksilik asitler de denilen yeni kinolon türevleri klinik kullanıma girmiş ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Nalidiksik asitle yapısal ilişkisi bulunan yeni kinolon türevleri nalidiksik aside benzer şekilde oral olarak alındığında iyi emilen ve kullanımı kolay bir ilaçtır. Moksifloksasin nalidiksik asitten farklı olarak daha geniş antibakteriyel etki spektrumuna, daha üstün farmakokinetik özelliklere sahiptir ve dirençli bakteri gelişimine de daha az neden olmaktadır.

Kinolonlar tümüyle sentetik olarak elde edilen antibiyotiklerdir. Ana yapıyı 1. konumda azot, 4. konumda çift bağla bağlı olan oksijen bulunduran kinolon halkası oluşturur. Kinolonlar arasındaki antibakteriyel etkinlik ve farmakokinetik farklılıklar, kimyasal yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanır.

Kinolonlar antibiyotik özellikte olmalarından dolayı bakterilerin metabolizmasını bozarak ya da hastalık yapma etkilerini yok ederek bakterileri etkisiz hale getirirler.

Yeni kinolonların binlerce türevi elde edilmiş ve halen üretilmekte iken bunlardan ancak bazıları insan enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. En çok uygulananların başında norfloksasin, enoksasin, ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin gelmekte; bunları fleroksasin, lomefloksasin, temafloksasin, amifloksasin, difloksasin, tosufloksasin, sparfloksasin izlemektedir.

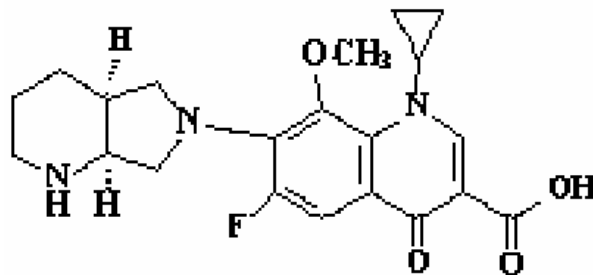
Genel olarak yeni kinolonlar Enterobacteriaceae ailesinin üyelerine, H. influenzae, gonokoklar, menengokoklar gibi gram negatif bakterilerine karşı son derece düşük derişimlerde etkilidirler. Kinolonlar arasında bu bakterilere karşı etkinlik açısından farklılıklar az da olsa görülebilir.

Kinolonların kullanıldığı başlıca enfeksiyonlar; genitoüriner enfeksiyonlar, gastrointestinal enfeksiyonlar (tifo ve paratifolar dahil), akciğer enfeksiyonları endokardit, menenjit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, oftalmik enfeksiyonlar sayılabilir.

Yeni kinolonlar; oral alım kolaylığı, idrar, böbrek ve prostat dokularında yüksek düzeye ulaşmaları, bu düzeyde üriner enfeksiyonlara neden olabilecek tüm bakterilere etkili olmaları nedeni ile idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde çok kullanılmaktadır. Kulak burun boğaz hastalıklarındaki en önemli kullanım yeri dış kulak iltihaplarıdır. Yan etkileri çok fazla olmayan kinolonların en fazla görülen yan etkileri mide barsak sistemi üzerindedir.

Moksifloksasin bir florokinolon türevidir ve antibakteriyel bir maddedir. Gram-pozitif ve gram-negatif organizmalar, anaeroblar, aside dirençli bakteri ve atipik bakterilerin geniş bir bölümüne karşı in-vitro aktiviteye sahiptir. Bakteri hücreindeki DNA zincirini bozarak etki gösterir. Moksifloksasin; 1-siklopropil-7-((S,S)-2,8-diazobisiklo[4.3.0]non-8-il)-6-9-floro-8-metoksi-1,4-dihidro-4-okso-3-kinolon karboksilik asidin hidro klorür tuzudur (Leomine). Kimyasal yapısı şekil 2.1.'de görülmektedir. Moksifloksasinin mol kütlesi 437,9 gramdır. Basit formülü ise $C_{21}H_{24}FN_3O_4$ 'tür (Kumar).

Moksifloksasin, diğer kinolonlardan farklı olarak 8 konumunda metoksi grubu ve 7 konumunda diazobisiklononil grubu içerir ve kronik bronşit, sinüzit gibi bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkilidir. Diğer kinolonlardan eliminasyon (yarı ömür) ve bakterilere karşı etkinlik açısından farklılık gösterir.



Şekil 1.1. Moksifloksasinin yapısı

Moksifloksasin hızlı bir şekilde mide ve bağırsaklardan emilir. İlaç derişimine bağılı olarak moksifloksasinin %50'si serum albuminine bağlanmaktadır. Bu bileşimin biyolojik etki mekanizması tam olarak açıklanabilmiş değildir. Ancak moksifloksasininde yer aldığı florokinolonların; bakteri hücreindeki DNA sentezini önleyerek öldürücü etki yaptıkları bilinmektedir.(Zhanel)

1.3.2. Moksifloksasinin tayin yöntemleri

1.3.2.1. Kromatografik yöntemler

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC); moksifloksasinin ayrılması ve tayini için oldukça yaygın kullanılan bir metottur. Boubakar ve arkadaşları, özel bir madde olan Mueller-Hinton suyundaki moksifloksasinin HPLC ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada grup floresans dedektör kullanmıştır. 0,5-3,2 µg/mL derişim aralığında moksifloksasin derişimi ile pik alanı arasında doğrusal bir artış bulmuşlardır (Boubakar).

Nguyen ve arkadaşları, moksifloksasinin, gatifloksasinin ve levofloksasinin serum numunesinde eş zamanlı tayinlerini gerçekleştirmek amacıyla HPLC ile bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada hareketli faz olarak asetonyril, tetrabutyl amonyum bromür ve fosfat tamponu içeren bir karışım kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem ile gözlenebilme sınırı levofloksasin için 60 ng/mL, gatifloksasin için 120 ng/mL ve moksifloksasin içinde 35 ng/mL olarak bulunmuştur (Nguyen).

Vishwanathan ve çalışma grubu, serum numunelerindeki moksifloksasinin; sıvı kromatografisi elektrosprey iyonlaştırıcı tandem kütle spektroskopisi (LC/ESI-MS/MS) ile tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde Oasis[®] HLB katı faz özütlemesi kullanılarak moksifloksasin özütü elde edilmiştir. Bu yöntem ile 1-1000 ng/mL arasında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş, moksifloksasin için tayin sınırı 50 pg/mL olarak bulunmuştur (Vishwanathan).

1.3.2.2. Kapiler elektroforez yöntemi

Moksifloksasin iki kiral merkeze sahiptir. İki kiral merkez atomundan dolayı dört

farklı izomeri vardır. Bunlar S,S izomeri, R,R enantiomeri, R,S diastreoizomeri ve S,R diastereoizomeridir.

Möller ve arkadaşları, kan serumundaki moksifloksasinin tayinini laser floresans kapiler elektroforez ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, HPLC yöntemi ile elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda kan serumundaki moksifloksasinin tayini için LOD değeri 2,5 µg/L ve LOQ değeride 0,5 µg/L olarak bulunmuştur. (Möller)

Cruz ve Hall, moksifloksasinin dört farklı stereoizomeri arasından S,S izomerini ayırt etmek için kapiler elektroforez yöntemini kullanmışlardır. Çalışma; %6 asetonitril, %5 sülfolanmış-γ-siklodekstrin içeren fosfat tamponunda, 20° C'da 50µmx40 cm silika kapiler ile yapılmıştır (Cruz).

1.3.2.3. Elektrokimyasal yöntemler

Moksifloksasin yapısındaki karbonil grubundan dolayı elektroaktif bir maddedir. Ancak moksifloksasinin elektrokimyasal yöntemlerle yapılan çalışmaları sınırlıdır. Elektrokimyasal yöntemlerle moksifloksasinin yükseltgenme davranışları ve adsorptif voltametri ile tabletlerde ve idrarda çalışılmıştır. Moksifloksasin hakkında elektrokimyasal tekniklerle yapılan çalışmalar sınırlı olmasına rağmen, üyesi olduğu florokinolonlar grubundaki ilaç aktif maddeler için çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Rizk ve arkadaşları, florokinolonlar grubuna giren ofloksasinin, ilaç yapılarındaki ve biyolojik akışkanlardaki tayini için diferansiyel puls polarografisini kullanarak bir yöntem geliştirmişlerdir. Ofloksasinin elektrokimyasal davranışını B-R tamponu kullanılarak pH 4,1 ile 10,3 arasında incelenmiştir. İndirgenme reaksiyonu tersinmez ve difüzyon kontrollü olarak bulunmuştur. DC polarografisi ile çalışma aralığı 5×10^{-5} - 5×10^{-4} M ve DP polarografisi ile 1×10^{-5} - 5×10^{-4} M ve minimum gözlenebilme sınırı 3×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır (Rizk).

Trindade ve çalışma grubu, tablet ve idrar numunelerindeki moksifloksasinin tayini

için asılı civa damla elektrodunda, kare dalga voltametri ile bir yöntem geliştirmişlerdir. Destek elektrolit olarak pH 8 fosfat tamponu kullanılmıştır. Yapılan çalışmada Ag/AgCl'e karşı -1,38 V'da tek bir indirgenme piki gözlenmiştir. Moksifloksasin için tayin sınırı değeri saf ilaç şeklinde 0,44 ng/mL ve idrarda ise 3,20 ng/mL olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı ise saf ilaç formunda 1,46 ng/mL ve 10,60 ng/mL olarak bulunmuştur.(Trindade)

Song ve çalışma grubu, ilaç formulasyonlarındaki lomefloksasinin, 2-iyodoasetamit varlığında polarografik katalitik dalgasını çalışmışlardır. Çalışma fosfat ortamında gerçekleştirilmiş ve 2-iyodoasetamit varlığında lomefloksasin katalitik bir dalga oluşturmuş olup çalışmada ikinci türev polarografisi kullanılmıştır. Bu yöntem ile lomefloksasin için çalışma aralığı 1×10^{-8} M ile 1×10^{-6} M olarak bulunmuştur (Song).

Jain ve çalışma grubu, florokinolonlar grubuna giren sparfloksasinin Co(II) komplekslerini çalışmışlar ve sparfloksasinin kalitatif ve kantitatif tayinini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen kompleksin elementel analizi IR spektrumlarından metal ligand oranını bulmuşlar, polarografi ve amperometri tayinini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan analizler sonucu metal ligand oranı 1:1 olarak bulunmuştur. (Jain)

1.3.3. Yan etkiler

Bulantı, kusma, ishal ve diğer gastrointestinal sistem ile ilgili rahatsızlıklar kinolonların en önemli yan etkilerini oluştururlar. Geniş spektrumlu diğer antibakteriyel ilaçlar (penisilinler veya sefalosporinler gibi) ile karşılaştırıldığında ishalin şiddet daha azdır %1–10 (Lipsky-Rolvold).

Hipokalemisi olan hastalarda QT aralığını uzattığı gösterilmiştir. Aritmisi olan hastalarda kullanılmamalıdır (Elming H).

Steroid kullanan hastalarda tekrarlayan ani tendon rüptürüne sebep olduğu gösterilmiştir. (Olaf Burkhardt)

Sinir sistemine yönelik istenmeyen etkileri daha seyrek ($<0,5\%$); ama psikolojik reaksiyonlar, halusinasyonlar, depresyonlar ve konvulsiyonlar kinolonlar ile tedavi sırasında sıklıkla ortaya çıkmaktadır; bu nedenle, hastanın bu ilaçlar ile tedavisi sırasında bu tür etkiler göz önünde tutulmalıdır. Fluorokinolonların sinir sistemine yönelik etkilerinin patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Kinolonların GABA için antagonistik etkileri in vitro olarak 7 numaralı karbon atomundaki heterosiklik yapının sürdürülmesiyle mümkündür. Serbest piperazinil grup taşıyan kinolonların bu türevleri, metil piperazin halka taşıyanlardan daha güçlü etkinlik gösterirler. (Lipsky-Rolvold)

Gebelik ve emzirme döneminde teratojenik etkilerinden dolayı çocuklar ve adolesanlarda geri dönüşümsüz kıkırdak deformitesine yol açtığı için kullanımı kontraendikedir (Lipsky-Rolvold).

1.4. Metronidazol

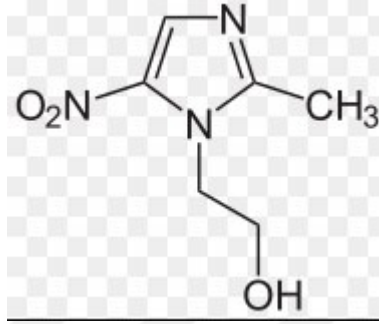
Metronidazol bir nitroimidazol türevidir. Nitroimidazoller (metronidazol, ornidazol, tinidazol) özellikle anaeroblar, protozonlar ve bazı helmintlere etkili antibiyotiklerdir.

Nitroimidazoller anaerobik enfeksiyonlar ve protozoa enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Anaerobik enfeksiyonlarda sıklıkla gram negatif aerobik bakterilerde birlikte gelişen mikst enfeksiyonlardır, bu nedenle tedavide metronidazol veya ornidazol betalaktamlarla birlikte kombine olarak kullanılır. Anaerobik bakteriyemi, abse, yumuşak doku enfeksiyonları, oral ve dental enfeksiyonlarda metronidazol kullanılabilir. Metronidazol *Clostridium Difficile*'nin neden olduğu psödomembranöz enterokolitte ilk seçenek antibiyotiktir.

Antibiyotik, herhangi bir mikroorganizma tarafından, başka bir mikroorganizmayı öldürmek veya çoğalmasını durdurmak için üretilen her türlü maddedir. Antibiyotik üretimi, onu üreten mikroorganizma için selektif bir avantaj sağlar. Örnek olarak, Penicillium tarafından üretilen antibiyotikler, doğada rekabet halinde olduğu diğer mikroorganizmaların büyümesini önleyerek Penicillium'a doğal ayıklanma sürecinde

bir avantaj sağlar.

Metronidazol ve ornidazol tek başına veya betalaktam antibiyotiklerle kombine edilerek elektif kolon cerrahisi jinekolojik operasyonlar ve acil apendektomi profilaksisinde de kullanılabilir (Leblebicioğlu, 2001).



Şekil 1.2. Metronidazol'ün kimyasal yapısı

1.4.1. Voltametrik Tekniklerle Yapılmış Bazı İlaç Analizleri

1.4.1.1. Metronidazol'ün Aktifleştirilmiş Camsı Karbon Elektrotta Elektrokimyasal İndirgenmesi ve İlaçlarda Tayini

Özkan ve diğerleri (1997), metronidazolun ilaçlarda tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem yeni bir ön işleme, aktifleştirilmiş camsı karbon elektrotta ilacın elektrokimyasal indirgenmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada elektrokimyasal indirgenmeye pH, konsantrasyon, tarama hızı, organik çözücü ve yüzey etken maddenin etkisini incelemişlerdir. Akımın konsantrasyonla orantılı olduğunu ve ilacın BR tamponunda (pH:10), 2×10^{-6} - 6×10^{-4} konsantrasyon aralığında tayin edilebileceğini bulmuşlardır. Ayrıca sonuçları HPLC metodu içeren USP XXIII prosedürü ile karşılaştırarak önerdikleri metodun doğruluğunu kontrol etmişlerdir.

Birçok heterosiklik bileşik, nitro grubunun biyolojik indirgenme olayından dolayı antibakteriyel ve antiprotozoan aktiviteye sahiptir. Bu bileşikler zaten, hem bir radyo-hassaslaştırıcı hem de bir sitotoksik ajan olarak kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu önemli ilaç sınıfının en önemli temsilcisi 5-nitroimidazol derivesi (türevi) olan Metronidazoldür. Bu madde trichomoniasis, giardiasis, amoebiasis ve balantidiasis bakterilerini içeren protozoal hastalıkların bir çeşidi için etkin bir ajandır.

Metronidazol daha önce spektrometri, titrimetri, ince tabaka kolon kromatografisi, gaz kromatografisi (GC) ve yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Bu etken maddenin elektrokimyasal indirgenmesinde çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Bir damlayan cıva elektrot kullanıldığında, metronidazol ve onun ilgili bileşikleri yüksek bir katodik pik verir. Bu piklerden birincisi hidroksil aminin 4 elektron ile indirgenmesine aitken, ikinci pik ise aminin 2 elektron ile indirgenmesine aittir. Ve bu reaksiyonlar pH ve destek elektrolite bağlıdır.

Metronidazol'un katı elektrotlardaki ilk elektrokimyasal çalışması ilk olarak Bishop ve Hussein tarafından yayınlanmıştır. Bu bilim adamları, metronidazoldeki amin grubunun alkali ortamdaki dönen platin ve altın elektrot kullanılarak iki adımda indirgenmesine ait bir rapor kaydetmişlerdir.

Voltametik ölçümler bir EPL-2 kaydedici (Tacussel) ile birleştirilmiş bir PRG-3 polarografi cihazı (Tacussel) ile yapılmıştır. Bütün potansiyeller doymuş kalomel elektrot (SCE) ve platin tel yardımcı elektrot ile kaydedilmiştir. Çalışma elektrodu olarak ise camı karbon elektrodu (Tacussel XM 540; alan: 1,013 cm²) kullanılmıştır.

Elektroda yapılacak ön işlem için bir Venking modeli HP 70 potansiyel düzenleyici ve aynı tip 250 fonksiyonlu bir jeneratör kullanılmıştır.

HPLC deneyleri UV dedektörü (Model 481) ile birleştirilmiş Waters Likit Kromatografi (Model 510) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Metronidazol etken maddesi Eczacıbaşı İlaç Fabrikasından temin edilmiştir. Diğer bütün reaktifler Sigma ya da Merck firmalarınca üretilmiş ve desteklenmiştir. Voltametik olarak gözden geçirilen stok çözeltiler günlük olarak yenilenmiş ve Britton-Robinson tamponu (1,6 -10,6) hazırlanmıştır.

Çift distile edilmiş saf su kullanılmıştır ve hücreden saf azot gazı geçirilerek deoksijenasyon engellenmiştir.

Camsı karbon elektrodun aktivasyonu için 0,3 µm alümina kullanılmıştır. Elektrot,

0,1 M KNO₃ çözeltisinde 5s+1,5V ve 2s-1V potansiyel uygulanarak elektrokimyasal bir işleme tabi tutulmuştur.

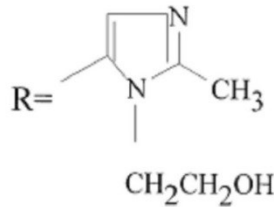
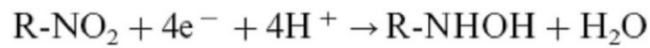
Bu çalışmalar, elektrodun tekrarlanabilir voltametik cevaplar vermesi gerçekleşene kadar tekrarlanmıştır.

Bu prosedürlerin sonunda yüzey yüksek aktiviteye sahip olur. Her taramadan önce bu işlemler yapılmıştır.

10 tane tabletin ortalama kütlesi alınmış ve bu tabletler çok iyi bir şekilde pudra haline getirilmiştir. Ve bu numuneden 10⁻³ M stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti pH 10 olan 100 mL'lik balon jodedeki 80 mL tampon içeren çözelti içine transfer edilmiştir. Balon jodedeki içerik 15 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ve aynı destek elektrolit ile istenilen hacme seyreltilmiştir. Çözelti süzölmüştür ve saf metronidazol'un voltamogramları kaydedilmiştir. Metronidazol'un içeriği ilgili eşitlikten hesaplanmıştır.

Doğrusal taramalı voltametri ile aktifleştirilmiş camı karbon elektrot kullanarak metronidazol'un tek bir indirgenme piki gözlenmiştir. (1,6 ile 10,6 pH değerleri arasındaki destek elektrolitlerde) (Şekil 1.4).

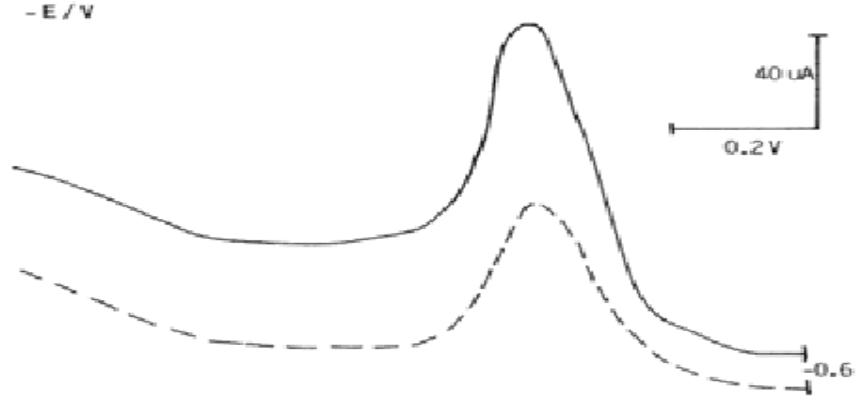
Bu pik, hidroksil amine ait nitro grubunun indirgenmesi ile ilgilidir. Ve buna göre aromatik ve heteroaromatik nitro bileşiklerinin elektrokimyasal indirgenmesinin mekanizması önerilmiştir.



Şekil 1.3. Metronidazol'un indirgenme mekanizması.

Aktive edilmemiş camı karbon elektrot ile alınan voltamogram ile aktive edilmiş

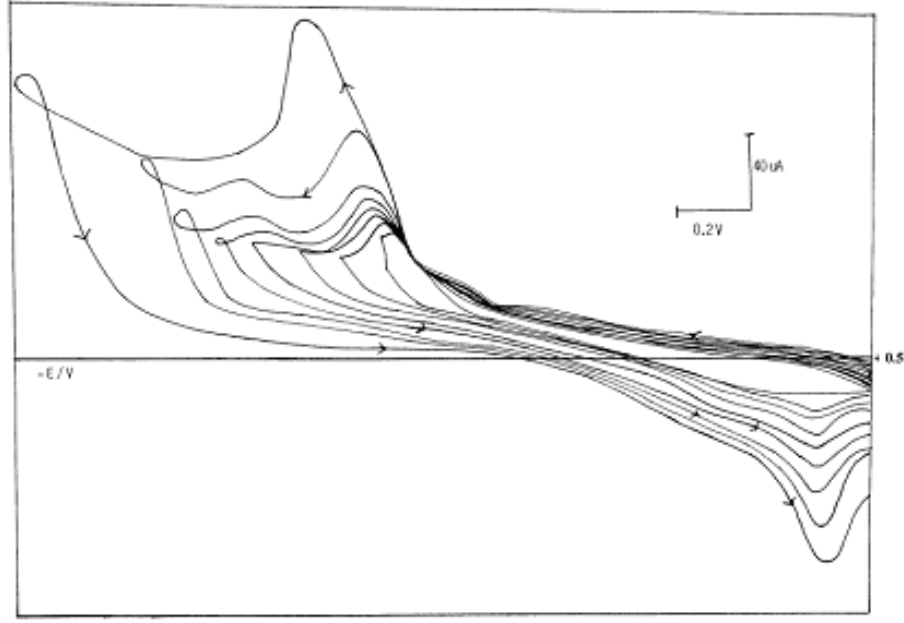
camsı karbon elektrot ile alınan voltamogram karşılaştırıldığında, aktive edilmiş elektrot ile alınan voltamogramdaki indirgenme pikinin daha yüksek akım değerine sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 1.4. Doğrusal taramalı voltametri ile elde edilmiş voltamogramlar: (–) aktifleştirilmiş ve (---) aktifleştirilmemiş camsı karbon elektrot ile. 4×10^{-4} M BR tamponu (pH 10), tarama hızı 100 mV/S.

Dönüşümlü voltametri (CV) taramasında, hidroksil amine ait tek bir anodik piki (+0,4 civarında, BR pH 6.5) gözlenmiştir. Katodik ve anodik pik potansiyel değerlerinin ayrılması 10 dan 100 mVs^{-1} e kadar hızlarda taranması sonucunda tersinir olmayan çift redoks ile açıklanmıştır.

Şekil 1.5’de tekrarlanan dönüşümlü voltamogramları göstermektedir. Bu voltamogramlara bakıldığında anodik veya katodik yönde tek bir pik gözlenmiştir. Bu reaksiyonun tersinmez olduğunu göstermektedir.



Şekil 1.5. 4×10^{-4} M metronidazol'un BR tamponu (pH 10) ortamında CV voltamogramı.

Bu sonuçların temeli aktifleştirilmiş camı karbon elektrot kullanarak sulu ortamda Metronidazol'un belirlenmesine dayanır.

En iyi voltamogramlar Britton-Robinson tamponu pH 10'da ve 100 mVs^{-1} tarama hızında elde edilmiştir.

Voltamogramlar, $+0,1 - (-1,5 \text{ V})$ potansiyel aralığında kaydedilmiştir.

Pik potansiyelinin ve pik akımının tekrarlanabilirliği 2×10^{-4} M Metronidazol çözeltisi ile 5 deneyin tekrarlanması ile elde edilmiştir. Pik potansiyeli ve akımı için bağıl standart sapma 0,9 ve %1,7 olarak hesaplanmıştır.

Metronidazol konsantrasyonuna karşı pik akımının grafiğinde konsantrasyon aralığı $2 \times 10^{-6} - 6 \times 10^{-4}$ M ($r = 0.997$) olan bir doğru görülmüştür. Bu doğrunun eğimi $24,5 \times 10^4 \mu\text{A}$ dir. Kayma değeri (n) ise $8,9 \mu\text{A}$ dir. Eğimin standart sapması $56,1 \times 10^2 \mu\text{A}$ ve kaymanın standart sapması ise $1,2 \mu\text{A}$ olarak belirlenmiştir. Belirme sınırı $1,1 \times 10^{-6}$ M olarak bulunmuştur (3s/m denklemine göre).

Çizelge 1.2. Metronidazol'un miktarını belirlemek için belirlenen analitik tayin parametreleri

Parametreler	Sonuçlar
Potansiyel (mV)	- 40
Kalibrasyon Aralığı (mol L ⁻¹)	2x10 ⁻⁶ - 6x10 ⁻⁴
Eğim (µA mol ⁻¹ L)	24,5x10 ⁴
Eğimin Bağıl Standart Sapması	56,1x10 ²
Kayma (nA)	8,9
Kaymanın Bağıl Standart Sapması	1,2
Korelasyon Katsayısı (r)	0,997
Ölçüm Sayısı	5
LOD (Belirme Sınırı) (mol L ⁻¹)	1,1x10 ⁻⁶
Pik Akımının Tekrarlanabilirliği (% Bağıl Standart Hata)	0,9

Yukarıdaki sonuçlar Metronidazol'un ticari formülasyonlarının aktifleştirilmiş camsı karbon elektrot ile belirlenmesine izin verir.

Sonuçlar UV dedektör sistemi ile birleştirilmiş HPLC sistemi ile belirlenmiş sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlar Çizelge 1.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.4'de ise aktifleştirilmiş camsı karbon elektrot ile geliştirilen bu voltametrik teknikte yapılan geri kazanım çalışmalarının sonuçları gösterilmektedir.

Çizelge 1.3. HPLC sistemi ile desteklenmiş voltametrik sonuçlar

	Voltametrik metod			
	Tablet (500 mg)	Oral suspansiyon (125 mg 5 mL ⁻¹)	i.v. infüzyon solusyonu (0,5%)	Vajinal tablet ^a (500mg)
Ortalama ^b	503,3	126,0	501,2	502,4
RSD. (%)	1,74	2,58	1,27	1,89
t-testi	0,702	0,460	0,534	0,466
RSD: Bağıl Standart Sapma				
^a Her bir vajinal tabletteki 100 mg mikonazol nitrat varlığı				
^b 10 deneyin ortalaması				
HPLC metodu	Oral	i.v. infüzyon	Vajinal tablet ^a	
Tablet (500 mg)	suspansiyon (125 mg 5 mL ⁻¹)	solusyonu (0,5%)	(500 mg)	
	506,0	125,4	503,2	504,5
	1,72	2,19	1,86	2,06
P=0,05, t=2,101				

Çizelge 1.4. Geri kazanım çalışmaları

Formülasyon	Geri Kazanıma(%)	R.S.D. (%)
Tablet	98,4	0,56
Oral suspansiyon	99,4	1,92
i.v. infüzyon solusyonu	99,5	0,66
Vajinal tablet	98,9	0,92

Sonuç olarak, Metronidazol adlı etken maddenin elektrokimyasal indirgenme özelliklerinden yararlanılarak ve aktifleştirilmiş camsı karbon elektrot kullanarak kantitatif tayini için hassas bir doğrusal taramalı voltametri tekniği geliştirilmiştir. (Özkan ve diğ., 1997).

1.4.1.2. Metronidazol'ün Karbon Fiber Mikrodisk Elektrotta Elektrokimyasal İndirgenmesi

Bartlett ve diğerleri (2005), yaptıkları çalışmada karbon fiber mikrodisk elektrotta Kare Dalga Adsorptif Sıyırma Voltametrisini kullanarak Metronidazol'ün elektrokimyasal davranışını incelemişlerdir. pH 9,0 olan BR tamponunu destek elektrolit olarak kullanarak doğrusallığın gözlemlendiği analitik konsantasyon tayin aralığını $5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}$ M olarak saptamışlardır. (Bartlett ve diğ., 2005)

1.5. Kemometrik Yöntemler

Kemometri kelimesi ilk olarak 1970'li yılların ortalarında, İsveçli organik kimyacı Svante Wold tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Bilgisayar teknolojisinin gelişmesiyle başlayan ve İngilizce'de "**computational chemistry**" olarak adlandırılan ve bilgisayar destekli kimya olarak adlandırılan bilim dalındaki gelişmeler sonucu ortaya çıkan bir kelimedir. Bu kelime, İngilizcede kimya ve ölçme kelimelerinin bir araya gelmesinden meydana gelmiştir ve kimyada uygulanan çeşitli ölçme ve değerlendirme işlemlerine bilimsel bir yaklaşımı ifade etmekte ve içermektedir. Kemometri, matematiksel ve istatistiksel metotları kimyasal verilere uygulama işlemidir. Uluslar arası kemometri derneğinin (ICS) tanımına göre kemometri; kimyasal ölçümlerle, matematiksel ve istatistiksel uygulama yöntemleri arasında ilişki kuran bir bilim dalıdır. Deneysel parametrelerin optimizasyonu, deney tasarımı, kalibrasyon, sinyal işleme gibi çeşitli teknikler kullanılarak veri elde edilir.

Bu verilerden bilgi edinmek için ise, istatistik, kalıp tanıma, modelleme, yapının niceliğini değerlendirme gibi teknikler kullanılır. Kemometri;

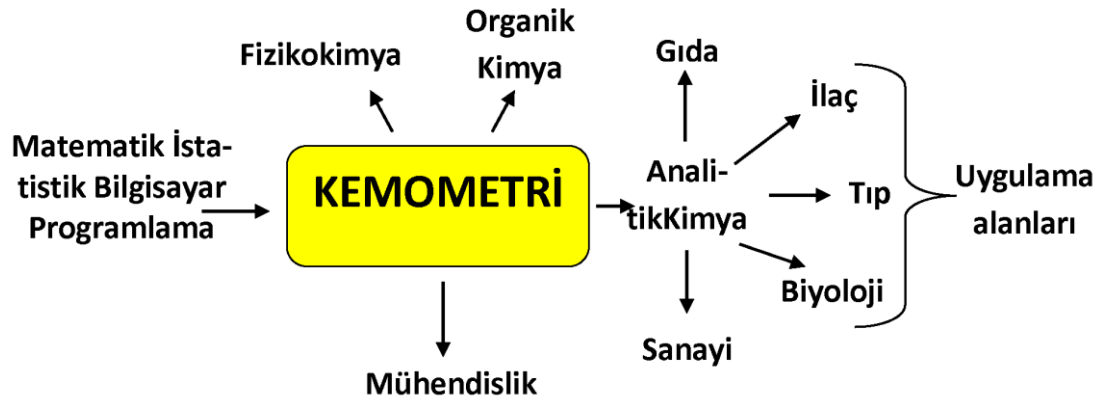
- İstatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanarak kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya disiplindir.
- Kimyasal analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ekstraksiyonunu ve yasaklı bilgilerin açığa çıkarılmasına olanak tanıyan güçlü bir araçtır.

Kemometrinin temel uygulama alanlarından biri de analitik kimyadır. Kemometri kimyada özellikle analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunar.

Nümerik yöntemler olarak da adlandırılan kemometrik yöntemler son yıllarda spektrumlardan elde edilen ölçüm değerlerinin bilgisayar destekli programlar ile lineer denklem sistemlerinin çözümüne dayalı kalibrasyonların ve ölçüm değerlerinin dekompozisyonunu içeren algoritmalar kullanılarak kalibrasyonların kurulduğu matematiksel metotlardır. Günümüzde kemometrik yöntemlerin gelişmesiyle birden fazla etken madde içeren ürünlerin kantitatif analizi hiçbir kimyasal ön ayırma işlemi ve hiçbir grafik işlemi gerektirmeksizin hızlı, doğru ve hassas olarak gerçekleştirilmektedir. Kemometrik hesap yöntemlerini spektrofotometrik, elektrokimyasal ve kromatografik ölçüm cihazlarından elde edilen verilere uygulamak mümkündür. Birden fazla etken maddenin bir arada bulunduğu bileşiklerde bu etken maddelerin aynı bölgede absorbans vermeleri sonucunda spektral girişimleri nedeniyle doğrudan kantitatif analizleri mümkün olmadığı için bir ayırma işleminin ardından ancak arı analizleri yapılabilir. Bu durum, uzun yıllar ürün analizlerinde UV-görünür alan spektrofotometrilerin kullanımını kısıtlayıcı bir faktör olmuştur. Ancak günümüzde karışım analizlerinde UV-görünür alan spektrofotometrisi, kemometrik yöntemlerin kullanımıyla tekrar güncellik kazanmıştır. Kemometrik yöntemlerle bir maddenin kantitatif analizi, maddenin UV-görünür alan spektrumundaki birden fazla dalga boyundaki absorbans ölçümleri kullanılarak, daha hassas bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Son yıllarda classicalleastsquares (CLS), principalcomponent-regression (PCR), partialleastsquares (PLS) ve artificialneural network gibi kemometrik yöntemler

analitik kimyacıların sık sık kullandıkları yöntemler olmuştur. Kompleks karışımların kantitatif analizinde kemometrik yöntemler, spektrumlardan ölçülen absorpsiyon değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki kalibrasyon algoritmalarına göre kalibrasyonlar hazırlanır ve bu kalibrasyonlarda çok sayıda dalga boyunun ölçümlerinde kullanılması sonucunda ortalama nedeniyle gürültü piklerinin etkisi ya tamamen ortadan kaldırılır ya da azaltılır. Bu kemometrik kalibrasyonların hesaplanması matris matematiği içeren bilgisayar programları ile yapılmaktadır. CLS, PCR, PLS ve ANN kalibrasyon algoritmalarına ek olarak kompleks karışımlardaki etken maddelerin analizinde son zamanlarda kullanılmaya başlanan bivariate kalibrasyon (BC) ve multilinear regression kalibrasyon (MLRC) yöntemleri de kompleks karışımların analizinde son derece başarılı sonuçlar vermektedir. Bu bivariate kalibrasyon ve multilinear regression kalibrasyon yöntemleri PCR ve PLS gibi soyut vektör işlemlerini de içermediği gibi basit bir matematiksel algoritmaya sahip olmaları diğer kemometrik kalibrasyon yöntemlerine alternatif oluşturmaktadır. Kemometri günümüzde lineer cebir matematiğine dayalı olarak bilgisayar destekli kalibrasyonlar kurularak kantitatif analizlerin yapılmasına olanak tanıyan Analitik Kimyanın bir koludur (Vandeginste vd., 1998).

Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri Şekil 1.6'da sunulmaktadır.



Şekil 1.6. Kemometrinin ilişkili olduğu alanlar

1.5.1. Çok değişkenli kalibrasyon algoritmaları (Multivariate calibration algorithms)

1.5.1.1. Klasik en küçük kareler yöntemi (Classical LeastSquares (Kmatris) method)

Klasik en küçük kareler kalibrasyon yöntemi, spektrofotometrik veya diğer analitik cihazlardan elde edilen ölçüm verilerinden oluşan lineer denklem sistemlerine, Beer–Lambert yasasının uygulanmasıdır. Burada açıklamalar spektrofotometrik çalışmalar için yapılmaktadır. $A = K \times C$ (Lambert-Beer yasasına göre)'dir. Bu denklem lineer denklem sistemleri ile ifade edilecek olursa;

$$A_1 = K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots + K_{1c}C_c$$

$$A_2 = K_{21}C_1 + K_{22}C_2 + \dots + K_{2c}C_c$$

$$A_3 = K_{31}C_1 + K_{32}C_2 + \dots + K_{3c}C_c$$

$$A_w = K_{w1}C_1 + K_{w2}C_2 + \dots + K_{wc}C_c$$

Burada A = ölçülen sinyal, K = ölçüm için seçilen noktalardaki katsayılar, C = analiz edilen bileşiğin konsantrasyon.

Yöntemin basit algoritması:

$$A_{pxq} = K_{pxj} \cdot C_{jxq} \quad (1)$$

$$K = (A_{pxj} C_{qxj}) \times (C_{pxj} C_{qxj}^T)^{-1}$$

$$K^* = (K^T_{jxp} K_{pxj})^{-1}$$

$$K^T_{jxp} C_{jxp} = K^* \cdot A_{sample}$$

Yöntemin avantajları;

1. Hesaplamalar hızlıdır,

2. Kalibrasyonlarda dalga boyu seçimi gerektirmez,
3. Dalga boylarının sayısı bileşenlerin sayısından fazla olsa da kullanılabilir,
4. Dalga boylarının sayısı bileşenlerin sayısından fazla olsa da kullanılabilir,
5. Geniş bir spektral alanda çok sayıda dalga boyunun absorban ölçümleri kalibrasyonda kullanılabilir,
6. PCR ve PLS'ye göre basit bir matematiğe sahiptir.

Yöntemin dezavantajları;

1. Bu kalibrasyonda kalibrasyon karışımlarının her bileşen için tam olarak kompozisyonunun bilinmesi gerekir,
2. Spektrofotometride grafik yöntemlerin uygulanmasında olduğu gibi CLS kalibrasyon için de birbiriyle etkileşen bileşenlerin bulunduğu karışımların analizi için uygun değildir.

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

ILS yöntemi lineer denklemler sisteminin spektroskopide Beer-Lambert yasasının ters ifadesinin lineer denklem sistemine uygulanmasını içerir:

$$C = P \times A \quad (2)$$

Bu 1 nolu denklem aşağıda verilen lineer denklem sistemi şeklinde yazılabilir:

$$C_1 = P_{11}A_1 + P_{12}A_2 + \dots P_{1w}A_w$$

$$C_2 = P_{21}A_1 + P_{22}A_2 + \dots P_{2w}A_w$$

$$\dots \dots \dots (3)$$

$$\dots \dots \dots$$

$$C_c = P_{c1}A_1 + P_{c2}A_2 + \dots P_{cw}A_w$$

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

Yöntemin basit algoritması: $C_{kxq} = P_{kxp} A_{pxq}$ (18)

$$P = (C_{kxq} A^T (A_{pxq} A_{qxp}^T)^{-1})$$

$$C_{\text{sample}} = P_{kxp} \cdot A_{pxq}$$

Yöntemin avantajları;

1. Numune için ölçülen absorbans değerleri, formülde yerine konduğu zaman doğrudan konsantrasyonu hesaplamak mümkündür, bu da hesaplamalarda zaman kaybını ortadan kaldırmaktadır,
2. Analiz edilen bileşiklerin bilinmesi şartıyla bu kalibrasyon modeli çok kompleks karışımların analizine olanak tanır,

Yöntemin dezavantajları;

1. Kalibrasyon için kullanılan dalga boyunun seçimi zor ve zaman alıcı olabilir,
2. Dalga boylarının sayısı kalibrasyon numunelerinin sayısı ile sınırlanan modeller kullanılır,
3. Genellikle çok sayıda numune kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, çünkü katsayı matrisinin hesaplanmasında matris determinant değerinin "0" çıkması sonsuz çözüm gerektirmesi nedeniyle sakınca doğurur, bunu aşmak için de kalibrasyon setindeki seri sayısını artırmak gerekir,
4. Kalibrasyon numunelerinin hazırlanması ve bir ön kalibrasyon vasıtasıyla ölçüm son derece zor ve sıkıntılıdır.

1.5.1.3. Temel bileşen regresyon yöntemi (Principal component regression (PCR) method)

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 absorpsiyon verilerinin varyans kovaryansı bulunur. Varyans-kovaryans saçılma matrisinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigenvector) kalibrasyonun lineer bileşenidir. PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A \quad (4)$$

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

$$b = P \cdot q \quad (5)$$

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:

$$q = D \cdot T^T \cdot Y \quad (6)$$

Burada D diagonal matris olup her bir öz değer tersine eşittir. t₁ sayı matrisi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir:

$$t_1 = A_0 \cdot P_1 \quad (7)$$

Ortalanmış absorpsiyon ve konsantrasyon, A₀ ve C₀ ile gösterilebilir. Burada a sabiti

genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir:

$$a = C_0 - A^T O. b(8)$$

Herbir aşamada elde edilen değerler 2 no'lu denklemde yerine konularak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

Yöntemin avantajları;

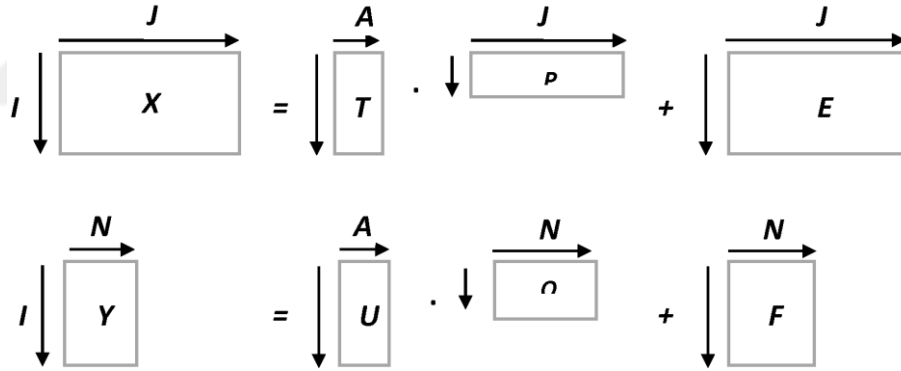
1. Dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle
2. Bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir,
3. Çok bileşen analiz için kullanılabilir,
4. PCR data işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına olanak tanır.
5. Analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir,
6. Bazen orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir,
7. Kalibrasyon için ölçülen absorbanlarındekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdan ve ölçüm aletlerinden gelen gürültünün eliminasyonuna olanak tanır.

Yöntemin dezavantajları;

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

1.5.1.4. Kısmi en küçük kareler yöntemi (Partial least squares regression method)

Kemometrik kalibrasyonlardan en yagın 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. Wold ve Martens tarafından verilen PLS algoritması en genel olanlardandır. 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.



Şekil 1.7. PLS2 kalibrasyonu

$$X = T P^T + E \quad (9)$$

$$Y = U Q^T + F$$

$$Y = X B + F$$

$$B = W (P^T W)^{-1} Q^T$$

Burada X= bağımlı değişken (örneğin absorbans 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 absorbans değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanır.

Yöntemin avantajları;

1. PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır,
2. 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,
3. Kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik konsantrasyonlarını yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır,
4. Yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir,
5. Bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir,
6. 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.

Yöntemin dezavantajları;

1. PLS hesaplamaları klasik metodlardan daha yavaştır,
2. PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur,
3. Genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir,
4. Kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur. (Dinç.2007)

1.5.2. 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 içindeana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturmaktadır. 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 hazırlamasında, çeşitli tasarım şekilleri verilmekle birlikte rastgele hazırlanan konsantrasyon setleride kullanılmaktadır.

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

1.5.4. Varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi tekniği kullanılarak grup ortalamaları arasındaki farklılığın veya

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

H0: İşlemlerin temsil ettiği popülasyon ortalamaları arasındaki fark tesadüften ileri gelmektedir. İşlem ortalamaları arasındaki gözlenen fark sıfır kabul edilebilir:

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

H1: En az iki muamele grubunun ortalaması arasında gözlenen fark tesadüften ileri gelmektedir. En az iki işlem grubunun incelenen özellik üzerine olan etkileri birbirinden farklıdır, yani aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

Karşıt hipotez kurulurken en az iki işlem arasındaki fark önemlidir denilmektedir. Çünkü kontrol hipotezinin yapılan analiz sonucunda reddedilmesi için denemede dikkate alınan k tane işlemin birbirinden farklı olması gerekmez. En az iki işlem arasındaki farklılık kontrol hipotezinin reddedilmesine sebep olabilir. Yapılan hipotez kontrolü sonucunda karşıt hipotez kabul edilmiş ise bu en az iki grup ortalaması arasındaki farklılığın önemli olduğu “çoklu karşılaştırma yöntemleri” kullanılarak araştırılır.

Gruplar arası, gruplar içi serbestlik dereceleri ve gruplar arası- gruplar içi kareler toplamı hesaplanır. Bu değerlerin oranlanmasıyla F değeri elde edilir. Elde edilen F değeri F tablosundan ($\alpha:0,05$) okunan değerle kıyaslanır (Dinç, 2009).

Çizelge 1.5. Varyans analizi çizelgesi (Anova testi çizelgesi: analysis of variation)

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F – Değeri
Yöntemler Arası (Gruplar Arası)	k – 1	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / (k-1)$	$F = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / (k-1)}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 / (k(n-1))}$
Yöntemler İçi (Gruplar İçi)	k (n-1)	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 / (k(n-1))$	
Genel Varyasyon	nk-1	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X})^2$		

1.5.5. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları

1.5.5.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları

Analitik kimyadaki miktar tayini çalışmalarında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri yada çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri IR spektrofotometre, UV- görünür alan spektrofotometre, spektroflorimetre, potansiyometre, elektrokimyasal analizör, kütle spektrometre, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez gibi analitik cihazlardan elde edilen analitik veriler uygulanmaktadır. Analitik kimyanın prensip ve yöntemleri çok değişik komşu disiplin tarafından kullanılmaktadır. Bu da analitik kimyanın biyoloji, tıp, ziraat, gıda ve eczacılık gibi alanlarda geniş bir uygulama alanı olduğunu göstermektedir.

Analitik çalışmalarda kemometrik yöntemlerin uygulamaları inorganik analiz, organik analiz, ilaç analizi, klinik ve biyolojik numunelerin analizi, gıda ve su analizleri, çevre analizleri ve stabilite tayinleri, çözünme hızı testleri şeklinde özetlenebilir.

1.5.5.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis)

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

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde tez kapsamında seçilen bileşiklerle ilgili yapılmış kemometrik çalışmalara değinilmiştir.

Maha A.Sultan (2009) Bu araştırmanın amacı, saf formda ve farmasötik formülasyonlarda moksifloksasinin (MOXF) belirlenmesinde kinetik spektrofotometrik bir yöntem geliştirmektir. Yöntem, asetaldehit mevcudiyetinde 2,3,5,6-tetrakloro-1, 4-benzokinon ile reaksiyona sokulması suretiyle MOXF'nin renkli bir N-vinil klorobenzokinon türevinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Renkli ürün oluşumu 652 nm'de absorbans ölçülerek spektrofotometrik olarak izlendi. Tepkimeyi etkileyen faktörler incelendi ve optimize edildi. Reaksiyonun stokiyometrisi belirlendi ve reaksiyon yolu öne sürüldü. Reaksiyonun aktivasyon enerjisi hesaplandı ve 6.65 kJ mol^{-1} olduğu bulundu. Optimize edilmiş şartlar altında, kalibrasyon grafikleri oluşturmak için başlangıç hızı ve sabit süre (5 dakikada) yöntemlerden yararlanılmıştır. Grafikler, sırasıyla, başlangıç hızı ve sabit zaman yöntemleri için 2.0 ve $5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'lik saptama limitiyle, sırasıyla

$5-100$ ve $15-150 \mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarında doğrusal idi. Her iki yöntem için de analitik performans tam olarak doğrulanmış ve sonuçlar tatmin edicidir. Farmasötik formülasyonlarda yaygın olarak bulunan ekşiyanlardan hiçbir parazit gözlemlenmedi. Önerilen yöntem, farmasötik formülasyonlarında MOXF'nin belirlenmesine başarıyla uygulanmıştır. İlk talep oranı ve sabit zaman yöntemi için etiket talep yüzdeleri sırasıyla $101.25 \pm 0.73\%$ ve $100.92 \pm 0.65\%$ idi. Sonuçların bir referans spektrofotometrik yöntemle elde edilenlerle istatistiksel olarak karşılaştırılması, iki yöntemin doğruluğu ve hassaslığı arasında mükemmel bir uyum gösterdi. Önerilen yöntem, kalite kontrol laboratuvarlarında MOXF analizine uygulanmasında büyük değere sahiptir.

Safwan Ashour (2015) Saf formda ve farmasötik formülasyonlarda moksifloksasin hidroklorürün (MOXF) analizi için yeni, doğru, hassas ve güvenilir kinetik spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Yöntem, 623 ve 660 nm'de lambda max ile renkli bir ürün oluşturmak üzere, asidik bir ortamda Ce (IV) varlığında MOXF'nin 3-

metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorür monohidratla (MBTH) oksidatif bağlama reaksiyonunu içerir. Reaksiyon, zamanın bir fonksiyonu olarak 623 nm'de absorbans artışı ölçülerek spektrofotometrik olarak izlenir. Kalibrasyon eğrilerini oluşturmak için başlangıç hızı ve sabit zaman yöntemleri kabul edildi. Lineerlik aralığı, başlangıç hızı ve sabit zaman yöntemleri için 1.89-40.0 µg ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Başlangıç hızı ve sabit zaman yöntemleri için saptama limiti sırasıyla 0.644 ve 0.043 µg ml⁻¹'dir. Yöntemin molar absorptivitesinin 0.89 × 10⁴ L mol⁻¹ cm⁻¹ olduğu bulunmuştur. Deney sonuçlarının istatistiksel olarak işlenmesi, yöntemlerin hassas ve doğru olduğunu gösterir. Önerilen yöntem, moxifloxacin hydrochloride'nin tablet dozaj formunda ekşiyanlardan herhangi bir müdahale olmaksızın kestirimi için başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar resmi yöntemle karşılaştırılmıştır.

S S Pekamwar (2015) Sefiksin ve moksifloksasin'in farmasötik dozaj formunda tahmini için basit, doğru, hassas, ekonomik ve güvenilir bir birinci dereceden türev spektrofotometrik yöntem geliştirildi ve doğrulanmıştır. İlaçların analizi için optimum koşullar oluşturulmuştur. Sefiksin ve moksifloksasin miktarının tayini için birinci derece türev yöntem geliştirildi. Spektrum, sefiksim ve moksifloksasin'in metanol ve suda (60:40 v / v) eritilmesi ile elde edildi; seçilen dalga boyu, sefiksim için 260 nm ve moksifloksasin için 316 nm'dir. Bira yasası 2-12 µg / ml konsantrasyon aralığında uygulandı. Tablet analizinin sonuçları, sefiksim ve moksifloksasin için yöntemin tekrarlanabilirliğini sırasıyla gösteren 0.1576-0.2183 aralığında göreceli göreceli standart sapmayı (% RSD) gösterdi. Kurtarılmalar, gösterilen% 100'den önemli ölçüde farklılık göstermez yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini belirten tablet formülasyonunda kullanılan ortak ekşiyanlardan herhangi bir etkileşim olmamıştır. Yöntem, ICH kılavuzuna göre doğrulanmış ve doğru, hassas ve güçlü bulunmuştur. Doğrusallık, doğruluk, hassaslık ve özgünlük, saptama limiti ve nicelik sınırı açısından da geçerlilik kazanmıştır.

Ayman A. (2014) Bazı fluorokinolonlar antibiyotiklerin, saf formda ve farmasötik formülasyonlarda: gemifloksasin mesilat (GMF), moksifloksasin hidroklorür (MXF) ve enrofloksasinin (ENF) belirlenmesi için basit, hızlı ve ekstrakte edici spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, bazik ilaçlar ve asit boyaları, asidik tampon çözeltilerde yani bromokresol yeşili (BCG), bromokresol

mor (BCP), bromofenol mavisi (BPB), bromotimol mavisi (BTB) ve metil turuncu (iyonlar çifti) arasındaki iyon çifti komplekslerinin oluşumuna dayanır. MO). Oluşan kompleksler, kloroform ile ekstrakt edildi .Oluşan kompleksler kloroform ile ekstre edildi ve GMF için sırasıyla BCG, BCP, BPB, BTB ve MO için 420, 408, 416, 415 ve 422 nm'de ölçüldü; MXF için sırasıyla BCP, BTB, BPB ve MO için 410, 415, 416 ve 420 nm'de; ve ENF durumunda sırasıyla BCG ve BTB için 419 ve 414 nm'de idi. Analitik parametreler ve etkileri araştırılmıştır. Bira kanunları GMF, MXF ve ENF için sırasıyla 1.0-30, 1.0-20 ve 2.0-24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında uygulandı. Önerilen yöntemler, saf formlarda ve farmasötik formülasyonlarda incelenen ilaçların analizi için başarıyla uygulanmıştır. Sonuçların referans yöntemlerle istatistiksel olarak karşılaştırılması mükemmel uyum gösterdi. Doğruluk ve kesinlik açısından önemli bir fark olmadığını gösterdi.

Sanjay K. Motwani (2006) Toplu ve farmasötik formülasyonlarda moksifloksasinin belirlenmesi için yeni, basit, uygun maliyetli, doğru ve tekrarlanabilir UV-spektrofotometrik yöntemler geliştirildi ve doğrulanmıştır. Moksifloksasin 0.1N hidroklorik asit (pH 1.2) içinde 296 nm'de ve fosfat tamponunda (pH 7.4) 289 nm'de tahmin edilmiştir. Fosfat tamponu ortamında hidroklorik asitte 1-12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9999$) ve 1-14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2 = 0.9998$) konsantrasyon aralığında biranın yasalarına uyulmuştur. Görünür molar absorptivite ve Sandell'in duyarlılık katsayısı hidroklorik asitte $4.63 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ve $9.5 \text{ ng cm}^{-2} / 0.001 \text{ A}$ olarak bulunmuştur; fosfat tampon ortamında $4.08 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ve $10.8 \text{ ng cm}^{-2} / 0.001 \text{ A}$, sırasıyla önerilen yöntemlerin yüksek hassasiyetini göstermektedir. Bu yöntemler, ICH kılavuzlarına göre çeşitli parametreler için test edilmiş ve onaylanmıştır. Saptama ve niceleme sınırları, hidroklorik asitte sırasıyla 0.0402, 0.1217 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve fosfat tampon ortamında 0.0384, 0.1163 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Önerilen yöntemler, moksifloksasinin farmasötik formülasyonlarda (tabletler, i.v. infüzyonlar, göz damlaları ve polimerik nanoparçacıklar) belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar, basit, ucuz ve daha az zaman alıcı olmakla birlikte prosedürün doğru, hassas ve tekrarlanabilir (göreceli standart sapma $< \% 2$) olduğunu ve dolayısıyla farklı dozaj formlarında ve dissolüsyon çalışmalarında moksifloksasinin belirlenmesi için uygun bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

Mahesh Attimarad (2012), Yeni moksifloksasin HCl ve sefiksim trihidrat kombinasyonu erişkinlerde alt solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde onaylanmıştır. Başlangıçtaki formülasyon geliştirme ve tarama aşamasında, moksifloksasin ve sefiksimin çözünmesi ve salım testi için hızlı ve güvenilir bir yöntem çok rağbet edildi. Moksifloksasin ve sefiksimin sıfır katlı UV spektrumları >% 90 örtüştü. Bu nedenle, moksifloksasin ve sefiksimin belirlenmesi için basit, doğru ve kesin doğrulanmış iki türev spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Birinci türev spektrofotometrik yöntemde, moksifloksasin ve sefiksimin çeşitli konsantrasyonları hazırlandı ve 200-400 nm aralığında tarandı ve birinci türev spektrumları hesaplandı (n = 1). Sırasıyla moksifloksasin ve sefiksimin belirlenmesi için sıfır geçiş dalga boyları 287 nm ve 317.9 nm seçilmiştir. İkinci yöntemde, oran spektrumu ilk türevi hesaplandı ve sırasıyla 359.3 nm ve 269.6 nm'de tepe yoğunluğunu ölçerek moksifloksasin ve sefiksimin tayini için kullanıldı. Kalibrasyon grafikleri her iki ilaç için ilk olarak 1-16 µg / mL ve 1-15 µg / mL aralığında ve iyi korelasyon katsayılarına sahip ilk türev spektroskopik yöntemlerle oluşturuldu. Ortalama moksifloksasin ve sefiksimin tahlil doğruluğunun sırasıyla % 100.68 ve % 98.93 olduğu bulundu. Hem gün içi hem de gün içi analizlerin göreceli standart sapmaları % 1.8'den azdı. Dahası, moksifloksasin ve sefiksimin geri kazanımı sırasıyla % 98.7 ve % 99.1'den fazladır. Tarif edilen türev spektrofotometrik yöntemler sofistike kromatografik teknikler için basit, hızlı, doğru, hassas ve mükemmel bir alternatiftir. Dolayısıyla önerilen yöntemler, atıf yapılan ilaçların kalite kontrolü için kullanılabilir ve formülasyonlarda ilaçların rutin analizi için kullanılabilir.

Predrag Djurdjevic (2009) Moxifloxacin'in, farmasötik formlarında ve moksifloksasin degradasyon ürünlerindeki yabancı maddelerin ayrılması ve belirlenmesi için bir RP-HPLC yöntemi, DryLab yazılımı ve kimyasal ölçüm (tepki yüzeyi) yaklaşımı yardımıyla geliştirildi. Dört sentezle ilgili kirliliğin ayrılması, (su + trietilamin (% 2, v/v)) mobil fazı kullanılarak bir Waters C₁₈ XTerra kolonu üzerinde elde edildi: asetonitril = 90: 10 (v/v%); su fazının pH'ı, fosforik asit ile 6.0'a ayarlanır. Hareketli fazın akış hızı 1.5 ml / dak idi ve 290 nm'de UV algılaması kullanıldı. Sütun, 45 °C'de termostatlandı. İki en az çözünmüş saf olmayan zirve

arasındaki çözünürlük, ortalama R (s, dk) > 1.5 idi. Yöntem doğrulama parametreleri, LOQ ca. ile 0.2-2.0 mikrogram/ml doğrusal dinamik aralığı göstermektedir. 0.20 mikrogram/ml ve LOD ca. Tüm analitler için 0.05 mikrogram/ml. Yöntem, ilaç tabletleri ve infüzyon (Avelox), Bayer AG'de kirliliklerin belirlenmesi için ve moksifloksasin'in kararlılık çalışmasında bozunma ürünlerinin saptanması için uygulanmıştır. Tabletlerdeki ve infüzyondaki yabancı madde içeriği toplam ilacın % 0.1'i olarak nicelleştirildi. Hidrolitik koşullar altında iki bozunma ürünü kaydedildi. Bu yöntem aynı zamanda moksifloksasin hidrokloridin tabletlerinde stabilite testi sırasında hızlı ve doğru bir şekilde ölçülmesi için de kullanılabilir.

Syed Naeem Razzaq (2017) Toplu ilaçlar ve farmasötik formülasyonlarda moksifloksasin hidroklorür ve deksametazonun aynı anda tespiti için ters faz sıvı kromatografi yöntemini belirten basit, hassas, spesifik, hassas ve doğru stabilite geliştirildi. Geliştirilen kromatografik yöntem, moksifloksasin hidroklorür, deksametazon ve strese bağlı bozunma ürünlerinin, BDS Hypersil C8 kolonunun (250 x 4.6 mm, 5 µm) sabit faz olarak mobil fazda fosfat tamponu karışımı (Seyreltik fosforik asit ile ayarlanmış) ve metanolün (38.5: 61.5 v/v) % 0.1 (v/v) trietilamin ihtiva eden bir çözeltisi (20 mM) ile 1.5 mL min⁻¹ Analitik zirvelere ve bozunma ürünlerine ait kromatografik ayrılmalar 10 dakika içinde başarılmıştır. Analitlerin ve bozunma ürünlerinin tespiti bir diyot dizisi detektörü kullanılarak 254 nm'de gerçekleştirildi. Yöntem geçerliliği ICH yönergelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Metodun doğrusallığı, moksifloksasin hidroklorür için 50-350 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralıkları ve deksametazon için 10-70 µg mL⁻¹ (korelasyon katsayıları 0.999'dan daha yüksek) konsantrasyonları üzerine kurulmuştur. Yöntem hem analitlerin hem de bozunma ürünlerinin, analit tepelerinin bozunma ürünlerinden tamamen ayrılmasını işaret eden, pik saflık indeksi ≥ 0.9999 olan kabul edilebilir atıklama ve çözünürlükle iyi bir şekilde ayrılmasına neden olmuştur. Bu nedenle, bu yöntem kararlılık gösterici olarak kabul edilebilir ve farmasötik formülasyonlarda ve stabilite çalışmalarında moksifloksasin hidroklorür ve deksametazonun aynı anda tespiti için başarıyla kullanılabilir.

Fahim Ullah Khan (2016) Fizyolojik sıvılardaki iç standart olarak timolol maleat kullanılarak moksifloksasin ve ofloksasinin aynı anda saptanması için yeni, hassas ve

geçerli bir RP-HPLC-UV yöntemi geliştirildi. Farklı deney parametreleri optimize edilmiş ve uluslararası kurallara uygun olarak doğrulanmıştır. Analitlerin komple ayrılması, mobil faz olarak Kromasil 100-5C18 analitik kolon (250mm x 4.6mm x 5µm), metanol ve% 0.05 trifloroasetik asit (TFA) (38: 62v / v) ile gerçekleştirildi ve akış hızında pompalandı İzokratik fazda 1.1 ml / dak, sütun fırın sıcaklığı 45 ° C'de ve 290 nm'lik saptama dalga boyunda muhafaza edilmiştir. Protein çökeltme yöntemi, uyuşturucuları insan plazmasından ve sığır sulu humor numunelerinden çökeltici solvent olarak metanol kullanarak çıkartmak için uygulanmıştır. Bu yöntem, moksifloksasin için 0.018-100 ug / ml konsantrasyonda ve ofloksasin için 0.014-20 ug / ml konsantrasyonda lineerdir. Metodun geri kazanımı sırasıyla MX ve OFN için insan plazmasında 97.52 ve% 97.39 iken MX için sulu humadaki% 94.48 idi. Plazmada LOD değerleri sırasıyla MX ve OFN için 10.0 ve 8.00ng / ml, kendi LOQ değerleri ise 18.0 ve 14ng / ml idi. Sulu mizahda MX için LOD ve LOQ sırasıyla 16.0 ve 24ng / ml idi. Gelecekte, bu yöntem biyolojik sıvılar ve farmasötik ürünlerdeki moksifloksasin ve ofloksasinin farmakokinetik profilini incelemek için kullanılacaktır.

Elgawad Radi (2010) Çıplak ve DNA ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrotlardaki üç florokinolon ilaç FQs: gatifloksasin GTF, moksifloksasin MXF ve sparfloxacin SPF'nin elektrokimyasal oksidasyonu voltametrik tekniklerle incelenmiştir. Üç FQ, pH 7.0'daki fosfat tamponunda Ag-AgCl'ye karşı 0.85-0.91 V potansiyel aralığında bir geri dönüşümsüz oksidasyon piki gösterdi. FQ'lar ile buzağı timus çift sarmallı deoksiribonükleik asit (ds CT-DNA) arasındaki etkileşimi araştırmak için diferansiyel pulmoner voltaj ölçümleri (DPV) ve UV absorpsiyon spektroskopisi teknikleri kullanıldı. Elektrokimyasal verilerden DNA ile gatifloksasin, moksifloksasin ve sparfloksasin arasındaki bağlanma sabiti sırasıyla 3228, 2596 ve 2857 M⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Elektrokimyasal ve spektroskopik sonuçlara dayanarak, interkalasyon ve elektrostatik etkileşimin kombine etkisi vasıtasıyla fluorokinolonun DNA'ya bağlanma biçimi sonuçlandırıldı. Çalışılan analitlerin iz tespiti için dsDNA modifiye camısı karbon elektrotta (DNA / GCE) önceden konsantrasyon ve diferansiyel puls voltametrik (DPV) tayinine dayalı bir tespit şeması önerildi. Geliştirilen yöntem, farmasötik formülasyonlarda FQ'ların

belirlenmesine başarıyla uygulanmıştır.

Maryam Vosough (2014) Bu çalışmada üç çok yönlü algoritmanın analitik performansı değerlendirildi. Önerilen analitik problem, floresans spektroskopisini kullanarak insan idrar örneklerinde moksifloksasin ve siprofloksasinin eşzamanlı olarak saptanmasıydı. Paralel faktör analizi (PARAFAC), kendi ağırlıklı dönüşümlü üçlü ayrıştırma (SWATLD) ve katlanamayan kısmi en küçük kareler (U-PLS / RBL), önerilen problemi çözmeye becerileri açısından karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada bahsedilen algoritmalar için farklı kalibrasyon stratejileri ile "ikinci dereceden avantaj" da kullanılmıştır. Üç yönlü veriler fluorescence spectroscopy ile elde edildi, böylece örneklerin uyarma emisyon matrisleri (EEM) analitik sinyaller olarak kaydedildi. İdrar numunelerindeki ilaçların analizinde kullanılan her bir algoritmanın doğruluğu ve hassaslığı, karekök hata tahminleri (RMSEP), iyileşme ve eliptik eklem güvenilirlik bölgesi (EJCR) arsları kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, üç algoritmanın her birinin farklı EEM alt gruplarına ve kalibrasyon stratejilerine rağmen moksifloksasin ve siprofloksasinin tayini için uygulanabileceğini ortaya koydu. Bununla birlikte, sırasıyla MOX ve CIP için PARAFAC ve U-PLS / RBL modellemesi ile daha iyi analitik performanslar gözlemlendi. Böylece, çok yönlü ayrıştırma algoritmalarını flüoresans spektroskopisi ile birleştirerek, ön analitik performans elde ederken, ön numune hazırlama adımlarının önemli bir kısmı elimine edilebilir ve deneysel prosedür basitleştirilebilir.

Adriana F.Faria (2006) UV algılama ile kılcal bölge elektroforezi (CZE) kullanarak siprofloksasin (CPFLX), gatifloksasin (GTFLX), levofloksasin (LVFLX), moksifloksasin (MFLX) ve sparfloksasin (SPFLX) florokinolon antibiyotiklerinin (FQ) eşzamanlı olarak ayrılması için 282 nm'de yeni bir metodoloji geliştirildi. Elektrolit bileşimi, Tris / hidroklorür ve sodyum tetraborat tampon karışımının değişimi yoluyla optimize edildi. Elektrolit, pH 8.87 ile sonuçlanan 25 mmol L⁻¹ Tris / hidroklorür ve 15 mmol L⁻¹ sodyum tetraborat tampon karışımından müteşekkildir. Tüm analitler 3 dakikadan kısa bir sürede ayrıldı. Önerilen yöntem FQ'ların farmasötik formülasyonlarda ayrılmasına uygulanmış ve tahlil sonuçları etiket talebinin% 95-105'inde olmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, UV/VIS spektrofotometrisi yöntemi ile iki bileşenli bir ilaç maddesindeki etken maddelerinin nicel olarak tayini yapılmıştır. Bu etken maddeler Moksifloksasin ve Metronidazol dır. Elde edilen veriler, PCA, PCR, PLS gibi kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır.

Elde edilen veriler, elimizde lisansı bulunan Minitab 17, Panorama, XLSTAT adı verilen kemometrik programlar ile değerlendirilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

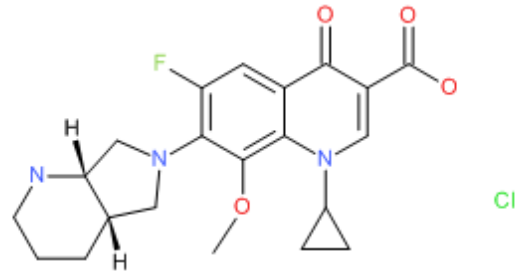
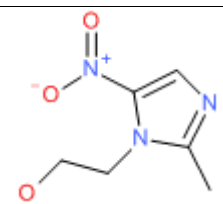
3.2.1. UV-görünür spektrofotometre cihazı

UV - VIS spektrumları, bilgisayar tarafından kontrol edilen 1 cm uzunluğundaki hücre ile donatılan UV 1700 PHARMASPEC SHİMADZU spektrofotometresi kullanılarak belirlenen spektrum değerleri ilaç numunelerindeki etken maddelerin miktarını belirlemek için kemometrik metoda uygulanmıştır.

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde analitik saflıkta olan kimyasallar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve formülleri

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN FORMULÜ
Moksifloksasin	 The chemical structure of Moxifloxacin is shown. It features a central quinolone ring system with a piperazine ring attached to the 8-position, a methyl group at the 7-position, a methoxy group at the 6-position, a fluorine atom at the 5-position, and a cyclopropyl group at the 4-position. A carboxylate group is attached to the 3-position. A chloride ion (Cl-) is shown as a counterion.
Metronidazol	 The chemical structure of Metronidazole is shown. It consists of a 5-membered imidazole ring with a nitro group (-NO2) at the 2-position and a propyl group at the 5-position.

3.3.1. Kullanılan çözeltiler

Çalışmada spektrofotometrik ölçümler için:

İki etken maddenin 0,025 g / 250 mL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

3.3.1.1. Moksifloksasin Çözeltisi

Moksifloksasin maddesinden 0,025 g tartılarak bir miktar 0,1 mol HCl içinde çözüldükten sonra son hacim 250 mL ye tamamlanmıştır.

3.3.1.2. Metronidazol Çözeltisi

Metronidazol maddesinden 0,025 g tartılarak bir 0,1 mol HCl içinde çözüldükten sonra son hacim 250 mL ye tamamlanmıştır.

3.3.1.3. 0,1 M HCl Çözeltisi

10,25 ml derişik HCl alınarak saf su ile son hacmi 1000 ml olacak şekilde tamamlanır.

3.4. Yöntem

3.4.1. UV/VIS spektroskopisi yöntemi

Bu çalışmada, spektrofotometrik ölçümlerle etken maddelerinin stok çözeltilerinin spektrumları okunmuştur. Bu işlem için önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Elde edilen veriler, farklı kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk basamakta, UV spektrofotometre cihazının kalibrasyonu (sıfırlama işlemi) yapılmıştır. Kalibrasyon işlemi önce her iki hücre boş bırakılarak havaya karşı yapılmıştır. Sonra aynı işlem bu kez her iki ışık yoluna 0,1 M HCl ile hazırlanan kör numunesi konularak yapılmıştır. Bütün okumalarda hep kör bu şekilde hazırlanmıştır. Kör olarak sadece 0,1 M HCl kullanılmasının nedeni bu çalışmada genel olarak çözücümüz 0,1 M HCl olduğu içindir. Kör seçimi yapılırken girişim etkilerini yok etmek için, kör olarak çözücü

tercih edilmiştir. İkinci basamakta, etken maddelerinin tek tek spektrumları alınmıştır. Bu işlem esnasında stok etken maddelerinden derişimleri moksifloksasin için 5-25 ppm, metronidazol için 7-35 ppm arasında olacak şekilde moksifloksasin için 1,25-6,25 mL, metronidazol için 1,75-8,75 mL arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 mL ye tamamlanarak çözeltileri hazırlanmıştır ve UV spektroskopisinde absorbands okumaları yapılmıştır. Üçüncü basamakta, her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum verdiğiinden saf etken maddelerinden oluşturulan sentetik karışımların UV spektroskopisinde absorbands okumaları yapılmıştır ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma işlemine gerek olmaksızın ilaç maddeleri incelenmiştir. Tablet numunesi hazırlanırken paket içindeki tabletler agat havanda ezildi ve 1 gram numune tartılarak 0,1 M HCl de çözüldü ve magnetik ısıtıcıda karıştırıldı. 25 ml ye 0,1 M HCl ile tamamlandı. Absorbansı okundu. (Avelox-moksifloksasin: Bayer Firması, Flagyl-metronidazol: Eczacıbaşı Firması)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. UV Spektroskopisi

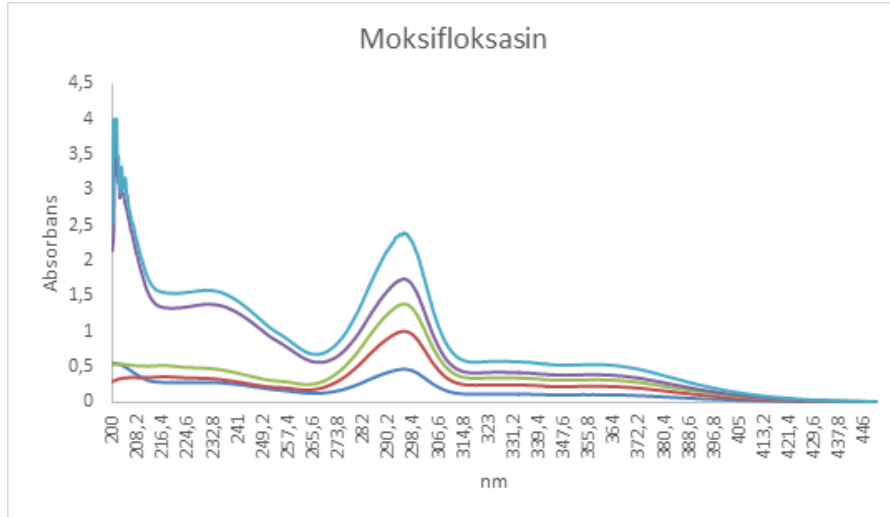
Önce her bir etken ilaç maddesinin saf halde ~ 25 mg/250 mL 0,1 M HCl standart çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra moksifloksasin için 1,25-6,25 mL, metronidazol için 1,75-8,75 mL arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlem sonrası absorbanlar ölçülerek kaydedilmiştir. Her bir etken maddesinin derişimleri ppm olarak hesaplanmıştır.

Her bir etken maddesinin saf halde yani tekli durumda spektrumları alınır. Bu spektrumlar alınırken Moksifloksasin için 5-25 ppm ve metronidazol 7-35 ppm'dir. Bu derişim aralığı, tayin edilecek etken maddeleri için doğrusallığın olduğu bölgedir.

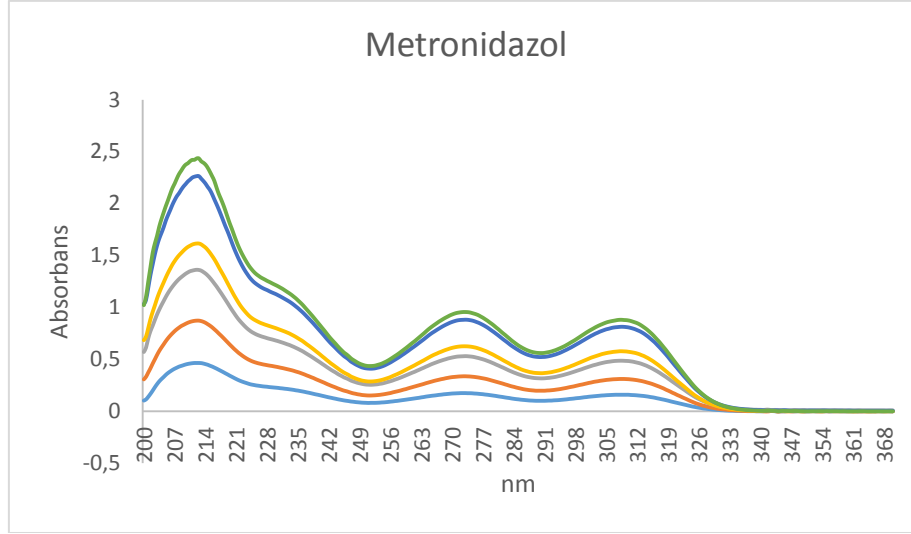
Çizelge 4.1. Etken maddelerinin spektroskopik özellikleri

ETKEN MADDE	MAK. ABS. YAPTIĞI DALGABOYU	KALIBRASYON DENKLEMİ	KORELASYON KATSAYISI
Moksifloksasin	295,4 nm	$y = 0,0942x$	0,9984
Metronidazol	277 nm	$y = 0,0557x - 0,0938$	0,9825

4.2. Saf halde etken maddelerinden elde edilen spektrumlar



Şekil 4.1. Moksifloksasin etken maddesinin absorpsiyon spektrumu



Şekil 4.2. Metronidazol etken maddesinin absorpsiyon spektrumu

Her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermektedir. Daha sonra bundan yararlanılarak sentetik karışımlar hazırlanmıştır ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma yapmaksızın etken maddeleri incelenmiştir. Etken maddeleri ayrıca sürekli spektrum göstermektedir ve üst üste örtüşen spektrumlar gözlenmektedir.

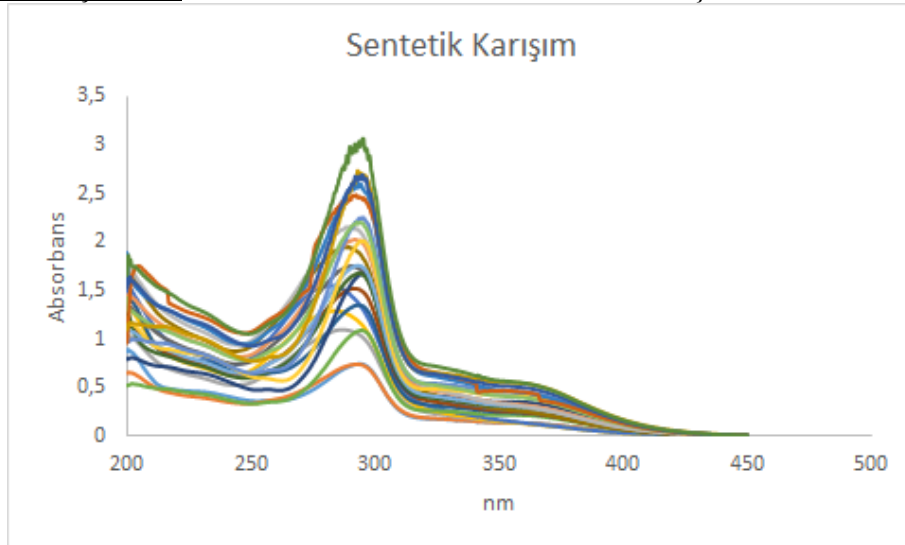
4.3. Kalibrasyon yönteminin validasyonu

Temel Bileşen Analizi için 5-35 ppm doğrusal çalışma aralığında moksifloksasin ve Metronidazol içeren çözeltilerin standart serisi stok çözeltilerinden yararlanılarak hazırlanmıştır. İlaç maddelerini içeren 25 adet yapay karışım çözeltilerinden ibaret olan bir konsantrasyon seti (Çizelge 4.2) hazırlanmıştır. Önce saf maddelerle çalışılarak her bir bileşenin hangi aralıkta spektrum verdiği belirlenmiştir. Ölçümler 200-700 nm arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık konsantrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda dalga boyu aralığı 200 nm- 450 nm olarak daraltılmıştır. Konsantrasyon seti hazırlanırken saf halde alınan spektrumların absorpsiyonlarıyla ilişkili değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.2. Moksifloksasin ve Metronidazol içeren kalibrasyon seti

No	Moksifloksasin ppm	Metronidazol Ppm
1	5	7
2	5	14
3	5	21
4	5	28
5	5	35
6	10	7
7	10	14
8	10	21
9	10	28
10	10	35
11	15	7
12	15	14
13	15	21
14	15	28
15	15	35
16	20	7
17	20	14
18	20	21
19	20	28
20	20	35
21	25	7
22	25	21
23	25	28
24	25	35

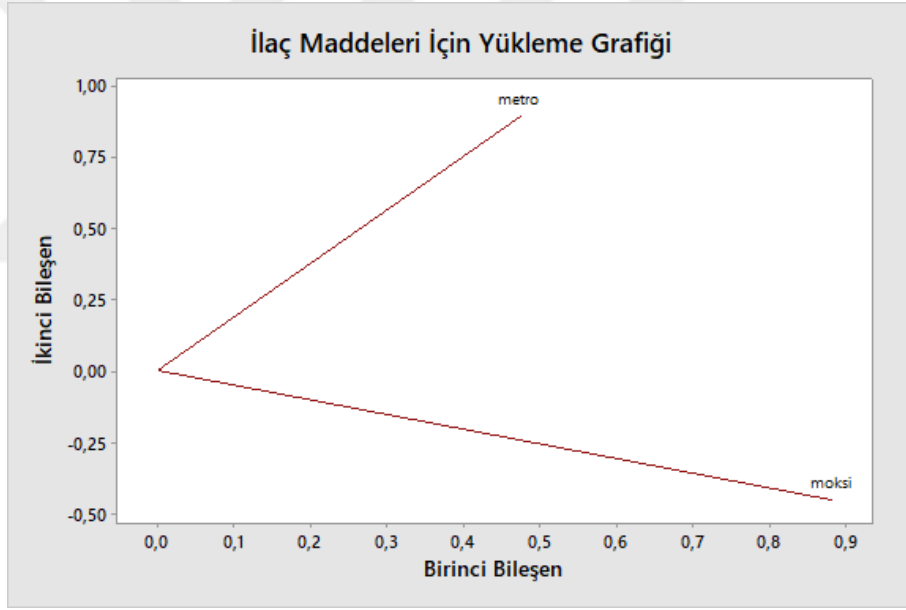
Sentetik Karışımlar: Moksifloksasin ve Metronidazolden oluşur.



Şekil 4.3. Sentetik karışımın absorpsiyon spektrumu.

4.4. Temel bileşen analizi (PCA)

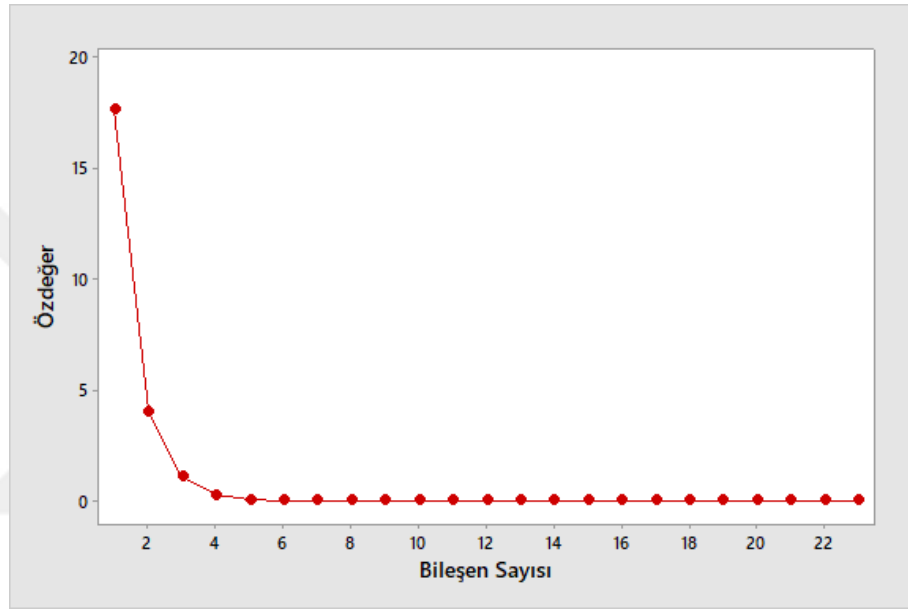
Sentetik çözeltilerde hesap yaparken programın kendi içinde ilk yaptığı işlem temel bileşen analizi yapmaktır. Temel bileşen analizi uygulanmasının amaçları, bir orijinal değişkeni temsil eden n sayıda orijinal aksı (doğruyu) yeni akslar haline dönüştürmektir. Bu dönüşüm işleminde yeni akslar, verilerin maksimum varyans yönelleri boyunca uzanır ve yeni aksların özelliği, ortogonal olmalarıdır ve bu yeni değişkenler arasında korelasyon yoktur. Numune verilerinin varyansının çoğunu açıklamak için ihtiyaç olan yeni değişkenlerin sayısı (p), n sayıdaki orijinal akslardan daha azdır. Temel bileşen analizi, çok değişkenli verilerin boyutunu indirgemek veya verileri azaltmak için bir yöntem olarak kabul edilir. Aynı zamanda değişkenlerin doğrusal bileşenlerini ortaya çıkarır.



Şekil 4.4. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri

Şekil 4.5'e bakıldığında programa yüklediğimiz verilerden birinci temel aks ve ikinci temel aks üzerinden doğrusal bileşenler bulunmuştur. İşlemlerin doğruluğu ölçüsünde doğrusal bileşenler elde edilmiştir. Bu grafik varyans-kovaryans matrisinin elemanlarının orijinin merkezine olan büyük aks birinci temel bileşeni (moksifloksasin) ve bu bileşene 90 ° lik açı ile ikinci temel bileşen (metronidazol) uzanmaktadır. Bir kare matris için, varyans-kovaryans matrisinin elemanları koordinat sisteminin orijini boyunca uzanır. Büyük aksın eğimi, birinci temel bileşen

ile birleştirilmiş özvektör (eigenvector)dür. Bu “özvektöre” karşılık gelen “özdeğer” (eigenvalue) Şekil 4.5. deki büyük aksın uzunluğudur. Şekil 4.6. da özdeğerlerin grafiği görülmektedir. Özdeğerlerin simetrik bir veri matrisinden çıkarılması kısmi en küçük kareler yöntemi ve temel bileşen analizi için önemlidir. Özdeğerler ve özvektörler elde edildikten sonra yapılacak işlem diğer kemometrik hesaplamalara geçiştir. Temel bileşen analizi ile elde edilen temel bileşenler yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisi diğer kemometrik regresyonlara ışık tutmaktadır.



Şekil 4.5. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği

Şekil 4.6’da belirgin bir şekilde görüldüğü gibi özdeğerler 2. değere göre 3. değere doğru düşmüştür. İlk iki faktör, toplam varyansın %99’undan daha fazla güvenilirdir.

4.5. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS)

Kısmi en küçük kareler yönteminde Çizelge 4.2 göre hazırlanan kalibrasyon seti kullanılmıştır. Ölçümler 200-700 nm arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda dalga boyu aralığı 200 nm- 340 nm olarak daraltılmıştır. Kullanılan istatistik program ile kalibrasyon setinin absorbans ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kurulmuştur. Moksifloksasin ve Metronidazol içeren karışımların yukarıda belirtilen

dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PLS kalibrasyonunda bu ilaç maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

4.6. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi

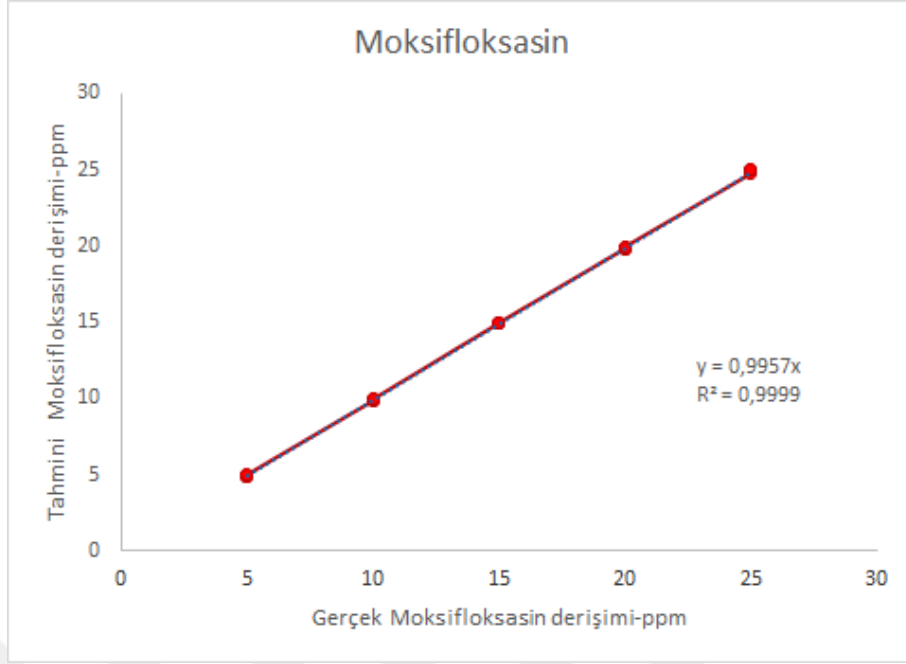
PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. PCR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 200 nm- 340 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda= 0,1$ nm aralıklarla absorbans değerleri okundu. PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve konsantrasyon değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbanların varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra konsantrasyonlar arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kuruldu. İlaç maddelerini içeren karışımın yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbansdeğerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirildi. PCR kalibrasyonu için Minitab 17 programında ilk olarak PCA değerleri elde edilerek grafikleri çizildi (Bölüm 4.1.3).

4.7. Kalibrasyon Yönteminin Analitik Parametrelerde Değerlendirilmesi

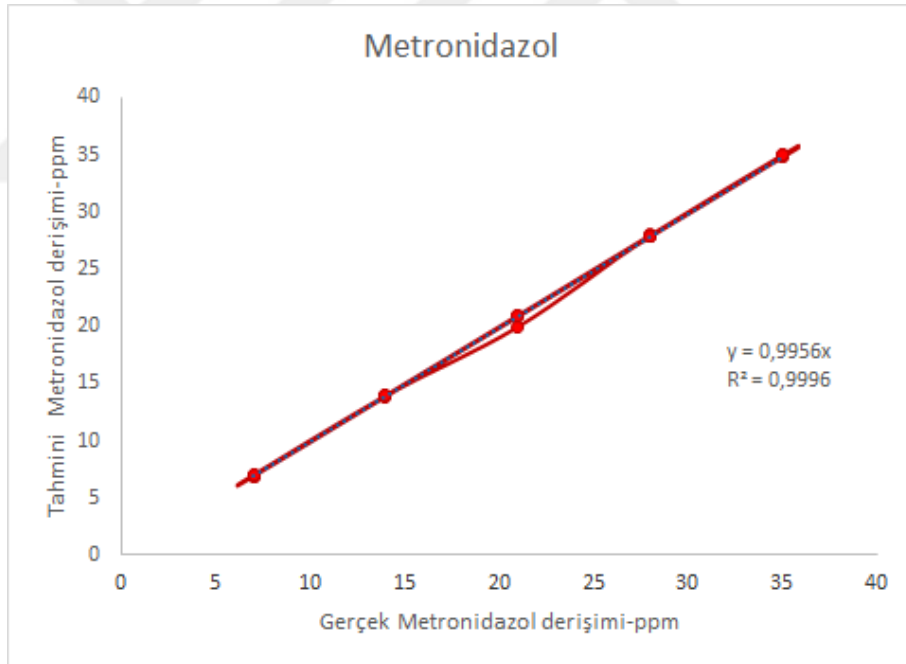
PLS ve PCR yöntemini valide etmek amacıyla iki ayrı ilaç maddesinden farklı derişimlerde 10 adet yapay karışım çözeltisinden ibaret olan bir set hazırlanmıştır. Hazırlanan bu validasyon seti (Çizelge 4.2.) kullanılarak kurulan PLS VE PCR kalibrasyonlarının kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Geri kazanım (GK) değerleri ve bağlı standart sapma değerleri hesaplanmıştır. PLS kalibrasyon yönteminin sentetik karışımına uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki ilaç maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçlar.

Karışım No	Moksifloksasin			Metronidazol		
	İlave Edilen (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri Kazanım	İlave Edilen (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri Kazanım
1	5	4,85	97	7	6,98	99,71429
2	5	4,97	99,4	14	13,92	99,42857
3	5	4,94	98,8	21	20,95	99,7619
4	5	4,86	97,2	28	27,89	99,60714
5	5	5,01	100,2	35	34,79	99,4
6	10	9,86	98,6	7	6,97	99,57143
7	10	9,87	98,7	14	13,94	99,57143
8	10	9,97	99,7	21	19,96	95,04762
9	10	10	100	28	27,93	99,75
10	10	9,97	99,7	35	34,97	99,91429
11	15	14,96	99,73333	7	6,92	98,85714
12	15	14,95	99,66667	14	13,85	98,92857
13	15	14,97	99,8	21	20,97	99,85714
14	15	14,93	99,53333	28	27,99	99,96429
15	15	14,98	99,86667	35	34,82	99,48571
16	20	19,85	99,25	7	6,89	98,42857
17	20	19,87	99,35	14	13,96	99,71429
18	20	19,82	99,1	21	20,98	99,90476
19	20	19,89	99,45	28	27,89	99,60714
20	20	19,97	99,85	35	34,96	99,88571
21	25	24,78	99,12	7	6,98	99,71429
22	25	24,98	99,92	21	20,95	99,7619
23	25	24,97	99,88	28	27,97	99,89286
24	25	25,01	100,04	35	34,96	99,88571
			Ortalama=99,33 SS=0,808			Ortalama=99,40 SS=0,999



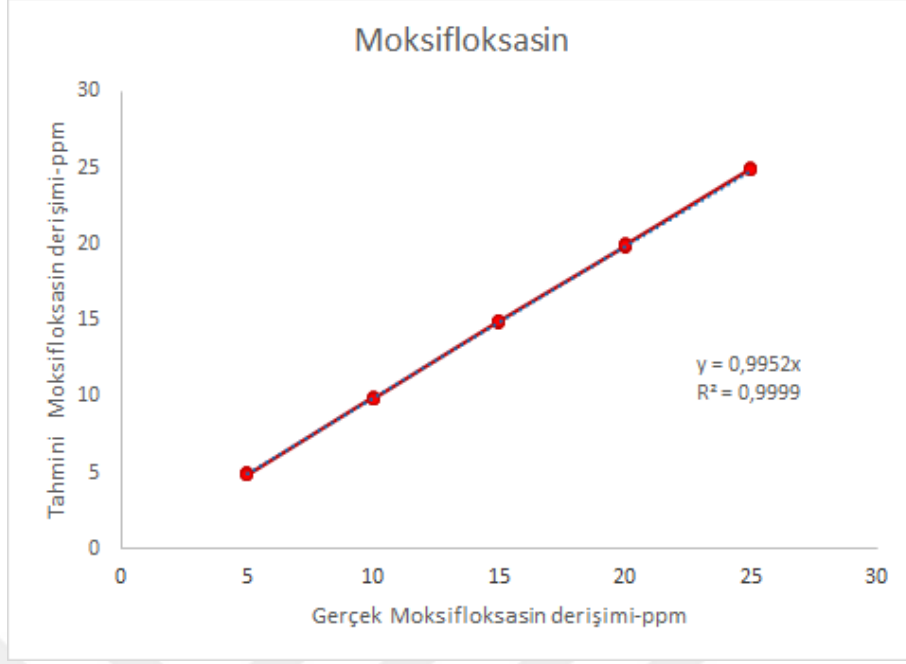
Şekil 4.6. PLS kalibrasyon basamağında Moksifloksasin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları.



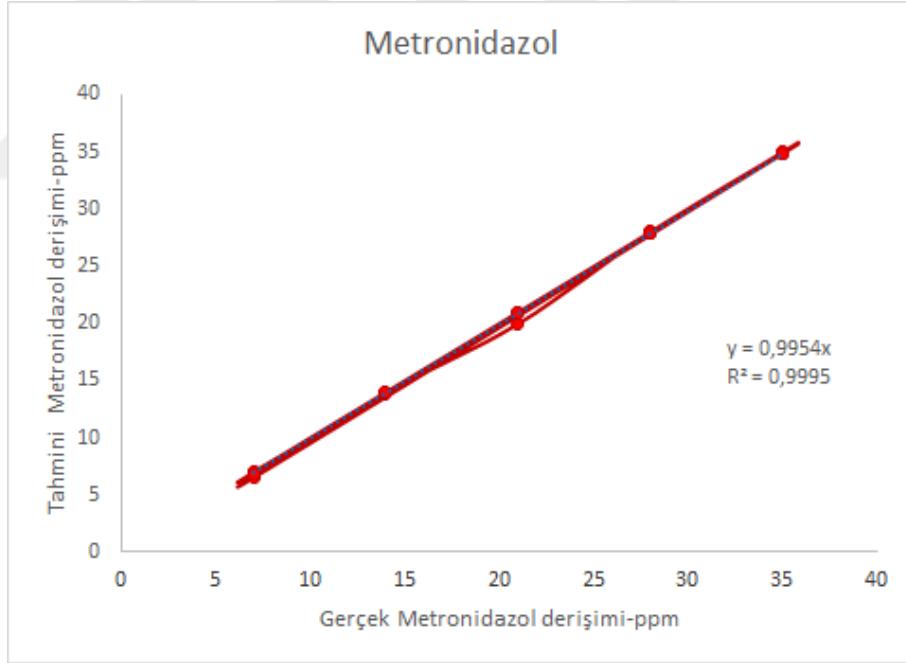
Şekil 4.7. PLS kalibrasyon basamağında Metronidazol için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçları.

Çizelge 4.4. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki ilaç maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçları

Karışım No	Moksifloksasin			Metronidazol		
	İlave Edilen (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri Kazanım	İlave Edilen (ppm)	Bulunan (ppm)	% Geri Kazanım
1	5	4,98	99,6	7	7,01	100,1429
2	5	4,88	97,6	14	13,85	98,92857
3	5	4,92	98,4	21	20,86	99,33333
4	5	4,97	99,4	28	27,88	99,57143
5	5	4,86	97,2	35	34,85	99,57143
6	10	9,97	99,7	7	6,5	92,85714
7	10	9,86	98,6	14	13,89	99,21429
8	10	9,88	98,8	21	19,95	95
9	10	9,89	98,9	28	27,98	99,92857
10	10	9,85	98,5	35	34,89	99,68571
11	15	14,96	99,73333	7	6,95	99,28571
12	15	14,97	99,8	14	13,98	99,85714
13	15	14,86	99,06667	21	20,95	99,7619
14	15	14,92	99,46667	28	27,98	99,92857
15	15	14,96	99,73333	35	34,96	99,88571
16	20	19,86	99,3	7	6,96	99,42857
17	20	19,87	99,35	14	13,97	99,78571
18	20	19,99	99,95	21	20,97	99,85714
19	20	19,95	99,75	28	27,96	99,85714
20	20	19,96	99,8	35	34,98	99,94286
21	25	24,96	99,84	7	6,85	97,85714
22	25	24,86	99,44	21	20,91	99,57143
23	25	24,92	99,68	28	27,94	99,78571
24	25	24,86	99,44	35	34,85	99,57143
			Ortalama=99,21 SS=0,720			Ortalama=99,43 SS=0,68



Şekil 4.8. PCR kalibrasyon basamağında Moksifloksasin için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçları.



Şekil 4.9. PCR kalibrasyon basamağında Metronidazol için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçları.

4.8. PLS yöntemi için ANOVA testi

PLS kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1,

grup içi serbestlik derecesi=46 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,05 olmasına karşılık Moksifloksasin için hesaplanan F-test değeri 0,00001311 ve p-değeri 0,97, metronidazol için hesaplanan F-test değeri 0,001362 ve p-değeri 0,97 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Moksifloksasin Maddesinin PLS yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları

ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,065269	1	0,065269	0,001311	0,971271	4,05
Gruplar İçinde	2289,791	46	49,77807			
Toplam	2289,856	47				

Çizelge 4.6. Metronidazol Maddesinin PLS yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları

ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,141919	1	0,141919	0,001362	0,970722	4,051749
Gruplar İçinde	4793,688	46	104,2106			
Toplam	4793,83	47				

ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0,05$ olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Gruplar arası serbestlik derecesi ve grup içi serbestlik derecesi olmak üzere varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0,05$ olduğu için bu kalibrasyon modelinin ilaç numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

4.9. PCR yöntemi için ANOVA testi

PCR kalibrasyon yönteminin doğruluk ve kesinliğini valide etmek amacıyla elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanmıştır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=46 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,05 olmasına karşılık Moksifloksasin için hesaplanan F-test değeri 0,00174 ve p-değeri 0,97, metronidazol için hesaplanan F-test değeri 0,001952 ve p-değeri 0,96 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.7. Moksifloksasin Maddesinin PCR yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları

ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,0867	1	0,0867	0,00174	0,966905	4,05
Gruplar İçinde	2291,622	46	49,81788			
Toplam	2291,709	47				

Çizelge 4.8. Metronidazol Maddesinin PCR yönteminde elde edilen sonuçlarla hesaplanan ANOVA sonuçları

ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	Df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	0,204102	1	0,204102	0,001952	0,964948	4,051749
Gruplar İçinde	4808,84	46	104,54			
Toplam	4809,044	47				

ANOVA testinde $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0,05$ olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Gruplar arası serbestlik derecesi ve grup içi serbestlik derecesi olmak üzere varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$ ve $p\text{-değeri} > p=0,05$ olduğu için bu kalibrasyon modelinin ilaç numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

4.10. PLS ve PCR yönteminde istatistiksel analiz

Kalibrasyonun Standart hatası

İkili ilaç maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS ve PCR kalibrasyonlarının kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür. Kalibrasyonun standart hatası (Standard Error of Prediction → SEP) gerçek ve tahmin edilen derişim arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplanmıştır.

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C^{\text{eklenen}} - C_i^{\text{bulunan}})^2}{n-1}}$$

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (C_i^{eklenen} - C_i^{bulunan})^2$$

Çizelge 4.9. PLS ve PCR yöntemleri ile hesaplanan istatistiksel parametreler

PARAMETRE	METOT	Moksifloksasin	Metronidazol
SEP	PLS	0,025	0,036
	PCR	0,028	0,043
PRESS	PLS	0,0096	0,052
	PCR	0,0096	0,064

Çizelge 4.10. İlaç numunesindeki sonuçlar

NO	Moksifloksasin (gram)		Metronidazol (gram)	
	PLS	PCR	PLS	PCR
1	0,495	0,496	0,435	0,436
2	0,49	0,492	0,436	0,434
3	0,496	0,497	0,43	0,432
4	0,497	0,493	0,432	0,435
5	0,496	0,495	0,434	0,435
Ortalama	0,4948	0,4946	0,4334	0,4344
Standart Sapma	0,002775	0,002074	0,002408	0,001517

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İki farklı ilaçtan hazırlanan numunedeki ilaç aktif maddelerini analiz etmeye yönelik çalışmada Ultra-Viyole Spektroskopisi, kemometri yöntemi ile birlikte kullanılmıştır.

Moksifloksasin ve Metronidazol ilaç maddelerinin UV spektrumları alınarak, çalışma yapılabilecek saflıkta olduğu belirlenmiş ve analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Moksifloksasin ve Metronidazol için, UV geliştirilerek, yöntem istatistiksel olarak desteklenmiştir. Yönteminin standart eğrilerinin regresyon analizi yapılarak sonuçlar istatistik hesaplanmıştır. Oluşturulan eğrilerin bir doğru olup olmadığını anlamak, bulunan doğrusallık sınırının uygun olup olmadığını belirlemek için doğrusallıktan ayrılışın önem testi yapılmıştır. $F_H < F_T$ olduğundan, doğrusallıktan sapmanın önemsiz olduğu bulunmuştur.

Kemometrik program kullanılırken de yine F testi göz önüne alınmıştır. Tabletlerden hazırlanan ilaç numunesine geçmeden önce yapılan deneysel tasarım esnasında hazırlanan sentetik modelde de sonuçlar kıyaslanmıştır. Sentetik modele ilave ettiğimiz madde miktarları ile kemometrik programdan elde ettiğimiz deneysel sonuçlar kıyaslanmıştır. Grup içi ve gruplar arası serbestlik dereceleri yardımıyla F testi yapılmıştır. F testi sonucuna göre kullandığımız modeli ilaç numunesi karışımına uygulayıp uygulayamayacağımıza karar verilmiştir. $F_H < F_T$ olduğunda model uygulanmıştır.

Yöntemimizde Moksifloksasin ve Metronidazol için % geri kazanım değerleri ortalama olarak gerek sentetik karışım için bulunmuştur. Her bir yöntem içinde geri kazanımlar yüksek değerlerde bulunmuştur.

Kullanılan yöntemlerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, yüksek duyarlılık ve doğruluğun yanı sıra hızlı oluşu ve ilaç karışımlarının analizi için önerilecek yöntem olmalarını sağlamaktadır. Geliştirilen yöntemler, tekrarlanabilir, duyarlı ve doğru sonuç veren yöntemler olup Moksifloksasin ve Metronidazol içeren farklı ilaç numunelerinin analizinde önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- A.-E. Radi., Tarek W., Zeinab A., Hend M., 2010, Electrochemical and Spectroscopic Studies on the Interaction of Gatifloxacin, Moxifloxacin and Sparfloxacin with DNA and Their Analytical Applications, *Electroanalysis*, 22(22), 2665-2671.
- Abdel-Rahman SM, Kearns LG. The Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Interface: Determinants of Anti-infective Drug Action and Efficacy In Pediatrics. Textbook of Pediatric Infectious Diseases Vol 2 5th edition pp:2965-2983, Feigin, Chenry, Demmler, Kaplan, Saunders, editors. 2004.
- Adriana F.F., Marcus V.N.S., Mauro V.A., Marcone A.L.O., 2006, "Simultaneous separation of five fluoroquinolone antibiotics by capillary zone electrophoresis", *Analytica Chimica Acta*, 579(2), 185-192.
- Aktuğlu Y. Giriş ve Genel Bilgiler Ed: Aktuğlu Y. Pratikte Antibiyotik Kullanımı. Sempozyum Dizisi Yayın No: 1. 1997.
- And Smeyers-Verbeke. J. 1998. Handbook Of Chemometrics And Qualimetrics Part B, Elsevier, Amsterdam.
- Antibiyotik Kullanımı. Enfeksiyon Kontrol Komitesi Yayını: 3., Gata Basımevi, Ankara, 2000.
- Ashour S., Bayram R., 2015, "Development And Validation of Sensitive Kinetic Spectrophotometric Method For The Determination of Moxifloxacin Antibiotic in Pure And Commercial Tablets", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 140, 216-222.
- Ayman A.G., Alaa S.A., Ragaa E.S., Amira G.Y., 2014, "Spectrophotometric Determination of Gemifloxacin Mesylate, Moxifloxacin Hydrochloride, and Enrofloxacin in Pharmaceutical Formulations Using Acid Dyes", *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014(2014), 16.
- Bartlett P.N., Ghoneim E., El-Hefnawy G. ve El-Hallag I., 2005. Voltammetry and Determination of Metronidazole at a Carbon Fiber Microdisk Elektrode. *Talanta*, 66: 869-874.
- Boubakar B.B., Etienne R., Ducint D., Quentin C., Saux M.C., "Determination of Moxifloxacin in growth media by high performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography* , 754: 107-112 (2001).
- Chambers FH. Antimicrobial Agents. Ed: Goodman LS, Gilman A. Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics 10th edition, pp; 1143-1169, The McGraw-Hill Company, USA, 2001.

- Crua L.A., Hall R., “Enantiomeric purity assay of moxifloxacin hydrochloride by capillary electrophoresis”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38: 8 -13 (2005).
- Çetin, A., 2008. Çoklu İlaç Karışımlarının Spektrofotometrik Olarak Kantitatif Analizi İçin Kemometrik ve Grafiksel Metot Geliştirme. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 86s, Sakarya.
- “Determination of moxifloxacin (BAY 12-8039) in plasma and lung tissue by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method with a new polymeric cartridge”, *Journal of Chromatography B*, 742: 247-254 (2000).
- Dinç, E., 2007. Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, 27(1), 61-92.
- Dinç, E., 2009. Kemometrik İşlem ve Yöntemlerin Analitik Kimyadaki Tipik Uygulamaları, Uygulamalı Kemometri Yaz okulu Notları, 1-5.
- Elming H, Sonne J, Lublin HKF. The importance of the QT interval: a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand* 2003; 107: 96–101.
- Fahim U.K., Fazli N., Zafar I., Ismail K., Naila S., Muhammad H., Farhad U., 2016, “Simultaneous determination of moxifloxacin and ofloxacin in physiological fluids using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection”, *Journal of Chromatography B*, 1017-1018, 120-128.
- Jain S., Jain N.K., Pitre K.S., “Electrochemical analysis of sparfloxacin in pharmaceutical formulation and biochemical screening of its Co(II) complex”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29:795 - 801 (2002).
- Kaya, B., 2007. Kombine Farmasötik Preparatlardan Telmisartan ve Hidrokloro tiyazid’in kemometrik Kemometrik Kalibrasyon Yöntemleriyle Aynı Anda Miktar Tayinleri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 104s, Ankara.
- Kumar Y.R., Raju P.V.V., Kumara R.R., S. Eswaraiah S.,Mukkanti K., Suryanarayana M.V., Reddya S.M., “Structural identification and characterization of impurities in moxifloxacin”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34:1125-1129 (2004).
- Leblebicioğlu H., (2001). Nitroimidazoller. *İnfeksiyon–2001*. 20 Aralık 2008, <http://www.omu.edu.tr/~hakan/ders/33nitr2001.pdf>.
- Lemoine T., Breilh D., Ducint D., Dubrez J., Jougon J., Velly J.F., Saux M.C.,
- Lipsky BA, Baker CA. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focusing on newer agents. *Clin Infect Dis* 1999;28:352–364.

- Maha A.S., 2009, "New, simple and validated kinetics spectrophotometric method for determination of moxifloxacin in its pharmaceutical formulations", *Arabian Journal Of Chemistry*, 2(2), 79-85.
- Mahesh A., Bander E Al-D., Ibrahim A.A., Anroop B.N., Harsha N.S., Ahmed K.M., 2012, "Simultaneous determination of moxifloxacin and cefixime by first and ratio first derivative ultraviolet spectrophotometry", *Chemistry Central Journal*, 6, 105.
- Maryam V., Sara N.E., Reza Z., 2015, "On the performance of multiway methods for simultaneous quantification of two fluoroquinolones in urine samples by fluorescence spectroscopy and second-order calibration strategies", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 618-624.
- Möller J.G., Staß H., Heinig R., Blasckhe G., "Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence: a routine method to determine moxifloxacin in human body fluids in very small sample volumes", *Journal of Chromatography B*, 716 : 325-334 (1998).
- Nguyen H.A., Grellet J., Boubakar B.B., Saux M.C., "Simultaneous determination of Levofloxacin, Gatifloxacin and Moxifloxacin in serum by liquid chromatography with column switching", *Journal of Chromatography B*, 810 : 77-83 (2004).
- Olaf Burkhardt, Thomas Köhnlein, Thomas Pap, Tobias Welte. Recurrent tendinitis after treatment with two different fluoroquinolones. *Scandinavian J Infectious disease* 2004;36(4) :315–316.
- Özkan S.A., Özkan Y. ve Şentürk., Z., 1997. Electrochemical Reduction of Metronidazole at Activated Glassy Carbon Electrode and Its Determination in Pharmaceutical Dosage Forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17: 3299-3305.
- Pekamwar S.S., Kalyankar T.M., Tambe B.V., Wadher S.J., 2015, "Validated UV-Visible Spectrophotometric method for simultaneous estimation of Cefixime and Moxifloxacin in Pharmaceutical Dosage Form", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(01), 037-041.
- Predrag D., Andrija C., Aleksandra D., Milena J.S., 2009, "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis", 50(2), 117-126.
- Rizk M., Belal F., Aly F.A., El-Enany N.M., "Differential pulse Polarographic determination of Ofloxacin in pharmaceuticals and biological fluids", *Talanta*, 46: 83 - 89 (1998).
- Rodvold KA. Clinical safety profile of newer fluoroquinolones. *J Crit Illness* 1999;14: 28–40.
- Sanjay K.M., Shruti C., Farhan J.A., Roop K.K., 2007, "Validated spectrophotometric methods for the estimation of moxifloxacin in bulk and

pharmaceutical formulations”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 68(2), 250-256.

Song J., Shao Y., Guo W., “Determination of Lomefloxacin, an antibacterial drug, in pharmaceutical preparations based on its polarographic catalytic wave in the presence of 2- iodoacetamide”, *Analytical Sciences*, 17:1145- 1148 (2001).

Syed N.R., Muhammad A., Islam U.K., Irfana M., Syed S.R., Waqar A., 2017, “Simultaneous determination of dexamethasone and moxifloxacin in pharmaceutical formulations using stability indicating HPLC method”, *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3), 321-328.

Trindade M.A.G., Silva G.M., Ferreira V.S., “Determination of moxifloxacin in tablets and human urine by square-wave adsorptive voltammetry”, *Microchemical Journal*, 81:209-216 (2005).

Tunçtan B, Buharalıoğlu K, Farmakoloji Terimleri Sözlüğü. Sendrom III Tıp Terimleri Sözlüğü 2005;3(2): 3-44.

Vandeginste, B. M. G., Massart D. L., Buydens L. M. C., De Jong S., Lew_ P. J.

Vishwanathan K., Bartlett M.G., Stewart J.T., “Determination of moxifloxacin in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30:961-968 (2002).

Zhanel G.G., Noreddin A.M., “Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections”, *Current Opinion in Pharmacology*, 1:459-463 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ümit Murat ÇELİK
Doğum Yeri ve Yılı : Şişli, 1988
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : umit_celik__88@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Vefa Poyraz Lisesi, 2005
Ön Lisans : KOÜ, İhsaniye MYO, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bölümü,
2010
Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2013

Yayımları

Ertokuş, G.P., Çelik, Ü.M., (2017). Chemometric Analysis Of Moxifloxacin And Metronidazole In Binary Drug Combinations With Spectrophotometric Method, Eastern Anatolian Journal of Science, 3-2, 30-37.
Ertokuş, G.P., Çelik, Ü.M., (2018). Simultaneous Determination Of Moxifloxacin And Metronidazole In Binary Drug Combinations With Chemometric Calibration Methods, Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi, MAKÜ, Burdur.