

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

**BAZI ANTİHİPERTANSİF İLAÇ NUMUNELERİNİN  
PCR VE PLS İLE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ**

**Yaşar EMİR ÜNSAL**

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2015**



© 2015 [Yaşar EMİR ÜNSAL]

## TEZ ONAYI

Yaşar EMİR ÜNSAL tarafından hazırlanan "Bazı antihipertansif ilaç numunelerinin PCR ve PLS ile spektrofotometrik tayinleri " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

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



Jüri Üyesi

**Prof. Dr. Fethiye GÖDE**  
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

**Doç. Dr. Aydan YILMAZ**  
Selçuk Üniversitesi



Enstitü Müdür V. **Doç. 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.

**Yaşar EMİR ÜNSAL**

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
1.1. İrbesertanın Genel Özellikleri .....	2
1.2. Hidroklorotiazitin Genel Özellikleri .....	3
1.3. Kullanılan Yöntem .....	4
1.3.1. UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi .....	4
1.3.2. Absorpsiyonun nicel yorumu .....	4
1.3.3. UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri.....	5
1.3.4. Işın Kaynakları .....	6
1.3.4.1. Dalga Boyu Seçiciler .....	7
1.3.4.2. Örnek Kapları.....	7
1.3.4.3. Dedektörler.....	8
1.3.5. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları .....	8
1.4. Kemometrik Yöntemler .....	9
1.4.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları .....	12
1.4.1.1. Temel Bileşen Analizi Yöntemi (Principal Component Analysis (PCA) Method) .....	12
1.4.1.2. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (Principal Component Regression (PCR) Method).....	13
1.4.1.3. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Least Squares Regression Method).....	15
1.4.2. Kalibrasyon (Derişim) setinin tasarımı .....	17

1.4.3. Çapraz validasyon işlemi (Cross-validation procedure) .....	17
1.4.4. Varyans Analizi (ANOVA).....	18
1.4.5. Kemometrik Kalibrasyon Yöntemlerinin Uygulamaları.....	19
1.4.5.1. Kemometrik Yöntemlerin Uygulama Alanları .....	19
1.4.5.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis).....	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	21
3. MATERYAL VE METOT .....	29
3.1. Materyal .....	29
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	29
3.2.1. UV-Görünür Spektrofotometre Cihazı.....	29
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	29
3.3.1. Kullanılan Çözeltiler .....	30
3.4. Yöntem.....	31
3.4.1. UV/VIS Spektroskopisi Yöntemi.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	33
4.1. UV Spektroskopisi .....	33
4.1.1. Saf halde HCT ve IRB'nin spektrumları.....	34
4.2. Kalibrasyon setinin hazırlanması .....	35
4.3. Spektral Koşulların Optimizasyonu .....	36
4.3.1. Temel Bileşen Analizi (PCA) .....	37
4.3.2. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi (PCR) .....	39
4.3.2.1. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu .....	41
4.3.2.2. PCR yöntemi için ANOVA testi.....	41
4.3.2.3. PCR yönteminde istatistiksel analiz.....	42
4.3.2.3.1. Kalibrasyonun Standart hatası .....	42
4.3.2.4. PCR Yönteminin Farmasotik Preparatlara Uygulanması .....	43
4.3.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS).....	44
4.3.3.1. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu .....	45
4.3.3.2. PLS yöntemi için ANOVA testi.....	46
4.3.3.3. PLS yönteminde istatistiksel analiz .....	46
4.3.3.3.1. Kalibrasyonun Standart hatası .....	46
4.3.3.4. PLS Yönteminin Farmasotik Preparatlara Uygulanması .....	47

5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	49
6. KAYNAKLAR .....	51
ÖZGEÇMİŞ .....	54



## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **BAZI ANTİHİPERTANSİF İLAÇ NUMUNELERİNİN PCR VE PLS İLE SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNLERİ**

**Yaşar EMİR ÜNSAL**

**Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı**

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

Bu tez çalışmasında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri temel bileşen analizi (PCA) temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR), kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS), farmasötik irbesartan (IRB) ve hidroklorotiazid (HCT)'in aynı anda miktar tayinlerine hiç bir ayırma işlemi kullanmaksızın başarıyla uygulanmıştır ve bu yöntemler UV-Görünür Alan Spektroskopisi yöntemlerinden elde edilen veriler kemometrik olarak değerlendirilmiştir.

Bu kemometrik yöntemlerin validasyonu için, irbesartan (IRB) için 0.3–1.5 µg/mL derişim aralığında ve hidroklorotiazid(HCT) için 4–20 µg/mL derişim aralığında bileşikleri içeren 19 adet karışımdan oluşan kalibrasyon (derişim) seti, etanol içerisinde hazırlandı. Kalibrasyon setinin 200- 400 nm aralığında absorpsiyon spektrumu kaydedildi. Kalibrasyon seti ve bu sete karşılık 200–400 nm aralığında elde edilen absorpsiyon verileri arasındaki ilişkiyi yararlanılarak üç kemometrik kalibrasyon oluşturuldu. PCR ve PLS yöntemlerinin validasyonu, IRB ve HCT içeren sentetik karışımların analiziyle gerçekleştirildi.

**Anahtar Kelimeler:** Antihipertansif, ilaç, spektrofotometre, PCA, PCR, PLS, UV, Kemometri

2015, 54 sayfa.



## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF SOME ANTİHYPERTENSİVE DRUG SAMPLES WITH PCR AND PLS

Yaşar EMİR ÜNSAL

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

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ

In this thesis, three different chemometric calibration methods principle component analysis (PCA), partial least square (PLS) and principal component regression (PCR) were successfully applied to the simultaneous determination of hydrochlorothiazide (HCT) and irbesartan (IRB) in pharmaceutical preparations without using any separation step. The data of UV-Visible Spectroscopy applied to the chemometric calculations.

For the validation of this chemometric method, a calibration set of 19 binary mixtures containing compounds in the working range of 4-16 µg/mL for HCT and 0.3-1.5 µg/mL for IRB was prepared in methanol. Calibration sets 200-400 nm range absorption spectra were recorded. Three chemometric calibrations were constructed by using the relationship between the calibration set and its corresponding absorption data obtained in the range 200-400 nm. The synthetic mixtures of two drugs were used for the validity of the calibrations.

**Keywords:** Antihypertensive, drug, spectrophotometry, PCA, PCR, PLS, UV, Chemometrics.

2015, 54 pages.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ahmet Hakan AKTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

4069-YL1-14 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Yaşar EMİR ÜNSAL  
Isparta, 2015

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İrbesartanın açık formülü.....	2
Şekil 1.2. Hidroklorotiazidin açık formülü .....	3
Şekil 1.3. Bir kapta bulunan bir çözelti üzerine gönderilen ışın demetinde yansıma, saçılma (dağılma) ve absorbansla I <sub>0</sub> demetinin zayıflaması ve I demeti olarak çözeltiyi terk etmesi.....	5
Şekil 1.4. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri .....	6
Şekil 1.5. UV-Görünür alan spektrofotometresi. ....	6
Şekil 1.6. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler.....	11
Şekil 1.7. X1 ve X2 olan iki değişken için PC1 ve PC2 olan iki esas bileşeni gösteren diyagram (Uyanık, 2008). ....	13
Şekil 1.8. PLS2 kalibrasyonu .....	16
Şekil 4.1. HCT maddesinin absorpsiyon spektrumu.....	34
Şekil 4.2. IRB maddesinin absorpsiyon spektrumu .....	34
Şekil 4.3. Simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği.....	36
Şekil 4.4. HCT (8 µg/mL) ve IRB (1,5 µg/mL) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın absorpsiyon spektrumları (Etanol içerisinde). ....	37
Şekil 4.5. Değişkenlerin doğrusal bileşenleri.....	38
Şekil 4.6. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği .....	39
Şekil 4.7. PCR kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. ....	43
Şekil 4.8. PCR kalibrasyon basamağında IRB için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. ....	43
Şekil 4.9. PLS kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. ....	47
Şekil 4.10. PLS kalibrasyon basamağında IRB için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiği ve istatistiksel sonuçlar. ....	47

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar .....	30
Çizelge 4.1. İlaç aktif maddelerinin spektroskopik özellikleri .....	33
Çizelge 4.2. HCT ve AMH analizi için kalibrasyon seti.....	35
Çizelge 4.3. HCT ve IRB sentetik karışımlarına PCR kalibrasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri .....	41
Çizelge 4.4. Co-İrba Tablet numunesine preparatına PCR yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar .....	44
Çizelge 4.5. HCT ve AMH sentetik karışımlarına PLS kalibrasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri .....	45
Çizelge 4.6. Co-İrda Tablet numunesine PLS yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.....	48

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	Varyans analizi (Analysis of variance)
AO	Ortalanmış absorbans
BSS	% Bağlı standart sapma
CO	Ortalanmış derişim
HCT	Hidroklorotiazid
IRB	İrbesartan
GK	% Geri Kazanım
IR	İnfrared
LOD	Dedektör limiti
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektrometre
PC	Matematiksel anlamda temel bileşenler
PCA	Temel bileşen analizi yöntemi(Principal component analysis method)
PCR	Temel bileşen regresyon yöntemi (Principal component regression)
PLS	Kısmi en küçük kareler yöntemi( Partial least squares regression)
PRESS	Prediction error sum of squares
SS	Standart sapma
UV	Ultra viyole görünür bölge spektroskopisi
X	Ortalama değer

## 1. GİRİŞ

İlaç, tıpta kullanılan ve biyolojik etkinliği olan saf kimyasal madde veya ona eşdeğer bitkisel veya hayvansal kaynaklı, standart miktarda aktif madde içeren bir karışımdır. Bir başka deyişle ilaç, canlı hücrelerde meydana getirdiği etki ile bir hastalığın iyileştirilmesi, teşhisi veya belirtilerinin azaltılması amacıyla kullanılan; doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal maddelerdir. İlaçlar etken madde ve taşıyıcı olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Etken madde, canlıda biyolojik ve fizyolojik etki gösteren hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan bir veya birkaç kimyasal madde karışımından oluşan kısmı; yani ilacın ana bileşenidir. Taşıyıcı ise etken maddenin hasta tarafından kolay alınabilmesi veya iyi doze edilebilmesi için katılan fizyolojik etkisi olmayan glikoz, parafin, gliserin gibi kimyasal maddelerdir. Etken maddeler yeterli miktarlarda alındığında insan sağlığını olumlu yönde etkilerken, az alınması durumunda fayda sağlamaz, aşırı ya da yanlışlıkla alındığı durumlarda ise insan sağlığına oldukça tehlikeli boyutlarda zarar vermektedir. Bu sebeple ilaçların üretiminden kullanımına ve vücuttan atılımına kadar olan tüm noktalarda miktar analizleri önemlidir.

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

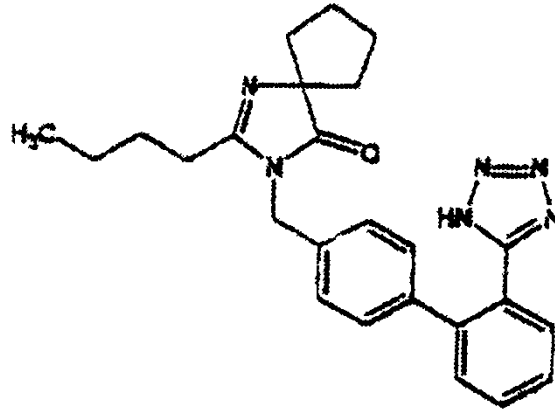
Analitik kimyada hiçbir ön ayırma işlemi yapmaksızın kombine ilaç numunelerinin aynı anda kantitatif analizi son derece önemlidir. Analitik yöntemler geliştirmek amacıyla, klasik analitik yöntemler ile birlikte değişik matematiksel algoritmalara dayanan hesaplama teknikleri kombine olarak uygulanmaktadır.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

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

Bu çalışmada ilaç etken maddelerinden İrbesartan ve Hidroklorotiazid' in miktar tayinlerini UV spektroskopisi yöntemiyle tayin edip elde edilen verilerin kemometrik yöntemlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu bölümde analizi yapılacak bu etken maddeler ve uygulanan yöntemler hakkında bilgi verilecektir.

### 1.1. İrbesartanın Genel Özellikleri

Kapalı formülü  $C_{25}H_{27}N_6O$  olan irbesartan'ın açık formülü Şekil 1.1' de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. İrbesartanın açık formülü

İrbesartan, 2-butil-3 - [[20- (1 H-tetrazol-5-il) [1,10-bifenil] -4-il] metil] -1,3-diazaspiro [4.4] non-1 en-4-on (IRB) etkili ve oral olarak aktif peptidik olmayan anjiyotensin II reseptör antagonistleri, yeni bir kimyasal sınıfının bir üyesidir.

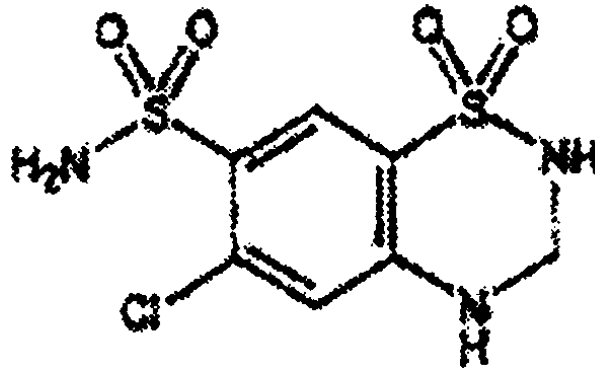
Anjiyotensin II vazokonstriksiyon, etkileri ile renin anjiyotensin sisteminin prensibi presör madde, sentezi ve aldosteron, kardiyak uyarımı serbest uyarılmasını ve sodyum renal emilimini içerir. Anjiyotensin II tip 1 reseptörü için hipertansiyonun tedavisinde gerekli endikedir ; güçlü, uzun süreli bir seçici bir antagonistidir. Ayrıca, 47.436 SR ve BMS-186295 olarak da bilinir, IRB Sanofi Recherche tarafından

keşfedilmiştir ve Sanofi Pharmaceuticals ve Bristol - Myers Squibb tarafından klinik olarak geliştirilmiştir.

İlaç kontrolü önemli bir parçası olarak, basit ve hızlı bir deney ilaçlarda IRB ve HCT izlenmesi için gereklidir. İki, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemlerini insan plazmasında IRB tayini için geliştirilmiştir. İki yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemlerini insan plazmasında IRB tayini için geliştirilmiştir. IRB, kapılar elektroforez (EC), misel elektrokinetik kılcal kromatografisi (MEKC) ile diğer anjiotensin II reseptör antagonistleri ayrılmıştır. Çeşitli analitik prosedürler HPLC dahil olmak üzere, kapiler elektroforez, polarografi, enjeksiyon akış analizi, ve spektrofotometri HCT nin kantitatif tayini için tek başına veya başka ile kombinasyon halinde tanımlanmıştır.

## 1.2. Hidroklorotiazitin Genel Özellikleri

Kapalı formülü  $C_7H_{10}O_4N_3S_2Cl$  olan Hidroklorotiazid'in açık formülü Şekil 1.2' de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Hidroklorotiazidin açık formülü

Hidroklorotiazid, 6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiazidin-7-sülfonamid-1,1-dioksit (HCT) diğer antihipertansifler ile birlikte dünya çapında kullanılan en eski Tiyazid diüretiklerden biridir. IRB, HCT ile birleşiminde daha etkilidir ve bu iki madde Sanofi ve Bristol-Myers Squibb tarafından kombinasyon ilaçlar olarak pazarlanmaktadır. Tiyazid yaklaşık eşdeğer miktarlarda elektrolit geri emiliminin, sodyum tuzu ile doğrudan artan atılımı ve klorür renal tübüler mekanizmalar etkiler.



### 1.3. Kullanılan Yöntem

#### 1.3.1. UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi

Her madde üzerine düşürülen ışınlardan bazılarını absorplayabilir. Maddenin hangi dalga boylarındaki ışınları absorplayacağı kendine özgüdür. Bundan yararlanılarak nitel analiz yapılabilir. Bir maddenin absorplayacağı ışın şiddeti ise madde miktarı ile orantılıdır. Bundan yararlanılarak da nicel analiz yapılabilir. Bu amaçla madde üzerine çok çeşitli enerjilere sahip ışınlar gönderilebilir. Madde ile etkileşen ışının enerjisi değiştiğinde madde ile etkileşim mekanizması da değişir. Buna bağlı olarak ölçüm tekniğinin de değişmesi gerekir. Bu nedenle elektromanyetik spektrumun tümü için ölçüm yapılabilecek tek bir cihazın bulunması mümkün değildir. Elektromanyetik spektrumun farklı bölgeleri için farklı cihazlar kullanılır. Dalga boyu 110 nm – 1000 nm arasındaki UV ve görünür bölge ışınları ile çalışılabilen cihazlara *UV ve Görünür Bölge Spektrofotometreleri* denir. Bu bölgedeki ışınların absorplanmalarının ölçümlerini temel alan analitik yönteme de *UV ve Görünür Bölge Spektroskopisi* denir. UV ve görünür bölge ışınları molekülün en üst enerji seviyesindeki bir elektronun daha yüksek bir enerji düzeyine geçiş yapmasına sebep olur. UV ve görünür bölge ışınları, moleküllerde benzer etki yaptığı için birleştirilmişlerdir. Hem organik, hem de anorganik moleküller UV ve görünür bölge ışınlarını absorplarlar. Her iki grup molekülde de ışın absorpsiyonu elektron geçişi ile gerçekleşmesine rağmen etkileşim mekanizmaları farklıdır. Organik moleküllerdeki absorpsiyon molekül orbital teorisine göre, anorganik moleküllerdeki absorpsiyon ise kristal alan teorisine göre açıklanır.

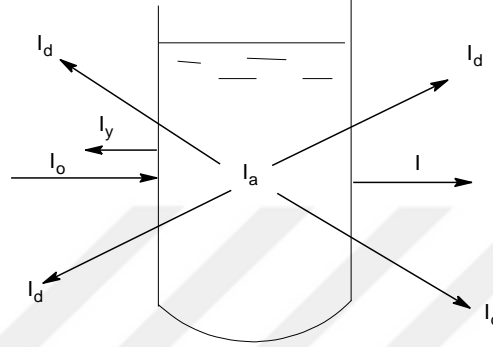
#### 1.3.2. Absorpsiyonun nicel yorumu

Işığın geçiren bir kap içerisinde bulunan bir madde üzerine  $I_0$  şiddetindeki monokromatik ışın demeti gönderilecek olursa demetten bir kısım ışın yansır ( $I_y$ ). Işın demeti çözeltiye dik olarak geldiği için çözelti kabının cidarına dik olarak geri döner, bir kısmı maddenin tanecikleri (iyon, molekül) tarafından absorplanır ( $I_a$ ), bir kısmı çözeltide bulunan büyük veya büyükçe moleküller tarafından etrafa saçılır ( $I_s$ ),

bir kısmı da çözültiden geçer (I). Şekil 1.3' de bu olaylar görülmektedir. Bunlar arasında,

$$I_0 = I + I_a + I_y + I_s \quad (1.1)$$

şeklinde bir bağıntı vardır.

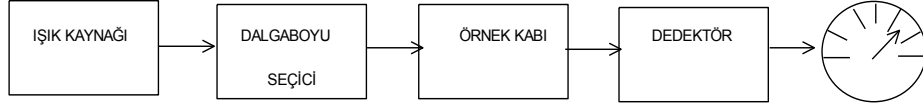


Şekil 1.3. Bir kaptta bulunan bir çözülti üzerine gönderilen ışın demetinde yansıma, saçılma (dağılma) ve absorpsiyonla  $I_0$  demetinin zayıflaması ve  $I$  demeti olarak çözültiyi terk etmesi.

Burada amaç ışık şiddetinin madde tarafından absorplanan ışık miktarını ölçmektir. Bu nedenle saçılma ve yansımada oluşan kayıpların engellenmesi gerekir. Bu amaçla  $I_0$  şiddetindeki ışın demeti birkaç kez çözücüden birkaç kez de incelenecek maddeyi içeren çözültiden geçirilir. Saf çözücüden geçen ışık şiddeti  $I_0$  olarak alınır. Maddeyi içeren çözültide yansıma, saçılma ve absorpsiyon, saf çözücüde ise sadece yansıma ve saçılma gerçekleşir.

### 1.3.3. UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrofotometreleri

Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir. Bir spektrofotometre düzeneği Şekil 1.4'de görüldüğü gibi başlıca ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi ve dedektörden oluşur. Dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür.



Şekil 1.4. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri

Bu ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrelerde ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri ve giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek ise, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına konularak ışık yoluna yerleştirilir (Şener, 2006). Deneyler sırasında araştırma laboratuvarımızda kullandığımız UV-Görünür alan cihazımızın şekli aşağıda verilmiştir.



Şekil 1.5. UV-Görünür alan spektrofotometresi.

#### 1.3.4. Işın Kaynakları

Spektroskopik çalışma için uygun bir kaynak, kolayca belirlenebilecek ve ölçülebilecek yeterli güçte ışın demetleri oluşturmalıdır. Buna ek olarak ışın şiddetinin, belirli bir süre içinde sabit kalması gereklidir. Tipik olarak, kaynağın ışın gücü, güç kaynağının potansiyeli ile üstel olarak değişim gösterir. Bu yüzden kaynaktan sabit bir ışın gücü sağlamak için, potansiyelinin istenilen kararlılıkta tutulması gereklidir. Kaynaktan gelen ışın şiddetini çok iyi kontrol etmek yerine, çift-

ışınılı cihaz tasarımı alternatif bir yoldur. Bu cihazlarda, numuneden geçen ışının şiddeti, numuneden geçmeyen ışınıki ile mukayese edilir (Skoog, 1998).

Soğurma cihazlarında kullanılacak ışın kaynakları, tayin ve ölçüm için yeterli güçte olmalı ve sürekli, yani kullanılan bölgedeki bütün dalga boylarında ışın vermelidir. Görünür bölgedeki ışınları sağlamak kolaydır genelde yaklaşık 3000K'e ısıtıldığında akkor hale gelerek kara cisim ışınması yapan W-lambalardan yararlanılır. Bu lambalar 320-2500 nm aralığında sürekli bir spektrum verirler. W-lambasının içine az miktarda I<sub>2</sub> konulduğunda W-Halojen lambalar elde edilir çalışma sıcaklığı yüksek olduğu için kuartz sistem gereklidir. Bu lambaların ömürleri daha uzun olup ömürleri yaklaşık iki kat fazladır.

UV ışın kaynağı olarak düşük basınçlı hidrojen ya da döteryum boşalım lambaları kullanılır. Bunlar 180-375 nm aralığında sürekli spektrum verirler. D2 lambalarının kullanım aralığı H<sub>2</sub>-lambalarınki ile aynıdır, fakat ışın şiddeti daha yüksek olup yaklaşık üç katı kadardır. Xe-ark lambaları daha yüksek şiddetli ışınlar için kullanılabilir. Bu lambalar 250-600 nm aralığında sürekli spektrum verirler, yalnız çok ısındıkları için cihazın öbür bölümlerinden izole edilmeli hatta soğutulmalıdırlar.

#### **1.3.4.1. Dalga Boyu Seçiciler**

Nicel analizde belli bir dalga boyunda çalışarak Beer yasasına uyum sağlanmış olur, bu aralık maksimum soğurmanın olduğu aralık ise, duyarlık artırılmış olur ve diğer dalga boylarında soğurma yapan maddelerin girişimi engellenerek, seçimlilik artırılmış olur. Bu nedenle istenilen dalga boylu ışınları elde etmek için filtreler ve monokromatörlerden yararlanılır. Filtreler; renkli çözeltiler, renkli camlar, cut off (dalga boyu sınırlayıcı filtreler), interferans (girişim) filtreleri olup, monokromatörler; optik ağlar ve prizmalar şeklinde sınıflandırılabilir.

#### **1.3.4.2. Örnek Kapları**

Çözelti için kullanılan kaplara sel ya da küvet denir. Bunlar çalışılan bölgedeki ışınları soğurmayan geçirgen maddelerden yapılmalıdır. Bu nedenle  $\lambda < 350$  nm olan

mor ötesi bölgede camdan değil kuartzdan yapılmış küvetler kullanılmalıdır. Bunlar 20nm-3µm dalga boyu aralığında kullanılabilirler. Silikat camlar ise 350nm-2 µm bölgesinde kullanılabilir. Görünür bölgede kimi zaman plastikten yapılmış malzemelerde seçilebilir. Küvetler dikdörtgenler prizması şeklinde olup en çok kullanılanların genişliği 1cm'dir. Küvetlerin ışın doğrultusundaki yüzeyleri temiz olmalıdır. Kirlilik ve parmak izinin varlığı yanılıgıları artırır ve tekrarlanabilir ölçümler alınamaz.

### **1.3.4.3. Dedektörler**

Dedektörler, genelde foton dedektörleri ve termal dedektörler şeklindedir. Mor ötesi ve görünür bölgede en çok kullanılan foton dedektörleridir. Foton dedektörleri, ışın enerjisini elektrik enerjisine çevirip ölçüm yaparlar. Tümü ışınları soğuran aktif bir yüzeye sahiptir. Işınlar soğurulduktan sonra ya fotoelektronlar oluşur ve yayımlanır ya da elektronlar iletkenlik bantlarına geçirilerek fotoiletim olur. Foton dedektörleri; fotovoltaiik piller, fototüpler, fotoiletken piller ve silisyum diyotlar şeklinde gruplanıp incelenebilir. İdeal bir dedektör;

- Duyarlılığı yüksek olmalı
- Sinyal/gürültü oranı yüksek olmalı,
- Geniş bir dalga boyu aralığında spektral yanıtı sabit olmalı,
- Aydınlatma yokken çıkış sinyali en az olmalı, yani dark akım küçük olmalı,
- Yanıtlama süresi kısa olmalı
- Alınan sinyal, ışın gücü ile doğru orantılı olmalıdır (Henden, 2006).

### **1.3.5. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları**

Bu yöntemin başlıca uygulama alanları şunlardır.

**Nitel Analiz:** Analizi yapılacak olan bilinmeyen madde saflaştırıldıktan sonra uygun bir çözücüde çözülerek spektrumu alınır. Bu spektrum bilinen bileşiklerin aynı koşullarda çekilmiş spektrumları ile karşılaştırılır. Bilinmeyen madde spektrumu

kendisinininkine tam olarak uygun maddedir. Bu yöntem nitel analiz için çok uygun bir yöntem değildir. Çünkü moleküllerin absorpsiyon bantları oldukça geniştir ve bazı kromoforların absorpsiyon bantları birbiri ile örtüşebilir. Ayrıca moleküllerin UV ve görünür bölge absorpsiyon spektrumlarında çok az sayıda bant bulunur. Bu az sayıda bandın birbiri ile karşılaştırılarak karar verilmesi bazen hatalı sonuçlara yol açabilir.

**Nicel Analiz:** Işının absorplamasına dayanan analiz yöntemleri nicel analiz için oldukça yararlı ve güçlü yöntemlerdir. Bu yöntemlerin klasik yöntemlere göre önemli avantajları vardır.

- a) Analiz süresi kısadır. Sonuç çabuk alınır.
- b) Doğruluk derecesi yüksektir. Çoğunlukla analizlerdeki hata binde bir veya iki civarındadır.
- c) Oldukça duyarlı bir yöntemdir.  $10^{-8}$  M a kadar seyreltik çözeltilerin bile analizleri yapılabilir.
- d) Her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu olduğu için seçiciliği yüksektir. Çoğunlukla bir karışımdaki maddeler bir ön ayırma işlemine gerek kalmaksızın analizleri yapılabilir.
- e) Hem organik hem de anorganik pek çok molekül UV ve görünür bölge ışınları absorpladığından uygulama alanı geniştir (Şener,2006).

#### **1.4. Kemometrik Yöntemler**

Kimyada yada Analitik kimyada verilerin işlenmesi ve istatistiksel değerlendirilmesi ile bu verilerin sağlandığı deney faktörlerinin araştırılması, optimize edilmesi, zaman tasarrufunun sağlanması ve kantitatif ölçümler için kalibrasyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan deneysel tasarımların hazırlanması kimyanın belki de en çok hesaplama ve modelleme çalışmalarına ihtiyaç duyulduğu alanlarıdır.

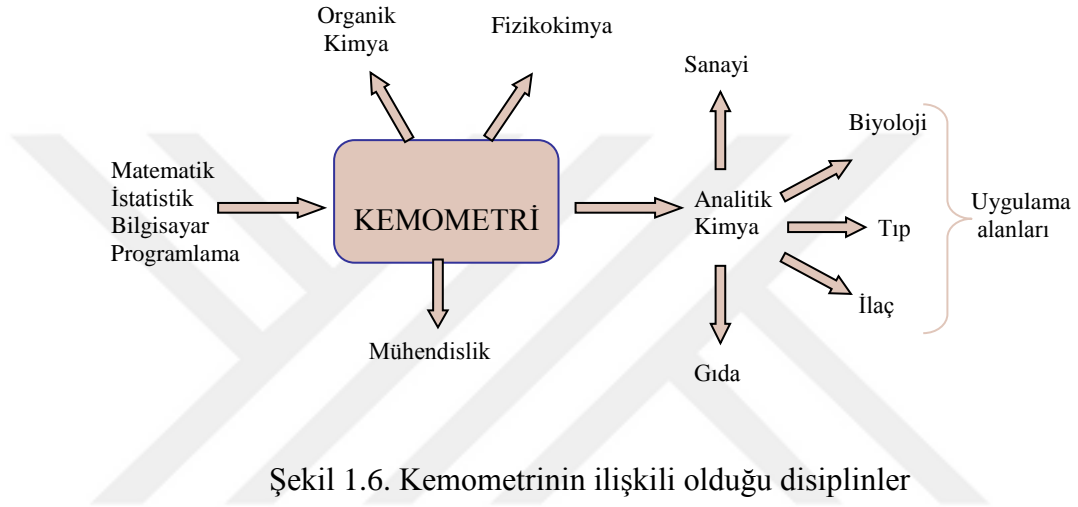
Temel kimya ve fizik bilgileri ile birlikte mühendislik ve hesaplama tekniklerine, matematik ve istatistik konularına dayanan kimyada verilerin işlendiği ve değerlendirildiği alan kemometri olarak bilinmektedir (Akpolat O, 2004).

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

Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürülmüştür ve 1974 yılında uluslararası kemometri derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapılmıştır. Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik (descriptive and inference statics), sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (artificial intelligence methods), resim işleme (image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

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. Bu durum kemometriye diğer yöntemlere göre büyük bir avantaj kazandırmıştır ve kemometrinin kullanım alanının geniş bir alana yayılmasını sağlamıştır.

Kemometri; analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimciler, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasotik kimyacılar, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda deneysel tasarım ve ilaç tasarımında yapı etki ilişkisi çalışmalarında kemometrinin araçlarını kullanmaktadırlar (Vandeginste ve ark., 1998).



Yukarıdaki şekilde de (Şekil 1.6) görüldüğü gibi kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektiği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB, PANORAMA, MİNİTAB, XLSTAT, SOLO ve diğer paket programlar kullanılmaktadır (Dinç E., 2009).

İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda bu aktif bileşiklerin hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın analizi analitik kimyanın ve diğer komşu dalların temel problemlerinden birisidir. Karışım halindeki numunelerin analizi için çeşitli kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı çalışmalarda da görülmektedir. Bazı durumlarda bahsedilen bu yöntemlerin de iyi sonuçlar vermediği de bir gerçektir. Sayılan bu nedenlerden dolayı daha düşük



miktarlarda numunelerin analizi için gelişmiş analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen klasik analitik cihazlardan elde edilen verilerin çeşitli matematiksel algoritmalara tabi tutularak yöntemlerin hassasiyeti ve sonuçların doğruluğu artırılmaya çalışılmaktadır.

#### **1.4.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları**

##### **1.4.1.1. Temel Bileşen Analizi Yöntemi (Principal Component Analysis (PCA) Method)**

Çok bileşenli verilerle ilgili en önemli sorunlardan biri, orijinal verilerin tamamının desen ve ilişkilerinin görülmesini engellemesidir. Çok değişkenli analiz yöntemlerinin birçoğunun temel hedefi verilerin boyutunu küçültmektir. Temel bileşen analizi daha çok bileşenler arasında korelasyonun olmadığı durumlarda verilerin miktarını azaltmak için kullanılan bir tekniktir.

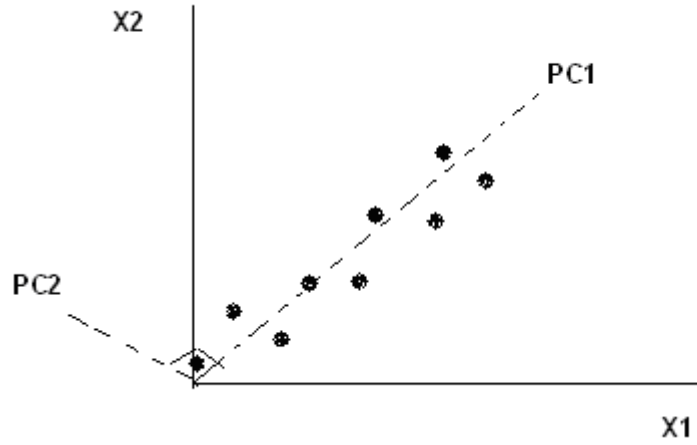
Temel bileşen analizinin dayandığı ana fikir, her bir numuneyi tanımlayan orijinal değişkenlerin,  $X_1, X_2, \dots, X_n$ , doğrusal kombinasyonu olan  $PC1, PC2, \dots, PCn$  şeklindeki temel bileşenleri bulmaktır.

$$PC1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1n}X_n \quad (1.2)$$

$$PC2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2n}X_n$$

vb.

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



Şekil 1.7. X1 ve X2 olan iki değişken için PC1 ve PC2 olan iki esas bileşeni gösteren diyagram (Uyanık, 2008).

#### 1.4.1.2. 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 absorbans verilerinin varyans-kovaryansı bulunur. Varyans-kovaryans saçılma matriksinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A \quad (1.3)$$

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

$$b = P \cdot q \quad (1.4)$$

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

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_0 \quad (1.5)$$

Burada D diagonal matriks olup her bir öz değer tersine eşittir.  $t_1$  sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir:

$$t_1 = A_0 \cdot P_1 \quad (1.6)$$

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

$$a = C_0 - A_0^T \cdot b \quad (1.7)$$

Her bir aşamada elde edilen değerler denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

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

öz değerlerin deneysel ortamdan ve ölçüm aletlerinden gelen gürültünün eliminasyonuna olanak tanır.

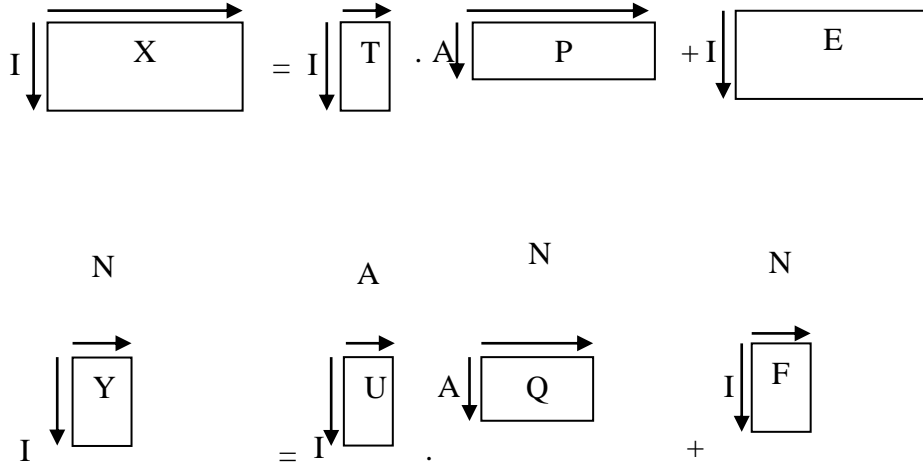
b) Yöntemin dezavantajları; *i*) hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır, *ii*) yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için), *iii*) kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere karşılık gelmeyebilir, *iv*) genellikle çok sayıda kalibrasyon numunesinin kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, *v*) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur (Dinç, 2007).

#### **1.4.1.3. Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Least Squares Regression Method)**

Kemometrik kalibrasyonlardan en yaygın ve popüler olanı PLS yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonalized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-ortogonalized PLS algorithm) gibi ekilleri vardır. Ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS kalibrasyonunun PLS<sub>1</sub> ve PLS<sub>2</sub> şeklinde iki tipi söz konusudur. PLS<sub>1</sub> de bir bileşik model içerisinde iken; PLS<sub>2</sub> de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir.

Wold ve Martens tarafından verilen PLS algoritması en genel olanlarıdır. PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X- ve Y- blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezleştirilmiş X- değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y- değişkeninin parçalanması aşağıdaki biçimde verilir.

$$J \quad A \quad J \quad \xrightarrow{J}$$



Şekil 1.8. PLS2 kalibrasyonu

$$X = T.P^T + E \quad (1.8)$$

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

$$Y = X.B + F$$

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

Burada X= bağımlı değişken absorpsiyon 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 absorpsiyon değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanabilir.

a) Yöntemin avantajları; *i*) PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır, *ii*) tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir, *iii*) kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik konsantrasyonlarını

yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır, *iv*) yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir, *v*) bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, *vi*) bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS' nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR' den daha iyi sonuçlar verir.

b) Yöntemin dezavantajları; *i*) PLS hesaplamaları klasik metodlardan daha yavaştır, *ii*) PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur, *iii*) genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir, *iv*) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur (Dinç, 2007).

#### **1.4.2. Kalibrasyon (Derişim) setinin tasarımı**

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

#### **1.4.3. 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 değerlerini minimum yapan kalibrasyon koşulları ve

F-istatistiği kullanılır. Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen derişim değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı, doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır.

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

#### **1.4.4. 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 aşığıdaki şekilde kurulur.

H<sub>0</sub>: İşlemlerin temsil ettiği popülasyon ortalamaları arasındaki fark tesadüften ileri gelmektedir. İşlem ortalamaları arasındaki gözlenen fark sıfır kabul edilebilir:

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

H<sub>1</sub>: 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 değeri F tablosundan ( $\alpha:0,05$ ) okunan değerle kıyaslanır.

Varyans analiz çizelgesi (ANOVA testi çizelgesi = ANalysis Of VAriation )

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-değeri
Yöntemler arası (Gruplar arası)	$k-1$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$	$\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 / (k-1)$	$F = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2}{k-1} \div \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2}{(k(n-1))}$
Yöntemler içi (Gruplar içi)	$k(n-1)$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 / (k(n-1))$	
Genel varyasyon	$nk-1$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X})^2$		

(Dinç,2009).

#### 1.4.5. Kemometrik Kalibrasyon Yöntemlerinin Uygulamaları

##### 1.4.5.1. Kemometrik Yöntemlerin Uygulama Alanları

Analitik kimyadaki miktar tayini çalışmalarında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri ya da çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri IR spektrofotometre, UV- görünür alan spektrofotometre, spektrofotometre, 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 anorganik analiz, organik analiz, ilaç analizi, klinik ve biyolojik numunelerin analizi, gıda ve su analizleri, çevre analizleri ve stabilite tayinleri, çözünme hızı testleri şeklinde özetlenebilir.



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

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



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

S. Hillaert, W. Van den Bossche tarafından 2002 yılında başladıkları çalışmalarda Hidroklorotiazit ve altı anjiyotensin-II alıcı antagonistini (ARA-II'ler) (candesartan, epresortan mesylate, irbesartan, losartan potasyum, telmisartan ve valsartan) eş zamanlı olarak ayırma amacıyla kapiller elektroforetik (CZE) ve misel elektrokromatografik yöntemlerinin (MEKC) alabilirliğini araştırdı. CZE ve MEKC yöntemleri farmasötikal formüllerdeki birleşik HCT/ARAII'lerin niteliksel ve sayısal değerlendirmesi için uygundur. ARA-II'e bağlı olarak iki yöntemden en az biri her kombinasyon için kullanılabilir. İki yöntem de tepki, yeniden üretilebilirlik ve hatasızlık doğrularlığında onaylanmışlardır.

Lara F. Tutunji, Maha F. Tutunji ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada hassas, özgün ve seçici kromatografi/tandem kütle spektrometrik yöntemi insan plazmasındaki irbesartan ve hidroklorotiazitin eş zamanlı saptaması için geliştirilip onaylandı. Plazma örnekleri asetonitrilli protein çözeltilisi kullanılarak, iki analit ve iç standart losartanın % 2.5 oranında formik asit içeren suyla ters fazlı C18 kolonunda (50mmx4mm,3\_μm) ayrıştırılmasıyla ve metanol ve asetonitril (40:45:15, v/v(v (% ))) akıcı durumdayken (akış oranı 0.70mL/min) hazırlandı. Irbesartan ve hidroklorotiazit negatif iyon modunda, çoklu reaksiyon gözetimiyle (MRM) tespit edilmeden önce ESI kaynağı kullanılarak iyonize edilmiş ve aşağıdaki transisyonlarda izlenilmiştir: Hidroklorotiazit m/z 296→269 ve m/z 296→205, irbesartan 427→175. Doğrusallık irbesartan için 0.06-6.00\_μg/mL ve hidroklorotiazit için 1.00-112.00 ng/mL yoğunlaşma aralığında gösterilmiştir. Geliştirilmiş ve onaylanmış yöntem gönüllülerde başarılı bir şekilde (N=36) 12.5 mg'lık hidroklorotiazit tablet ve irbesartan (300mg) biyo eşdeğerlik çalışmasına uygulanmıştır.

Duohai Pan, George Crull ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmalarda yüksek tansiyonun tedavisinde kullanılan bir ilaç olan Avalide Irbesartan ve Hidroklorotiazit'in birleşimidir. Avalide ürünlerindeki aktif farmasötik bileşenlerden(API) biri olan Irbesartan kristalize halde iki şekilde bulunur: Şekil A ve Şekil B. Irbesartan Şekil A Avalide tabletlerin hazırlanışındaki ıslak granülasyon

aşamasında kullanılan API formudur. Daha zor çözünen Irbesartan Form B'nin Avalide tabletlerinde bulunması daha yavaş çözünmeyle sonuçlanabilir. Bu makalede yöntem gelişimi, onayı ve NIR ve ssNMR aracılığıyla Avalide tabletlerindeki çok düşük miktarlardaki Irbesartan Şekil B'nin saptanmasındaki zorlukları sunduk. NIR yöntem gelişimi ve niteliğinin parçası olarak tespit sınırı, doğrusalılık ve kesinlik de incelendi. Ek olarak, yöntemin sağlamlığıyla ilgili sınırlı bir çalışma da yapıldı ve Şekil B seviyesindeki değişim ortamın nemiyle ilişkilendirildi. Polimorfik bileşimlerin saptanmasındaki öncelikli yöntem olan ssNMR, NIR yönteminin hassasiyetini onaylamak için başarılı bir şekilde ortogonal bir teknik olarak kullanıldı ve NIR yöntemine duyulan güveni onayladı. NIR yönteminin hızı ve verimliliği, onu QC ortamında Avalide tabletlerinin rutin Form B analizleri için uygun ve kullanışlı bir araçtır.

Sema Koyutürk, Nafiz Oncu Can ve arkadaşlarıyla yaptıkları 2014 yılındaki çalışmalarda irbesartan (IRB) ve hidroklorotiazit(HCT) sırasıyla, yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan anjiyotensin-II alıcı antagonist ve tiazit-diüretik bileşenlerdir. İdrar örnekleri ve sabit doz bileşim tabletlerindeki IRB ve HCT'nin eş zamanlı ölçümü için kullanılan özgün seyrelti HPLC yöntemi anlatılmıştır. IRB, HCT ve agomelelatinin ayrıştırılması (iç standart) ikinci jenerasyon C-18 bağlanık monolitik silika kolon (Chromolith Yüksek Çözünürlük RP-18e, 100x4.6mm, Merck KGaA) kullanılarak, hem akışkan safhayı hem de akış hızı eğim elüsyon programlarıyla desteklenerek gerçekleştirilmiştir. Analitler 24 dakika içinde yüksek çözünürlükte fotodiyot dizisi dedektörü kullanılarak 230 nm dalga boyunda tespit edilmiş, ikinci jenerasyon C18 bağlanık monolitik silika kolon kullanıldığında % 50 daha fazla pik kapasitesi gözlemlenmiştir. İdrar örnekleri sisteme yalnızca filtreleme ve hemen ardından gelen damıltma dışında kolaylıkla tanıtılmıştır. Onay çalışmaları USP and ICH'nin resmi tavsiyelerine göre gerçekleştirilmiş ve geliştirilmiş yöntem başarılı bir şekilde farmasötik tabletlere ve idrar örneklerine uygulanmıştır.

Kararlılık tespitinde kullanılan basit ve hatasız bir sıvı kromatografi yöntemi, birleştirilmiş farmasötik dozaj formundaki irbesartan (IRB) ve hidroklorotiazitin (HCTZ) eş zamanlı ölçüm tahmini amacıyla geliştirildi ve onaylandı. İki ilacın kromatografik ayrıştırılması direktken asetonitril (70:30 v/v) kullanan Ace5 C18 25-

cm analitik kolonla gerçekleştirilmiştir. Akışkan safhada kullanılan direktken asetik asitle 5.5 pH'e ayarlanmış 50 mM amonyum asetat içeriyor. Araçsal ayarlarda akış oranı 1.5ml/dk, kolon sıcaklığı 30 C ve fotodiyot dizi dedektörü 235 nm dalga boyundadır. IRB, HCTZ ve ikisinin birleşimi ilaç ürünleri termal, ışık kırım, hidrolitik ve oksidatif gerilme şartlarına maruz bırakılmış ve örnekler önerilen yöntemle analiz edilmiştir. IRB ve HCTZ'nin en üst homojenlik verisi fotodiyot dizi dedektörü kullanılarak elde edilmiştir. Örnek kromatografilerde, bozunma ürünlerinin varlığındaki estimasyonları için deney yönteminin özgünlüğünü göstermiştir. Bahsedilen yöntem IRB için 10-200 ug/mL ve HCTZ için 5-100 µg/mL aralığında mükemmel bir doğrusallık göstermektedir. Metilparaben iç standart olarak kullanılmıştır. IRB ve HCTZ için korelasyon katsayısı 0.998 ve 0.999'dur. IRB ve HCTZ için ortalama geri kazanım değerleri % 100.45 - % 101.25 arasında değişmektedir. IRB ve HCTZ için tespit sınırı sırasıyla 0.019 ve 0.023 µg/mL'dir. Önerilen yöntem IRB ve HCTZ'nin farmasötik hazırlıklardaki miktar saptama ve denge çalışması için uygundur ve ayrıca seri üretim ve farmasötik dozaj formlarının kalite kontrolünde de kullanılabilir.

V.P Rane,K.R.Patil ,J . N. Sangshetti ve diğer arkadaşlarıyla 2010 yılında yaptıkları çalışmalarda kararlılık tespitinde kullanılan basit ve hatasız bir sıvı kromatografi yöntemi, birleştirilmiş farmasötik dozaj formundaki irbesartan (IRB) ve hidroklorotiazitin (HCTZ) eş zamanlı ölçüm tahmini amacıyla geliştirildi ve onaylandı. İki ilacın kromatografik ayrıştırılması direktken asetonitril (70:30 v/v) kullanan Ace5 C<sub>18</sub> 25-cm analitik kolonla gerçekleştirilmiştir. Akışkan safhada kullanılan tampon asetik asitle 5.5 pH'e ayarlanmış 50 mM amonyum asetat içeriyor. Enstrümental sistem ayarların akış oranı 1.5ml/dk, kolon sıcaklığı 30 C ve fotodiyot dizi dedektörü 235 nm dalga boyundadır. IRB, HCTZ ve ikisinin birleşimi ilaç ürünleri termal, ışık kırım, hidrolitik ve oksidatif gerilme şartlarına maruz bırakılmış ve örnekler önerilen yöntemle analiz edilmiştir. IRB ve HCTZ'nin en üst homojenlik verisi fotodiyot dizi dedektörü kullanılarak elde edilmiştir. Örnek kromatografilerde, bozunma ürünlerinin varlığındaki tahminleri için deney yönteminin özgünlüğünü göstermiştir. Bahsedilen yöntem IRB için 10-200 µg/mL ve HCTZ için 5-100 µg/mL aralığında mükemmel bir doğrusallık göstermektedir. Metilparaben iç standart olarak

kullanılmıştır. IRB ve HCTZ için korelasyon katsayısı 0.998 ve 0.999'dur. IRB ve HCTZ için ortalama geri kazanım değerleri % 100.45 - % 101.25 arasında değişmektedir. IRB ve HCTZ için tespit sınırı sırasıyla 0.019 ve 0.023 µg/mL'dir. Önerilen yöntem IRB ve HCTZ'nin farmasötik hazırlıklardaki miktar saptama ve denge çalışması için uygundur ve ayrıca seri üretim ve farmasötik dozaj formlarının kalite kontrolünde de kullanılabilir.

Fei Liu, Jundong Zhang, Yu Xu, Shu Gao, and Qingxiang Guo 2008 yılında yaptıkları çalışmalarda insan plazmasındaki hidroklorotiazit ve valsartanın eş zamanlı tespiti için oluşturulan hızlı ve özgün bir sıvı kromatografi = tandem kütle spektrometri yöntemi anlatıldı. Metanol, hidroklorotiazit, valsartan ve hidroflümtiazit kullanılarak plazmadan çıkarıldıktan sonra iç standart olarak kullanılan irbesartan akışkan safhada metanol (27:73, v=v) ve su ile Phenomenex Kromasil C<sub>8</sub> kolonunda kromatografik olarak analiz edildi. Seçilmiş tepki izleme negatif elektrosprey iyonizasyonunu kullanan çoklu tespitte özel bir yöntemdi. Kalibrasyon standartları konsantrasyon aralığı üzerinde (Hidroklorotiazit için 3.13-800 ng=ml ve valsartan için 11.72-3000 ng=ml) çizgiseldi. Yöntem 20 sağlıklı gönüllüye 12.5mg hidroklorotiazit ve 80 mg valsartan içeren çözünür tabletlerin ağızdan verilmesinin ardından farmakokinetik çalışmaya uygun bulunmuştur.

J. Joseph-Charles, S. Brault ve C. Boyer 2007 yılında yaptıkları çalışmada tabletlerdeki Irbesartan (IRB) ve hidroklorotiazit (HCT)'nin eş zamanlı tespiti için ikinci türev bir spektrofotometrik yöntem anlatılmaktadır. Ölçümler IRB için 230.1nm ve HCT için 232.7nm'de sıfırdan geçiş dalga boylarında yapılmıştır. Kalibrasyon grafikleri IRB için 14.4-33.6mgL<sup>-1</sup> ve HCT için 1.2-2.8 mgL<sup>-1</sup> çizgisindeydi. Miktar sınırları 5.0 ve 1.1mg L<sup>-1</sup>'dir. Önerilen yöntem başarılı bir şekilde IRB ve HCT'nin yüksek yüzdeli iyileşme, iyi hassasiyet ve doğruluğa sahip ticari tabletlerdeki eş zamanlı tespitinde kullanılmıştır.

Zorica Vujić, Nedžad Mulavdić, Miralem Smajić, diğer arkadaşlarıyla yaptıkları çalışmalarda deneysel dizayn yöntemi birleştirilmiş dozaj formlarında hidroklorotiazit ve irbesartanın HPLC tespiti için kullanılmıştır. Deneyleerin optimizasyonu için kullanılan geleneksel yaklaşım çok uzun sürmekte, çok sayıda

deneme içermekte ve karşılıklı etkileşimde bulunan birden fazla parametre oluşturulmasına izin vermemektedir. Deneysel dizayn yönteminin ana avantajları muhtemel etkileşim tahminlerini ve tepkiyi etkileyen daha geniş sayıda faktörü eş zamanlı olarak göstermesidir. Ön deneylerden yola çıkarak üç bağımsız değişken olarak seçilmiş (metanol içerik, akışkan safhanın pH'i ve sıcaklık) ve bağımlı değişkenler olarak beş etken (çözünürlük, irbesartan pikinin simetrisi, hidroklorotiazit pikinin simetrisi, irbesartanın muhafaza faktörü, hidroklorotiazitin muhafaza faktörü) seçilmiştir. Faktörlerin iki farklı seviyede incelendiği ("alçak" ve "yüksek") bir tam 23 faktöriyel dizayn hangi faktörlerin çalışılmış tepkinin üzerinde etkisi olduğunu tespit etmede kullanıldı. Daha sonra deneysel dizayn bu etkili parametreleri daha önceki deneysel alanda optimize etmede kullanıldı. Yöntemimizin orijinalliği Derringer'ın istenilme fonksiyonuyla ulaşılan optimizasyon adımıdır. Deneysel koşulları optimize ettikten sonra 47:10:43 v/v/v, pH 6.5 değerinde direktken ve 25°C kolon sıcaklığında metanol-tetrahidrofurasetat içeren akış safhasındaki Supelcosil C<sub>18</sub> (150mm x 4.6mm, 5m partikül boyutu) kolonunda bir ayırıştırma gerçekleştirildi. Geliştirilmiş yöntem başarılı bir şekilde, ticari farmasötik dozaj formlarındaki bu aktif ilaç bileşenlerinin eş zamanlı ayırıştırılmasında kullanıldı.

M Amer Alanazi ve diğerleri 2014 yılında yaptıkları çalışmada Irbesartan (IRB) ve hidroklorotiazit (HCT)'nin birleşik farmasötik dozaj formlarında eş zamanlı tespiti için yüksek verimli basit, hassas ve hatasız bir HPLC yöntemi geliştirildi ve onaylandı. Önerilen yöntem ilk kez analizdeki monolitik kolonda uygulandı. Analitlerin optimal kromatografik ayırıştırılması dakikada 1.0mL akış hızıyla pompalanan fosfat direktken (pH4) / asetonitril (50: 50, V/V) içeren akışkan safhanın kullanıldığı Chromolith (R) Performance RP-18e kolonunda gerçekleştirildi. Birbirinden ayrılmış analitler 270nm'ye ayarlanmış bir UV dedektörüyle izlendi. Optimum kromatografik koşullar altında iyi bir korelasyon katsayısıyla ( $R \geq 0.9997$ ) çizgisel bir ilişki 10-200 ve 1-20 ng mL<sup>-1</sup> aralığında hem HCT hem IRB'nin karşılıklı yoğunlaşmalarında ve pik alanında bulunmuştur. Tespit sınırı sırasıyla IRB için 2.34 ve HCT için 0.03 ng mL<sup>-1</sup>'dir. RSD değerleri % 3'ü geçmediğinden intra ve inter-assay hassasiyetleri tatmin ediciydi. Önerilen yöntemin doğruluğu % 97 idi.

Analiz basit bir prosedürü takip ettiğinden ve 3 dakikanın altında bir sürede tamamlandığından önerilen yöntemden yüksek verim alındı. Sonuçlar yöntemin IRB ve HCT içeren birleşik farmasötik tabletlerin kalite kontrolünde kullanılabilceğini gösterdi.

Hafez, Hany Mohammed; Elshanawane, Abdullah Ahmed; ve diğer arkadaşlarıyla 2013 yılında yaptıkları çalışmalarda Losartan Potasyum, Valsartan, Telmisartan ve Irbesartan yüksek tansiyonun veya Hidroklorotiazit'le birlikte diğer ilaçlarla birlikte kullanılabilen anjiyotensin-II-alıcı antagonistleridir(ARA II). RP-HPLC yöntemi, üç anjiyotensin-II-alıcı antagonistin (ARA-II) Hidroklorotiazit'in varlığında denenmesi için geliştirilmiştir. Yöntem, izokratik şekilde dakikada 1.5mL akış oranıyla ACE C18 kolonda (250mm x 4.6 mm, 5 µm), 220 nm'de % 65.35 oranda tespitile 0.025 M potasyum dihidrojen fosfat içeren akış safhası kullanılarak yüksek performans sıvı kromatografiyle denenmiştir. Önerilen yöntem doğruluk, kesinlik, hassasiyet, sağlamlık, tespit sınırı ve miktar sınırı açısından ICH prensiplerine göre doğrulanmıştır.

Coudore, Francois; Harvard, Laurent ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmalarda Hidroklorotiazit (HCTZ) ve anjiyotensin II tip 1 alıcı antagonist (ARB) irbesartan(IRBE) iyi bilinen ve düşük doz kombinasyonu sıklıkla alınan yüksek tansiyon önleyici ilaçlardır. Bu çalışmada basit, hassas ve özgün yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi diyot dizisi tespitiyle birlikte sabit 12.5 mg HCTZ ve 300 mg IRB verilen yüksek tansiyon hastalarının plazmalarındaki HCTZ ve IRB seviyelerinin eş zamanlı tespiti için geliştirilmiştir. Bileşenler 3 mL etil asetatla asitlenmiş plazma örneklerinden çıkarılmış ve dakikada 1 mL'lik akış oranlı asetonitril-fosfat direktkeniyle (pH 3.6) C-4 kolonundan 6 ve 19 dakikada birbirinden ayrılmıştır. Deneme sırasıyla HCTZ ve IRB için 2.5-500 ve 20-4000 ng mL(-1) aralığındaydı. Genel intra-assay ve inter-assay değişkenleri kabul edilebilir sınırlar içerisindeydi. Miktar limitleri sırasıyla HCTZ ve IRB için 2.5 ve 20 ng mL(-1) değerindeydi. Plazma örnekleri oda sıcaklığında üç donma-erime döngüsünde 12 saat, -20 derecede ise 2 ve 7 ay sabit kaldı. Yüksek tansiyon hastalarında artık yoğunlaşmalar sırasıyla HCTZ ve IRB için 22.3± 6.0 ve 241.8 ± 39.0 ng mL(-1) arasında idi. Birlikte verilen diğer ilaçlarla herhangi bir çakışma olmadı. HCTZ ve

IRB'nin farklı fizikokimyasal özelliklerine rağmen, yöntemimiz iki ilacın da HCTZ-IRB sabit doz kombinasyon terapisiyle tedavi edilen hastalar için uyumluluk incelemesinde ilaçların doğru ölçümünü mümkün kıldığını göstermektedir.

El-Desoky, Hanaa S.; Ghoneim, Mohamed M.;ve diğer arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmalarda Irbesartan'ın Britton-Robinson direktkenindeki cıva-damla elektrotunun periyodik voltamogramının 4.5'tan düşük pH değerleri tetrazol bölümünün C=N çift bağının azaltılması-soğurmasına karşılık gelen tek - 2 elektronluk geri döndürülemez katodik pikinin ortaya çıkardığı. 4.5-5.5 pH aralığının üzerinde voltamogramlar iki geri döndürülemez daha düşük pik akım fakat sırasıyla C=N asidik grup ve irbesartanın basit formlarının düşmesine karşılık ortaya çıkan neredeyse eşit yükseklikte katodik pikler 1(Birinci) ve 2(İkinci) zirveler gösterdi. Onaylanmış bir kare dalga soğurma katodik soyma voltametrik yöntemi kaba formunda irbesartanın sayımı için geliştirildi. Geliştirilmiş soyma voltametrik yöntemi başarılı bir şekilde analizden önceki örnek ön tedavi veya zaman alan çıkarma adımları olmadan farmasötik formülasyonlara ve sağlıklı insan serumuna uygulanmıştır.

Rahman, Nafisur; Siddiqui, Masoom Raza ve diğer arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmalarda Bu çalışmanın amacı, farmasötik formülasyonlarda irbesartanın tespiti için yeni bir kinetik spektrofotometrik yöntem geliştirmektir. Bu yöntem 30 +/- 1 derecede sulu ortamda sarı renkli triiyodür iyonları oluşturmak için potasyum iyodat ( $KIO_3$ ) ve iyodid (KI)'in karışımı oksitlenmiş irbesartan karboksili asit grubunun tepkisi üzerine oluşturulmuştur. Tepki 352 nm'de emilim değişim oranı ölçülerek spektrofotometrik olarak izlenmiştir. Son oran ve sabit zaman (Delta A) yöntemleri sırasıyla 10.0-60.0 ve 7.5-60.0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  yoğunlaşma aralığında çizgisel olarak bulunan kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılmıştır. Kalibrasyon verisinin gerileme analizi sırasıyla şu çizgisel ekuasyonları ortaya çıkarmıştır: oran =  $-2.138 \times 10^{-6} + 1.058 \times 10^{-4} C$  ve Delta A =  $-3.75 \times 10^{-3} + 3.25 \times 10^{-3}$ . Son oran C ve sabit zaman (Delta A) yöntemleri. Son oran ve sabit zaman yöntemleri için tespit sınırı sırasıyla 0.21 ve 2.40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'dir. E-a, Delta H-double dagger, Delta S-double dagger ve Delta G(double dagger) gibi çeşitli aktivasyon parametreleri de tepki zamanı için hesaplamada kullanılmış ve sırasıyla 70.95 +/- 0.43  $\text{kJ mol}^{-1}$ , 68.48



+/- 0.21 kJ mol<sup>-1</sup>, 16.54 +/- 0.24 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> ve -4.94 +/- 0.07 kJ mol<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Önerilen yöntemler Uluslararası Uyumlandırma Konferansı (U.S.A.) prensiplerine göre optimize edilmiş ve onaylanmıştır. Sonuç ve aralık hipotez testleri uygulanmış ve önerilen yöntemler ve referans yöntemi arasında önemli önemi farklar olmadığı görülmüştür. Yöntemler başarılı bir şekilde ticari dozaj formlarda irbesartanın tespitinde kullanılmıştır.



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

#### **3.1. Materyal**

Bu çalışmada, UV/VIS spektrofotometrisi ile iki bileşenli bir ilaç numunesindeki aktif maddelerin nicel olarak tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler, PCA, PCR ve PLS gibi kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Spektrofotometrik ölçümlerle çözücü olarak metanol kullanılarak hidroklorotiazid (HCT) ve irbesartan (IRB) çözeltileri hazırlanıp spektrumları okunmuştur. Bu işlem için Önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ilaç örneğinde ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler lisansı elimizde bulunan MİNİTAB 16 istatistik programıyla değerlendirilmiştir.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

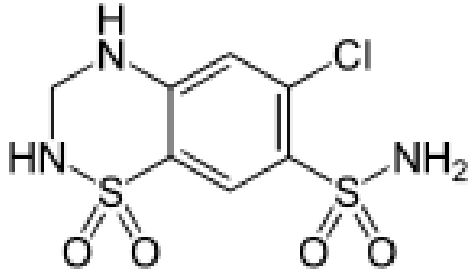
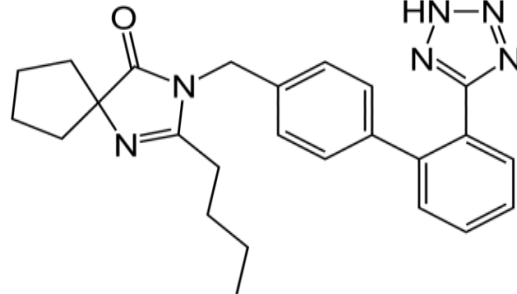
##### **3.2.1. UV-Görünür Spektrofotometre Cihazı**

UV-Vis spektrumları, bilgisayar tarafından kontrol edilen 1cm uzunluğundaki hücre ile donatılan UV 1700 PHARMASPEC SHİMADZU spektrofotometresi kullanılarak not edilen spektrum değerleri ilaç tabletlerindeki HCT ve IRB miktarını belirlemek için kemometrik metotlara uygulanmıştır.

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

Deneylerde analitik saflıkta olan kimyasallar kullanılmıştır. Bu kimyasallar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Bileşğin Adı	Bileşğin Formülü
Hidroklorotiazid	
Irbesartan	
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH

Su, 0,05 S. cm<sup>-1</sup> den düşük kondüktiviteye sahip, Milli – Q su arıtma (Millipore Corp.) sisteminden sağlanmıştır.

### 3.3.1. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada spektrofotometrik ölçümler için HCT ve IRB maddelerinin 500 ppm olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

#### Stok Hidroklorotiazid Çözeltisi

Hidroklorotiazid maddesinden 0,0631g tartılarak bir miktar etanol' de çözüldükten sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

#### Stok Irbesartan Çözeltisi

Irbesartan maddesinden 0,0011g tartılarak bir miktar etanol' de çözüldükten sonra son hacim 250 ml' ye tamamlandı.

## **Analiz edilen bileşiklerin ticari preparatı**

### **Co-İrda (Tablet)**

Hidroklorotiazid :..... 25 mg

Irbesartan :..... 300 mg

### **Ticari numune**

#### **Co-İrda**

Ticari olarak satın alınan Co-İrda tablettten 20 tablet havanda ezilip 1 tablet ağırlığına karşılık gelen 0,627g tartıldı. Bir miktar etanol ilave edilip yarım saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve son hacim 100 ml' ye tamamlandı. Çözelti daha sonra süzülüp süzgeç kâğıdında kalan kısım 3 kez 10 mL metanol ile yıkandı ve hacim 100 mL'ye tamamlanıp daha sonra çalışılacak olan aralığa seyreltilti.

### **3.4. Yöntem**

#### **3.4.1. UV/VIS Spektroskopisi Yöntemi**

Bu çalışmada, spektrofotometrik ölçümlerle ilaç aktif maddelerinin stok çözeltilerinin spektrumları okunmuştur. Bu işlem için önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ilaç örneklerinde ölçümler yapılmıştır. 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 etanol – su ile hazırlanan kör numunesi konularak yapılmıştır. Bütün okumalarda hep kör bu şekilde hazırlanmıştır. Kör olarak sadece etanol – su kullanılmasının nedeni bu çalışmada genel olarak çözücümüz etanol- su karışımı olduğu içindir. Kör seçimi yapılırken girişim etkilerini yok etmek için, kör olarak çözücü tercih edilmiştir.

İkinci basamakta, saf ilaç aktif maddelerinin tek tek spektrumları alınmıştır. Bu işlem esnasında stok ilaç aktif maddelerinden derişimleri 0,3- 20 ppm arasında olacak şekilde saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 mL ye tamamlanarak çözeltileri hazırlanmış ve UV spektroskopisinde absorbands okumaları yapılmıştır. Üçüncü basamakta, her bir madde ayrı bir dalga boyunda maksimum verdiğiinden saf ilaç maddelerinden oluşturulan sentetik karışımların UV spektroskopisinde absorbands okumaları yapılmış ve birbiri yanında herhangi bir ön ayırma işlemine gerek olmaksızın ilaç aktif maddeleri incelenmiştir. Son basamakta ise, piyasada satılan ilaç numunesindeki ilaç aktif maddelerinin çözeltileri incelenmiştir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kemometrik kalibrasyonların HCT ve IRB bileşiklerinin analizine uygulamasında üç farklı kemometrik yöntem geliştirildi. Bunlar PCA, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleridir. Kemometrik yöntemlerin uygulaması için spektral koşullar optimizasyonu ve optimal kalibrasyon setinin hazırlanması için ön çalışmalar yapıldı.

Saptanan spektral koşullarda kalibrasyon setinin ve numunelerin 200-400 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı ve kemometrik kalibrasyonlar 225-280 nm dalga boyu bölgesindeki bütün absorpsiyon değerlerinin vektörel ölçümleri kullanılarak elde edildi. Kemometrik algoritmalarla hesaplanan PCA, PCR ve PLS kalibrasyonları yapay ve tablet numunenin analizine uygulandı.

##### 4.1. UV Spektroskopisi

Önce her bir renk maddesinin saf halde 500 ppm standart çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra 0,05-3,5 mL arasında saf maddeler stoklardan alınarak toplam hacim 25 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlem sonrası absorpsiyonlar ölçülerek kaydedilmiştir. Her bir ilaç maddesinin derişimleri ppm olarak hesaplanmış ve absorpsiyonlardan yararlanılarak molar absorpsiyon katsayıları belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. İlaç aktif maddelerinin spektroskopik özellikleri

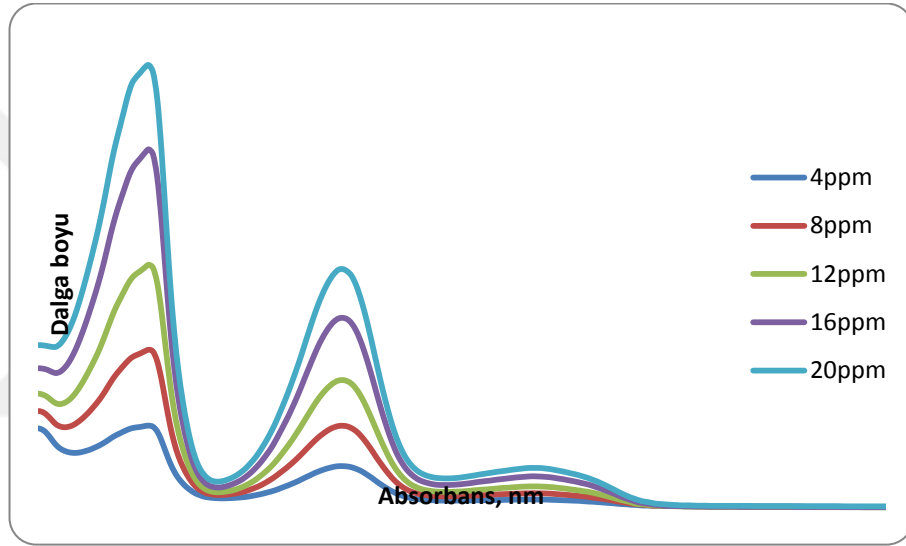
İLAÇ AKTİF MADDESİ	MAK. ABS. YAPTIĞI DALGABOYU	MOLAR ABSORPSİYON KATSAYISI	KALİBRASYON DENKLEMİ	KORELASYON KATSAYISI
Hidroklorotiazid (HCT)	270 nm	$75,3 \cdot 10^3$	$y = 0,3068x - 0,0422$	0,9940
İrbesartan (IRB)	232 nm	$19,8 \cdot 10^3$	$y = 0,0416x + 0,0278$	0,9998

Her bir ilaç aktif maddesinin önce tek tek spektrumları alınır. Bu spektrumlar alınırken derişim aralıkları HCT için 4 – 20 ppm ve IRB için ise bu değerler 0,3 – 1,5 ppm arasındadır. Bu derişim aralıkları tayini yapılan her bir aktif madde için lineer doğrusallığın olduğu bölgelerdir.

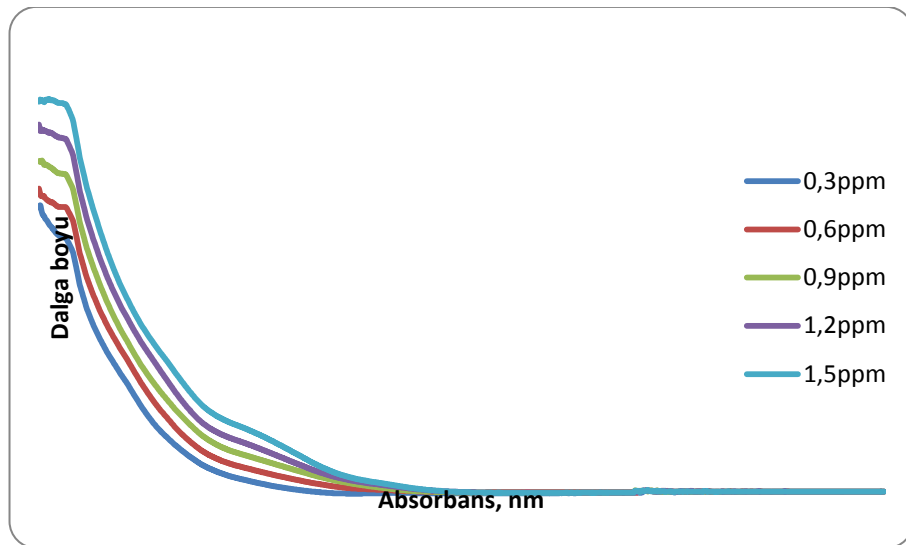
#### 4.1.1. Saf halde HCT ve IRB'nin spektrumları

HCT ve IRB maddeleri Çizelge 4.1'de de görüldüğü üzere ayrı dalga boylarında maksimum absorptans vermektedirler.

Bu özellikten yararlanılarak bir sonraki aşamada bu iki etken maddenin sentetik karışımları hazırlanmış ve bunlar birbiri yanında herhangi bir ön ayırma işlemi yapmaksızın tayin edilmişlerdir. HCT ve IRB ilaç aktif maddeleri sürekli spektrum göstermekte ve üst üste örtüşen spektrumlar gözlenmektedir.



Şekil 4.1. HCT maddesinin absorpsiyon spektrumu



Şekil 4.2. IRB maddesinin absorpsiyon spektrumu

Kemometrik kalibrasyonların HCT ve IRB bileşiklerinin analizine uygulamasında üç farklı kemometrik yöntem geliştirildi. Bunlar PCA, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleridir. Kemometrik yöntemlerin uygulaması için spektral koşullar optimizasyonu ve optimal kalibrasyon setinin hazırlanması için ön çalışmalar yapıldı.

Saptanan spektral koşullarda kalibrasyon setinin ve numunelerin 200-400 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon spektrumları alındı ve kemometrik kalibrasyonlar 225-280 nm dalga boyu bölgesindeki bütün absorbans değerlerinin vektörel ölçümleri kullanılarak elde edildi. Kemometrik algoritmalarla hesaplanan PCA, PCR ve PLS kalibrasyonları yapay ve tablet numunenin analizine uygulandı.

#### 4.2. Kalibrasyon setinin hazırlanması

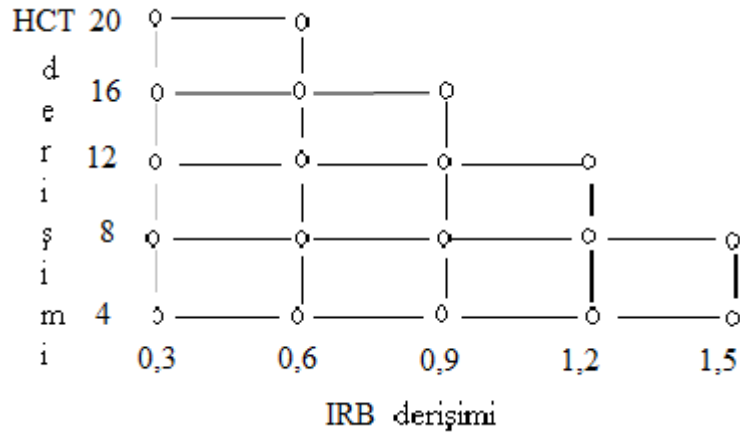
Kemometrik kalibrasyonlar için etanol içerisinde HCT için 4-20 µg/mL ve IRB için 0,3-1,5 µg/mL derişim aralığında her iki bileşigi içeren 19 değişik kompozisyonda simetrik bir kalibrasyon seti hazırlandı. Çizelge 4.1. de hazırlanan kalibrasyon seti sunulmaktadır.

Çizelge 4.2. HCT ve AMH analizi için kalibrasyon seti

Kalibrasyon Seti		
Derişim (µg/mL)		
No	HCT	IRB
1	4	0,3
2	4	0,6
3	4	0,9
4	4	1,2
5	4	1,5
6	8	0,3
7	8	0,6
8	8	0,9
9	8	1,2
10	8	1,5
11	12	0,3
12	12	0,6
13	12	0,9
14	12	1,2
15	16	0,3
16	16	0,6
17	16	0,9
18	20	0,3
19	20	0,6



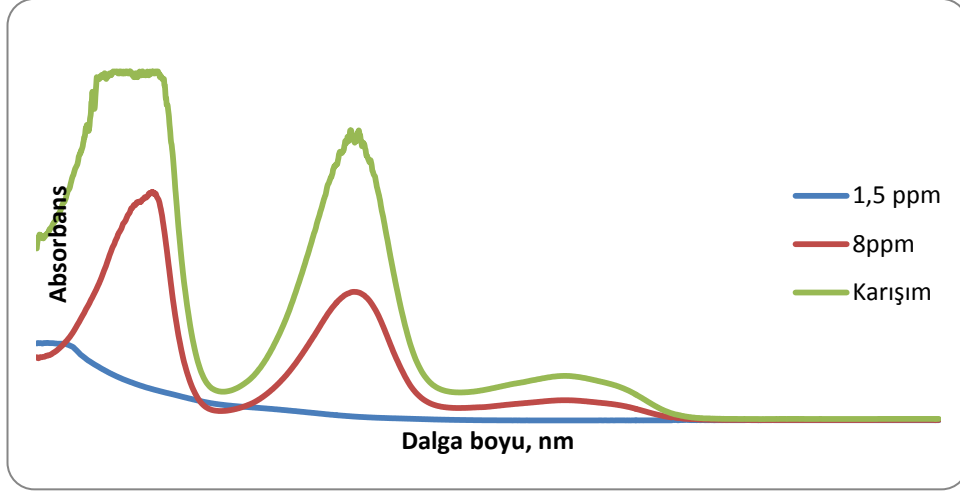
Kalibrasyonlar için rastgele kalibrasyon seti yerine simetrik kalibrasyon seti tercih edilmiştir. Bunun sebebi analiz esnasında meydana gelebilecek kalibrasyon hatalarını minimize etmektir. Çizelge 4.1. deki simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki projeksiyon grafiği Şekil 4.3 de görülmektedir.



Şekil 4.3. Simetrik kalibrasyon setinin iki boyutlu düzlemdeki grafiği

### 4.3. Spektral Koşulların Optimizasyonu

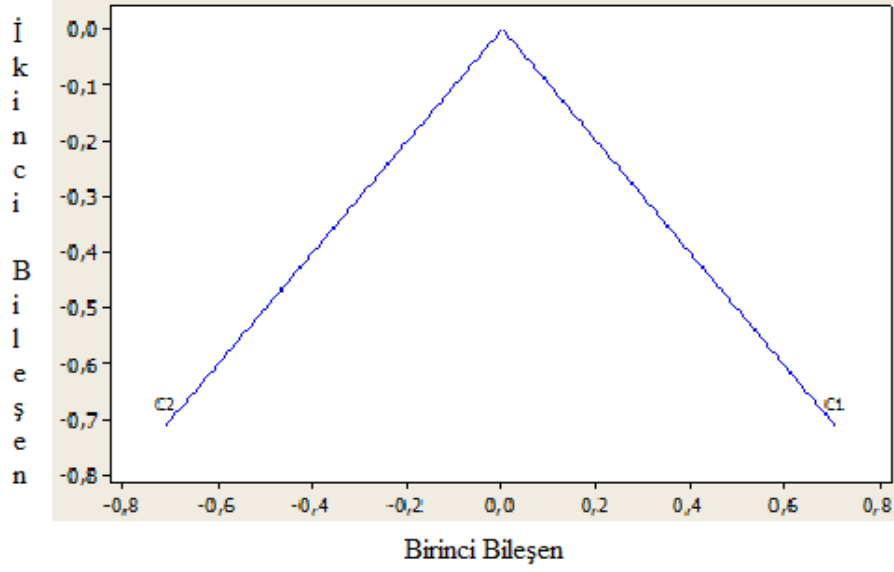
Spektrofotometrik çalışmalarda HCT ve IRB için metanol' ün uygun çözücü olduğu literatürden saptandı. Etanol içerisinde HCT ve IRB bileşikleri ile karşılık gelen karışımının 200-400 nm dalga boyu aralığında spektrumları alındı (Şekil 4.4.). Şekil 4.4. den de görüldüğü gibi her iki bileşik aynı dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır. Bu nedenle klasik spektroskopik yaklaşımlarla her iki bileşiğin aynı anda miktar tayinleri mümkün değildir.



Şekil 4.4. HCT (8 µg/mL) ve IRB (1,5 µg/mL) ile iki bileşiğe karşılık gelen karışımın absorpsiyon spektrumları (Etanol içerisinde).

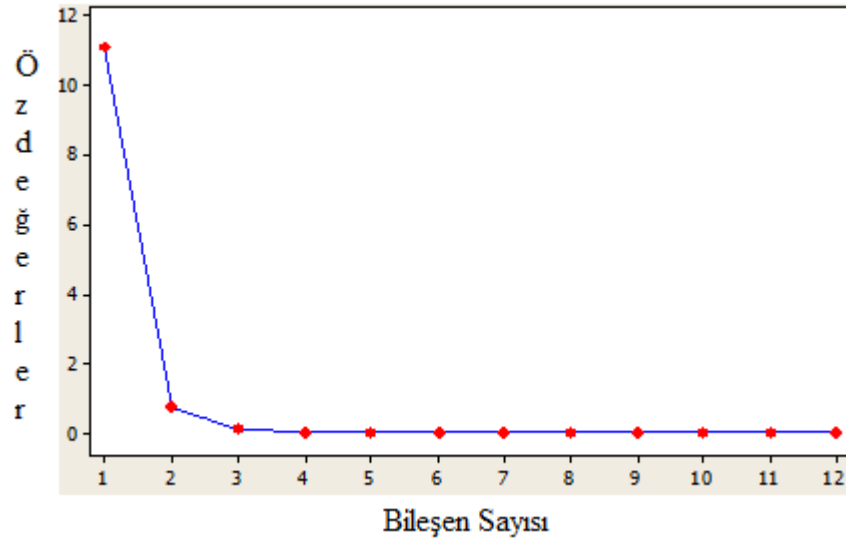
#### 4.3.1. Temel Bileşen Analizi (PCA)

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 yönelimleri 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 4.5. 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 (C1) ve bu bileşene 45 ° lik açı ile ikinci temel bileşen (C2) uzanmaktadır. Bir kare matris için, varyans-kovaryans matrisinin elemanları koordinat sisteminin orijini boyunca uzanır. Büyük aksın eğimi, birinci temel bileşen ile birleştirilmiş öz vektör (eigenvector)dür. Bu “özvektöre” karşılık gelen “özdeğer” (eigenvalue) Şekil 4.5. deki büyük aksın uzunluğudur. Şekil 4.6. de öz değerlerin grafiği görülmektedir. Öz değerlerin 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 (PLS, PCR... ) ışık tutmaktadır.



Şekil 4.6. Kemometrik verilerden elde edilen özdeğerlerin grafiği

Şekil 4.6’de belirgin bir şekilde görüldüğü gibi özdeğerler 1. değerden 2. değere doğru düşmüştür. İlk iki faktör, toplam varyansın % 99’undan daha fazla güvenilirdir.

#### 4.3.2. Temel Bileşen Regresyonu Yöntemi (PCR)

PCR yöntemi kalibrasyon seti için ölçülen absorbans matrisinin parçalanmasıyla elde edilen temel bileşen regresyonuna dayalı bir yöntemdir. Yöntemin algoritması Bölüm 1.4.1.2. de ayrıntılı olarak verilmiştir.

PCR kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 225 – 280 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda= 0,1$  nm aralıklarla absorbans değerleri okundu. Bölüm 1.4.1.2. de açıklanan PCR algoritmasına göre kalibrasyon setinin absorbans ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplandı. Kalibrasyon seti için absorbansların varyans-kovaryans matrisinin dekompozisyon işlemine tabi tutulmasından sonra derişimleri arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PCR kalibrasyonu kuruldu. İlaç aktif maddelerini içeren karışımların yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PCR kalibrasyonunda bu etken maddelerin miktar tayinleri gerçekleştirildi. PCR kalibrasyonu için Minitab 16 programında ilk olarak PCA değerleri hesaplanarak aşağıdaki çıktı elde edildi.

Özdeğer	11,100	0,768	0,103	0,024	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000
Oran	0,925	0,064	0,009	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Toplam	0,925	0,989	0,998	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Özdeğer	0,000	0,000	0,000						
Oran	0,000	0,000	0,000						
Toplam	1,000	1,000	1,000						

Değişken	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
C3	0,251	0,574	-0,684	0,078	-0,165	0,300	0,066	0,100	-0,015
C4	0,292	0,257	0,032	0,144	0,288	-0,290	-0,776	-0,217	0,094
C5	0,294	-0,218	-0,085	-0,062	0,156	0,066	0,072	-0,190	0,099
C6	0,294	-0,228	-0,088	-0,079	0,390	0,040	0,004	0,615	0,181
C7	0,294	-0,231	-0,082	-0,078	0,249	0,101	0,016	0,216	-0,007
C8	0,294	-0,231	-0,087	-0,056	0,095	0,160	0,081	-0,284	-0,122
C9	0,294	-0,234	-0,091	-0,071	0,012	0,189	0,091	-0,545	-0,199
C10	0,294	-0,158	0,136	0,880	-0,254	-0,064	0,131	0,097	0,001
C11	0,290	0,239	0,478	-0,168	-0,222	0,358	0,063	-0,072	0,639
C12	0,284	0,361	0,104	-0,104	0,213	-0,633	0,555	-0,095	-0,014
C13	0,290	0,239	0,454	-0,149	-0,101	0,211	-0,098	0,248	-0,696
C14	0,290	-0,271	-0,173	-0,336	-0,688	-0,412	-0,186	0,142	0,037

Değişken	PC10	PC11	PC12
C3	-0,023	-0,001	-0,001
C4	0,045	0,001	0,004
C5	-0,879	0,014	0,047
C6	0,133	0,509	-0,076
C7	0,152	-0,821	-0,177
C8	0,294	0,045	0,790
C9	0,262	0,247	-0,579
C10	0,002	-0,002	-0,013
C11	0,083	-0,025	-0,007
C12	0,057	-0,015	-0,007
C13	-0,136	0,042	0,011
C14	0,011	0,004	0,008

Bu çizelge ilk üç esas bileşenin absorbandsdaki değişiminin % 99,99 kadarından sorumlu olduğunu göstermektedir. Bu nedenle regresyon işlemi bu üç bileşen esas alınarak yapılabilir. Ancak biz yaptığımız bu çalışmada diğer bileşenleri de işin içine katarak bir regresyon eşitliği türettik. Türetilen regresyon eşitlikleri aşağıda verilmiştir.

$$C_{HCT} = 3,74085 - 1,02539 C3 + 2,25389 C4 - 8,57561 C5 - 42,6646 C6 - 43,3367 C7 + 100,85 C8 - 17,1849 C9 - 1,36288 C10 - 1,33026 C11 - 0,906702 C12 + 1,38961 C13 - 0,310555 C14$$

$$C_{IRB} = -2,51807 + 0,775372 C3 + 0,207193 C4 - 35,2502 C5 - 7,88088 C6 + 177,245 C7 - 38,2976 C8 - 6,85402 C9 + 0,325144 C10 + 0,463074 C11 + 0,00726139 C12 - 0,762433 C13 - 0,617616 C14$$

#### 4.3.2.1. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

PCR yöntemini valide etmek için HCT için 4-20 µg/mL ve IRB için 0,3-1,5 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 19 adet yapay karışım çözeltilisinden ibaret olan bir set hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti (çizelge 4.2.) kullanılarak kurulan PCR kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım (GK) değerleri; HCT için % 100,00 ve IRB için % 97,26 olarak bulundu. Standart sapma değerleri HCT için % 0,96 ; IRB için ise % 6,51 olarak hesaplandı. PCR kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2. de gösterildi.

Çizelge 4.3. HCT ve IRB sentetik karışımlarına PCR kalibrasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri

Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
HCT	IRB	HCT	IRB	HCT	IRB
4	0,3	4,03	0,27	100,81	90,88
4	0,6	4,03	0,68	100,83	114,58
4	0,9	4,04	0,86	101,03	95,58
4	1,2	3,97	1,17	99,40	97,79
4	1,5	3,91	1,51	97,90	101,29
8	0,3	7,91	0,27	98,85	91,09
8	0,6	8,10	0,58	101,32	96,67
8	0,9	8,12	0,86	101,56	96,36
8	1,2	7,95	1,21	99,44	101,65
8	1,5	7,91	1,47	98,90	98,56
12	0,3	11,88	0,31	99,51	102,27
12	0,6	11,94	0,57	100,57	96,07
12	0,9	12,06	0,87	100,84	97,50
12	1,2	12,10	1,17	99,92	97,35
16	0,3	15,98	0,26	99,57	87,54
16	0,6	15,93	0,64	100,48	108,10
16	0,9	16,07	0,80	99,95	89,81
20	0,3	19,99	0,27	100,01	90,29
20	0,6	20,00	0,56	100,00	94,79
			$\bar{X}$	100,00	97,26
			SS	0,96	6,51

#### 4.3.2.2. 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=36 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,11 olmasına karşılık HCT için hesaplanan F-test değeri  $1,76 \cdot 10^{-10}$  ve p-değeri 0,9999 ve IRB için hesaplanan F-test değeri 0,0125 ve p-değeri 0,9113 olarak bulunmuştur.

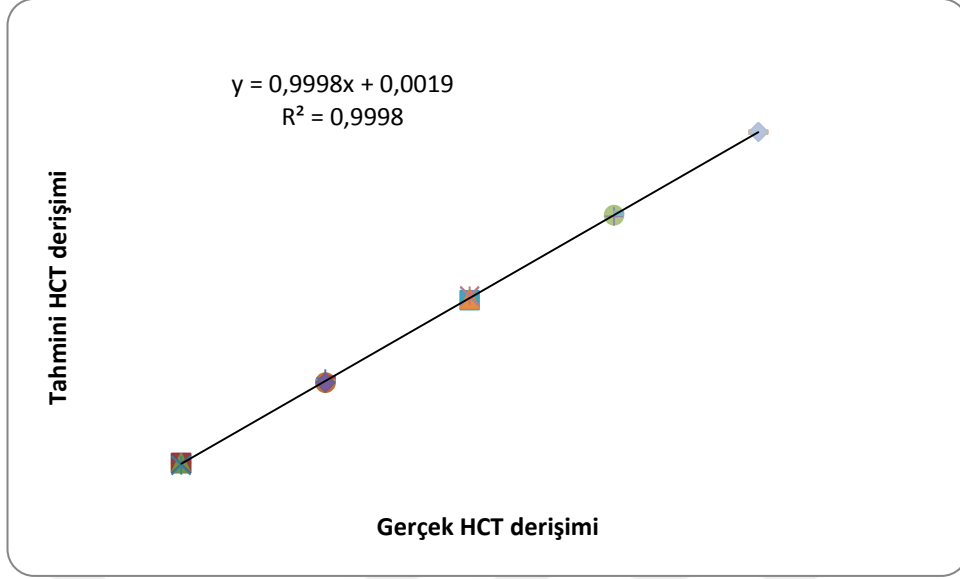
ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1 Grup içi serbestlik derecesi=36.  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p\text{-değeri} > p=0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

### **4.3.2.3. PCR yönteminde istatistiksel analiz**

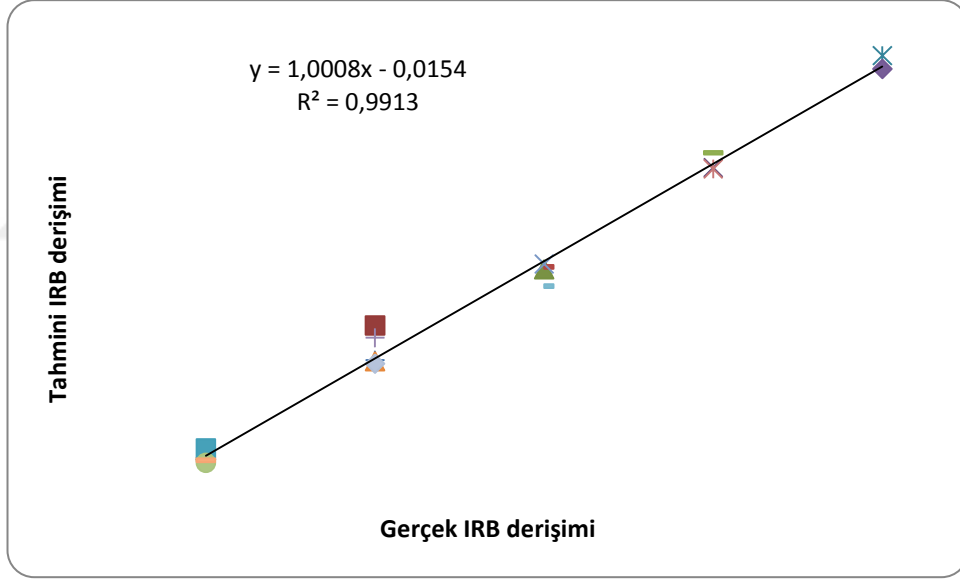
#### **4.3.2.3.1. Kalibrasyonun Standart hatası**

HCT ve AMH içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PCR kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Kurulan PCR kalibrasyonunda PRESS değeri HCT ve IRB için sırasıyla 0,0982 ve 0,0719 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür.

Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration → SEC), gerçek ve tahmin edilen derişimler arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve HCT ve IRB için sırasıyla 0,0299 ve 0,0397 olarak bulundu. Gerçek ve tahmin edilen derişim için lineer regresyon analiz sonuçları HCT için Şekil 4.7'de ve IRB için Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7. PCR kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar.



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

#### 4.3.2.4. PCR Yönteminin Farmasotik Preparatlara Uygulanması

PCR yönteminin tablet numunesine uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı. Havanda iyice toz edildikten sonra Co-İrba için 1 tablete karşılık gelen miktar olan 0,2480g tartılarak 100 mL'lik balon jodede üzerine bir miktar etanol eklenerek yarım saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve son hacim 100 ml' ye tamamlandı. Çözelti daha sonra süzülüp süzgeç kâğıdında kalan kısım 3 kez 10 mL



etanol ile yıkandı ve hacim 100 mL' ye tamamlanıp daha sonra çalışılacak olan aralığa seyreltildi. Bu analiz çözeltilerinin 225- 280 nm dalga boyu bölgesinde  $\Delta\lambda=1,0$  nm aralıklarla ölçülen absorbans değerleri Bölüm 1.4.1.2. de açıklanan PCR algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki HCT ve IRB hesaplandı. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi Co-İrba Tablet numunesi için ayrı ayrı tekrar edildi. Sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Co-İrba Tablet numunesine preparatına PCR yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

Co-İrda	
HCT	IRB
298.50± 1.50	24.05±2.67

#### 4.3.3. Kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS)

Bölüm 1.4.1.3'de ayrıntılı olarak algoritması verilen kısmi en küçük kareler yönteminde Çizelge 4.2'ye göre hazırlanan kalibrasyon seti kullanılmıştır. Ölçümler 200–400 nm arasında yapılmıştır. Daha sonra aralık kalibrasyon seti için ve kullanılacak olan istatistik programı doğrultusunda dalga boyu aralığı 225 – 280 nm olarak daraltılmıştır. 225; 230; 235; 240; 245; 250; 255; 260; 265; 270; 275 ve 280 karşılık gelen 12 noktada absorbans okunmuştur. PLS kalibrasyon için hazırlanan kalibrasyon setinin 225-280 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda= 0,1$  nm aralıklarla absorbanslar okunmuştur. Kullanılan istatistik program ile kalibrasyon setinin absorbans ve derişim değerlerinin varyans-kovaryans matrisleri hesaplanmıştır. Derişimler arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı PLS kalibrasyonu kurulmuştur. İlaç aktif maddelerini içeren ticari tablet numunesi de yukarıda belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerleri okunarak PLS kalibrasyonunda bu maddelerinin miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

#### 4.3.3.1. Kalibrasyon Yönteminin Validasyonu

PLS yöntemini valide etmek için HCT için 4-20 µg/mL ve IRB için 0,3-1,5 µg/mL çalışma aralığı içinde olacak şekilde farklı derişimlerde 19 adet yapay karışım çözeltilisinden ibaret olan bir set hazırlandı. Hazırlanan bu validasyon seti (çizelge 4.2.) kullanılarak kurulan PLS kalibrasyonun kesinlik ve doğruluğu test edildi. Geri kazanım (GK) değerleri; HCT için % 100,00 ve IRB için % 100,52 olarak bulundu. Standart sapma değerleri HCT için % 1,08 IRB için ise % 7,10 olarak hesaplandı. PLS kalibrasyon yönteminin sentetik karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4. de gösterildi.

Çizelge 4.5. HCT ve AMH sentetik karışımlarına PLS kalibrasyon yönteminin uygulanması ve elde edilen geri kazanım değerleri

Karışım (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)		Geri kazanım (%)	
HCT	IRB	HCT	IRB	HCT	IRB
4	0,3	4,01	0,31	100,36	101,75
4	0,6	4,04	0,70	101,11	117,65
4	0,9	4,07	0,77	101,83	86,60
4	1,2	3,97	1,15	99,38	95,92
4	1,5	3,89	1,56	97,35	104,11
8	0,3	7,92	0,26	99,01	87,59
8	0,6	8,09	0,61	101,15	102,11
8	0,9	8,09	0,91	101,20	102,16
8	1,2	7,98	1,17	99,77	98,01
8	1,5	7,91	1,52	98,89	101,70
12	0,3	11,87	0,32	98,98	107,60
12	0,6	11,93	0,63	99,45	105,47
12	0,9	12,01	0,89	100,10	99,51
12	1,2	12,18	1,14	101,50	95,20
16	0,3	16,03	0,30	100,23	100,99
16	0,6	15,91	0,65	99,44	108,37
16	0,9	16,05	0,84	100,31	94,28
20	0,3	19,98	0,30	99,91	100,41
20	0,6	20,00	0,60	100,03	100,50
			$\bar{X}$	100,00	100,52
			SS	1,08	7,10

#### 4.3.3.2. 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=36 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,11 olmasına karşılık HCT için hesaplanan F-test değeri  $3,63.10^{-11}$  ve p-değeri 0,9999 ve IRB için hesaplanan F-test değeri  $1,62.10^{-11}$  ve p-değeri 0,9999 olarak bulunmuştur.

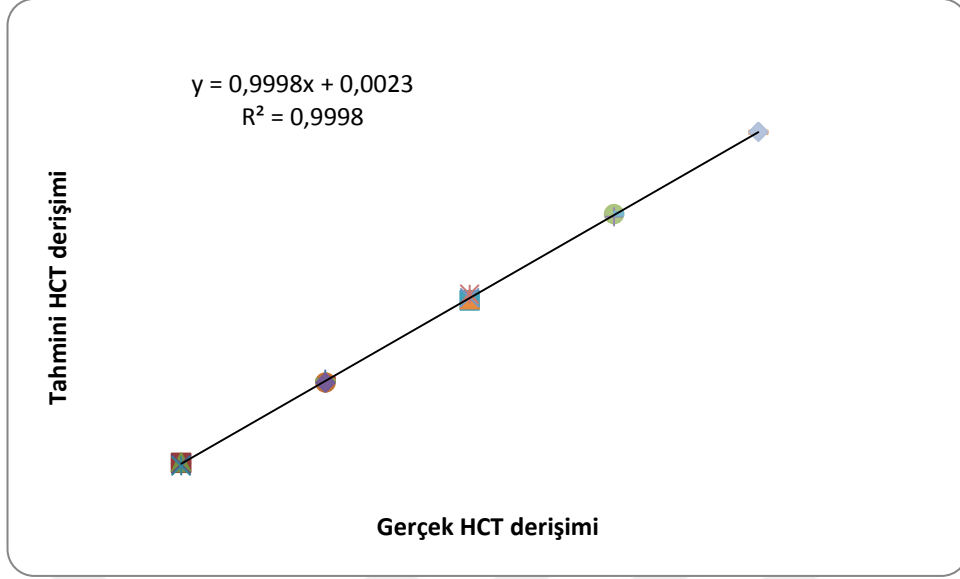
ANOVA testinde  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için % 95 güven aralığında elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Varyans analizinde iki serbestlik derecesi kullanılır. Gruplar arası serbestlik derecesi=1 Grup içi serbestlik derecesi=36  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  ve  $p > 0,05$  olduğu için bu kalibrasyon modeli ticari numunenin incelenmesinde kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.3.3.3. PLS yönteminde istatistiksel analiz

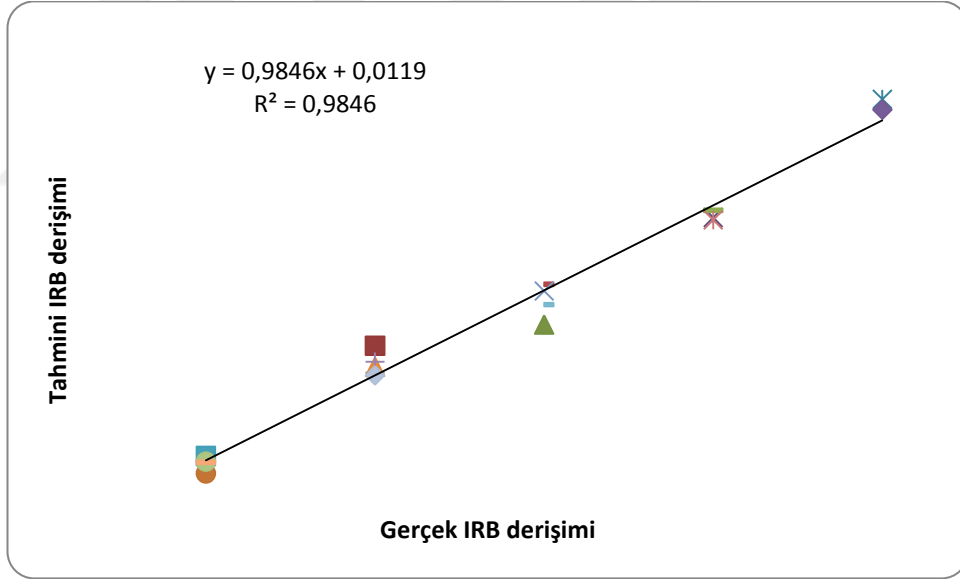
##### 4.3.3.3.1. Kalibrasyonun Standart hatası

HCT ve IRB içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS kalibrasyonun kurulmasında çapraz validasyon işlemi tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares → PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. Kurulan PLS kalibrasyonunda PRESS değeri HCT ve IRB için sırasıyla 0,1156 ve 0,0452 olarak hesaplanmıştır. PRESS değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır. Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür.

Kalibrasyonun standart hatası (Standard error of calibration → SEC), gerçek ve tahmin edilen derişimler arasındaki ilişkiye dayalı olarak hesaplandı ve HCT ve IRB için sırasıyla 0,0780 ve 0,0487 olarak bulundu. Gerçek ve tahmin edilen derişim için lineer regresyon analiz sonuçları HCT için Şekil 4.9'de ve IRB için Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. PLS kalibrasyon basamağında HCT için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar.



Şekil 4.10. PLS kalibrasyon basamağında IRB için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiğı ve istatistiksel sonuçlar.

#### 4.3.3.4. PLS Yönteminin Farmasotik Preparatlara Uygulanması

PLS yönteminin tablet numunesine uygulanmasında 20 tablet doğru bir şekilde tartıldı. Havanda iyice toz edildikten sonra Co-İrda için 1 tablete karşılık gelen miktar olan 0,2480g tartılarak 100 mL'lik balon jodede üzerine bir miktar etanol ile yarım saat manyetik karıştırmacıda karıştırıldı ve son hacim 100 ml' ye tamamlandı.

Çözelti daha sonra süzülüp süzgeç kâğıdında kalan kısım 3 kez 10 mL metanol ile yıkandı ve hacim 100 mL'ye tamamlanıp daha sonra çalışılacak olan aralığa seyreltildi. Bu analiz çözeltilerinin 225- 280 nm dalga boyu bölgesinde  $\Delta\lambda= 0,1$  nm aralıklarla ölçülen absorbans değerleri Bölüm 1.4.1.3. de açıklanan PLS algoritması uygulandı ve tablet içeriğindeki HCT ve IRB hesaplandı. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır.

Yukarıda açıklanan tablet analiz işlemi Co-İrda Tablet numunesi için ayrı ayrı tekrar edildi. Sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Co-İrda Tablet numunesine PLS yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar.

<b>Co-İrda</b>	
HCT	AMH
299.48± 1.20	24.56±2.42

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde insanların hastalıklardan kurtulmak amacıyla sık olarak tükettikleri en etkili maddeler ilaçlardır. İlaçlar canlı bünyesinde içerdikleri etken maddeler sayesinde etki gösterebilmektedir. Bu etken maddeler ise giriş kısmında da belirtildiği üzere belirli miktarlarda alındıklarında canlı bünyesinde olumlu etki gösterirken aşırı alınması durumunda tehlikeli boyutlarda zararlar veren kimyasal maddelerdir. Bu nedenle ilaç analizlerinde etken madde analizi önemli yer tutmaktadır. Bu analizlerde genel olarak spektroskopik ve kromatografik yöntemler tercih edilmesine rağmen pahalı yöntemler olması ve çok uzun süren ön ayırma işlemleri bu yöntemlerin kullanımını sınırlamaktadır.

Bu tez çalışmasında kemometrik kalibrasyonların ilaç etken maddelerinden HCT ve IRB bileşiklerinin hiçbir ön ayırma işlemi yapmaksızın aynı anda analizine uygulanmasında üç farklı kemometrik yöntem geliştirilmiştir. Bunlar PCA, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleridir.

Öncelikle ilaç etken maddelerinin saf haldeki spektrumları alınıp Çizelge 4.1. de görüldüğü üzere ayrı dalga boylarında absorbans vermelerinden yararlanarak bu etken maddelerin sentetik karışımları hazırlanmıştır. Şekil 4.4. de görüldüğü gibi her iki bileşik aynı dalga boyu aralığında girişim yapmaktadır bu durumda her iki bileşiğin klasik spektroskopik yaklaşımlarla aynı anda miktar tayinlerinin mümkün olmadığı görülmüştür.

Geliştirilen PCR ve PLS kemometrik yöntemlerinin kesinlik ve doğruluğu test edilmiştir. Kesinliğin sayısal ölçütü olan bağıl standart sapmanın düşük olması kesinliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.3. ve çizelge 4.5. de görüldüğü üzere bağıl standart sapmaların düşük olduğu görülmektedir. Doğruluğun sayısal ölçütü olan PRESS (Tahmin edilen hataların kareleri toplamı) değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesinin yüksek olduğunun göstergesidir. PCR yöntemi ile elde edilen PRESS değeri HCT için 0,0982 ve IRB için 0,0299 olarak hesaplanıp PLS

yöntemi ile elde edilen PRESS değeri HCT için 0,1156 ve IRB için 0,0452 olarak hesaplanmıştır ve bu değerlerin yeterince küçük olduğu görülmüştür.

PCR ve PLS yöntemlerinin doğruluk ve kesinliğini valide etmek için elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanıp grup içi ve gruplar arası serbestlik derecesi ile tablodan okunan F değerine karşın hesaplanan F değerleri kıyaslanmıştır. Tablodan okunan F değeri 4,11 olup PCR yönteminde HCT için hesaplanan F değeri  $1,76 \cdot 10^{-10}$  ve IRB için 0,0125 bulunmuş; PLS yönteminde HCT için  $3,63 \cdot 10^{-11}$  ve IRB için  $1,62 \cdot 10^{-11}$  olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar  $F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}}$  olduğu için bu kalibrasyon modellerinin ticari numunelerinin incelenmesinde kullanılabilir olduğu görülmüştür.

PCR kalibrasyon basamağında şekil 4.7. de HCT için ve şekil 4.8. de IRB için gerçek ve tahmin edilen derişimlerin lineer regresyon grafiklerinde görüldüğü üzere çalışılan aralıklarda doğrusal sonuçların elde edildiği görülmektedir. Aynı şekilde PLS yöntemi için de şekil 4.9. da HCT için ve şekil 4.10. da IRB için de aynı durum görülmektedir.

PCR ve PLS yöntemlerinin uygulanmasıyla HCT ve IRB için elde edilen geri kazanım değerleri çizelge 4.3. ve 4.5. de gösterilmiştir ve iki yöntem de elde edilen geri kazanımlar yüksek değerlerde bulunmuştur.

Son olarak PCR ve PLS yöntemleri analiz edilen maddelerin ticari preparatlarına uygulanmış ve tabletlerde belirtilen HCT ve IRB miktarları ile çizelge 4.4. ve çizelge 4.6. da bulunan bu aktif maddelerin miktarının birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, geliştirilen kemometrik yöntemlerin birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür ve bu yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin yüksek olup duyarlı ve doğru sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar geliştirilen bu kemometrik yöntemlerin HCT ve IRB içeren ilaç tabletlerinin analizinde kullanılabileceğini göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Akpolat, O., Kartal, F., 2009. Kimyacılar İçin Bilişim Teknolojileri, 3-4

Alanazi, Amer M., Abdelhameed, Ali S., Khalil, Nasr Y., 2014, HPLC Method with Monolithic Column for Simultaneous Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Tablets , Acta Pharmaceutica, 2, 187 – 198

Coudore, F., Harvard, L., Lefevre, S., 2011 ,HPLC - DAD Analysis of Hydrochlorothiazide and Irbesartan in Hypertensive Patients on Fixed - Dose Combination Therapy, Chromatographia, 74, 598-565

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.

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.

El-Desoky, Hanaa S., Ghoneim, Mohamed M., Habazy, Allia. D., 2011 Voltammery of Irbesartan Drug in Pharmaceutical Formulations and Human Blood: Quantification and Pharmacokinetic Studies, Journal of the Brazilian Chemical Society , 22, 239-247

Hafez, H.H., Elhanawane, A.A, Abdellaziz, L.M., 2013, Quantitative Determination of three Angiotensin - II - receptor Antagonists in Presence of Hydrochlorothiazide by RP - HPLC in their Tablet Preparations , Iranian journal of Pharmaceutical Research ,12 ,635-643

Henden, E., 2006. Spektroskopi Ders Notları, 16-33

Hillaert, S., Bossche ,W.V., 2003, Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Several Angiotensin - II - receptor Antagonists by Capillary Electrophoresis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 31, 329 -339

Joseph-Charles, J.,Brault,S., Boyer, C.,Langlois,M.-H.,Cabrero,L.,Dubost,J.-P., 2007,Simultaneous Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide : in Tablets by Derivate Spectrophotometry 23.07.2014, <http://dx.doi.org/10.1081/AL-120024337>



- Kaya, B., 2007. Kombine Farmasötik Preparatlardan Telmisartan ve Hidroklorotiyazid'in kemometrik Kemometrik Kalibrasyon Yöntemleriyle Aynı Anda Miktar Tayinleri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 104s, Ankara.
- Koyutürk, S.,Can, O.N., Atkosar Z.,Arli, G.,2014, A novel Dilute and Shoot HPLC assay Method for Quantification of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Combination Tablets and Urine Using Second Generation C18 - Bonded Monolithic Silica Column with Double gradient elution ,Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 97, 103-110
- Liu, F., Zhang,J.,Xu Yu ,Gao,S., Guo, Q.,2008, Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Valsartan in Human Plasma by Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry,23.07.2014, <http://www.tandfonline.com/Loi/Lanl20>
- Martens, H., Naes, T. 1989. Multivariate Calibration. Journal of Chemometrics, 4 (6), 441-444.
- Pan, D., Crull, G., Yin, S., Grosso, J., 2014, Low Level Drug Product API Form Analysis - Avalide Tablet NIR Quantitative method Development and Robustness Challenges ,Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 89,268-275
- Rahman, N., Siddiqui, M. R., Azmi, S.N.H., 2006, Quantitative analysis of Irbesartan in Commercial Dosage Forms by Kinetic Spectrophotometry, Chemical &Pharmaceutical Bulletin , 54, 626-631
- Rane, V.P., Patil , J.N., Sangshetti, J.N., Yeole, R.D., Shinde D.B., 2010, Department of Chemical Technology, Dr.Babasaheb Ambedkar Marathwada University, Aurangabad - 431004(MS), India and Wockhardt Research Centre, Aurangad - 431210(MS),India
- Skoog, D.A., Holler,F.J., Nieman, T.A., 1998. Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık, Özkan Matbaacılık, 849, Ankara
- Şener, M., 2006. İçme Sularında Kalsiyum ve Magnezyumun Spektrofotometrik Metotla Simultane Tayini ve Yapay Sinir Ağları İle Kemometrik Analizi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49s, Isparta.
- Tutunji, L.F., Tutunji, M.F., Alzoubi, I.M., Khabbas, M.H.,Arida, A.I., 2010, Simultaneous Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma Using HPLC coupled with Tandem Mass Spectrometry: Application

to Bioequivalence studies, Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis,51, 985-990

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

Vandeginste B. M. G., Massart D. L., Buydens L. M. C., De Jong S., Lew\_ P. J. And Smeyers-Verbeke. J. 1998. Handbook Of Chemometrics And Qualimetrics Part B, Elsevier, Amsterdam.

Vujic, Z., Mulavdic, N.,Smajic, M., Brboric, J.,Stankovic,P.,2012,Simultaneous Analysis of Irbesartan and Hydrochlorothiazide : An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocal ,23.07.2014, [www.mdpi.com/journal/moleculs](http://www.mdpi.com/journal/moleculs)



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yaşar EMİR ÜNSAL

Doğum Yeri ve Yılı : Keçiborlu, 1989

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : rose\_yasar\_18@hotmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Keçiborlu Anadolu Lisesi, 2007

Lisans : Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 2012

### Mesleki Deneyim

Cleanrose Kozmetik, Kimyager, 2013 – 2014

Safanur Boya ve Yapı Kimyasalları, Kimyager, 2014 - 2015

Rosa Natura Kozmetik, Kimyager, 2015 - halen

### Yayımları

Ünsal E., Aktaş A.H., 2015. Spectrometric determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablets by principal component regression and partial least squares calibration, ChemXpress 8(3), 152-157.