

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOKLU İLAÇ KARIŞIMLARININ
SPEKTROFOTOMETRİK OLARAK KANTİTATİF
ANALİZİ İÇİN KEMOMETRİK VE GRAFİKSEL
METOT GELİŞTİRME**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Arzu ÇETİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR

Mayıs 2008

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOKLU İLAÇ KARIŞIMLARININ
SPEKTROFOTOMETRİK OLARAK KANTİTATİF
ANALİZİ İÇİN KEMOMETRİK VE GRAFİKSEL
METOT GELİŞTİRME**

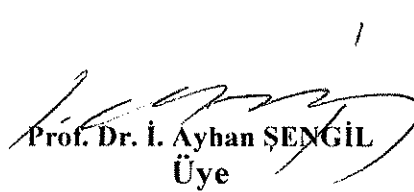
YÜKSEK LİSANS TEZİ


Kimyager Arzu ÇETİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 21 / 05 /2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR
Jüri Başkanı


Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL
Üye


Doç. Dr. Mahmut ÖZACAR
Üye

TEŞEKKÜR

Tezin hazırlanmasında bana destek veren, gösterdiği iyi niyet ve sabırdan dolayı danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR'e ve laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Daima yanımda olan, en büyük desteğim çok kıymetli annem, babam, kardeşlerim ve eşime candan teşekkür ederim. Ve gösterdiği sabır için canım oğlum BARAN'a....

Arzu ÇETİN

Mayıs 2008, ADAPAZARI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
ETKEN MADDELERİN YAPISILARI VE GENEL ÖZELLİKLERİ.....	3
2.1. Asetaminofenin (Parasetamol) Yapısı ve Genel Özellikleri.....	3
2.2. Asetil salisilik Asidin (Aspirin) Yapısı ve Genel Özellikleri.....	5
2.3. Kafeinin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	7
BÖLÜM 3.	
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERİN TEMEL İLKELERİ.....	8
3.1. Elektromanyetik Işımanın Özellikleri.....	8
3.1.1. Işımanın dalga özelliği.....	9
3.1.2. Işımanın tanecik özelliği.....	10
3.2. Işımanın Absorpsiyonu.....	10
3.3. Beer Yasası.....	12
3.3.1. Beer yasaının karışımlara uygulanması.....	13
3.3.2. Beer yasaından sapmalar.....	13

BÖLÜM 4.

UV VE GÖRÜNÜR BÖLGE ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRİSİ....	14
4.1. Cihazın Bileşenleri.....	16
4.1.1. Işık kaynakları.....	16
4.1.2. Monokromatörler (Dalgaboyu seçiciler).....	16
4.1.3. Örnek kapları.....	16
4.1.4. Dedektör.....	16
4.2. Kullanılan Çözücüler.....	17
4.3. Kullanılan Cihaz Tipleri.....	18
4.3.1. Tek ışık yollu spektrofotometreler.....	18
4.3.2. Çift ışık yollu spektrofotometreler.....	19
4.4. Analitik Uygulamaları.....	20

BÖLÜM 5.

TÜREV VE ÇİFT DALGA BOYLU SPEKTROFOTOMETRİ.....	21
5.1. Türev Spektrofotometrisi.....	21
5.1.1. Türev tekniğinin gelişimi.....	24
5.1.2. Türev tekniğinin teorik önemi.....	24
5.1.3. İyi çözünen spektralar.....	26
5.1.3.1. Optik metotlar.....	26
5.1.3.2. Hesaplama metotları.....	26
5.1.3.2.1. Eğriye uydurma metodu.....	26
5.1.3.2.2. Sayısal çoklu bileşen analizi.....	27
5.1.3 Türev alma ve türev spektrumu.....	28
5.1.4. Analitik bantların türevi.....	34
5.2. Çift Dalga Boylu Spektrofotometri.....	38
5.3. Oran Spektrofotometri.....	40
5.3.1. Oran spektranın birinci türevi.....	41

BÖLÜM 6.

KULLANILAN KEMOMETRİK TEKNİKLER.....	42
6.1. Klasik En Küçük Kareler Metodu.....	43
6.1.1. Kalibrasyon hesaplaması.....	44
6.1.2. Saf bileşenlerin spektralarının tahmini.....	45
6.1.3. Alıştırma gruplarına uygunluk.....	46
6.2. Temel Bileşen Regresyonu Metodu	47
6.2.1. Kalibrasyonun hesaplanması.....	47
6.2.2. Bilinmeyenlerin tahmini.....	48
6.3. Kısmi En Küçük Kareler Metodu.....	49
6.4. Kullanılan Tekniklerde Hata Hesaplanması.....	51

BÖLÜM 7.

GİRİŞ.....	53
7.1. Enstrumentasyon.....	55
7.2. Ticari Tablet Formülasyonu.....	55
7.3. Standart Çözeltiler.....	55
7.4. Tablet Analizi.....	56

BÖLÜM 8.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	57
8.1. Birinci Türev Spektrofotometri Metodu.....	59
8.1.1. Oran spektrofotometri metodu.....	59
8.1.2. Sıfır kesim noktası metodu.....	60
8.2. Kullanılan Etkin Maddeler İçin Metot Geliştirme.....	60
8.2.1. Kemometrik metotlar.....	67
8.3. Metot Validasyonu.....	72
8.4. Sonuçlar.....	80

KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$^{\circ}\text{C}$	Santigrad Derece
g	Gram
mol	Mol
cm^3	Santimetre küp
%	Yüzde
λ	Dalga boyu
ν	Frekans
c	Işık hızı
E	Enerji
h	Planck sabiti
J	Joule
I_0	Gelen ışığın şiddeti
I	Çıkan ışığın şiddeti
b	Işın yolu
T	Geçirgenlik
A	Absorbans
ϵ	Molar absorptivite
C	Derişim
UV	Ultraviyole
nm	Nanometre
UV-VIS	Ultraviyole görünür
d^1	Birinci türev
d^2	İkinci türev
SNR	Sinyal-gürültü oranı
RC	Rezistans-sığa devresi
CLS	Klasik en küçük kareler metodu
PCR	Temel bileşen regresyonu

PLS	Kısmi en küçük kareler metodu
K	Kalibrasyon matris
V_{c^r}	Matriks içeren öz vektörler
F	Kalibrasyon katsayısı
PRESS	Tahmin edilen artan hataların kareleri toplamı
SEC	Kalibrasyonun Standart Hatası
SEP	Tayinin Standart Hatası
r	korelasyon katsayısı
ACE	Asetaminofen(parasetamol)
ASP	Asetil salisilik asit (aspirin)
KAF	Kafein
mg	Miligram
mL	mililitre
μg	Mikrogram
HCl	Hidroklorik asit
μm	Mikrometre
SE(r)	Doğrusal regresyonun standart hatası
SE(m)	Eğimin standart hatası
SE(n)	Kesimin standart hatası
SD	Standart sapma
RSD	Bağıl standart sapma
ORT	Ortalama
SE	Standart hata
S_b	Regresyon denkleminin eğiminin standart sapması
S_a	Kesimin standart sapması
CL	Güvenilirlik sınırı
LOD	Tayin limitleri
LOQ	Kantitatif limitler
ANOVA	Varyans analizi
n	Denklemin kesim noktası
m	Denklemin eğimi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Asetaminofen (Parasetamol); $C_8H_9NO_2$	3
Şekil 2.2.	Asetil salisilik asit (aspirin) ; $C_9H_8O_4$	5
Şekil 2.3.	Kafein; $C_8H_{10}N_4O_2$	7
Şekil 3.1.	Elektromanyetik ışımının dalga özelliği.....	9
Şekil 3.2.	I_0 başlangıç gücündeki bir ışımın gücünün, litrede c mol absorplayıcı madde içeren b cm ışın yoluna sahip bir çözelti tarafından azaltılması, $I < I_0$	12
Şekil 4.1.	Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri.....	15
Şekil 4.2.	Asetaldehitin absorpsiyon spektrumu üzerine çözücü etkisi.....	17
Şekil 4.3.	Çift ışık yollu spektrofotometrelerde tek dedektör kullanılması durumunda alınan sinyaller.....	19
Şekil 5.1.	Sudaki fenolün absorpsiyon spektrumu (—), birinci (---) ve ikinci (.....) türev spektrumu.....	25
Şekil 5.2.	Üst üste geçmiş üç analitik pik.....	27
Şekil 5.3.	Belirlenen noktadaki eğrinin tanjantları.....	29
Şekil 5.4.	Örnekten geçen ışığın şiddetindeki azalma (LTH: tabaka kalınlığı, I: şiddet, I_0 : orijinal ışığın şiddeti).....	30
Şekil 5.5.	FWHM ve σ nun şematik çizimi.....	35
Şekil 5.6.	Analitik bantların türevi.....	37
Şekil 5.7.	Çift dalga boylu spektrofotometri.....	38
Şekil 5.8.	Sodyum nitrat ve sodyum nitritin hesaplanması.....	39
Şekil 6.1.	Saf bileşenlerin spektralarının CLS hesaplamaları.....	45
Şekil 6.2.	Beklenen ve tahmin edilen konsantrasyonlar için A_1 ve A_2 alıştırma gruplarına uygunluk.....	47
Şekil 8.1.	Sıfırıncı derece ASP, ACE VE KAF spektrumu.....	59
Şekil 8.2.	ACE spektrumununun ASP ve CAF toplamına bölünmesinden elde edilen spektrum.....	62

Şekil 8.3.	ACE spektrumunun ASP ve CAF toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumun türevi.....	63
Şekil 8.4.	ASP spektrumunun KAF ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrum.....	64
Şekil 8.5.	ASP spektrumunun KAF ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumun türevi.....	65
Şekil 8.6.	KAF spektrumunun ASP ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spectrum.....	66
Şekil 8.7.	KAF spektrumunun ASP ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumun türevi.....	67
Şekil 8.8.	PLS kalibrasyon kullanılarak ACE, ASP ve KAF' nin tahmin edilen sonuçları için konsantrasyon sonuçları.....	69
Şekil 8.9.	PCR kalibrasyon kullanılarak ACE, ASP ve KAF' nin tahmin edilen sonuçları için konsantrasyon sonuçları.....	70
Şekil 8.10.	CLS kalibrasyon kullanılarak ACE, ASP ve KAF' nin tahmin edilen sonuçları için konsantrasyon sonuçları.....	71

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.	UV ve görünür bölge için çözücüler.....	18
Tablo 8.1.	ACE, ASP ve KAF içeren kalibrasyon karışımları.....	68
Tablo 8.2.	Türev metodundan elde edilen kalibrasyon grafiğinin istatistiksel sonuçları.....	72
Tablo 8.3.	Uygulanan kalibrasyon teknikleri ile farklı sentetik karışımlarda ACE, ASP ve KAF için elde edilen geri kazanımlar.....	74
Tablo 8.4.	Önerilen kalibrasyon teknikleri tarafından ticari tablete uygulanan standart ekleme metodunun sonuçları.....	75
Tablo 8.5.	Önerilen kalibrasyon metotları tarafından farmokolojik dozaj formlarında elde edilen sonuçlar.....	77
Tablo 8.6.	Kemometrik metotlardan elde edilen istatistiksel sonuçlar.....	78

ÖZET

Anahtar kelimeler: Asetaminofen, asetil salisilik asit, kafein, oran-türev spektrofotometri, CLS, PCR, PLS

Üçlü ilaç karışımlarının tablet analizleri için yeni bir metot geliştirildi. Bu metot uygulaması için seçilen ilaç karışımı aspirin, parasetamol ve kafein içermektedir. Bu metot oran-türev ve sıfır kesim noktası içermektedir. Bu metotla bulunan sonuçlar PLS PCR ve CLS gibi kemometrik metotlarla bulunanlarla karşılaştırıldı. Tüm bu metotlarda elde edilen kalibrasyon grafikleri r değerleri 0.9970 ve 1.0000 arasında değişmekte ve 40 $\mu\text{g/l}$ kadar lineer özellik göstermektedir. Her iki metot için yapılan ölçümler 210 ila 300 nm arasında yapılmıştır. Oran-türev metodu için yapılan hesaplamalarda 265 nm, 217 nm ve 222 nm noktalarında sıfır kesim noktaları elde edildi ve bu metot için kalibrasyon grafikleri bu noktalar kullanılarak oluşturuldu. Tayin sınırları, LOD ve kantitatif sınırlar, LOQ sınırlarının da dahil olduğu tüm istatistiksel parametreler hesaplandı ve LOD için 0.0550 ve 0.8066, LOQ için bulunan 0.1834 ve 4.0254 arasında bu değerler hesaplandı. Tüm numune çözeltileri kararlılık testlerine tabi tutuldu ve çözeltiler deneylerden hemen önce hazırlanarak kullanıldı. Türetilen oran-türev spektrofotometrisi ve kemometrik metotlar sentetik karışımlara uygulanarak her bir metot göre ilaçlar için RSD değerleri bulundu ve bulunan değerler oran-türev spektrofotometrisi için 0.39 ve 3.40 arasında, kemometrik metotlar için 2.00 ve 5.60 arasında bulundu. Geri kazanımlar ise oran-türev metodu için % 99.1 ve % 100.6 arasında, kemometrik metotlar için % 99.0 ve % 101.0 arasında bulundu. Geliştirilen metot basit kolay ve her hangi bir ön ayırmayı gerektirmemektedir.

CHEMOMETRIC and GRAPHICAL METHOD DEVELOPMENT FOR THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF MULTI COMPONENT DRUGS

SUMMARY

Keywords: acetaminophen (paracetamol), acetylsalicylic acid, caffeine, ratio-spectra derivative spectrophotometry, CLS, PCR, PLS

A new method was developed for the determination of the ternary mixtures in the pharmaceutical tablet preparations. The selected drug combination for the application of this new method is aspirin, acetaminophen and caffeine. Developed method contains ratio derivative and zero-crossing. The calculated results were compared with the results that obtained using chemometric methods namely PLS, PCR and CLS. In all the procedures, the calibration plots are linear up to 40 ug/ml for each drug, with r ranging from 0.9970 to 1.0000. In the ratio-spectra and chemometric methods, the measurements were taken between 210 and 300 nm. For ratio-derivative method zero crossings were obtained at 265 nm, 217 nm and 222 nm. And related calibration curves were prepared by using these points. All the statistical parameters were calculated including limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ). LOD and LOQ were found, respectively, from 0.0550 to 0.8066, and from 0.1834 to 4.0254 ug/ml. All the samples were tested for stability in solution and in the course of actual analysis and solutions were prepared just before the measurement. The developed ratio-derivative spectrophotometric method and chemometric methods were applied to synthetic mixtures and the RSD values ranged between 0.39 and 3.40 % for ratio-derivative and 2.00 and 5.60 % for chemometric methods. The recoveries were obtained between 99.1 and 100.6 % (ratio-spectra) and between 99.0 ve 101.0 % (chemometric methods). The procedure is simple, rapid, and did not require any preliminary separation or treatment of the samples.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İlaçlar, günlük yaşamımızda önemli bir yer teşkil etmektedir. Bunların üretiminden kullanımına hatta vücuttan atılımına kadar olan tüm noktalarda miktar analizleri önemlidir. İlaçların tablet üretiminde tablet içine konulan miktarlar sağlığımız için çok önemlidir. Alınan dozların fazla olması durumunda önemli sağlık problemlerine neden olurken az olmasında her hangi bir faydası olmayabilir. Bu ilaçların vücuda alındığında ise kana geçme miktarları daha sonra ne kadarının boşaltım yoluyla ne kadarının karaciğerde kullanıldığının bilinmesi çok önemlidir.

Söz konusu olan ilaç analizlerinin yapılabilmesi için, önemli olan öncelikle analiz için kullanılacak aletler ve elde edilecek verilerin anlaşılabilir hale getirilebileceği matematiksel metotlardır. Günümüzde analiz için kullanılan sıvı kromatografisi kütle spektrometresi gibi son derece hassas gelişmiş fakat pahalı aletler varken ucuz ve hassas olup ama karmaşık sonuçlar veren UV Visible spektrofotometreler gibi her laboratuarda bulunan aletlerde vardır. UV Visible aletlerinin kullanılması tek etken madde içeren ilaçların analizinde her hangi bir sorun oluşturmazken birbiri ile örtüşen spektrum veren ilaç karışımları analizinde sorunlar oluşturabilir ve bu durumda değişik matematiksel işlemlerin kullanılması gerekebilir.

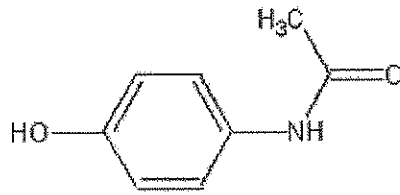
Birden fazla etken madde içeren ilaç karışımlarının spektrofotometrik analizlerinde değişik metotlar kullanılabilir. Bunlardan ilki, grafik metotlar ikincisi ise kemometrik metotlardır. Bunlara ilaveten yeni hibrit metotlar geliştirilmiştir ki bunlar bu iki metodun değişik türlerinin kombinasyonlarından oluşmaktadır. Karışımların analizinde sıklıkla kullanılan metot türev metodu olmuştur. Sıklıkla kullanılmasının nedeni, kolay olması ve karmaşık matematiksel hesaplamaları ihtiyaç olmamasıdır. Bunun yanında eğer ikili karışımlar sadece türev metodu ile ayrılamıyorsa önce oran daha sonra türev uygulanarak madde spektrumlarının birbirinden ayrılması sağlanır. Daha karmaşık durumlarda ise üçlü karışımlar gibi türev ya da oran metotları pek

uygulan bir durum değildir. İkili ve daha fazla karışımların analizinde aynı zamanda kemometrik metotlar da kullanılmaktadır. Özellikle bileşen sayısı dört ve daha fazla olduğunda bu metotlar önem kazanmaktadır. Bu metotlar matematiksel olarak daha fazla bilgi ve karmaşık algoritmalar içermesi dolayısıyla herkes tarafından kolayca anlaşılabilen ve uygulanabilen metotlar değildir.

Bu çalışmada grafik metotlar olarak bilinen ve üçlü karışımlara uygulanabilen bir oran türev metodu geliştirildi. Metodun temelinde türev uygulamasından sonra elde edilen değerlere göre sıfır kesim noktasında oluşturulan kalibrasyon denklemleri bulunmaktadır. Elde edilen absorpsiyon spektrumlarına önce oran uygulanmaktadır. Bunun için iki maddenin absorpsiyon spektrumları toplamına tüm spektrumlar bölünür ve daha sonraki basamakta dalga boyuna göre türev alınır ve toplanan iki maddenin sıfır olduğu noktada diğer maddenin artan miktarına bağlı kalibrasyon oluşturulur ve elde edilen kalibrasyonda bilinmeyen madde miktarları tespitinde kullanılır. Geliştirilen metoda kullanılan model karışım üç etken madde içeren bir ilaç. Bu ilaca ait diğer metotlar geliştirilmiş fakat burada geliştirilen yeni metot için en uygun model olduğu için seçilmiştir.

BÖLÜM 2. ETKEN MADDELERİN YAPILARI VE GENEL ÖZELLİKLERİ

2.1. Asetaminofenin (Parasetamol) Yapısı ve Genel Özellikleri



Şekil 2.1. Asetaminofen (parasetamol) ; C₈H₉NO₂

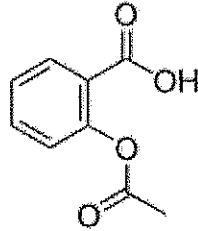
Asetaminofen, beyaz, kokusuz kristalize bir tozudur. Suda sınırlı ölçüde çözünür. Eter ve metilen klorürdeki çözünürlüğü çok azdır. Diğer bir adı; N-asetil-p-aminofenol dür. Kimyasal formülü C₈H₉NO₂'dir. Molekül ağırlığı 151.17 g/mol, erime noktası 169 °C yoğunluğu 1.263 g/cm³ dür. Asetaminofen, 30 °C nin altındaki oda sıcaklığında ve hava almayan kaplarda saklanmalıdır, ışıktan korunmalıdır.

Asetaminofen, paraaminofenol türevi analjezik ve antipiretik bir ilaçtır. Ağrı eşiğini yükselterek analjezik, hipotalamustaki termoregülatör merkezi üzerine etkisi nedeni ile de antipiretik etki gösterir. Parasetamol, ağırlıklı olarak merkezi sinir sisteminde prostaglandin sentezini durdurarak ve daha az oranda periferde ağrı yanıtını bloke ederek etki eder.

Asetaminofen, oral ve rektal yolla uygulanır. Oral yolla uygulandıktan sonra parasetamolün tamamına yakın bir bölümü ince bağırsaktan hızla emilir ve yaklaşık 0.5 ile 2 saat içinde en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşır. Hızla ve eşit olarak

dokulara dağılır. %65 ve %89 arasındaki mutlak yarılanma oranları ilk geçiş etkisini gösterir. Parasetamol, karaciğerde, tamamı 24 saat içinde idrarla atılan, inaktif glukronik (yaklaşık %60) ve sülfirik asit (yaklaşık %35) bileşiklerine dönüşür. Alınan dozun %5 den azı değişmeden atılır. Terapötik dozlarda plazma yarılanma süresi 1.5 – 3 saat arasındadır. Çocuklarda yarılanma süresi uzar ve sülfat konsantrasyonu ile metabolize olur. Rektal yolla uygulandığında, karaciğere uğramadan sistemik dolaşıma gireceği için karaciğerin yıkıcı etkisinden kurtulur, etkisi çabuk başlar ve güçlü olur.

2.2. Asetil Salisilik Asidin (Aspirin) Yapısı ve Genel Özellikleri



Şekil 2.2. Asetil salisilik asit (aspirin) ; $C_9H_8O_4$

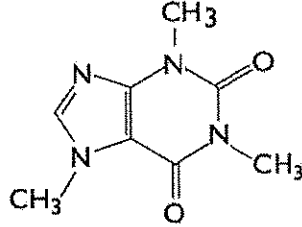
Aspirin, ilaç endüstrisinde çok önemli bir karboksilik asit türevidir. Aspirin o-asetil salisilik asidin ticari adıdır. Aspirin tamamen sentetik bir bileşiktir. Önce fenolden salisilik asit elde edilir. Salisilik asidin bazik ortamda asetik anhidrit ile reaksiyonu asetil salisilik asidi (aspirin) verir.

ASA, ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılan aspirinin etken maddesidir. Kaynağı ise dünyanın her yerinde yetişen söğüt ağacıdır. 1897 yılında Bayer kimyacıları olan Felix Hoffmann salisilik asit üzerine yaptığı çalışmalarla saf olarak asetil salisilik asidi elde etmeyi ve bileşiğin açık kimyasal yapısını ortaya çıkarmayı başarmıştır. Yapılan çalışmalar saf asetil salisilik asidin salisilattan daha iyi tolere edildiğini ortaya çıkarınca 1899 yılında ilaç olarak piyasaya sürülmüştür.

Kimyasal formülü $C_9H_8O_4$, $C_6H_4(OCOCH_3)COOH$ dır. Aspirinin diğer adlandırılışları; 2-asetiloksibenzoik asit, 2-asetoksibenzoik asit, asetilsalisilat, asetilsalisilik asit, o-asetilsalisilik asit şeklindedir. Moleküler ağırlığı 180.16 g/mol, yoğunluğu 1.40 g/cm³, erime noktası 136⁰C, kaynama noktası 140⁰C'dır. Aspirin, beyaz, kokusuz, hafif ekşi, acı bir tozdur. Sodyum karbonat içinde erir. Suda kolay erimez. Bağırsaklarda ya da alkali bir ortamda parçalanırsa salisilik asit ve asetik aside ayrışır. Tortu bırakmadan yanar. İnce iğnecikler halinde billurlaşır.

Aspirin, ağrı, ateş ve soğuk algınlığı haricinde kan sulandırıcı etkisinden ötürü kalp krizi, felç ve bazı kanser türlerinde de fayda sağladığı bilinmektedir. Aspirin asidik ortamda noniyonize formda olduğundan, en iyi midede absorbe edilir. İlacın oral yoldan alınmasını takiben 15 - 20 dakika gibi kısa sürede kan düzeyi minimum etkin dozu aşar ve etkisi başlar. Aspirin ince barsağın proksimalinden de absorbe edilir. Tamponlu aspirin tabletleri kalsiyum, magnezum, aliminyum veya bikarbonat antiasitlerini içermekte olup mide ve barğırsakta tabletin disintegrasyonu sonucu oluşan partiküllerin çevresinde pH'sı daha yüksek bir diffüzyon tabakası oluştururlar. Böylece hem dissolüsyon hızlanır hem de global mide pH'sı değişmediğinden absorbsiyon azalmaz. Aspirin karaciğer ve kanda salisilata hidrolize edilir. Salisilat aspirine göre daha fazla oranda plazma proteinlerine bağlanır. Aspirin ve ondan vücutta oluşan sodyum salisilat doza bağımlı kinetik ile elimine edilir. Verilen doz az ise karaciğerde büyük çoğunluğu glisin ile konjuge edilmek suretiyle salisürik asit olarak böbreklerden itrah edilir. Çok az bir kısmı glukronat konjugatı ve gentizik asit şeklinde veya serbest salisilat olarak itrah edilir. Verilen doz yüksek ise eliminasyon sıfır derece kinetiğine uyar ve büyük bir kısmı serbest salisilat olarak itrah edilir.

2.3. Kafeinin Yapısı ve Genel Özellikleri



Şekil 2.3. Kafein; C₈H₁₀N₄O₂

Trimetilksantin ailesinin bir üyesi olan kafein acı tadlı beyaz bir tozdur. Kimyasal formülü C₈H₁₀N₄O₂ ve sistematik adı 1,3,7-trimetilksantin'dir. Molekül ağırlığı 194.19 g/mol olan kafeinin kaynama noktası 238⁰C, erime noktası 178⁰C, yoğunluğu 1.2 g/cm³, pH sı 6.9, sudaki çözünürlüğü % 2.17 dir.

Kafein, tein, trimetilksantin, matein, guarinin, metilteobromin gibi isimlerle de anılan ve başlıca kahve, çay, kolalı içecekler ve az miktarda da kakaoda bulunan alkali bir kimyasal maddedir. Ayrıca ağrı kesici ilaçlar ve karbonatlı içecekler de kafein içerirler. Tıp alanında kalbi uyarmak için kullanılır. Az miktarda idrar sökücü etkisi de bulunur. Halk arasında ise enerji verici etkisi ile tanınır. Kişiye uyanıklık hali verir. Kafeinin, vücutta yağ yakımını hızlandırdığı, trigliserit miktarını azalttığı, kan şekerini yükselttiği görülmüştür. Kafein, mutluluk hormonu olan dopamin adı verilen bir maddenin salınımını da amfetaminler, kokain ve eroin gibi arttırarak benzer mekanizmalar ile beyni uyarır. Kafeinin bağımlılık yapma nedeni buna bağlanmaktadır. Yemeklerden hemen sonra alınan kafein demirin bağırsaklardaki emilimini %40 oranında azaltır. Kafein doğada birçok bitkide bulunur. Bunlardan en önemlileri kahve, çay yaprağı ve kakao çekirdeğidir. Farmokolojik olarak merkezi sinir sistemi üzerine etkisi mevcuttur, merkezi sinir sistemini uyarır, kalp hızlanır, solunum yolları genişler, midenin kan akımı azalır, cilt soluklaşır ve soğur, kaslar kasılarak hareketi hazırlanır ve ek enerji sağlamak için karaciğer kan şekerini yükseltir. Vücutta kalma süresi 6 saattir. Kafein karaciğerde değişime uğrar.

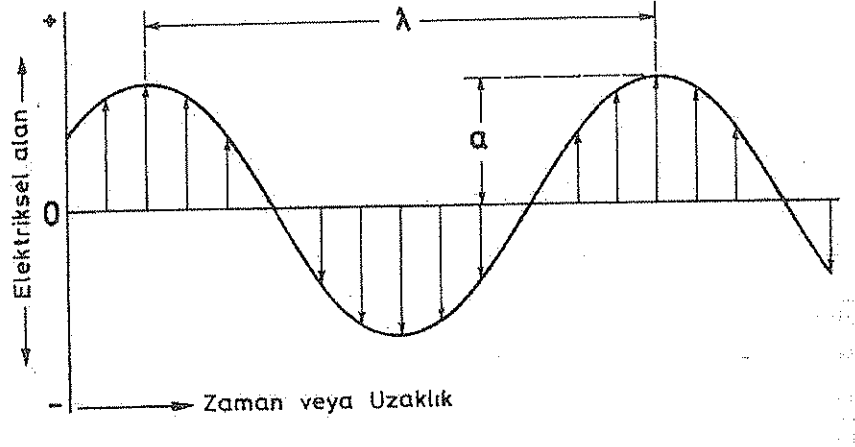
BÖLÜM 3. SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERİN TEMEL İLKELERİ

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Her atom, molekül veya iyonun elektromanyetik ışıma ile kendine özgü bir ilişkisi vardır ve bunların dönme, titreşim ve elektronik enerjilerindeki değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur.

3.1. Elektromanyetik Işımanın Özellikleri

Elektromanyetik ışıma uzayda çok büyük bir hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışımının en çok karşılaşılan türleri gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared (kırmızı ötesi) ışınlarıdır; x-ışınları, ultraviyole (mor ötesi), mikrodalga ve radyo ışınları ise elektromanyetik ışımının diğer türleridir. Elektromanyetik ışımının interferans (girişim) ve difraksiyon (kırınım) gibi davranışlarını tanımlamak için dalga özelliğinden yararlanılır. Bir metal yüzeyinden ışıma ile elektron koparılması (fotoelektrik olay) ve ışıma enerjisinin bir madde tarafından absorpsiyonu (soğurulması) ve emisyonu (yayılması) olaylarını açıklamak için ise dalga modeli yetersiz kalır. Bu olayları açıklamak için ışımının tanecik özelliklerini göz önüne almak, yani elektromanyetik ışımayı enerji taşıyan ve foton adı verilen tanecikler olarak düşünmek gerekir. Işımanın madde ile etkileşmelerini açıklayabilmek için bu iki model, dalga ve tanecik modelleri, bir arada düşünülmelidir. Bu iki modelin birbiri ile çelişmezliği ve birbirini tamamladığı dalga mekaniği ile kanıtlanmıştır.

3.1.1. Işımanın dalga özelliği



Şekil 3.1. Elektromanyetik ışımın dalga özelliği

Elektromanyetik ışımın dalga özellikleri dalganın ilerleme yönüne dik elektriksel alan vektörleri ile gösterilebilir (Şekil 3.1). Bu elektriksel vektörlere dik yönde oluşan manyetik alan vektörleri de vardır. Işımanın dalga boyu, λ ve frekansı, ν arasında;

$$\lambda\nu = c \quad (3.1)$$

bağıntısı vardır.

λ = Dalga boyu (m)

ν = Frekans (s^{-1})

c = Işık hızı ($2,9979 \times 10^8$ m/s)

3.1.2. Işımanın tanecik özelliği

Dalga modeli ile açıklanamayan etkileşimler ışımının foton veya kuant adı verilen enerji paketleri şeklinde davranışı ile açıklanabilir. Fotonun enerjisi ışımının frekansına bağlıdır:

$$E = h\nu \quad (3.2)$$

E = Enerji (J)

h = Planck sabiti (6.6262×10^{-34} Js)

ν = Frekans (s^{-1})

Eşitlik dalga boyu cinsinden;

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (3.3)$$

şeklinde yazılabilir.

3.2. Işımanın Absorpsiyonu

Kuantum kuramına göre atomlar ancak belirli potansiyel enerji düzeylerinde bulunabilirler. Bir atomun potansiyel enerjisi, elektron konfigürasyonuna ve dış elektronlarının belirli bir enerji düzeyleri arasındaki geçişlerine bağlıdır. Bu geçişler sırasında absorplanan veya yayılan ışımının enerjisi, atomun potansiyel enerjisindeki değişim ile orantılıdır ve $\Delta E = h\nu$ eşitliği ile verilir. Atomik spektrum sadece elektronların bir enerji düzeyinden diğerine geçişlerini içerir. En düşük enerji düzeyindeki, yani temel düzeydeki bir atomun ışık absorplayarak yüksek enerjili uyarılmış düzeylere ulaşmasına ait geçişler, söz konusu atomun absorpsiyon spektrumunu oluşturur. Bir atomun elektronlarının yüksek enerjili düzeylere uyarılmasında absorplanan veya uyarılmış bir atomun temel düzeye dönüşü sırasında

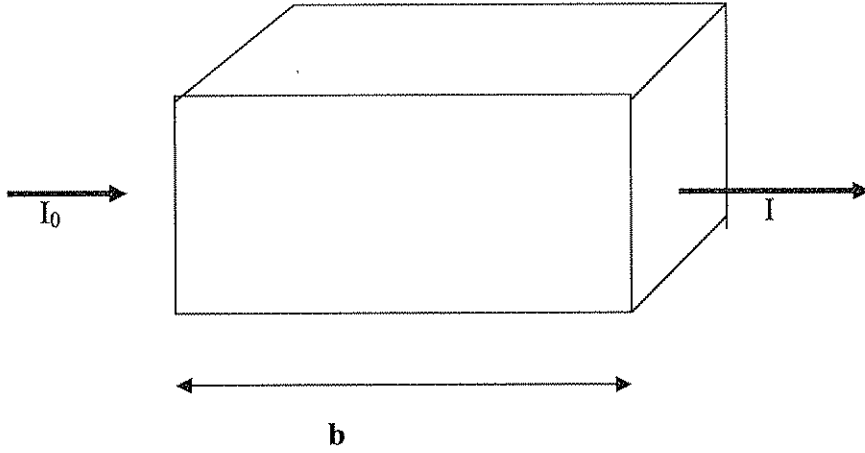
yayılan ışınım enerjileri, elektromanyetik spektrumun ultraviyole veya görünür bölgesi sınırları içindedir.

Moleküllerin elektronik spektrumları, atomlarındaki gibi, elektromanyetik spektrumun ultraviyole veya görünür bölgelerinde gözlenir. Moleküler spektrum, elektronik düzeyler arasındaki geçişlere ek olarak dönme ve titreşim enerji düzeyleri arasındaki geçişleri de içerir. Molekülün toplam enerjisi;

$$E_T = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}} \quad (3.4)$$

eşitliği ile belirlenir. Bir UV veya görünür bölge fotonunun absorplanması sonucu molekülün elektronik enerjisi ile beraber dönme ve titreşim enerjileri de değişebilir. Bu nedenle moleküllerin absorpsiyon spektrumları, atomik absorpsiyon hatları gibi keskin olmayıp spektruma geniş bantlar hakimdir [1].

3.3. Beer Yasası



Şekil 3. 2. I_0 başlangıç gücündeki bir ışının gücünün, litrede c mol absorplayıcı madde içeren b cm ışın yoluna sahip bir çözelti tarafından azaltılması, $I < I_0$

Moleküler absorpsiyon spektroskopisi b cm ışın yoluna sahip ışık geçirgen bir kaptaki bulunan bir çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorpsiyonunun (A) ölçümüne dayanır. Normal olarak absorpsiyon yapan analitin derişimi ile aşağıdaki eşitlikte belirtildiği gibi değişir;

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (3.5)$$

A = Absorbans

T = Çözeltinin geçirgenliği

I_0 = Numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti

I = Numuneyi terk eden ışığın şiddeti

ϵ = Molar absorptivite

b = Işın yolu

c = Derişim

3.3.1. Beer yasasının karışımlara uygulanması

Beer yasası birden çok absorplayıcı madde içeren karışımlar için de geçerlidir. Türlerin birbirini etkilememesi koşulu ile çok bileşenli bir sistemin toplam absorbanansı;

$$A_{toplam} = A_1 + A_2 + \dots + A_n \quad (3.6)$$

$$= \varepsilon_1 bc_1 + \varepsilon_2 bc_2 + \dots + \varepsilon_n bc_n \quad (3.7)$$

olarak verilir. Alt indisler, 1,2,...,n, absorpsiyon yapan bileşenleri gösterir [2].

3.3.2. Beer yasasından sapmalar

Lambert-Beer eşitliğinin geçerli olabilmesi için uygulanan ışığın monokromatik olması, absorpsiyon olayının örneğin her yerinde eşit miktarda olması, yani örneğin homojen olması, birden fazla bileşenin ışığı absorplaması halinde her bir bileşenin diğerlerinin absorpsiyonunu etkilememesi gerekir.

Lambert-Beer yasasından saptmaya neden olacak faktörlerin başında, örneğe gönderilen ışığın tam monokromatik olmaması veya örneğe ışık kaynağından gelen ışığa ek olarak dışarıdan kaçak ışık gelmesidir. İncelenen örnekte disosyasyon, asosyasyon, polimerleşme, kompleks oluşumu gibi dengelerin oluşması ile de Lambert-Beer yasasından sapmalar ortaya çıkar. İncelenen maddenin floresans özelliğe sahip olması, aynı kaçak ışın gibi etki yapar. Ölçüm sırasında ışığı absorplayan türün fotokimyasal bir tepkimeye girerek bozunması da istenmeyen bir durumdur. Maddenin incelendiği çözücünün değiştirilmesi ile hem absorbanans hem de λ_{max} değeri değişir. Sıcaklık değişimleri de ölçümlerde hatalara neden olabilir [1].

BÖLÜM 4. UV VE GÖRÜNÜR BÖLGE ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRİSİ

Elektromagnetik dalgayla (enerjiyle), maddenin etkileşmesini inceleyen bilim dalına spektroskopi denir. Söz konusu madde çekirdek, atom veya molekül olabilir. Bir madde, üzerine düşürülen çeşitli dalga boylarından (Ultraviyole ışınlarından radyo dalgalarına kadar) ancak bazılarını absorplar. Maddenin bu özelliğinden yararlanılarak yapısı, konsantrasyonu v.s. tayin edilebilir. Bunun için madde üzerine dalga boyu 110 nm den 3000 nm ye kadar değişen ışınlar düşürülür. Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz yapmak mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara Ultraviyole ve görünür alan, 2500-25000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer magnetik rezonans cihazları denir.

Mor ötesi(UV) ışınması, dalga boyu 10-400 (nm) olan ışımadır ve elektromagnetik spektrumda x-ışınları ve görünür bölge arasında bulunur.

10-200 nm bölgesinde uzak mor ötesi,

200-400 nm bölgesinde mor ötesi (yakın mor ötesi),

400-800 nm bölgesi görünür bölgedir.

Mor ötesi ve görünür bölge spektroskopisi, elektronik spektroskopi olarak adlandırılır.

Uzak mor ötesi bölgesinde hava da soğurma yaptığından (içindeki su, oksijen, azot ve karbondioksitten dolayı) uzak mor ötesi ışınmasının kullanıldığı spektroskopik analizleri vakumda yapmak gerekir, bunun için uzak mor ötesi bölgesine Vakum Bölgesi denir. Diğer taraftan 300 nm'nin altında cam da soğurucu olduğundan spektroskopik analiz için kuvars hücreler kullanılır ve 200-300 nm bölgesine Kuvars Bölgesi denir.

Bütün organik bileşikler mor ötesi ışınmasını soğururlar, bununla beraber bir kısmı çok kısa dalga boylarında ışıma yaptıklarından sadece 200 nm den yukarıda soğurma yapan organik bileşiklerin mor ötesi analizinin pratik değerleri vardır. Mor ötesi spektrometreleri, kırmızı ötesi, NMR ve kütle spektrometrelerinden önce geliştirilip kullanılmıştır, fakat günümüzde daha çok bu yeni tekniklerin kullanılmasından dolayı mor ötesi analizlerinden yapı aydınlatılmasında yararlanılması oldukça kısıtlıdır.



Şekil 4.1. Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri

Bu ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrelerde ışığı toplamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüleri ve giriş çıkış aralıkları vardır. Örnek ise, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına konularak ışık yoluna yerleştirilir [1].

4.1. Cihazın Bileşenleri

4.1.1. Işık kaynakları

Moleküler absorpsiyon ölçümleri için, oldukça geniş bir dalga boyu aralığında gücü ani olarak değişmeyen bir sürekli ışık kaynağı tercih edilir. UV ve görünür bölgede D₂, W, H₂ ve Xe gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır.

4.1.2. Monokromatörler (Dalga boyu seçiciler)

Absorbansın ölçülmesi sırasında, ışık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda ışık seçilerek örneğe gönderilir. Polikromatik ışıktan monokromatik ışık elde edilmesini gerçekleştiren düzeneğe monokromatör adı verilir. Monokromatör olarak prizmalar veya optik ağ adını alan parçalar kullanılır [1].

4.1.3. Örnek kapları

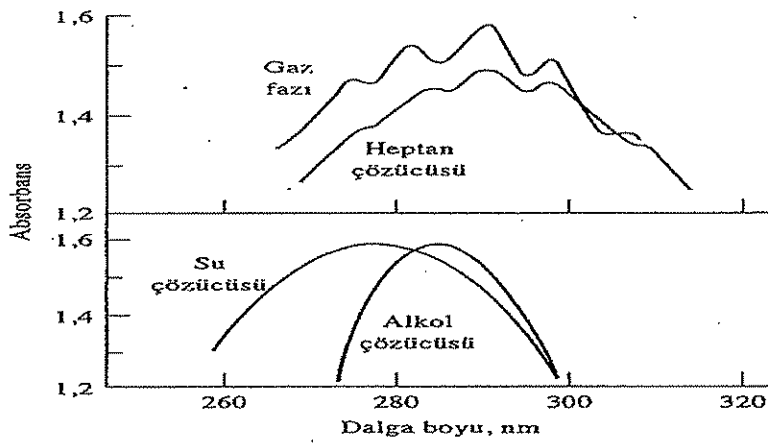
Numune kabı veya hücreleri çalışan spektrum bölgesinde ışını geçiren maddelerden yapılmalıdır, ultraviyole bölgede (350 nm'nin altında) kuvars veya erimiş silis kullanılır [2].

4.1.4. Dedektör

Maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için, ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla spektrofotometrelerde kullanılan bileşendir [1].

4.2. Kullanılan Çözücüler

Bir çözücü seçerken, onun sadece geçirgenliği değil, aynı zamanda absorplayıcı sistem üzerindeki olası etkileri de göz önüne alınmalıdır. Oldukça sık olarak, su, alkoller, esterler ve ketonlar gibi polar çözücüler titreşim etkilerinden ileri gelen spektral ince yapıyı bozma eğilimindedirler; gaz fazındakine benzeyen spektrumların hidrokarbon gibi apolar çözücülerde görülme olasılığı daha fazladır. Bunu ilaveten absorpsiyon maksimumlarının pozisyonları, çözücünün özelliğinden etkilenir. Kalitatif amaçla absorpsiyon spektrumları kıyaslanırken her defasında aynı çözücünün kullanılması gerekir.



Şekil 4.2. Asetaldehitin absorpsiyon spektrumu üzerine çözücü etkisi

Tabloda 4.1’de ultraviyole ve görünür bölge için çözücüler verilmiştir [2].

Tablo 4.1. UV ve görünür bölge için çözücüler

Çözücü	Yaklaşık Geçirgenlik(nm)
Karbondisülfür	375
Aseton	330
Pridin	305
Benzen	280
Karbonditetraklorür	260
Kloroform	245
Diklorometan	235
1,4-Dioksan	220
Metanol	215
Sikloheksan	215
Etanol	210
Eter	205
Hekzan	200
Su	200

4.3. Cihaz Tipleri

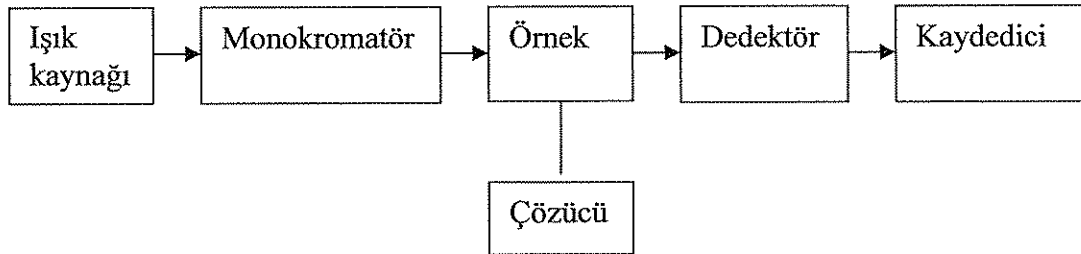
4.3.1. Tek ışık yollu spektrofotometreler

En basit bir spektrofotometrede kaynaktan çıkan ışık, bir mercek ile toplanarak monokromatöre gönderilir ve dalga boyu seçiminden sonra bir aralıktan geçirilerek örnek üzerine düşürülür. Örneğin ışığı absorplama miktarı uygun bir dedektörle ölçülür, bu sinyal elektronik olarak çoğaltılır ve bir galvanometrede okunur. Bu bileşenlerin tümünün aynı ışık yoluna yerleştirildiği böyle bir spektrofotometreye, tek ışık yollu spektrofotometre adı verilir. %T ayarı ile numunenin %T değerinin

ölçümünü süresince ışın şiddetinin değişmesini ve bu nedenle oluşacak hataları önlemek için cihazda kararlı bir potansiyel kaynağı olmalıdır [1,2].

4.3.2. Çift ışık yolu spektrofotometreler

Spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışığın eşit şiddette iki demete bölünerek, birinin örneğe diğerinin ise sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesi ile “sıfır” ve “yüz” ayarı işlemine gerek kalmaz. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Bu tür aletlere çift ışık yollu spektrofotometreler denir (Şekil 4.2.). Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir [1].



Şekil 4.3. Çift ışık yollu spektrofotometrelerde tek dedektör kullanılması durumunda alınan sinyaller

Çift ışıklı cihazların çok kısa süreli değişimler hariç ışın şiddetindeki sapmaların ve transduser ve yükselticideki salınımların sonuçlara etkisini önleme avantajları vardır. Ayrıca, dalga boyu ve ışın şiddetindeki büyük değişimlerin etkisini de önler. Çift ışıklı tasarım, geçirgenlik ve absorbans spektrumlarının sürekli kayıt edilmesine de uygundur. Bu nedenle UV ve görünür bölge spektrofotometrelerinin çoğu çift ışıklıdır [2].

4.4. Analitik Uygulamaları

Çeşitli kromoforların absorpsiyon bantlarının birbiri ile örtüşmesi ve absorpsiyon bantlarının genellikle oldukça geniş olması nedeni ile UV ve görünür bölge spektroskopisi ile nitel analiz pek yapılmaz. Fakat bu yöntem nicel analiz için oldukça uygundur. Bir maddenin nicel analizinin yapılacağı dalga boyu ve kullanılacak çözücüü kararlaştırmak için örneğin absorpsiyon spektrumunu bilmek gerekir. Spektrum incelenerek Lambert-Beer eşitliğine uyan ve maksimum absorban veren bir dalga boyu seçilir. Çözeltide analizi yapılacak türden başka türler de bulunuyorsa, bunların ışığı absorplamadığı dalga boylarının seçilmesine dikkat edilir. Seçilen dalgaboyu ile derişimleri bilinen bir dizi standart çözelti ile bu dalga boyunda A değerleri ölçülür. A değerleri standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirilir. Kalibrasyon doğrusu ve standart ekleme yöntemleri ile bilinmeyen derişim saptanır [1].

BÖLÜM 5. TÜREV VE ÇİFT DALGA BOYLU SPEKTROFOTOMETRİ

5.1. Türev Spektrofotometrisi

Klasik analitik problemlerin biri, aynı örnekteki iki ya da daha fazla bileşenin ön kimyasal ayrıştırma olmadan, eş zamanlı olarak hesaplanmasıdır. Bu yöntemde, bilgisayar kontrollü alet altında, türev teknikleri ve ikili veya çoklu kalibrasyon metodu UV-VIS moleküler absorpsiyon spektrofotometrisiyle karışımların analizinde önemli rol oynar. Her iki yaklaşım, kantitatif analizde çakışık bantların çözülmesinde faydalıdır. Türev teknikleri, ikili ve üçlü karışımların çözülmesinde oldukça yarar sağlar [3].

Türev tekniği, çeşitli karışımları içeren ilaçların kalitatif ve kantitatif analizinde duyarlılığı ve belirginliği arttırmak için kullanılan bir tekniktir. Bu metot, atomik absorpsiyon ve alev yayan spektrofotometri, florimetri, infrared ve ultraviyole-görünür bölge spektrofotometriden herhangi biri ile uygunluk ve uyumluluk gösterir. İyi yapılanmış özellikteki bir türev tekniği ile çakışık bantların düzenlenmesi ile keskin ve şiddetli bantlar ve daha büyük duyarlılık verir. Türev spektrofotometrinin kromatografi ve spektrofotometri üzerinde avantajları mevcuttur. İlaç preparatlarındaki maddenin hesaplanmasında, bu formülasyonlar genellikle karışık çözeltiler için verildiğinden katılanları elimine etmek için yorucu ve zaman alıcı olduğundan ekstraksiyon işlemine gerek yoktur. Türev spektrofotometrinin kullanımı özel durumlar için sınırlı değildir ama normal spektranın kantitatif çalışmasının zorluğu her zaman bir avantaj olmayabilir. Bunun dezavantajı gürültü-sinyal oranı için farkın azaltılmasıdır [4].

Birçok çalışma, türev spektrofotometrinin, normal (sıfır derece) spektrofotometriden daha yüksek seçicilik avantajı olduğunu bildirmiştir. Kemometrik metotların

kullanımı, çoklu element analizi için spektrofotometrik metotların uygulanabilirliğini yaygınlaştırmıştır [5].

Türev tekniği, spektrofotometrik metotlarla birleşmede özellikle seçiciliğin geliştirilmesi gereken durumlarda oldukça yaygın kullanılır. Veri dönüşüm işlemlerinde dönüşüm sırasında bazı düşük sinyaller meydana gelmesi gibi dezavantajları vardır. Birleştirilmiş türev tekniği ve kemometrik tekniklerin, bazı durumlarda seçilecek en uygun teknik olduğu kanıtlanmıştır [6].

Türev spektrofotometri, basit ikili karışımların ya da karışık örneklerin iki üst üste geçmiş spektralarının çözülmesi için faydalıdır, sıfır kesim noktası metodu kullanılarak iki bileşenin analizinde matriks girişimleri elimine edilir [7,8]. Absorpsiyon incelemelerinde, türev şemaları orijinal absorpsiyon eğrilerinden daha fazla bilgi verir. Birinci türev şeması orijinal eğriye benzemez, ama maksimum absorpsiyonun dalga boyunun, λ_{max} , doğru şekilde uygunluğu için kullanılabilir. İkinci türev, orijinal banttı daha keskin ama aynı yükseklikte merkez pike sahiptir. İkinci türev spektrofotometri kullanılarak, üst üste geçmiş spektral bantlara sahip iki maddeden oluşan karışımlar herhangi bir kimyasal ayrıştırma olmadan analiz edilebilir [9].

Türev spektrofotometri, iyi tanımlanmış analitik problemlerin hesaplanması için uygun çözümleri tercih eder, örneğin çoklu bileşen sisteminin çözülmesi, matriks ve bulanık örneklerin arka planından girişimin elimine edilmesi, spektral detayın artırılması gibi. Salinas, bileşenlerin spektraları çakıştığında, ikili karışımların çözülmesi için oran spektrının birinci türevinin kullanımına dayanan spektrofotometrik metodu geliştirdi. Bu metot, sıfır kesim noktası metodu ile karışımdaki üçlü karışımların çözülmesi için genişletilmiştir [10].

5.1.1. Türev tekniğinin gelişimi

Türev alma ile iyi yapıli elektrik sinyallerinin ayrılması metodu yaklaşık 70 yıldır vardır. 1920 lerin başında Lord Rutherford, gaz uyarma potansiyellerinin kütle spektrometrik çalışmalarındaki düzensizlikleri ortaya çıkarmak için birinci türev tekniğini ileri sürdü.

Singleton ve Collier, elektronik biliminin gelişiminden yararlanıp en eski türev tekniğini yaptığında bu metot 1953 e kadar unutulma içindeydi. İkinci türev spektrumunu oluşturmak için kıyaslama aleti ile IR spektrofotometrelerde değiştirtirdiler ve konuda patent aldılar. Aynı zamanda, Hammond ve Price dalgaboyu modülasyon prensiplerini sundular, Giese ve French fotosentetik sistemlerin görünür spektralarının birinci türevi çalışması için uyguladı.

1953 te Morrison diferansiyel eğrilerle $\Delta i(V)/\Delta V$, birinci ve ikinci türevi (d^1 ve d^2) hesapladı. Bunlar küçük aralıklardan çıkarma ile elde edildi ve gerçek türevlerin en iyi yaklaşımlarıydı. Enstrumentasyonun karışıklığı ve elektronik aygıtların yetersiz sinyal-gürültü (SNR) oranı bunlara neden olur ama birkaç bilim adamı bu metodu reddetti. 1966 yılında Meister ikinci türev için (d^2) pratik direnç-sığa (RC devresi) devresini geliştirdi ki bitki kimyasındaki problemleri araştırmada diğer fotokimyacılar kadar başarılıydı.

1953 te Singleton ve Collier, ikinci türevden daha yüksek türevlerin daha dar bant genişliği vermesi gerektiğini çoktan önermişlerdi, bunu deneysel kanıtla sunmada yetersiz kaldılar çünkü o zaman için onların kullandıkları alet bu iş için yeterince gelişmiş değildi. Martin, hesaplanan Lorentzian bantları için teorik temelleri doğruladı ve 1968 de Morrey, dijital bilgisayar ile student T_3 ve Lorentzian dağılım fonksiyonlarının birden dörde Gaussian türevlerini oluşturdu. Morrey aynı zamanda, sentetik karışımların üst üste geçmiş bantları için dördüncü türevin ikinci türevden daha mükemmel çözünme verdiğini gösterdi. Savitzky ve Golay, düzensiz verilerin türevi ve düzenlenmesi için en küçük kareler metodunu kullandılar. Butler ve Hopkins, fotosentetik maddelerle çalışmak amacıyla, ikinci türev spektrasından

dördüncü türev spektrasını rutin şekilde oluşturmak için bilgisayar destekli yaklaşımı genişlettiler.

Daha yüksek seviyedeki türev spektrası ($n \geq 2$), sistematik ve kuvvetli şekilde laboratuarda incelendi. Yüksek kalitede UV-VIS türev spektrası üretmek için online ölçüm yapıldı ve düzleme modülü, düşük geçirgenli filtreler ve RC devreli düşük gürültülü türev birimi olan cihaz yardımıyla yeniden geliştirildi. Butler, altıncı ve sekizinci dereceli spektraları dijital metotlarla hesapladı. Sasaki, onüçüncü dereceye kadar boyaların, birbiri üzerine geçmiş türev spektraları çalışması için dijital metotları kullandı.

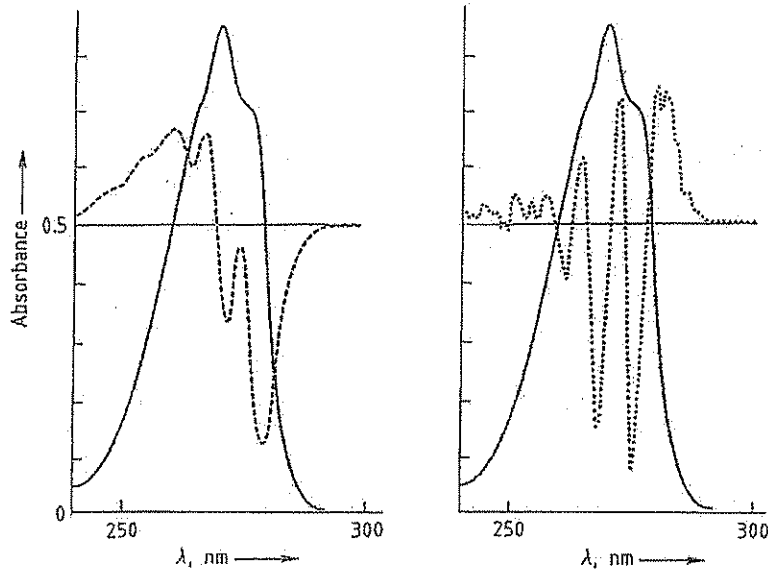
Mevcut ticari türev aletlerinin kalitesi yıllar geçtikçe gelişti. Şu anda, yeni spektrofotometrilerinin hepsi pratik olarak en az ikinci derecede türev sistemlerine uyumludur, ama birçoğu dördüncü dereceye kadar çıkarılabilir, hatta bazıları altıncı ya da dokuzuncu dereceye kadar çıkabilir. Bu, sadece laboratuvar araştırmaları için değil aynı zamanda rutin işlemler için de yüksek dereceli türev spektrası tekniğinin uygulanmasını mümkün kılar [11].

5.1.2. Türev tekniğinin teorik önemi

Eğer iki bileşiğin absorpsiyon bantları üst üste gelirse (biri geniş diğeri dar) çözümü için türev spektroskopisi kullanılır. Bununla birlikte, eser miktarda kantitatif analiz yapılabilir. Türev spektroskopisi, aynı zamanda endüstriyel atık sular ya da biyolojik örnekler gibi bulanık çözeltilerin incelenmesi için kullanılır. Bu metot omuz şeklinde spektraların ve üst üste geçmiş absorpsiyon bantlarının analizi için uygundur. Genellikle, birinci ve ikinci türevler kullanılır. Yüksek türevlerde gürültü problemi oluşur, gürültü her türevle bir miktar artar. Yüksek türevlerin, özel uygulamalar için uygun olduğu ifade edilir [12].

Türev spektrumu, çift dalga boylu spektrofotometrelerden elde edilir. Türev spektrofotometride, absorbans ya da geçirgenliğin dalga boyuna göre birinci veya daha yüksek dereceden türevi, dalga boyuna karşı kaydedilerek spektrum çizilir. Çoğu kez bu eğriler, normal bir spektrumda görülmeyen spektral ayrıntıları ortaya çıkarırlar. Bazen bozucu maddeler varlığında bir analitin derişiminin ölçümü daha kolay ya da daha doğru olarak yapılabilir. Türev spektrumunun üstünlükleri, türev eldesine eşlik eden sinyal/gürültü oranının düşürülmesi ile kısmen ortadan kalkar. Ancak ultraviyole ve görünür bölgenin çoğunda kısmında sinyal/gürültü oranı ciddi bir sınırlandırıcı faktör değildir; türev spektrumlarından burada en fazla yararlanılır [2].

Türev spektroskopisi, floresans ve floresans uyarma spektrasına uygulanabilir. Aynı zamanda pik maksimumunu araştırmada, kromotografide ve interferans spektrasında min ve max hesaplamak için interferomatik ölçümlerde kullanılır. Şekil 5.1 de sudaki fenolün absorpsiyon spektrumu ve türev spektrumu görülmektedir [12].



Şekil 5.1. Sudaki fenolün absorpsiyon spektrumu (—), birinci (---) ve ikinci (.....) türev spektrumu

5.1.3. İyi çözünen spektralar

Sarmal spektraların iyi çözünmeleri için birçok metot vardır. En önemli teknikler kısaca bu bölümde işlenmiştir:

5.1.3.1. Optik metotlar

Monokromatör sliti ışık kaynağının bant genişliğini sınırlar. Bu yüzden slit aralığının daraltılması lineer spektral çözünürlüğü artırır, ama ışık enerjisi üstel ikinci derece ile azalır. Optik kenarın uzaması aynı zamanda lineer çözünürlüğü artırır. Tersine enerji, çoğaltıcı ve ışık kaynağı arasındaki uzaklığın karesiyle azalır. mm başına ne kadar çok çizgi varsa çözünürlük o kadar daha yüksek olacaktır, pratik olarak mm başına yaklaşık 2000-2400 çizgi sınırına ulaşılacaktır.

Birkaç yıl önce, çok dar bant genişliğine sahip lazerler geliştirildi. Sıkça, ışık kaynağı merkezli bağlı yüksek enerji, aydınlatılan maddelerin bozulmasına sebep olur ve bundan öte lazerden yayılan ışığın dalga boyu, elektromanyetik spektrumun sadece küçük bir bölgesinde değiştirilebilir. (yaklaşık 50-100 nm)

5.1.3.2. Hesaplama metotları

5.1.3.2.1. Eğriye uydurma metodu

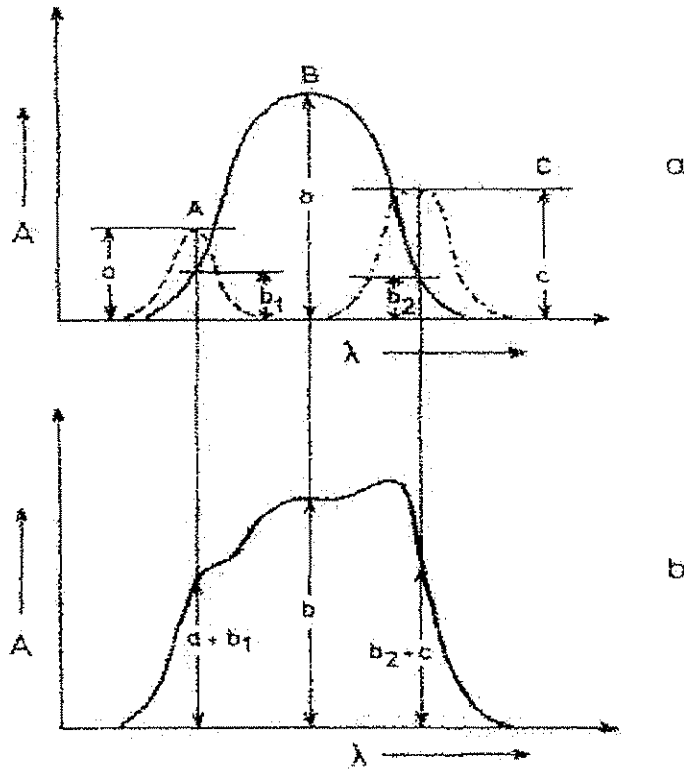
Görsel pik kabulünün en yakın yaklaşımını veren bu metoda eğriye uydurma metodu denir. Ama bu bilinen profil fonksiyonunu gerektirir.

İlk olarak en yüksek pik aranır. Daha sonra ana bileşenin teorik olarak önemi profil fonksiyonu yardımı ile hesaplanır. Sonra, belirli limitleri karşılamak için kullanılan en küçük kareler metodunun başarısız olduğu noktaları eklenen pikler ortaya çıkarır, en küçük kareler toplamı yeterince küçükse hesaplamaya devam edilir.

Büyük belirsizlikleri ortadan kaldırmak için profil ve pik sayısı kesin olmalıdır. Birbiri ile örtüşen sinyaller hesaplanan piklerin sayısını, şeklini, yüksekliğini ve her bir pikin genişliğini değiştirebilir.

5.1.3.2.2. Sayısal çoklu bileşen analizi

Her biri birbiri üzerine geçmiş üç analitik pik düşünülüğünde; saf maddelerin her birinin standart absorpsiyon spektrumu biliniyorsa, herhangi bir dalga boyundaki A absorbansı Lambert-Beer yasasına göre, bu dalga boyundaki bileşenlerin bireysel absorbanslarının toplamı olacaktır. (Şekil 5.2)Matematiksel ifade ile;



Şekil 5.2. Üst üste geçmiş üç analitik pik
a-) Tekli pikler A (-----), B(———), C(-.-.-.-) —
b-) Üst üste geçmiş pikler toplamı

$$A_{\lambda_1} = C_A \varepsilon_{1,A} + C_B \varepsilon_{1,B} + C_C \varepsilon_{1,C} \quad (5.1)$$

C_A , C_B ve C_C parametreleri istenilen değerlerdir. Bu yüzden problemi çözmek için en az üç denklem gereklidir;

$$A_{\lambda_2} = C_A \varepsilon_{2,A} + C_B \varepsilon_{2,B} + C_C \varepsilon_{2,C} \quad (5.2)$$

$$A_{\lambda_3} = C_A \varepsilon_{3,A} + C_B \varepsilon_{3,B} + C_C \varepsilon_{3,C} \quad (5.3)$$

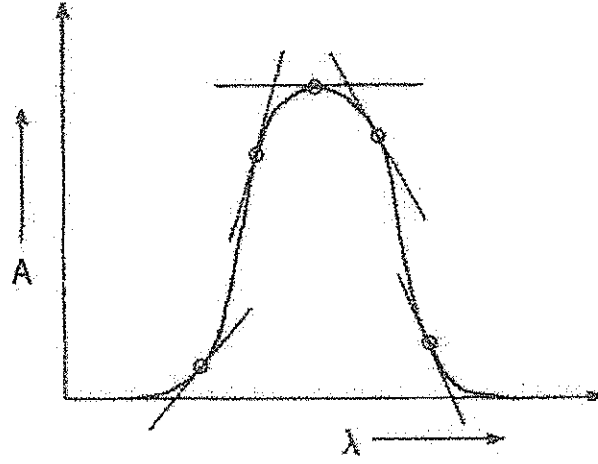
Çoklu bileşen analizi için pratikte iki yol yaygın olarak kullanılır.

- a-) Ölçülen dalga boyu sayısı ve kullanılan denklem sayısı madde sayısına eşittir.
- b-) Ölçülen dalga boyu sayısı ve kullanılan denklem sayısı maddelerin sayısını geçer.

Her iki durumda eğer en uygun ölçüm noktaları seçilirse, bilinmeyen maddeler yoksa veya tanımlanamayan arka plan girişimi mevcut değilse çok kesin sonuçlar elde edilebilir. Karışık spektrumları daha kesin şekilde çözmenin bir yolu türev hesaplamalarını kullanmaktır. Her bir standart spektrum, birinci, ikinci ve daha yüksek derecedeki türeve dönüştürülür. Böylece, lineer kombinasyonlar hesaplanabilir.

5.1.3. Türev alma ve türev spektrumu

Eğrinin ya da onun matematiksel fonksiyonlarının türevi bütün bölge üzerinde eğimin hesaplamasının basit bir şeklidir. Aynı yolla, spektrumunun türevinin alınması mümkündür (Şekil 5.4).



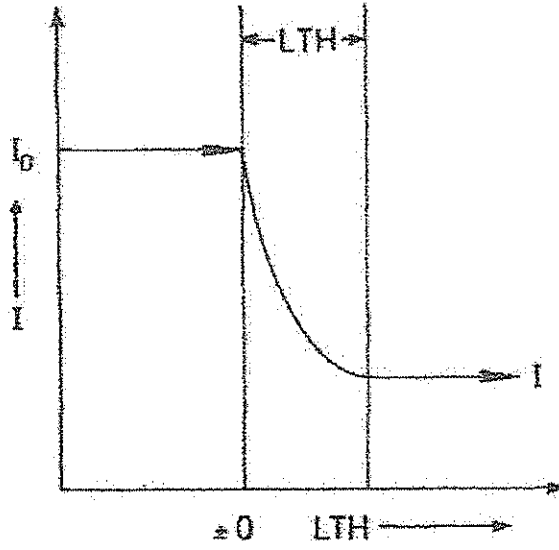
Şekil 5.3. Belirlenen noktalardaki eğrinin tanjantları

Spektroskopide ölçülen değer, örneği terk eden ışık şiddetinin (I) örneğe giren ışık şiddetine (I_0) oranıdır. Bu oran geçirgenlik T ' dir.

$$\frac{I}{I_0} = T \quad (5.7)$$

Homojen saydam bir örnekten geçen ışığın şiddetindeki azalma lineer değildir.

(Şekil 5.5)



Şekil 5.4. Örnekten geçen ışığın şiddetindeki azalma (LTH: tabaka kalınlığı, I: şiddet, I_0 : orijinal ışığın şiddeti)

I ile çözülmüş saydam sıvı örneğin ya da katının konsantrasyonu arasındaki ilişki Bougueur-Lambert-Beer kanunu ile verilmiştir:

$$\frac{I_{\lambda}}{I_{0,\lambda}} = e^{-c/l\epsilon\lambda} = T_{\lambda} \quad (5.8)$$

C : absorpsiyon yapan türün konsantrasyonu (mol/L)

I : yol uzunluğu (cm)

ϵ_{λ} : molar absorpsiyon (λ dalga boyunda absorpsiyon yapan türün katsayısı)

T_{λ} : λ dalga boyundaki geçirgenlik

Genellikle I_0 şiddeti, ışık kaynağının şiddetinin otomatik kontrolü ya da otomatik elektronik genişletme ayarı ve otomatik olarak kontrol edilen aralıklarla girilen dalga boyu aralığı üzerinde sabit tutulur.

Eşitlik 5.8 in doğal logaritması alınarak;

$$\ln I_{\lambda} - I_{0,\lambda} = -cl\varepsilon_{\lambda} \quad (5.9)$$

bu ifadenin türevi alınırsa ;

$$\frac{d(\ln I)}{d\lambda} = -cl \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad (5.10)$$

eğer I_0 sabitse;

$$\frac{d(\ln I)}{d\lambda} = 0 \quad (5.11)$$

ve

$$\frac{d(\ln I)}{d\lambda} = \frac{1}{I} \quad (5.12)$$

eşitlik 5.8 in birinci türevi aşağıdaki gibi elde edilir;

$$\frac{dI}{d\lambda} \frac{1}{I} = -cl \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad (5.13)$$

Birinci türev, her bir dalga boyundaki konsantrasyonla direkt orantılıdır. Ölçümün hassasiyeti, bükülme noktası yakınında yüksektir ki, burada $d\varepsilon / d\lambda$ değeri en uçtur.

$$\frac{d^2 I}{d\lambda^2} \frac{1}{I} = -c^2 I^2 \left[\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right]^2 - cl \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \quad (5.14)$$

Eğer ε ($d\varepsilon/d\lambda$) nin birinci türevi sifira eşitse ikinci türev konsantrasyonla direkt orantılı olacaktır. Aksi takdirde hiçbir lineer ilişki bulunmaz ve özel kalibrasyon gerekli olacaktır. Ek olarak, ($d^2\varepsilon/d\lambda^2$) nin uç değerleri için ölçümün hassasiyeti yüksektir.

Benzer şekilde üçüncü türev de elde edilir.

$$\frac{d^3 I}{d\lambda^3} \frac{1}{T} = -cd \frac{d^3 \varepsilon}{d\lambda^3} + 3c^3 d^2 \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} - c^3 d^3 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^3 \quad (5.15)$$

Bu durumda, üçüncü türev konsantrasyonla doğru orantılı olduğu için $d\varepsilon/d\lambda$ sıfır olmalıdır. Belirli yüksek ölçümlerin hassasiyeti, omuzdaki omuzdaki bükülme noktasındaki yatay tanjantlar ve kavislenmenin küçük yarıçapı ile elde edilir. Eğer, $d\varepsilon/d\lambda$ sıfır değilse lineer olmayan kalibrasyon eğrisi hazırlanmalıdır.

Dördüncü türev aşağıdaki gibidir;

$$\frac{d^4 I}{d\lambda^4} \frac{1}{T} = -cd \frac{d^4 \varepsilon}{d\lambda^4} + 4c^3 d^2 \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \frac{d^3 \varepsilon}{d\lambda^3} + 3c^2 d^2 \left(\frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \right)^2 - 6c^3 d^3 \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^2 + c^4 d^4 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^4 \quad (5.16)$$

Lineer oran sadece $d\varepsilon/d\lambda$ ve $d^2\varepsilon/d\lambda^2$ değerleri sıfır farz edildiğinde verilir. Bu nedenle, geçirgenlik spektrofotometride direkt ölçülebilen fiziksel bir nicelik olduğu halde geçirgenliğin türevi nadiren kullanılır. Bütün diğer nicelikler, örneğin absorbansı A, log A ya da konsantrasyon c, türevli niceliklerdir. Bunlar, temel nicelik T'den hesaplanır.

Daha yüksek türevler için denklemler benzer yolla bulunabilir. Yukarıda geçen absorbans A, aşağıdaki gibi tanımlanır.

$$A = \log_{10} \frac{I}{I_0} = \log_{10} \frac{1}{T} = cl\varepsilon' \quad (5.17)$$

ε' , absorpsiyın yapan çözeltinin molar sönme katsayısı olarak adlandırılır. Aşağıdaki gibidir;

$$\varepsilon' = \varepsilon / 2,303 \quad (5.18)$$

Eğer I_0 sabit tutulursa birinci türev için,

$$\frac{dA}{d\lambda} = cl \frac{d\varepsilon'}{d\lambda} \quad (5.19)$$

ikinci türev için;

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = cl \frac{d^2 \varepsilon'}{d\lambda^2} \quad (5.20)$$

n. dereceden türev için;

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = cl \frac{d^n \varepsilon'}{d\lambda^n} \quad (5.21)$$

Her durumda A'nın bütün türevleri, konsantrasyon c ile doğru orantılıdır. Bu, türev spektralarının yorumu ve hesaplanması için, büyük avantajdır, böylece pratikte T'nin türevleri nadir iken A'nın türevleri yaygın olarak üretilir.

Bazen A'nın türevinin alınması, konsantrasyonda türevlerin lineer olmayan bağımlılığı ile sonuçlanabilir. Bu durum her zaman Beer kanununa uymayabilir, örneğin, maddenin molekülleri arasında ya da madde ve çözücü arasında etkileşim meydana geldiyse veya daha yüksek derecede türev alma hesaplamalarıdır.

5.1.4. Analitik bantların türevleri

Analitik bant olarak adlandırılan absorpsiyon bantları yaklaşım formülleri ile daha doğru tanımlanır. Gaussian fonksiyonları, UV-VIS bantların tanımlanması için daha uygundur. λ dalgaboyundaki bantın absorbansı A aşağıdaki gibidir;

$$A_{\lambda} = A_{\max} e^{-cx^2} \quad (5.22)$$

A_{\max} = λ_{\max} 'daki absorbans

c = sabit

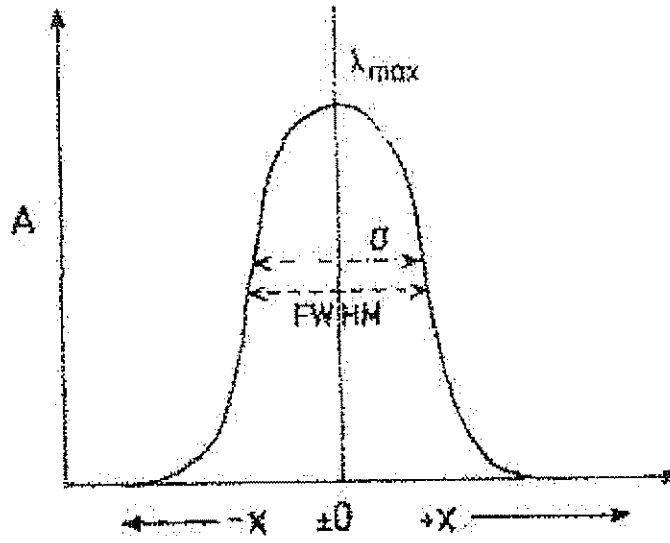
x = $(\lambda - \lambda_{\max})$

Bu ifadenin x'e göre türevi alındığında

$$\frac{dA_{\lambda}}{d\lambda} = d^1 = (-2)C_x \cdot A_{\lambda} \quad (5.23)$$

$$\frac{d^2 A_{\lambda}}{d\lambda^2} = d^2 = 2C(2C_{x^2-1}) \cdot A_{\lambda} \quad (5.24)$$

.....



Şekil 5.5. FWHM ve σ 'nun şematik çizimi

- a-) Maksimum yüksekliğin yarısında bant genişliği, FWHM genliği
b-) σ , büküm noktaları arasındaki bant genişliği

Orjin kanatlarının solunda ve sağında simetrik olarak mevkilenmiş analitik bantlar için büküm noktasındaki durumun sonuçları

$$d^1 = d^2 = 0 \quad (5.25)$$

olduğunda

$$x_\sigma = \sqrt{\frac{1}{2C}} \quad (5.26)$$

eğer $A_\lambda = 0,5 \cdot A_{\lambda_{\max}}$ ise FWHM noktası için

$$x_{FWHM} = \sqrt{\frac{\ln 2}{C}} \quad (5.27)$$

C sabiti için $x_{FWHM} = 0,5 \cdot FWHM$ ve $x_\sigma = 0,5\sigma$ olmak üzere

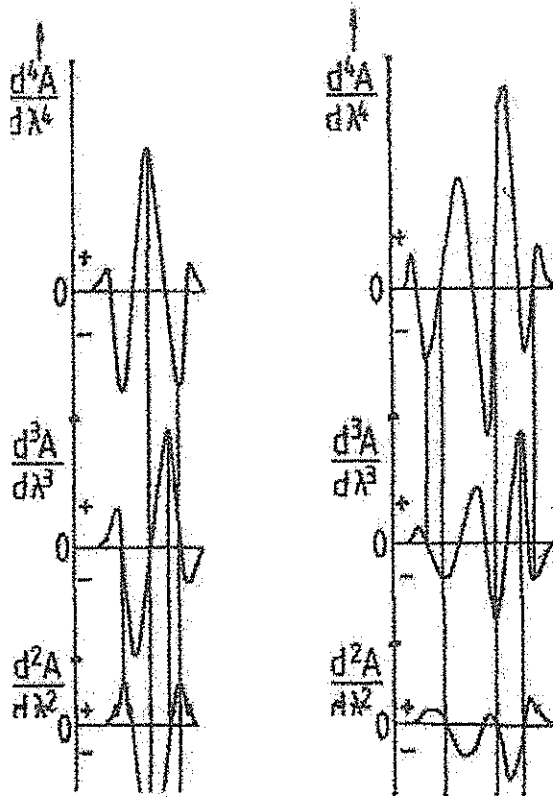
$$C_{FWHM} = \frac{4 \ln 2}{(FWHM)} \quad (5.28)$$

$$C_{\sigma} = \frac{2}{\sigma^2} \quad (5.29)$$

FWHM daima σ 'dan büyüktür.

$$\frac{FWHM}{\sigma} = \sqrt{2 \ln 2} = 1,177 \quad (5.30)$$

Analitik bantların absorbansını hesaplamak için en iyi yol eğrinin altındaki alanın kullanılmasıdır ve mekanik katılımla sayısal olarak hesaplanır (Şekil 5.7). Diğer bir hesaplama kağıt üzerindeki pikin kesip çıkarıldıktan sonra tartılması veya kağıdın üzerindeki pikin kare şeklinde çerçeveselendirilmesidir. λ_{max} 'da A pik yüksekliğinin ve σ yarı genişliğinin üretilmesi, eğer bantlar simetrik ise alanın iyi bir yaklaşımıdır. Bununla birlikte, pratik spektrofotometride, A_{max} 'ın maddenin konsantrasyonu ile orantılı olması yeterlidir.



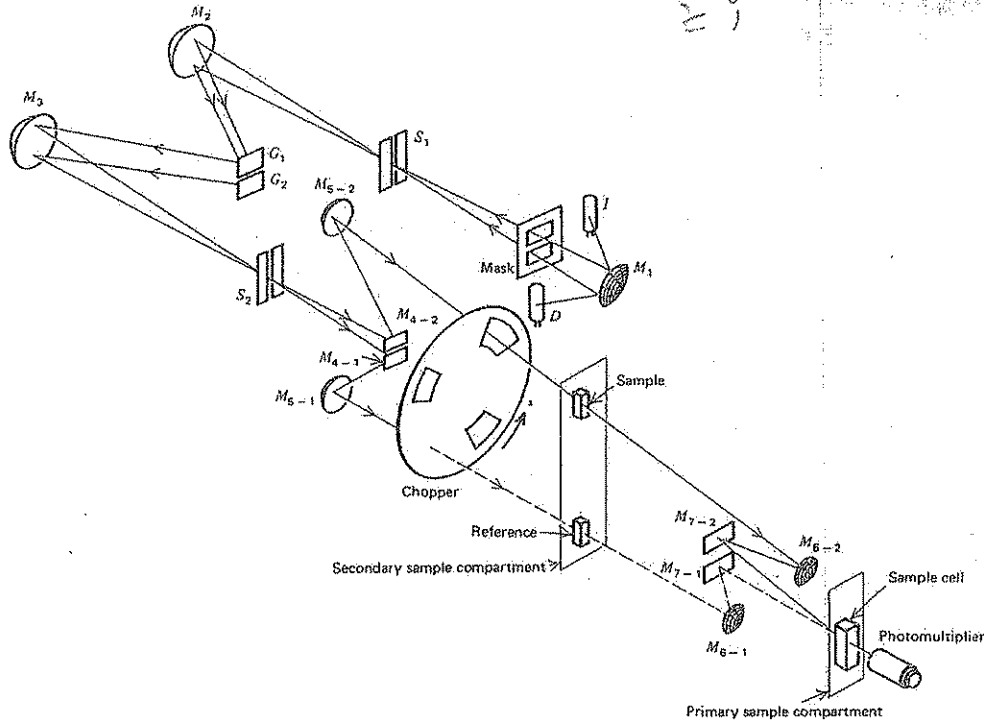
Şekil 5.6. Analitik bantların türevi

Analitık bantlarının türevinin sonuçları Şekil 5.8'de grafiksel olarak verilmiştir.

Bu sonuçlardan görülüyor ki;

1. Tek dereceli türevlerde temel eğrinin maksimumu sıfırdan geçmeye uygundur, daha yüksek dereceli türevlerde, diğer min ve max'un extremum değerlerine uyar. Diğer bir ifade ile temel max daima 4., 8. ve 4n. türevlerde pozitif extremum, 2., 6. ve (4n-2). türevlerde negatif extremum meydana gelir.
2. Temel eğri üzerindeki bükümler tek dereceli uca ve yüksek dereceli türevlerde sıfırdan geçişe yol gösterir.
3. Türevin derecesinin artması ile her büküm türev alma ile eklenen extremum vereceği için temel eğride extremum sayısı aşırıya kaçır.
4. Türev derecesinin artışı ile bant keskinliğinin artışı FWHM kadar σ 'da küçülme meydana getirir [11].

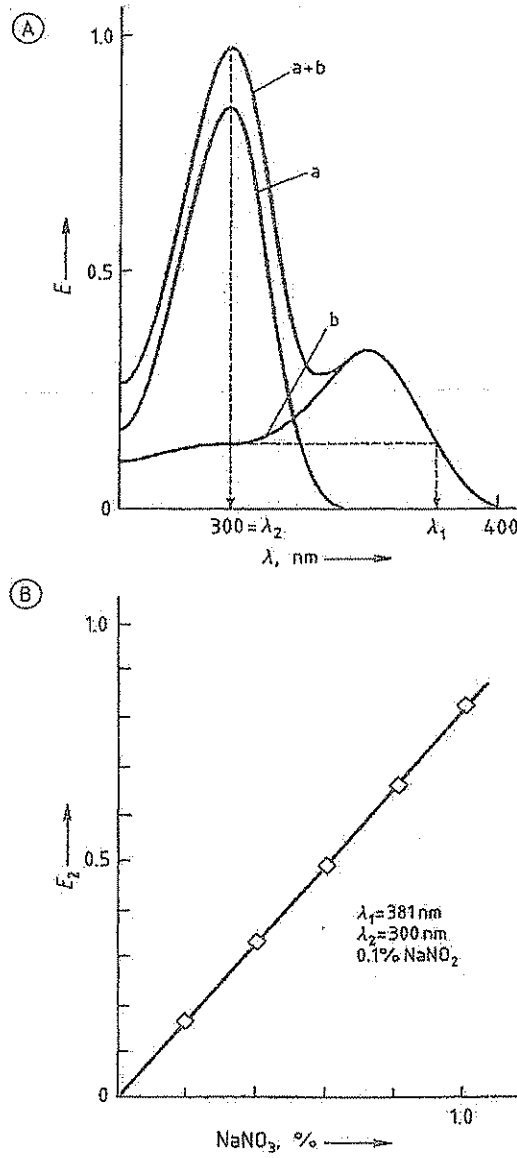
5.2. Çift Dalga Boylu Spektrofotometri



Şekil 5.7. Çift dalga boylu spektrofotometri

Çift dalga boylu spektrofotometri metodu 1951’de Chance tarafından sunulmuştur. Giese ve French ise çift dalga boylu spektrofotometriyi yapmıştır [11]. Çift dalga boylu spektrofotometri, özellikle ışığın saçılması ile bir absorpsiyon spektrumunun ayrıntılarının karmaşık hale geldiği durumlarda, bulanık çözeltilerdeki analitlerin UV-VIS absorpsiyon spektrumlarının eldesinde belirgin yarar sağlar [2].

Bu metot hücrenin durumundaki farklılıktan doğan problemlerden kaçınma avantajına sahiptir. Hücredeki farklılıklar, bulanıklık, saçılma etkileri, hücrenin dışında veya içindeki kirlilikler sahte bir absorpsiyona neden olur. İki teknik kullanılır; bunlardan biri olan “eş absorpsiyon metodu”nda aynı absorpsiyona sahip bileşenlerden biri için iki dalga boyu seçilir. İkinci bileşen ise, iki dalga boyundan sadece birinde absorpsiyon yapmalıdır. Bu durum, şekil 5.9’daki sodyum nitratın bulunduğu bir örnekteki sodyum nitritin hesaplanması gibidir.



Şekil 5. 8. Sodyum nitrat ve sodyum nitritin hesaplanması
 (A) %1 NaNO₃ ve (b) %0,1NaNO₂ spektrasi
 (B) Kalibrasyon eğrisi

Sinyal genişletme metodu ise genel bir uygulamadır. Ya sadece bir bileşen absorpsiyon yaptığıında bir bölge oluşmuyorsa ya da girişim yapan bileşen max absorpsiyona sahip değilse bu metot kullanılır. Bu ekipman çeşidi ile absorpsiyon elde edilen, diğer dalga boyunda da aynı değeri veren bir dalga boyundaki faktörle doğrulanır. Eğer ölçülen iki dalga boyundaki absorbans katsayıları bilinirse iki dalga

boyundaki absorbans farklarından istenilen bileşenin absorbansı hesaplanabilir. Bu metot, tıpta ve biyolojik örneklerin incelenmesinde kullanılmış ve son dönemlerde önemi artmıştır [12].

Çift dalga boylu spektrofotometri aynı zamanda spektral bir girişim varlığında bir analitin tayin edilmesinde de yararını kanıtlamıştır. Burada, cihaz tarayıcı olmayan modda çalıştırılarak, girişim yapan türün aynı molar absorptivite değerlerini gösterdiği iki dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır. Bunun tersine, analit bu dalga boylarından birinde, diğerine nazaran daha kuvvetli absorpsiyon yapmalıdır. Bu durumda fark absorbans, analit derişimi ile doğru orantılıdır [2].

5.3. Oran Spektrofotometri

Türev spektrofotometri, sıfır kesim noktası ölçümlerinin temelinde, ikili karışimli bileşiklerin çakışık spektralarının çözümlenmesi için yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, şiddetli çakışık spektralarda bazen türev tekniği girişim seviyelerinin üstesinden gelemez. Oran spektrumunun birinci türevinin kullanımı, normal türev tekniği ile çözülemeyen ikili karışımların çözümlenmesi için yapılmıştır [13].

Oran spektra türevi metodu ilk kez Blanco tarafından geliştirildi ve Salinas tarafından değiştirildi. Bu metot, oran spektranın birinci türevinin kullanımına dayanır ve spektroskopik verilere başarı ile uygulanır. Karışımların absorpsiyon spektrumu elde edilir ve bir bileşenin standart çözeltisinin absorpsiyon spektrumu ile bölünür böylece oran spektrumun birinci türevi elde edilir. Daha sonra diğer bileşenlerin konsantrasyonları kalibrasyon grafiğinden hesaplanır [14].

5.3.1 Oran spektranın birinci türevi

Oran spektranın türevi metodunun asıl avantajı analitik sinyalleri yüksek değerli dalga boylarının kullanımına izin veren uygun piklerde yapılan kolay ölçümlerin değiştirilebilmesidir.

M ve N gibi iki bileşikli karışım düşünelim. Eğer Beer kanunu eşitliği, bileşenlerden birinin standart çözeltisinin uygun eşitliği ile bölünür (M 'nin konsantrasyonu C_M^0) ve sonuçların birinci türevi elde edilir, aşağıdaki eşitlik yazılabilir:

$$\frac{d}{d\lambda} \left(\frac{A_{m,\lambda_1}}{\varepsilon_{M,\lambda_1}} \right) = \frac{C_p d}{C_M^0 d\lambda} \left(\frac{\varepsilon_{p,\lambda_1}}{\varepsilon_{M,\lambda_1}} \right) \quad (5.31)$$

A_{m,λ_1} , λ_1 dalga boyundaki karışımın absorpsiyonu, $\varepsilon_{p,\lambda_1}$ ve $\varepsilon_{M,\lambda_1}$, λ_1 dalga boyundaki M ve P nin molar absorptiviteyi, C_M ve C_p sırasıyla M ve P nin molar konsantrasyonlarıdır. Eşitlik gösterir ki, ikili karışımların oran spektrumunun türevi C_p ve C_M^0 değerlerine bağlı, C_M değerinden bağımsızdır [3].

BÖLÜM 6. KULLANILAN KEMOMETRİK TEKNİKLER

Kemometrik spektrofotometri, analitik kimya ile kemometrinin çok iyi bileşimidir ve sinyal-gürültü oranını (S/N) arttırabilir, hesaplamanın seçiciliğini geliştirebilir, deneysel koşulları optimize edebilir, analitik operasyonun etkinliğini arttırabilir ve birçok bilimsel bilgi sağlar. Analistlerin dikkatini çabuk çeken bu durum son yıllarda çoklu bileşenin eş zamanlı hesaplanması için kullanıldı [15].

Tüm bu metotlar, iki ayrıştırma basamağını kapsar. İlk basamakta, kalibrasyon adlandırılır, deneysel model inşa edilir, sırası ile ilgili bileşenlerin konsantrasyonları ve referans örnek setinden üretilen veriler arasındaki ilişki gösterilir. Takip eden ikinci basamağa önceden haber veren basamak denir, ki kalibrasyon modeli bilinmeyenlerin spektral datalarından bileşenlerin konsantrasyonlarını hesaplamak için kullanılır [16].

Zaman tüketen işlemlerden kaçınmak için, aletsel yaklaşımların kullanımı ile çakışık spektraların çözülmesi için denemeler ya da çeşitli kemometrik metotlar yapılmıştır. Türev ve çoklu değişkenli istatistiksel analiz metotlarının her ikisi de absorbans ve bileşen konsantrasyonu arasında doğrusal ilişki olduğunu farz eder. Kalibrasyon basamağına sahip her bir metot, bileşen konsantrasyonları ve spektraları arasındaki ilişkiyi referans örnek setinden izah eder. Bu basamağı tahmin basamağı takip eder ki kalibrasyonun sonuçları örnek spektrumun bilinmeyenlerinden bileşen konsantrasyonlarını hesaplamak için kullanılır [7].

Çoklu bileşen analizlerine uygulanan çeşitli kemometrik yaklaşımlar arasında bulunan, klasik en küçük kareler metodu (CLS), temel bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi en küçük kareler metodu (PLS), bir çok ilaç formülasyonlarının kantitatif analizinde başarı ile uygulanmıştır [15].

Çok değişkenli metotlar örneğin klasik en küçük kareler (CLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR), seçilemeyen verilerden seçici bilgileri elde etmek için kantitatif spektral analizde kullanılır. Çoklu veri kalibrasyonu kullanılan çoklu bileşen analizinin en büyük avantajı karışımdaki bileşenler için hesaplama hızıdır ve ön ayırıştırma gereksinimi olmamasıdır [10].

6.1. Klasik En Küçük Kareler Metodu

CLS, doğrudan Beer kanununa dayanan, çoklu değişkenli en küçük kareler işlemlerine başlamak için en basit metotlardan biridir ki model, spektral ölçümlerde hata hesaplar. Birçok dezavantaja sahiptir, bunların arasında üretilen değişmez modelde, matriks ile bileşenler arasında etkileşim nedeni ile uygulanamaz. Her birinin konsantrasyonları ve karışımın bileşenlerinin hepsinin tam olarak bilinmesi gerekir [16].

CLS metodu en basit çoklu değişken metodudur ve çoklu lineer regresyon ile kalibrasyona dayanır. Bunun asıl dezavantajı, esnek olmayan bir model olmasıdır ve karışımdaki bileşenlerin hepsinin ve bunların konsantrasyonlarının bilinmesini gerektirir. Burada karışımdaki bileşenler arasında fiziksel veya kimyasal bir etkileşim olmamalıdır [10].

CLS metodu spektral şiddetlerin çoğu ya da hepsi analizde hesaba katılırken sinyalin ortalama etkisi için küçük sayıdaki dalga boyları için sınırlandırılmış olup, metotların kesinliği üzerinde önemli gelişmeler sağlayabilir [17].

Klasik en küçük kareler metodu (CLS), genellikle K-matris kalibrasyonu olarak bilinir. Bu şekilde adlandırılmasının nedeni, Lambert-Beer kanununun klasik ifadesine çoklu lineer regresyonun uygulanmasını içermesidir.

$$A = K \cdot C \quad (6.1)$$

A = Absorbans

C = Konsantrasyon

K = Seçilen dalga boyunun katsayıları

6.1.1. Kalibrasyon hesaplaması

CLS, kullanarak kalibrasyon üretmek üzere, bilinen örneklerin kalibrasyonları için matrisin absorbansı A ve matrisin konsantrasyonu C'yi oluşturmakla başlanır. Böylece K matrisi çözülür. Saf bileşenlerin alınan her bir spektrumu K kolonunu oluşturur.

Hesaplanan K, bilinmeyen örneklerin ölçülen spektrumlarında konsantrasyonlarını tahmin etmek için kullanılır. K, kalibrasyon matris ya da regresyon matris olarak adlandırılır. Katsayıları, spektrumdan bilinmeyenlerin katsayılarını tahmin etmek için kullanılır. Her sıra, bir spektral dalga boyu için bir katsayıya sahip olacaktır. Böylece, bilinmeyen spektrum ve kalibrasyon matrisinin basit matris çarpımı ile bilinmeyen konsantrasyon tahmin edilebilir.

CLS, bileşenler kadar dalga boyuna ve örneğe sahip olmayı gerektirir. Örnekte bulunan bileşenlerin konsantrasyon terimleri için her bir dalga boyundaki absorbansların konsantrasyon terimlerini hesaplamak için;

$$A_1 = K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots + K_{1c}C_c \quad (6.2)$$

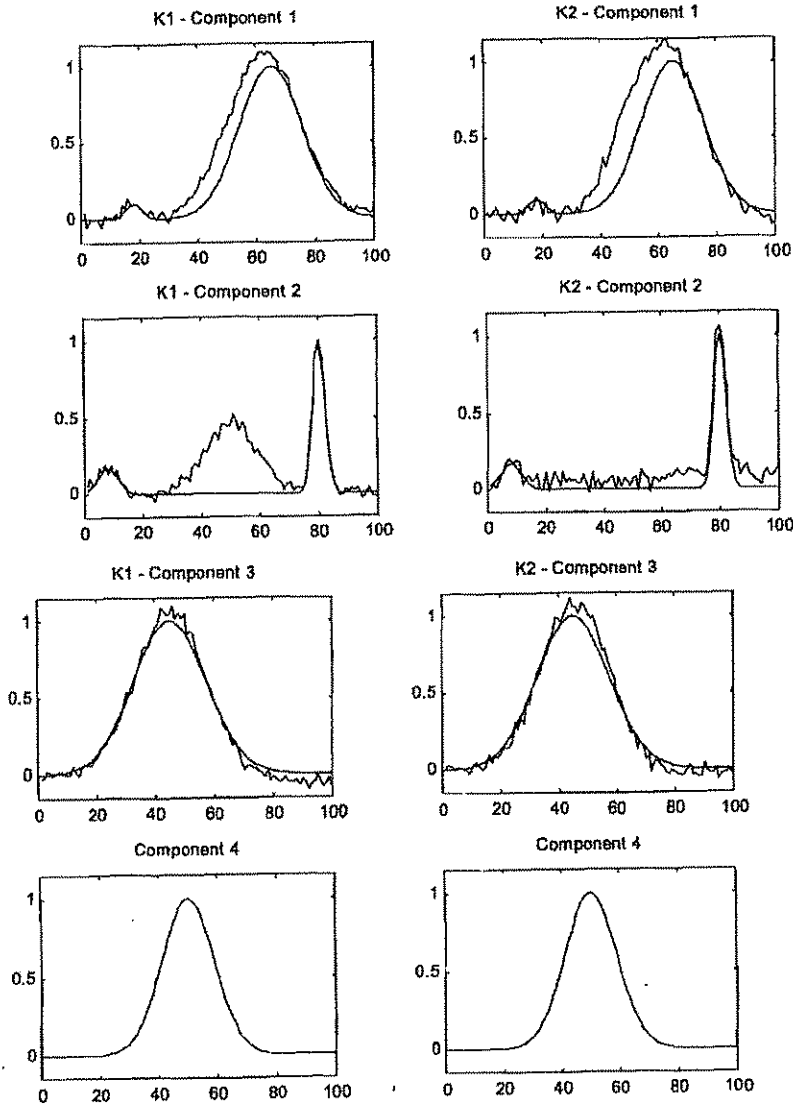
$$A_2 = K_{21}C_1 + K_{22}C_2 + \dots + K_{2c}C_c$$

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

.....

$A_w = K_{w1}C_w + K_{w2}C + \dots + K_{wc}C_c$ kullanılır. Eşitlik 6.2'de her bir dalga boyundaki absorpsiyon, A , yeniden yapılandırılmıştır. CLS kullanarak örnekteki bileşenlerin hepsi için konsantrasyon değerleri tam olarak bulunur.

6.1.2 Saf bileşenlerin spektralarının tahmin edilmesi



Şekil 6.1. Saf bileşenlerin spektralarının CLS hesaplamaları

Şekil 6.1 saf bileşenlerin gerçek spektralleri ile CLS ile hesaplanan saf bileşenlerin spektrallerini göstermektedir. Düz eğriler gerçek spektrallerdir, gürültülü eğriler CLS tahminleridir.

$$K_{artan} = (K_1 + K_2 + K_3) - (A_{1saf} + A_{2saf} + A_{3saf}) \quad (6.3)$$

$K_1, K_2, K_3 = 1. , 2. ve 3. bileşenler için tahmin edilen saf bileşen spektralleri$

$A_1, A_2, A_3 = 1. , 2. ve 3. bileşenlerin gerçek spektralleri$

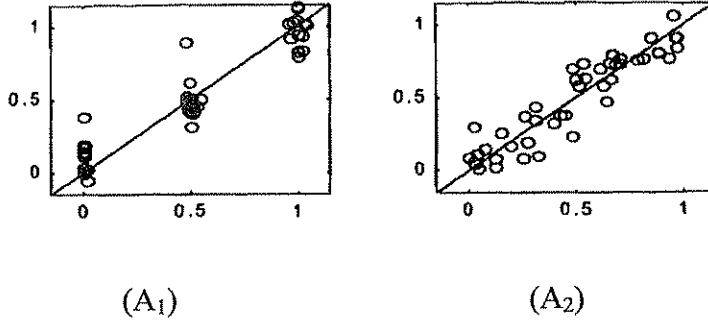
Şekil 6.1'de CLS, 1. ve 2. bileşenin düşük şiddetteki piklerinin tahmini için kullanılır. Bu pikler 4. bileşenin girişim yapmadığı spektrum bölgesine uzanır. Böylece, bu spektrum bölgesinde 4. bileşenden hesaplanana ayırmak için aşırı absorpsiyon dağılımı olmaz.

6.1.3 Alıştırma gruplarına uygunluk

Üretilen kalibrasyon ile örneğin konsantrasyonlarının tahmini için CLS kalibrasyon matrisi, K_{cal} kullanılır. Tahmin edilen ve gerçek konsantrasyon arasındaki farklar incelenir.

$$C_{unk} = K_{cal} A_{unk} \quad (6.4)$$

K_{1cal} ve A_1 eşitlik 6.4'te yerine konularak tahmin edilen konsantrasyonlar ile sonuç matrisi K_{1artan} tayin edilir. Aynı işlemler K_{2cal} ve A_2 için de yapılarak K_{2artan} tayin edilir.



Şekil 6.2. Beklenen ve tahmin edilen konsantrasyonlar için A_1 ve A_2 alıştırma gruplarına uygunluk

Beklenen konsantrasyon ile tahmin edilen konsantrasyonların A_1 ve A_2 alıştırma gruplarına uygunluğu, lineer regresyon ile kalibrasyon verilerinin uygunluğunun nasıl iyi yapılabileceğinin bir göstergesidir.

6.2. Temel Bileşen Regresyonu Metodu

Deneysel verilerin ayrıştırılması işlemlerini içerir. Veri matrisinin faktörü ve çalışılan analitin konsantrasyonları arasında kalibrasyon modeli inşa etmeye çalışan bir modeldir. PCR, analitin konsantrasyonu bilgisi kullanılmadan temel bileşendeki veri matrisinin ayrıştırılmasını yapar. İlk basamak, ikili karışımlar için kalibrasyon matrisi kurmayı içerir. Bu basamakta, dedektör gürültüsü ve bileşen pikinin şeklinin değişmesi, bileşenler arasında kimyasal hiçbir etkileşimin olmaması gibi, sistematik sinyal değişiminin diğer kaynakları ve bağımsız kimyasal değişikliklerin sayısına bağlı uygun sayıda faktör seçilir. PCR'de faktör sayısının seçimi, konsantrasyon verilerinde uygunluk olmayan sistemin modeli için sunulmuştur [19].

6.2.1 Kalibrasyonun hesaplanması

Elde bulunan temel vektörlerle tanımlanmış koordinat sistemindeki absorbans değerleri ile yeni koordinat sisteminin her bir eksenindeki spektrum koordinatlarını içeren veri matrisi için kalibrasyon oluşturulur. Yeni koordinatlar, temel vektördeki yeni koordinatları içeren matrisin spektralarından daha fazla değildir.

$$A_{proj} = V_{C^T} \cdot A \quad (6.6)$$

A_{proj} = Matriks içeren yeni koordinatlar

V_{C^T} = Matriks içeren öz vektörler

A = Orijinal alıştırma grupları absorbanans matriksi

Bilinmeyen konsantrasyon C'yi hesaplamak için;

$$C = F \cdot A_{proj} \quad (6.7)$$

C = Konsantrasyon

F = Kalibrasyon katsayısı

A_{proj} = Matriks içeren yeni koordinatlar

6.2.2 Bilinmeyenlerin tahmini

Hesaplanan F, bilinmeyen örneklerin ölçülen spektrumlarından konsantrasyonu tahmin etmek için kullanılır. Eşitlik 6.7'de A_{proj} yerine eşitlik 6.6 konulursa;

$$C_{unk} = F \cdot V_{C^T} \cdot A_{unk} \quad (6.8)$$

$F \cdot V_{C^T}$ yerine F_{cal} kullanılarak ölçülen spektrumdan bilinmeyen örnekteki konsantrasyon tahmin edilir.

$$C_{unk} = F_{cal} A_{unk} \quad (6.9)$$

Yeni absorbanans matrisindeki spektrumlar A_{unk} 'da yerine konularak, eşitlik 6.9'dan, yeni konsantrasyon matrisi üretmek için bilinmeyen örneklerin tahmin edilen konsantrasyon değerlerini içeren, C_{unk} bulunur [18].

6.3. Kısmi En Küçük Kareler Metodu

PLS genellikle, çoklu değişkenli veriler için temel regresyon tekniği olarak sunulur. Metodun en önemli özelliği, hesaplanan konsantrasyonlar ve spektraların her ikisinde de hataların hesaplanmasıdır. Bu metot PCR gibi hesaplanan konsantrasyonları hatasız kabul eder. Birçok geleneksel istatistik, hataların tümünün değişkenlerden (spektra) geldiği farzına dayanır. Örnek preparatında tartım ve seyreltmenin tam doğruluğundan kaynaklanan hatalar önemli hatalardır, bu yüzden bağımsız değişkenler önemli hatalardır [20].

PLS, PCR metodu gibi, kimyasal verilerin matrisleri arasında ilişki kuran faktör analizi metodudur. Ancak, PCR metodunda spektral ayrıştırma analit konsantrasyonu ile ilgili değilken PLS'de analit konsantrasyonu önem taşır [15].

PCR ve PLS metotları arasındaki ana fark deneysel verilerin ayrıştırma işlemindedir. PCR, analit konsantrasyonu bilgisini kullanmadan temel bileşendeki veri matrisinin ayrıştırılmasını yaparken; PLS, analit konsantrasyonu ve veri matrisinin ikisini de kullanarak ayrıştırma yapar. Bu iki metotta kalibrasyon işlemi birinci basamak uygun sayıda faktör seçmek içindir ki bu dedektör gürültüsü, bileşen pikinin şeklinin değişikliği ve kimyasal bileşenler arasında herhangi bir etkileşim gibi sistematik kaynak değişiminin kaynakları ve bağımsız kimyasal değişenlerin sayısına bağlıdır [19].

PLS metodu, konsantrasyon matrisi (X olarak gösterilir) ve absorban matrisi (Y olarak gösterilir) arasındaki ilişkiyi hesaplamak için kullanılır. Bu metot, orijinal çok değişkenli veri matrisinin daha küçük matrisler üzerinden gösterimine dayanır. Tanımlayıcı matris X'de sistematik değişiklik için cevap matris Y'deki bilgileri ileten ortogonal kolonlar ile gösterilir.

$$X = X^- + P' + E \quad (6.10)$$

$$Y = Y^- + UC' + F \quad (6.11)$$

$$U = H + T \text{ (iç ilişki)} \quad (6.12)$$

X^- ve Y^- = temel değer matrisi

P' = her bir bileşende X' 'in etki gösterdiği yükleme matrisi

E, F ve H = artan matris

C' = X ve Y arasındaki korelasyonu ifade eden ağırlıkların matrisi [3]

PCR, basit olarak bir ILS uygulamasıdır fakat burada elde edilen spektrumlara basit ve optimize edilmiş bir koordinat sistemi uygulanır ki en uygun kalibrasyon oluşturulmaya çalışılır. PLS, ise bu anlayışı bir basamak ileri götürür ki bu PCR'de kullanılan koordinat sisteminden farklı bir sistem içerir. Bu strateji ise faktörlerin bulunmasında her iki değer hem konsantrasyon hem de absorpsiyon değerlerinin kullanılmasını içerir. Bunun bu şekilde yapılmasında ise iki sebep vardır. Bunlardan birincisi birincil komponent analizi (PCA) olarak bilinen metodun konsantrasyon verilerinden gürültü uzaklaştırma yeteneğinin kullanılmasıdır. İkincisinde ise gürültü nedeni ile aygen vektörlerdeki sapmayı içerir. Spektral verilerdeki gürültüler genel olarak teorik olarak oluşturulan gürültüsüz verilerin aygen değerlerinin sapmasına neden olur. Konsantrasyon verilerindeki gürültü spektral verilerdeki gürültüden bağımsız olduğu için, konsantrasyon verilerindeki gürültü nedeniyle oluşan hata genel olarak her bir konsantrasyon aygen vektörlerin ilgili spektral aygen vektörlerden farklı olarak her bir yöne geliş güzel sapmasına neden olur. Bu yüzden her bir spektral vektör ilgili olan konsantrasyon vektörü ile karşılaştırılırsa aralarında bir açının olduğu görülür. Bu açısal fark her bir veri alanları arasında gürültü farklılıklarından olduğu için, vektörler birbirine doğru çevrilerek bunlar aynı doğrultuya getirilebilir. Bu çevirme genel olarak gürültüyü daha iyi uzaklaştırmalıdır ve böylece vektörleri gürültüsüz spektral ve konsantrasyon verileri içeren ideal düzlemde birbirine yaklaştırabilir.

Çoklu lineer regresyon metotlarında olduğu gibi, PLS'deki ana amaç lineer bir model oluşturmaktır,

$$Y=XB + E$$

Burada Y matris formundaki spektral değeri ifade ederken X ise konsantrasyon verilerini ifade eder. B regresyon katsayısı matrisidir ve E ise Y ile aynı boyutlarda olan gürültü terimini ifade eder.

Her iki PCR ve PLS konsantrasyon ve absorbans değerlerinin lineer birleşimi olarak katsayı değerleri üretirler, bu yüzden konsantrasyon modelinde kullanılan katsayı matris değeri arasında hiçbir korelasyon yoktur. Örneğin, konsantrasyon verilerini ifade eden bir X matrisine karşılık, aletten elde edilecek bir Y absorbans kullanılan aletten elde edilen ve matris matris formunda olan Y olarak adlandırılan spektral verileri ifade etsin. Bu iki matris arasında bir korelasyon vardır ve bir regresyon hesaplaması yapılarak uygun bir ağırlık matrisi (W) için katsayı değeri matrisi $T= XW$ hesaplanabilir. Aynı zamanda lineer regresyon modeli $Y=TQ + E$ hesaplanabilir ve burada Q, T için regresyon matris katsayıları ve E ise gürültü ya da hata terimini ifade eder. Q değeri hesaplandıktan sonra yukarıdaki regresyon modeli $Y= XB + E$ değerine eşit olacaktır. Burada $B=WQ$ olarak verilir [21,22].

6.4. Kullanılan Tekniklerde Hata Hesaplanması

“Tahmin edilen artan hataların kareleri toplamı” ya da PRESS ile sonuçları sayısal olarak incelemek en iyi yollardan biridir. PRESS hesaplamasında, tüm örnekler için, beklenen ve tahmin edilen değerler arasındaki hatalar hesaplanır, kareleri alınır ve toplanır.

$$PRESS = \sum (C_{tahmin\ edilen} - C_{beklenen})^2 \quad (6.5)$$

Genellikle, PRESS her bir tahmin edilen bileşen için hesapla ayrılmalıdır ve her bileşen için kalibrasyon bireysel olarak optimize edilmelidir. Tüm bileşenler için hesaplanan toplam PRESS, her bir grubu için tek PRESS değerlerini verecektir. Bu veri gruplarının hiçbirisi aynı sayıdaki örneğe sahip olmadığından sıralı veri gruplarındaki örnek sayısı ile her bir PRESS değeri bölünecektir, bu nedenle daha

kesin karşılaştırma yapılabilir. Aynı zamanda tahmin edilen bileşenlerin sayısı ile her bir değer bölünecektir.

Hiçbir veri grubu aynı sayıda örnek içermediğinde PRESS değerlerini düzenlemek doğru bir yol değildir. Eğer farklı sayıda örnek içeren veri grupları için PRESS değerleri doğru şekilde karşılaştırılmak isteniyorsa, alıştırma grupları için bunları Kalibrasyonun Standart Hatası, SEC, validasyon grupları için Tayinin Standart Hatası, SEP'e dönüştürmek gerekir.

Aynı zamanda, her bir K_{artan} için r , korelasyon katsayısı hesaplanır. Eğer veri grupları için tahmin edilen konsantrasyon beklenen konsantrasyona tam olarak uyuyorsa r , 1'e eşittir. Eğer beklenen ve tahmin edilen konsantrasyonlar arasında hiçbir ilişki yoksa r , 0'a eşittir.

Her bir kalibrasyon işlemi için gerçek regresyon katsayısı da bulunmalıdır. Tahmin edilen her bir bileşen için kalibrasyon matrisinde bir sıra alınır. Her sıra, her dalga boyu için bir katsayı içerir. Böylece eğer bir spektrum çizmek istenirse K_{cal} 'un her bir sırası ile uygun şekil çizilebilir [18].

BÖLÜM 7. DENEYSEL KISIM

GİRİŞ

Parasetamol (asetaminofen), ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip bir ilaç etken maddesidir. Parasetamol ağızdan alındığında gastrointestinal sistemde hızla emilir. İlaç alındıktan 30-60 dakika sonra maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Parasetamol bütün dokulara hızla dağılır. Plazma proteinlerine bağlanması zayıftır. Plazma yarı ömrü 1-4 saattir. İdrarla, parasetamol'ün %1-3'ü değişmemiş olarak atılır. %80'i ise biyolojik olarak glukuronid veya sülfat bileşikleri olarak atılır. Analjezik etkisi yeni nesil analjeziklere göre hafif kalmış olsa da gastrointestinal sistemde yan etkisinin hemen hemen olmaması, güvenilirliği ve de gebelerde kullanılabilmesi parasetamolun her zaman ön planda kalmasını ve klasik bir analjezik olmasını sağlar.

Aspirin ya da asetilsalisilik asit (ASA), genellikle ufac ağrı ve sızılar için kullanılan ağrı kesici ve ateş düşürücü bir ilaçtır. Ayrıca kan seyreltici etkisi vardır ve kalp krizine karşı koruma sağlaması amacıyla uzun dönem az dozaj kullanılır. Aşırı dozda kullanımı yüzünden her yıl yüzlerce kişi ölümcül etkilere maruz kalsa da, genel olarak aspirinin faydalı bir ilaç olduğu kabul edilir.

Kafein kahve, çay, kola, çikolata gibi yiyeceklerin içinde bulunan ve vücutta bağımlılık yaratan bir maddedir. Kimyasal ismi trimetilksantin'dir. Bağımlılık yaratma mekanizması kokain ve eroin gibi amfetaminlerle aynı olmakla birlikte onlar kadar etkili değildir. Bağımlılık yaratmasının yanı sıra uyku açıcı ve enerji verici iki etkisi daha vardır. Vücutta kafein miktarının yarıya inme süresi 6 saattir.

Bu çalışmada kullanılan üç ilaç etken maddeleri hem tek olarak [34,35,36] hem de üçünün beraber olduğu [31] karışımlarda spektrofotometrik ve kromatografik olarak

çalışılmıştır. Bu çalışmalarda etken maddeler hem plazmada hem de tablet içeriğinde analiz edilmişler ve buna göre metotlar geliştirilmiştir [13]. Burada aynı maddelerin tekrar kullanılmamızın sebebi bu üçlü karışımın çalışmamızda model olarak kullanılmasıdır.

Kemometrik metotlar son yıllarda ilaç etken maddelerinin karışımlarda kantitatif belirlenmesinde sıklıkla kullanılan metotlardandır [32]. Çok uygun olmalarına rağmen matematiksel olarak karmaşık algoritmalar içermektedirler bu yüzden de uygulamaları problemler oluşturabilmektedir. Kalibrasyon oluşturulması içinse kemometrik metotlarda yine deneysel aşamalarda fazla ölçümlerin alınması gerekecektir. Türev spektrofotometresi kemometrik metotlara göre daha hassas sonuçlar vermese de uygulama olarak kemometrik metotlardan daha kolaydır. Son yıllarda türev spektrofotometresinin değişik uygulamaları ortaya çıkmıştır. Bunlardan biri olan oran-türev spektrofotometrisidir [33]. Bu metoda önce spektrumların oranlarının elde edilip sonra türevlerinin alınması ile hesaplamalar yapılır. İkincisi, diğer metotların özellikle kemometrik metotların türev spektrofotometrisi ile birleştirilmesi esasına dayanan metotlar [15] ve son olarak sadece türev spektrofotometrisinin uygulandığı hesaplamalar [4]. Oran-türev spektrofotometresi ikili karışımlara çoklukla uygulanan bir metottur fakat üçlü karışımlara uygulaması oldukça sınırlıdır. Literatürde üçlü karışımlara uygulanan tek çalışmada [37] ilk yapılan işlem ikili bölme metodu ve daha sonra ise türev işleminin uygulanmasıdır. Fakat bu çalışmada türev işleminden sonra uygulanan yöntem bizim burada uyguladığımız yöntemden farklıdır.

Bu çalışmada oran-türev spektrofotometresi yanında kemometrik metotlar da referans olarak kullanılmıştır. Özellikle PLS yöntemi test uygulamalarında referans olarak seçilmiştir ve bunun yanında PCR ve CLS metotları da elde edilen deneysel verilere uygulanmıştır. Temel olarak bu yeni metot tablet analizlerinde üçlü karışımların analizlerine uygulanabilecektir.

7.1. Enstrumentasyon

Absorpsiyon ölçümleri için Shimadzu UVPC yazılımı yüklenmiş bir Shimadzu UV-240 çift ışıklı UV-VIS spektrofotometrisi kullanıldı. Ölçümlerde 1 nm slit aralığı kullanıldı ve spektrumlar 0,1 nm aralıklarla elde edildi. Verilerin düzenlenmeleri, regresyonlar ve istatistiksel analiz için UVPC ve EXCEL yazılımları kullanıldı.

7.2. Ticari Tablet Formülasyonu

Metot geliştirme için 15 mg ACE, 15 mg ASP ve 3.9 mg CAF içeren bir ticari tablet formülasyonu (Bristol-Myers tarafından üretilmiş Excedrin[®], 50844 Rev: 0303A) kullanıldı. Bütün önerilen metotlar bu tablet üzerine uygulandı. ACE, ASP ve CAF Türk ilaç firmaları tarafından sağlandı.

7.3. Standart Çözeltiler

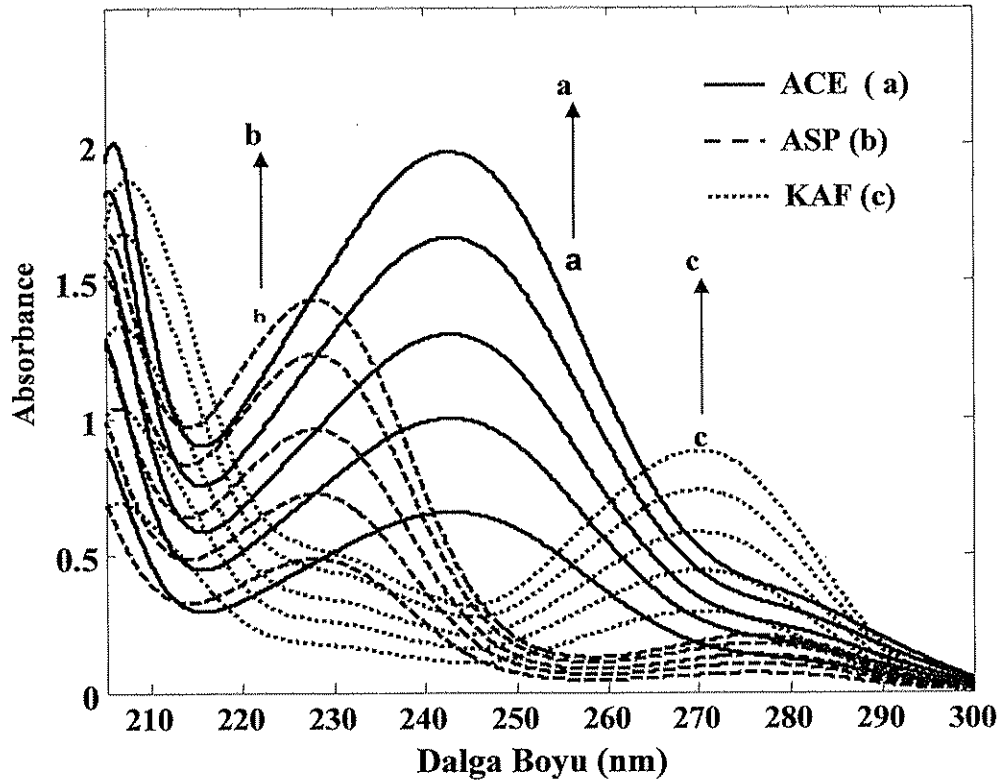
50 mg/100 mL ACE, 50 mg/100 mL ASP ve 30 mg/100 mL CAF içeren stok çözeltiler pH'sı 2'ye ayarlanan asitle hazırlandı. Oluşacak bozunmalardan dolayı meydana gelecek hataları önlemek amacı ile deneyin her seti için taze çözeltiler hazırlandı. ACE için 10-30 µg/mL, ASP için 10-30 µg/mL ve CAF için 4-20 µg/mL içeren çözeltilerin standart bir serisi stok çözeltiler kullanılarak hazırlandı. Üç metot için aynı konsantrasyon aralığındaki çözeltiler kullanıldı. Bütün kalibrasyon denklemleri üç farklı ölçüm kullanılarak elde edildi ve final sonuçları bunların ortalaması alınarak elde edildi. 10-30 µg/mL ACE, 10-30 µg/mL ASP ve 4-20 µg/mL CAF içeren stok çözeltiden 8 tane sentetik karışım validasyon set için hazırlandı. PLS, CLS ve PCR kalibrasyonu için ACE, ASP ve CAF içeren tablet içeriğinden 21 farklı sentetik karışım hazırlandı.

7.4. Tablet Analizi

Tablet çözeltilerinin hazırlanmasında, 10 tablet tartıldı ve bir havanda toz haline getirildi. Bu 10 tabletin ortalamalarından bir tablet miktarı kadar tartılarak 100 mL kalibreli bir volumetrik şişede 100 mL HCl içinde çözüldü. Hazırlanan çözeltiler 0.45 µm tek kullanımlık membran filtreden süzöldü. Final çözeltilisi deneysel çalışmalar için çalışılacak konsantrasyon aralığına seyreltildi.

BÖLÜM 8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Şekil 8.1, ACE, ASP ve CAF'in pH 2'deki sulu çözeltileri için 210 – 320 nm aralığındaki absorpsiyon spektrallerini gösterir. Burada spektraller arasında güçlü bir girişim görülmektedir ve bu üç maddenin klasik metotlarla ayrılma işlemini zorlaştırır. Bu çalışmada, üçlü karışımı oluşturan bileşenlerin kantitatif tayini için CLS, PCR ve PLS matematiksel modellerinden ve türev metodundan yararlanıldı.



Şekil 8.1. Sıfır derece ASP, ACE VE KAF spektrumu

a₁ – a₅; 10 µg/mL'den 30 µg/mL'ye ACE konsantrasyonlarını gösterir.

b₁ – b₅; 10 µg/mL'den 30 µg/mL'ye ASP konsantrasyonlarını gösterir.

c₁ – c₅; 4 µg/mL'den 20 µg/mL'ye KAF konsantrasyonlarını gösterir.

Doğrudan UV-VIS spektrofotometrik metotlar, ilaçların eş zamanlı hesaplanmasını imkansız kılan, ortak formüle edilmiş ilaçların çakışık spektral bantlarında birçok problem verir. UV spektrofotometride türev tekniğinden, spektral çakışıklığa sebep olan girişim problemlerinin üstesinden gelmek için başarıyla faydalanılmıştır. Bunun yanında, bu teknik, herhangi bir ayırma gerektirmeyen hızlı ve duyarlı bir metottur. Bu metot, diğer benzer ilaç formülasyonlarının analizinde özellikle ikili karışımlara başarıyla uygulanmıştır [26].

Birinci türev metodu, bir karışım içindeki etken maddelerin çözülmesini sağlayan sıfır kesim noktası kullanmayı gerektiren bir [14,22,23,24,25] metottur. Bir biri ile çakışmış spektrumların türev tekniği ile çözülmesinde hassaslıkta absorpsiyon piki yüksekliğindeki azalmadan dolayı azalma oluşmaktadır. Elde edilen sıfır kesim noktası her zaman absorpsiyonun maksimum olduğu noktada elde edilmeyebilir. Bu durumda absorpsiyonların okunmasında gürültü oranlarındaki artmadan dolayı hataların oluşmasına neden olmaktadır. Bu yüzden okuma yapılan absorpsiyon değerinin çok iyi belirlenmesi gerekmektedir [27].

Türev tekniği safsızlık içeren madde spektrumlarının analizinde ve birden fazla aktif madde içeren karışımların analizinde kullanışlı bir metottur. Fakat dördü beşli karışımların analizinde türev metodu yeterli bir analiz metodu değildir. Bu tür karışımların analizinde çoklu değişken analizleri ön plana çıkmaktadır. Tüm bileşenlerin analizleri eş zamanlı olarak hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Bu metotlardaki dezavantaj ise algoritmalarındaki karmaşıklık nedeni ile herkes tarafından kolayca uygulanması zordur. Çoklu değişken analizlerinde elde edilen sonuçlar daha güvenilirdir. Bunun ana sebeplerinden biri, türev metodunda tek dalga boyuna göre kalibrasyonlar oluşturulurken çoklu değişken metotlarında absorpsiyon ölçümlerinde kullanılan tüm dalga boylarının hesaplamalarda kullanılmamasıdır. Bu da bu metotların güvenilirliğini arttırmaktadır. Fakat belirtildiği gibi bu metotların uygulamadaki zorluklarından dolayı daha basit hızlı uygulanabilir metotlarda ihtiyaç vardır. Burada uygulanan kemometrik metotlar PLS, PCR ve CLS olarak uygulanmış ve elde edilen sonuçlar bu çalışmada geliştirilen oran-türev metodu ile elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır.

8.1 Birinci Türev Spektrofotometri Metodu

Şekil 8.1, ACE, ASP ve CAF için sıfırıncı derece spektrumlarını gösterir. Ölçülen maksimum absorbanstaki dalga boyları, ACE için 243 nm, ASP için 228 nm ve CAF için 270 nm dir. Üç maddenin spektral bantlarının çakışık olmasından ötürü üçlü karışımın her bir bileşeninin hesaplanması için sıfırıncı derece spektrumların kullanılması mümkün olmaz. Türev spektrofotometri, karışımdaki çakışık spekturumlu maddelerin eş zamanlı hesaplanması için yaygın kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, son yıllarda ikili karışımların çözülmesi için analitik sinyallere sadece türev uygulanması yeterli olmamakta iyi bir ayrılmayı sağlamak için bu sinyallere önce oran daha sonra türev uygulanarak hesaplamalar yapılmaktadır.

8.1.1 Oran spektrofotometri metodu

Çakışık spektralı karışımların çözülmesi için türev spektrofotometride sıfır kesim noktası tekniğinin kullanımı doğruluk ve hassasiyette kayba neden olur. Bu problem, ölçümlerin çok kritik dalga boylarında olmasından ve noktanın tayininin bazen zor olmasından kaynaklanır ve noktayı belirlemedeki en küçük değişiklik bazı hataları meydana getirir. Oran spektrofotometri, maksimum ya da minimumdaki uygun dalga boyunda karışımdaki bileşenlerin hesaplanmasını sağlar [27].

Türev spektrofotometri, normal spektrofotometriden daha iyi seçicilik sunar çünkü spektral çakışıklığı azaltır ve daha iyi çözünme sağlar [25].

Türev spektrumunun şekline etki eden ana parametreler, dalga boyu tarama hızı, türev dalga boyu farkı ($\Delta\lambda$) ve düzleştirmedir. Bu parametreler geniş piklerde iyi sonuç vermesi, hesaplamalarda daha büyük seçicilik ve hassasiyet vermesi için optimize edilmelidir. Genellikle $\Delta\lambda$ 'daki artış ile gürültü seviyesinde azalma meydana gelir, böylece türev spektrumundaki dalgalanma azalır. Eğer, $\Delta\lambda$ değeri çok büyük ise spektral çözünme çok zayıftır. Böylece $\Delta\lambda$ 'nın uygun değer, gürültü seviyesi ve spektrumun çözünmesi hesaba katılarak hesaplanmalıdır [30]. Yapılan

çalışmada en iyi kalibrasyon denklemi için bazı $\Delta\lambda$ değerleri denendi ve hesaplamalar için en uygun $\Delta\lambda$ değeri 5 olarak bulundu, $\Delta\lambda = 5$ nm.

8.1.2 Sıfır kesim noktası metodu

Sıfır kesim noktası metodu O'Haver tarafından ilk kez, kalibrasyon grafiklerinin yapılandırılmasında türev yaklaşımı için sunuldu. Metodun başarısı, türevden sonra elde edilen bantların şiddetine ve ilgili çakışık spektraların derecesine bağlıdır. Metodun avantajları kadar dezavantajları da vardır. Elde edilen türevlerdeki gürültü seviyesi özellikle uzun dalga boyu bölgelerinde yüksektir. Klasik düzleştirme işlemleri kullanılarak gürültü uzaklaştırılabilir ancak bu uzun dalga boyu bölgelerinde daha zayıf, kısa dalga boyu bölgelerinde daha güçlü olan türev eğrisinin deformasyonunu içeren bazı problemleri getirir [28].

Sıfır kesim noktası metodu, bileşenlerin bireysel türev spektralarının sıfır kesim noktası dalga boyları için uygun değerli absorpsiyon değerlerinin ölçümlerini içerir [29]. Analitik kalibrasyonun hazırlanması için oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir.

8.2 Kullanılan Etken Maddeler İçin Metot Geliştirme

Şekil 8.2, ACE spektrumunun ASP ve CAF toplamına bölünmesinden elde edilen spektrumu göstermektedir. Figürde görüldüğü gibi ACE absorpsiyon pikinde bir artma varken diğer ikisindeki azalma açıkça görünmektedir. Tüm maddeler için aynı işlemler yapıldı. Önce iki maddeye ait ve orta noktayı temsil eden absorpsiyon spektrumları toplandı ve tüm spektrumlar bu toplam spektruma bölündü. Elde edilen bölüm sonuçlarının türevleri alınarak sıfır kesim noktaları elde edildi.

$$O_{KAF} = \frac{A_{tot}}{A_{PAR} + A_{ASP}} \quad (8.1)$$

$$\frac{dO_{KAF}}{d\lambda} = \frac{dA_{TOT}}{d\lambda(A_{PAR} + A_{ASP})} = \frac{dA_{TOT}}{d\lambda(\varepsilon_{PAR}C_{PAR} + \varepsilon_{ASP}C_{ASP})} \quad (8.2)$$

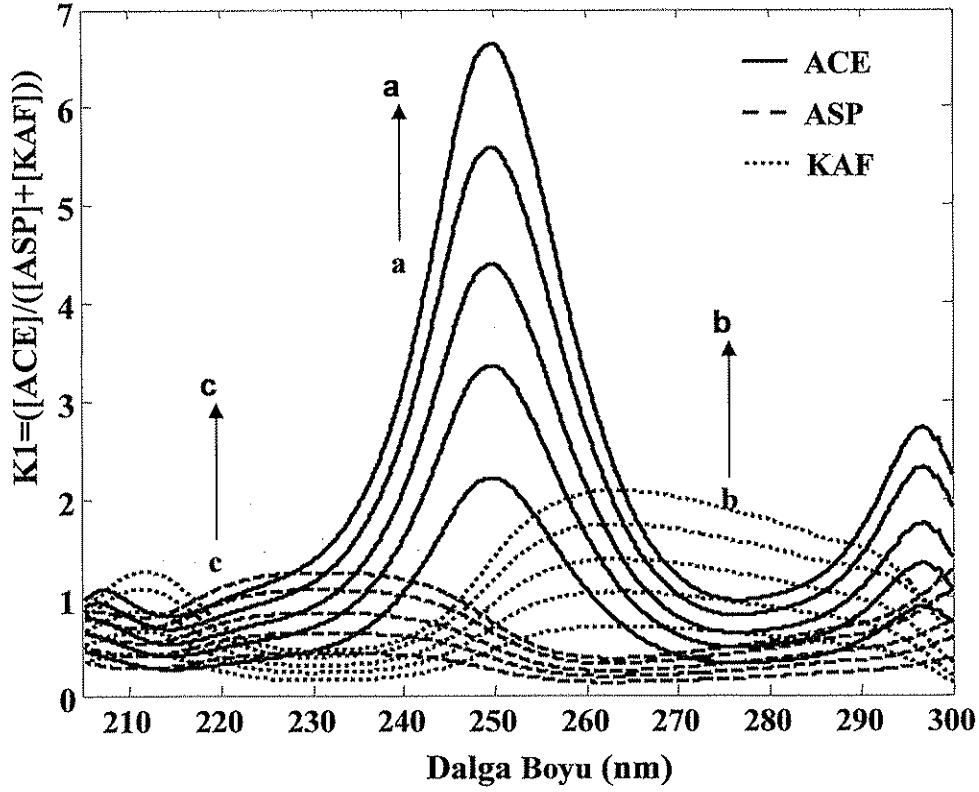
$$O_{ASP} = \frac{A_{tot}}{(A_{PAR} + A_{KAF})} \quad (8.3)$$

$$\frac{dO_{ASP}}{d\lambda} = \frac{dA_{TOT}}{d\lambda(A_{PAR} + A_{KAF})} = \frac{dA_{TOT}}{d\lambda(\varepsilon_{PAR}C_{PAR} + \varepsilon_{KAF}C_{KAF})} \quad (8.4)$$

$$O_{PAR} = \frac{A_{tot}}{(A_{ASP} + A_{KAF})} \quad (8.5)$$

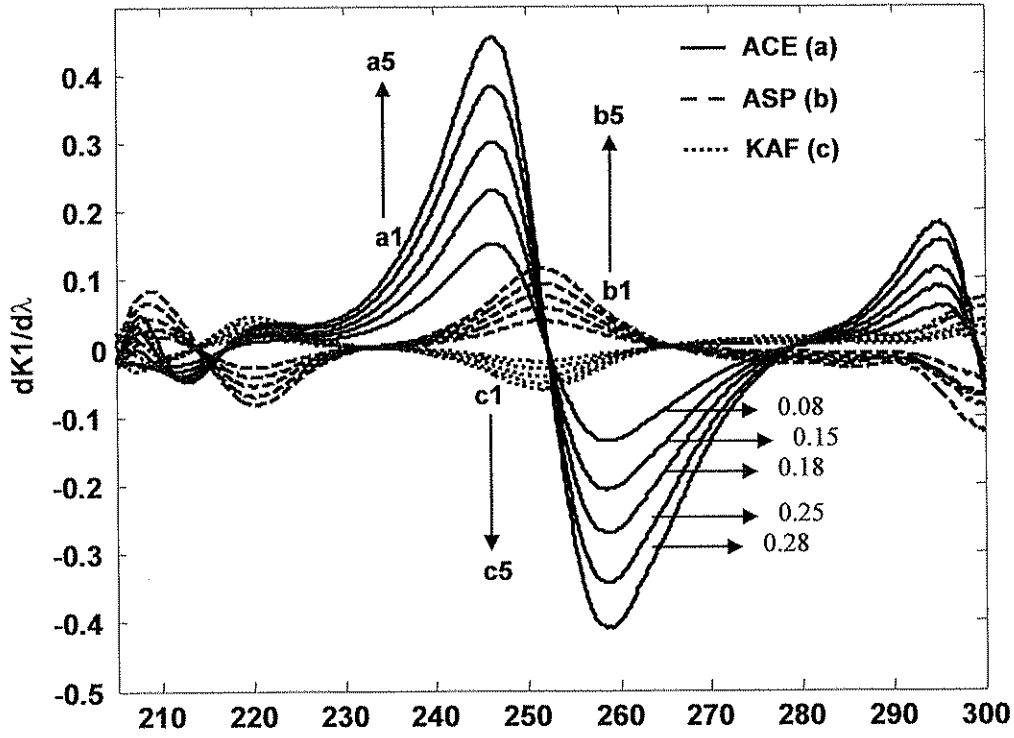
$$\frac{dO_{PAR}}{d\lambda} = \frac{dA_{TOT}}{d\lambda(A_{ASP} + A_{KAF})} = \frac{dA_{TOT}}{d\lambda(\varepsilon_{ASP}C_{ASP} + \varepsilon_{KAF}C_{KAF})} \quad (8.6)$$

Her bir madde için birden fazla sıfır kesim noktası elde edildi ve her bir nokta için ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ve en iyi sonucu veren nokta tespit edilerek hesaplamalar yapıldı.



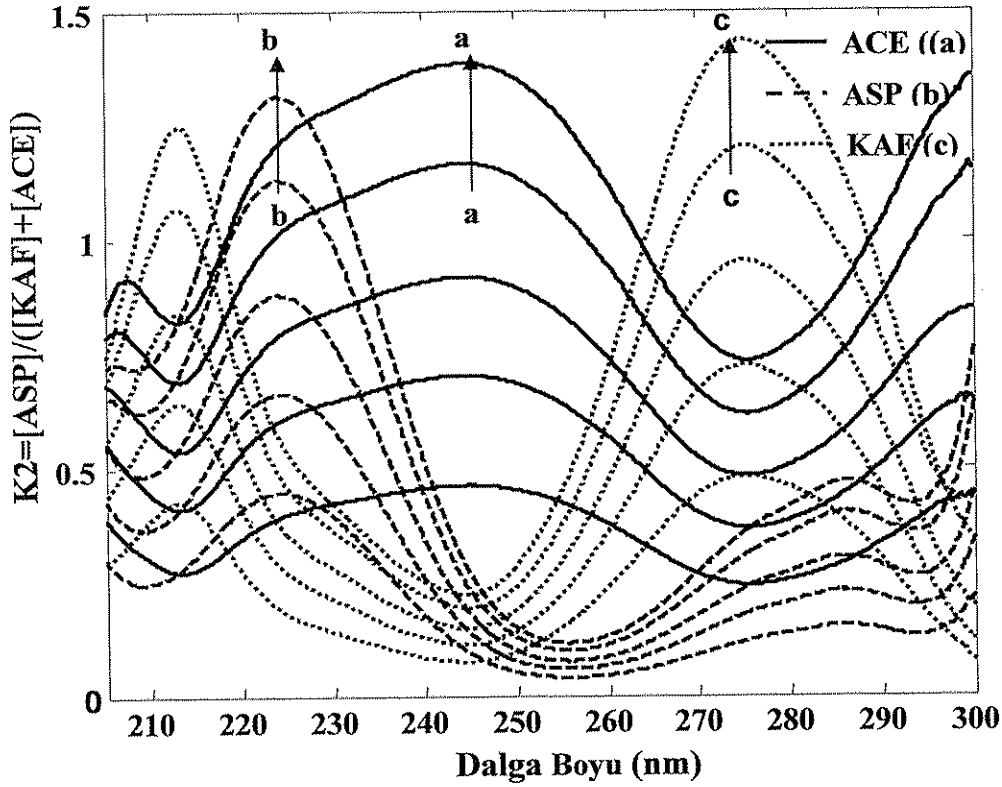
Şekil 8.2. ACE spektrumunun ASP ve CAF toplamına bölünmesinden elde edilen spektrum.

Şekil 8.3 ACE spektrumunun ASP ve CAF toplamına bölünmesi ile elde edilen spektrumun türevini göstermektedir. Yapılan çalışmada, ACE'nin konsantrasyonu için, 10-30 mg/mL aralığındaki ACE'nin absorpsiyon spektrası, 10-30 mg/mL aralığındaki ASP ve 4-20 mg/mL aralığındaki CAF'nin orta noktaya gelen tablet içeriğine karşılık gelen spektrumlarının toplamına bölündü. Elde edilen absorpsiyon spektrasının dalga boyuna göre türevi alındı (Şekil 8.3). ACE'nin hesaplanması için sıfır kesim noktaları 213 nm, 235 nm ve 265 nm olarak elde edildi. Bu dalga boylarında kalibrasyon grafikleri hazırlandı ve en uygun sonucu veren dalga boyu seçilerek hesaplamalar yapıldı ve ACE için bu dalga boyu 265.1 nm olarak elde bulundu.



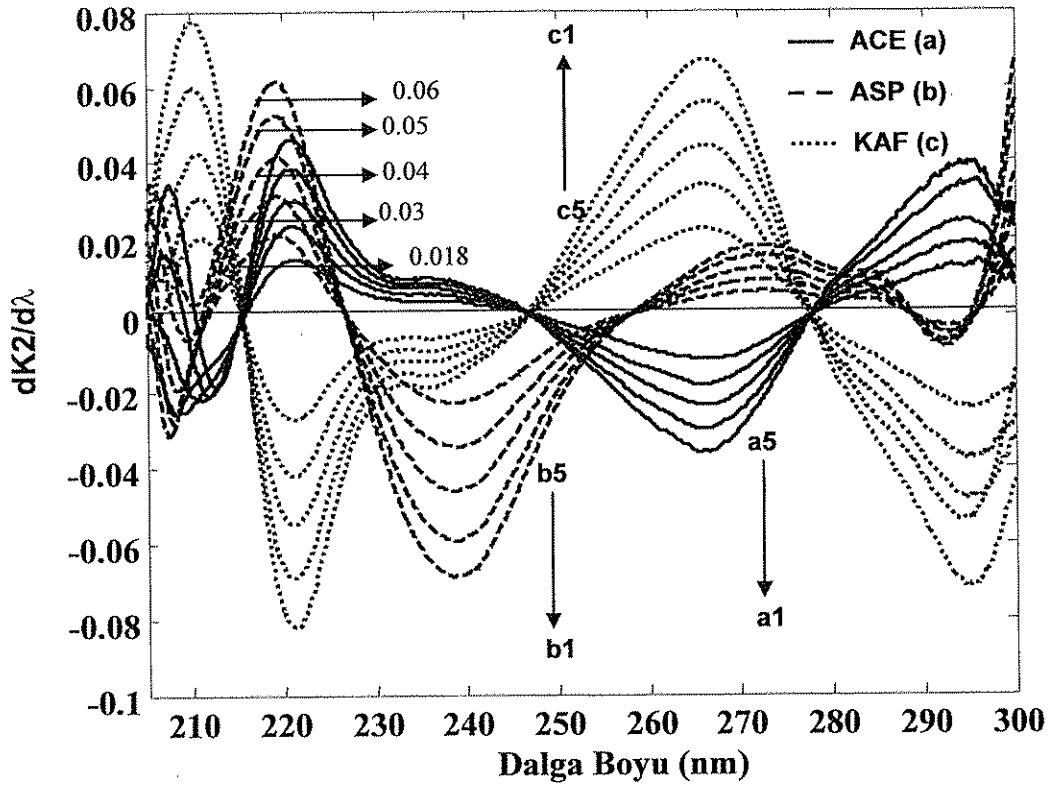
Şekil 8.3. ACE spektrumunun ASP ve CAF toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumun türevi

Şekil 8.4, ASP spektrumunun KAF ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumu göstermektedir.



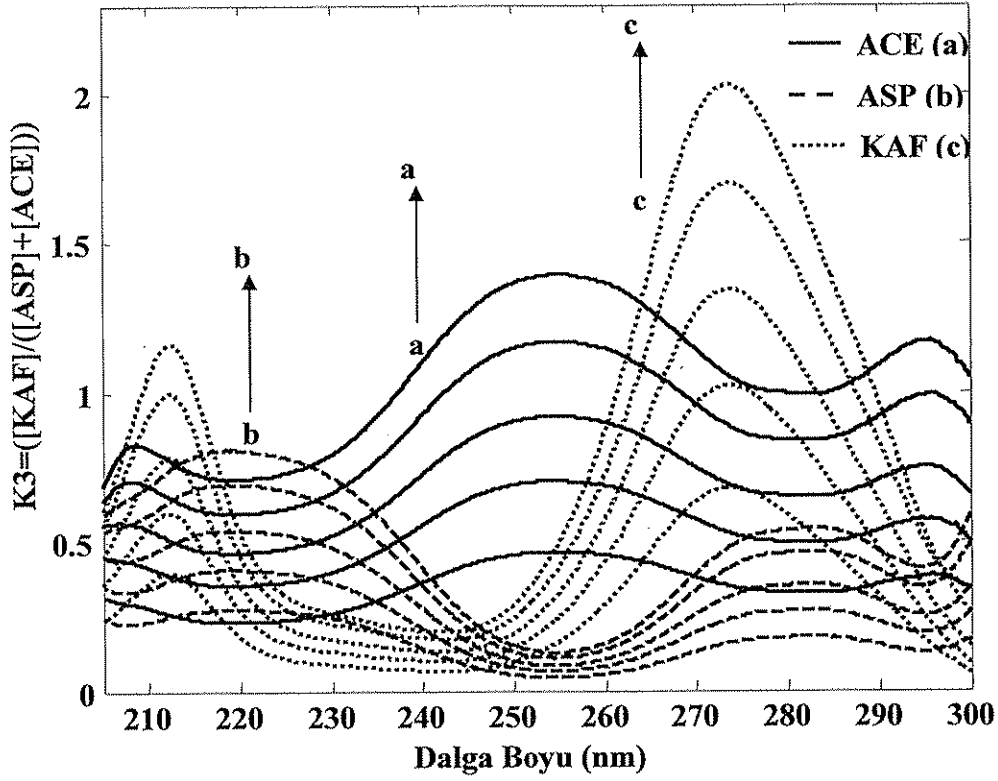
Şekil 8.4. ASP spektrumunun KAF ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrum

Şekil 8.5 ASP spektrumunun KAF ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen türevin spektrumunu göstermektedir. Yapılan çalışmada ASP'nin konsantrasyonu için, 10-30 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki ASP'nin absorpsiyon spektrası, 4-20 $\mu\text{g/mL}$ KAF ve 10-30 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki ACE'nin orta noktaya gelen spektrumları toplamına bölündü. Elde edilen absorpsiyon spektrasının dalga boyuna göre türevi alındı, Şekil 8.5. ASP'nin hesaplanması için sıfır kesim noktaları 217 nm, 248 nm ve 280 nm olarak elde edildi. Bu dalga boylarının her biri için kalibrasyon grafikleri oluşturuldu ve en iyi sonucu veren dalga boyu 217 nm olarak tespit edilerek konsantrasyon hesaplamaları ona göre yapıldı.



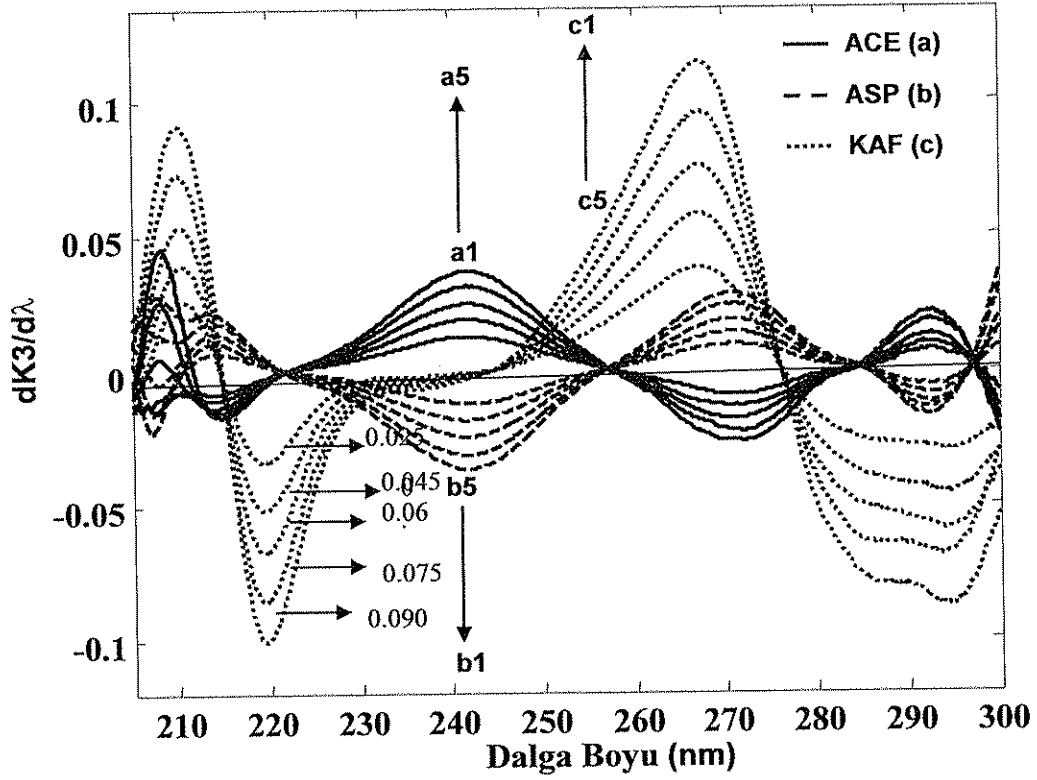
Şekil 8.5. ASP spektrumunun KAF ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumun türevi

Şekil 8.6, KAF spektrumunun ASP ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumu göstermektedir.



Şekil 8.6. KAF spektrumunun ASP ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrum

Şekil 8.7, KAF spektrumunun ASP ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen türevin spektrumunu göstermektedir. Yapılan çalışmada KAF'nin konsantrasyonu için, 4-20 mg/mL KAF'nin absorpsiyon spektrasi, 10-30 mg/mL aralığındaki ASP'nin ve 10-30 mg/mL aralığındaki ACE'nin orta noktaya gelen toplam spektrumuna bölündü. Elde edilen absorpsiyon spektrasi dalga boyuna göre türevi alındı, Şekil 8.7. KAF'nin hesaplanması için sıfır kesim noktaları 222 nm, 258 nm, 287 nm ve 298 nm olarak elde edildi. Bu dalga boylarında kalibrasyon grafikleri hazırlandığında 222 nm de en iyi sonuçlar elde edildi.



Şekil 8.7. KAF spektrumunun ASP ve ACE toplamına bölünmesiyle elde edilen spektrumun türevi

8.2.1 Kemometrik metotlar

Tek bir dalga boyu yerine birçok spektral dalga boyunu eş zamanlı olarak kullanılması, çok değişkenli kalibrasyonlarda sıklıkla kullanılır. Bu metotlar kantitatif analizlerde bant çakışıklığının getirdiği hatalara en aza indirgemedede oldukça yarar sağlarlar.

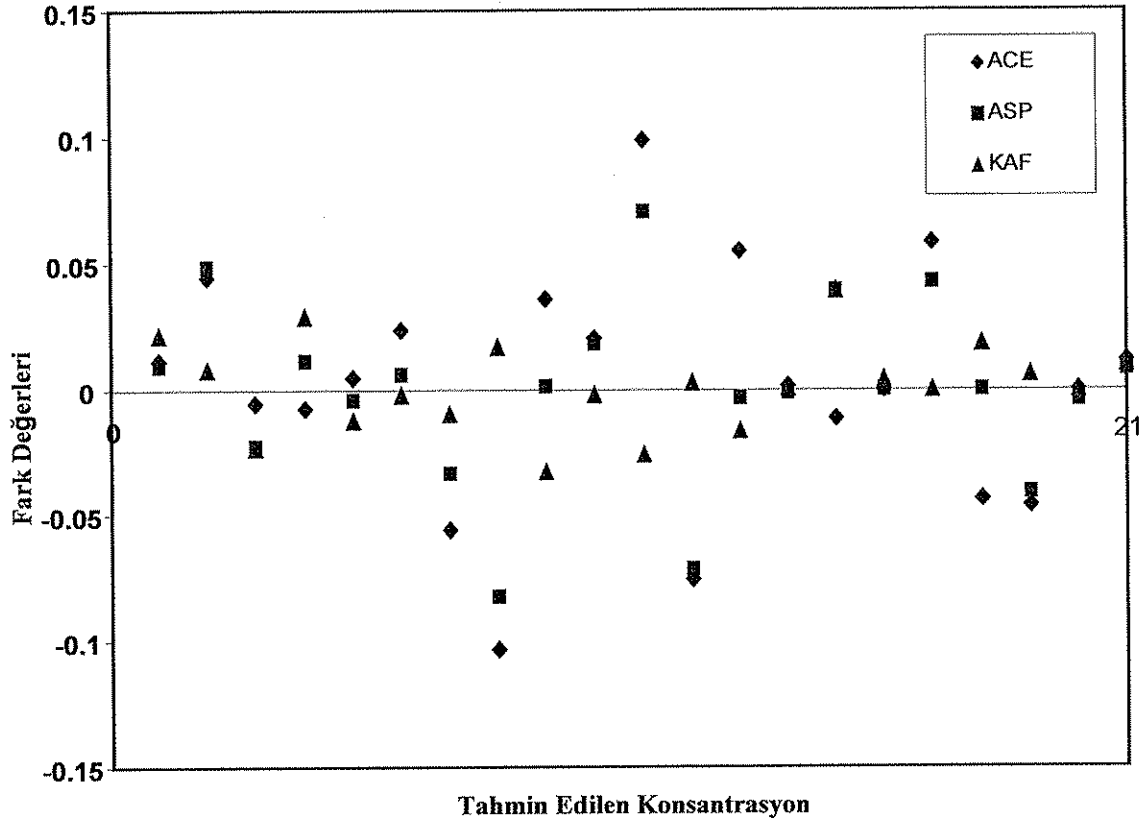
Tablo 8.1. ACE, ASP ve KAF içeren kalibrasyon karışımları

	ACE	ASP	KAF
1	10	10	4
2	15	15	8
3	20	20	12
4	25	25	16
5	30	30	20
6	10	20	4
7	15	20	4
8	20	20	4
9	25	20	4
10	30	15	4
11	20	10	4
12	20	15	4
13	20	20	4
14	20	25	4
15	20	30	4
16	0	0	4
17	0	20	0
18	20	0	0
19	0	20	4
20	20	0	4
21	20	20	0

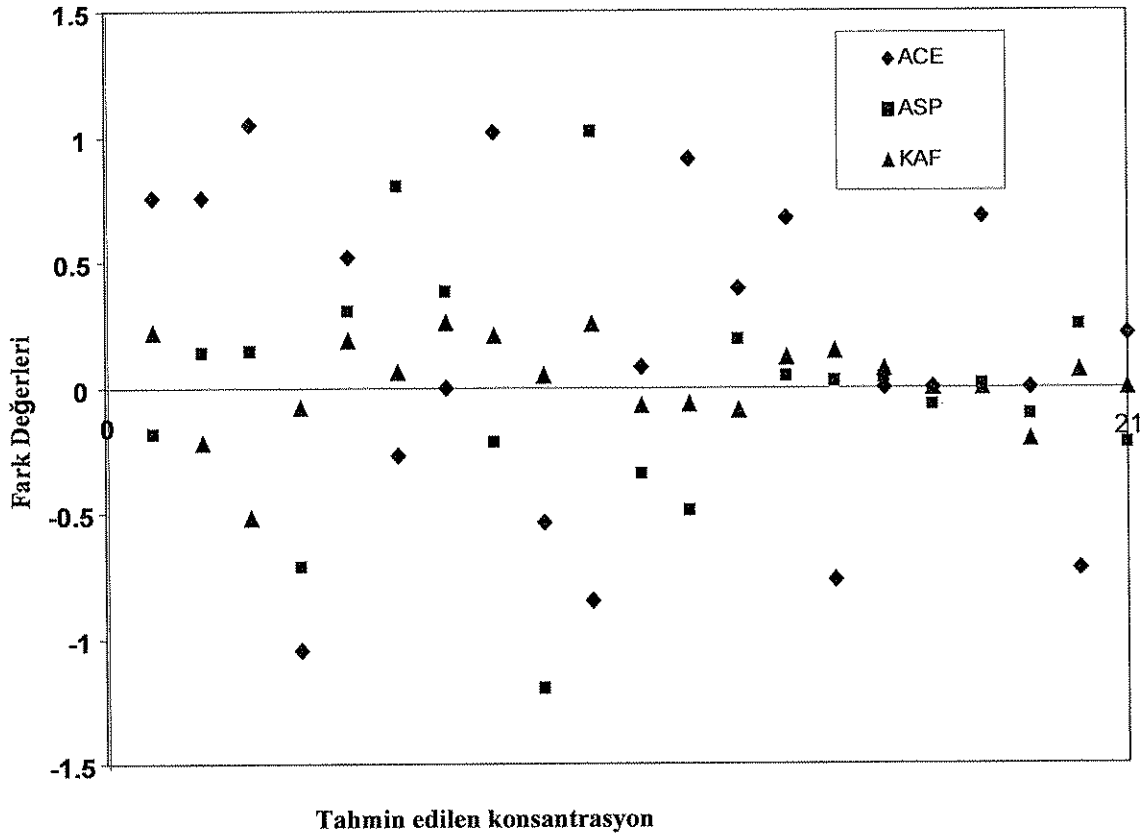
Bu çalışmada, ACE, ASP ve KAF'nin üçlü karışımının hesaplanması için CLS, PCR ve PLS kemometrik metotları uygulandı. Yapılan çalışmada kalibrasyon için farklı konsantrasyonlarda ACE, ASP ve KAF içeren 21 adet kalibrasyon çözeltisi stok çözeltiler kullanılarak 25 mL'lik balonjojelere hazırlandı (Tablo 8.1) pH'sı 2'ye ayarlanmış HCl çözeltisi ile balonjojeler tamamlanarak karışımların absorbansları 200 – 300 nm arasında, 0.1 nm aralığında elde edildi. Elde edilen veriler kullanılarak çok değişkenli kalibrasyon modelleri (CLS, PLS ve PCR) hazırlandı. Tüm kemometrik işlemler Matlab 7.14 ve PLS toolbox 4.1 yardımı ile yapıldı.

Kemometrik kalibrasyonlar için elde edilen değerlere ait kalıntı analizleri yapılmıştır Şekil 8.8, Şekil 8.9 ve Şekil 8.10 PLS, PCR ve CLS için kalibrasyon sonuçlarını göstermektedir. Bu şekillerde tahmin edilen konsantrasyonlar ile gerçek konsantrasyonlar arasındaki ilişki incelenmiş ve çok önemli fark olmadığı

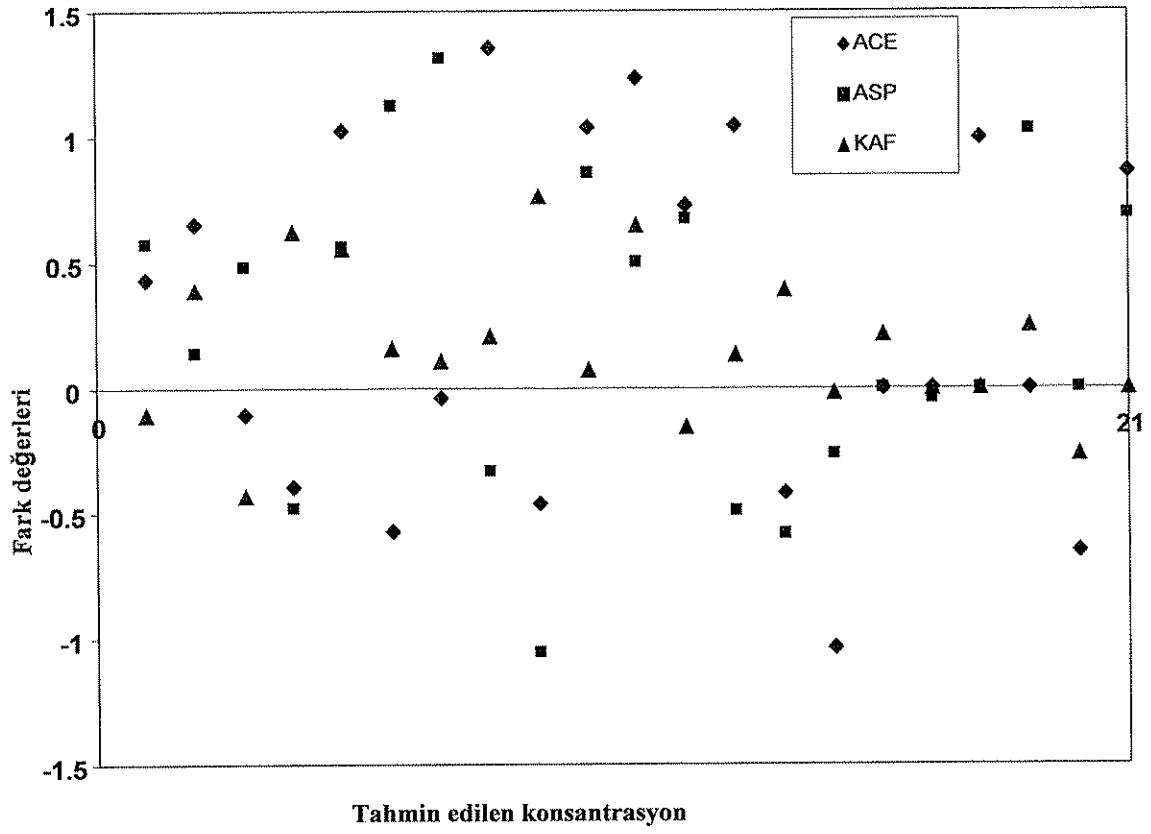
görülmüştür. Bu da elde edilen kalibrasyon değerlerinin doğruluk ve kesinliğini ifade etmektedir.



Şekil 8.8. PLS kalibrasyon kullanılarak ACE, ASP ve KAF' nin tahmin edilen sonuçları için konsantrasyon sonuçları



Şekil 8.9. PCR kalibrasyon kullanılarak ACE, ASP ve KAF' nin tahmin edilen sonuçları için konsantrasyon sonuçları



Şekil 8.10. CLS kalibrasyon kullanılarak ACE, ASP ve KAF' nin tahmin edilen sonuçları için konsantrasyon sonuçları

8.3 Metot Validasyonu

Çalışmada kullanılan üç madde için, ACE için 10-30 µg/mL, ASP için 10-30 µg/mL ve KAF için 4-20 µg/mL konsantrasyon aralıkları üzerinden beş noktalı kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Bu konsantrasyon aralığı spektrofotometrik metot geliştirmek için kullanılan ve absorpsiyon çalışmaları için beklenen ilaç konsantrasyonu temel alınarak seçildi. Oran spektranın birinci türevi alınarak sıfır kesim noktaları elde edildi ve bu noktalara göre kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Kalibrasyon grafiklerinden regresyon denklemleri eğimin standart sapması (S_b) ve kesimin standart sapması (S_a) hesaplandı. Kalibrasyon grafiklerinin doğrusallıkları ve absorpsiyon ölçümlerinin Beer kanunlarına uyumu regresyon denklemlerinin korelasyon katsayılarının (r) yüksek değerleri sayesinde kanıtlandı. Tablo 8.2’de elde edilen kalibrasyon denklemleri ve hata değerleri gösterilmiştir.

Tablo 8.2. Türev metodundan elde edilen kalibrasyon grafiğinin istatistiksel sonuçları

Metot	İlaç	λ	Regresyon denklemi	r^2	SE(m)	SE(n)	S(r)
D	ACE	265.1	$A = -9.08E-03C_{ACE} + 7.37E04$	0.999503	1.17E-04	2.48E-03	1.85E-03
	ASP	217.0	$A = -1.40E-03C_{ASP} - 7.68E05$	0.998305	3.32E-05	7.04E-04	5.25E-04
	KAF	222.1	$A = -3.83E-03C_{CAF} - 1.62E-02$	0.999561	4.63E-05	6.15E-04	5.86E-04

D = Birinci türev

C = Konsantrasyon (µg/mL)

A = ACE, ASP ve KAF için seçilen dalga boylarında genlikler

r^2 = Regresyon katsayısının karesi

SE(r) = Doğrusal regresyonun standart hatası

SE(m) = Eğimin standart hatası

SE(n) = Kesimin standart hatası

Saf haldeki ACE, ASP ve KAF ve üçlü sentetik karışımlar ve tablet içeriği için geri kazanım yolu ile uygulanan metotların kesinliği ve seçiciliği kanıtlandı. Sentetik karışımları hazırlamak ve kalibrasyon için kullanılan stok çözeltiler seyreltildi. Metotların yüzde geri kazanımları $100 \pm 5\%$ civarında bulundu. (Tablo 8.3)

Tablo 8.3. Uygulanan kalibrasyon teknikleri ile farklı sentetik karışımlarda ACE, ASP ve KAF için elde edilen geri kazanımlar

No	Eklenen (mg/mL)			Geri Kazanım (%)											
				PLS			PCR			CLS			TÜREV		
	ACE	ASP	CAF	ACE	ASP	KAF	ACE	ASP	KAF	ACE	ASP	KAF	ACE	ASP	KAF
1	20	10	4	104.3	101.8	103.3	105.7	103.0	103.5	106.6	105.8	95.5	101.1	103.9	104.4
2	20	15	8	102.5	95.0	96.5	105.3	93.7	97.5	106.3	93.9	97.0	102.8	102.9	104.5
3	20	20	12	98.5	104.5	96.6	102.2	104.2	96.9	98.9	106.5	95.2	100.7	103.4	96.5
4	20	25	16	101.0	99.0	98.1	100.9	97.6	94.0	94.7	104.5	100.1	101.2	101.1	95.4
5	20	30	20	103.3	97.7	95.5	98.0	105.1	96.1	95.8	99.8	94.9	98.1	98.3	96.9
6	10	20	4	106.1	104.7	104.8	105.5	104.5	101.4	95.2	101.1	99.5	102.2	104.9	103.7
7	15	20	8	97.0	103.3	101.8	104.3	99.5	99.1	98.1	105.1	99.5	98.9	104.4	101.9
8	20	20	12	104.1	103.6	99.6	102.0	103.6	98.0	94.8	105.1	103.9	100.2	124.8	97.7
9	25	20	16	95.4	95.2	97.5	95.4	103.1	97.0	103.4	106.3	99.3	99.8	94.2	105.7
10	30	20	20	99.9	105.4	98.3	97.2	99.2	96.0	104.9	95.4	99.5	97.9	104.5	94.5
11	10	10	5.2	97.6	105.5	101.7	102.1	101.5	102.1	95.5	104.7	101.7	99.1	104.9	99.7
12	15	15	5.2	102.1	96.3	101.4	104.5	99.7	98.4	98.5	96.5	99.0	101.5	106.4	99.4
13	20	20	5.2	100.8	101.2	98.3	95.8	105.2	97.7	95.5	105.6	97.2	99.7	102.1	98.5
14	25	25	5.2	102.1	97.5	101.9	104.7	97.2	100.1	100.3	97.6	100.1	100.3	94.7	100.9
15	30	30	5.2	102.1	106.0	100.7	93.6	104.7	100.2	101.6	105.0	99.4	99.0	96.7	102.1
			Ortalama	100.2	100.5	100.7	100.3	99.0	100.0	101.0	100.9	101.0	100.3	100.6	99.1
			SD	2.97	3.99	2.74	4.11	3.48	2.55	4.30	4.42	2.45	1.44	7.12	3.56
			RSD	0.83	1.06	2.04	1.34	1.99	2.90	2.00	1.53	2.58	1.32	1.42	1.27

SD = Standart sapma
RSD = Bağlı standart sapma

PLS modelin kalibrasyonu için Tablo 8.1' de verilen 21 adet üçlü karışım kullanıldı. Kalibrasyon hesaplamalarında cross-validasyon işlemine kullanılmasıyla en uygun faktör seçimi yapıldı. Cross-validasyon işlemine göre farklı faktör sayıları test edildi ve en uygun faktör 6 olarak tespit edildi. Bu çalışmada en küçük PRESS değerine sahip ilk altı değer uygun bulundu. İlk altı faktörü kullanan kalibrasyonda PRESS, SEC, SEP, korelasyon katsayısı, kesim noktası, eğim hesaplandı ve Tablo 8.6'de gösterildi. ACE, ASP ve KAF'in, kalibrasyonun standart hatası, SEC, değerleri her üç ilacın kalibrasyon basamağında tahmin edilen ve eklenen konsantrasyonlar arasındaki farktan elde edilen verilerle hesaplandı. SEP, tahmin edilenlerin standart hatası, değerleri sentetik karışımlarda tahmin edilen ve eklenen konsantrasyon arasındaki farka göre hesaplandı.

Yapılan çalışmada, ACE, ASP ve KAF üçlü karışımlarının konsantrasyon hesaplamaları için PLS modelinin yanı sıra PCR modeli de kullanılarak yapıldı. PCR model için de uygun faktör seçimi işlemi cross-validasyon yardımı ile yapıldı ve elde edilen istatistiksel sonuçlar Tablo 8.6' da gösterildi.

CLS modelin kalibrasyonu için aynı şekilde Tablo 8.1'de verilen 21 adet üçlü karışım kullanıldı. CLS modelin yapılanmasında, bilgisayar destekli olarak, alıştırma grupları için konsantrasyon matrisi ve absorban oluşturularak K matrisi hesaplandı. Hesaplanan K, Tablo 8.1'de verilen karışımların ölçülen spektrumlarında konsantrasyonları tahmin etmek için kullanıldı. Elde edilen sonuçların istatistikî değerleri Tablo 8.6'da verildi.

Tablo 8.4. Önerilen kalibrasyon teknikleri tarafından ticari tablete uygulanan standart ekleme metodunun sonuçları

	PLS			PCR			CLS			TÜREV		
	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF
ORT:	253.4	253.5	65.6	254.3	251.0	65.9	250.7	264.0	64.2	246.0	248.1	65.3
SD	6.83	7.65	0.44	8.23	9.72	0.24	8.25	4.02	1.10	9.47	6.97	0.93
RSD	2.70	3.02	0.67	3.24	3.87	0.37	3.29	1.52	1.72	3.85	2.81	1.43
SE	2.42	2.70	0.15	2.91	3.43	0.09	2.92	1.42	0.39	3.35	2.46	0.33
CL (0.05)	4.74	5.30	0.30	5.70	6.73	0.17	5.71	2.79	0.76	6.56	4.83	0.65

Metodun hassasiyetini belirleyen tayin limitleri (LOD) ve kantitatif limitler (LOQ) kalibrasyon verilerinden hesaplanarak Tablo 8.5'de gösterildi. LOD, analitin belirlenen en küçük konsantrasyonu, LOQ ise ölçülebilen minimum konsantrasyondur. LOD değerleri ACE, ASP ve KAF en küçük 0.0550 en büyük 0.8066 iken, LOQ değerleri en küçük 0.1834 en büyük 4.0254'dür. Metodun seçiciliği farmakolojik preparatın test edilmesi ile belirleneceğinden elde edilen sonuçlar her iki tayin ve kantitatif limitlerin kabul edilebilir aralıkta olduğunu gösterdi. Tablo 8.5, ACE, ASP ve KAF 'nin dört metot için LOD ve LOQ değerleri hakkında detaylı bilgi verir.

Tablo 8.5. Önerilen kalibrasyon metotları tarafından farmakolojik dozaj formlarında elde edilen sonuçlar

	PLS			PCR			CLS			TÜREV		
	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF
ORTALAMA:	250.23	254.88	64.82	253.40	248.18	65.15	260.14	252.74	65.43	259.34	253.27	65.46
SD	6.50	7.43	0.95	11.98	13.89	1.40	6.26	9.43	1.31	5.70	8.60	0.26
RSD	2.60	2.91	1.46	4.73	5.60	2.15	2.41	3.73	2.00	2.20	3.40	0.39
SE	2.30	2.63	0.34	4.23	4.91	0.49	2.21	3.33	0.46	2.01	3.04	0.09
CL (0.05)	4.51	5.15	0.66	8.30	9.63	0.97	4.34	6.53	0.91	3.95	5.96	0.18
ANOVA	2.83	0.64	0.61	2.83	0.64	0.61	2.83	0.64	0.61	2.83	0.64	0.61
F _{teoretik}	2.95			2.95			2.95			2.95		
F _{hesaplanan}	-	-	-	0.2426	0.2014	0.1232	0.1744	0.2121	0.2003	0.1902	0.1890	0.1567
F _{teorik}	-	-	-	0.2641			0.2641			0.2641		
LOD	0.0550	0.0722	0.0625	0.7867	0.4058	0.3048	0.5709	0.4393	0.3694	0.8066	1.2076	0.6237
LOQ	0.1834	0.2408	0.2083	2.6223	1.3527	1.0162	1.9030	1.4645	1.2313	2.6886	4.0254	2.0789

Ticari tablet analizlerine geliştirilen metotlar uygulandı. Sekiz eşdeğer numune hazırlanarak tayini yapıldı. Her üç ilacın geri kazanımları için uygun sonuçlar elde edildi (Tablo 8.5) ve tablet içerikleri ile iyi uyuşma içinde olduğu gözlemlendi. Türev spektrofotometrik metodunun validasyonu için kemometrik metotlardan de edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Kemometrik ve türev metotları ile elde edilen değerler varyans analizi (ANOVA) ile incelendi ve sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görüldü. Test sonuçları Tablo 8.5' gösterildi. Hesaplanan F değerleri metotlar arasında çok fazla farklılık olmadığını kanıtlayacak şekilde kritik F değerlerinden daha düşük bulundu.

Tablo 8.6. Kemometrik metotlardan elde edilen istatistiksel sonuçlar

	PLS			PCR			CLS		
	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF	PAR	ASP	CAF
PRESS	0.00212	0.00169	0.00034	0.41713	0.21539	0.03307	0.56164	0.42514	0.118313
SEC	0.04602	0.04114	0.01847	0.64586	0.4641	0.18184	0.74943	0.65203	0.343967
SEP	0.2145	0.2028	0.1359	0.8037	0.6813	0.4264	0.8657	0.8075	0.5865
r	1.0000	1.0000	1.0000	0.9973	0.9985	0.9993	0.9970	0.9983	0.9983
n	0.0001	0.0090	0.0001	0.2668	0.0393	0.0565	0.3000	0.0602	0.0602
m	1.0000	0.9996	1.0000	0.9923	0.9970	0.9928	0.9954	0.9954	1.0199

Yapılan tez çalışmasında, ACE, ASP ve KAF içeren ilaç formülasyonunun analizi için oran-türev spektrofotometri ve kemometrik metotlar denendi. Elde edilen türev spektrumlarında istenilen etkin maddenin analizini yaparken, diğerlerinin sıfır olduğu noktayı bulmak için oran-türev metodu uygulandı ve sıfır kesim noktalarından hareketle kalibrasyon grafikleri çizilerek bilinmeyen madde miktarları tayin edildi, sonuçlar kemometrik metotlarla bulunan sonuçlarla karşılaştırıldı.

İlaç analizinde kemometrik metotların kullanılması, kimyasal bir ayrıştırmaya gerek olmadan kolay, ucuz ve tekrar edilebilir bir yöntem olması açısından avantajlıdır. Çalışmada uygulanan CLS, PLS ve PCR kemometrik teknikleriyle bulunan sonuçlar için % geri kazanım, SEP, SEC, korelasyon katsayısı değerlerine bakıldığında

kullanılan tekniklerin uygulanabilir olduğu ve ilaç formülündeki bulunması gereken değerlerle karşılaştırıldığında sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görölmektedir.

Bu çalışmada sunulan bütün metotlar ACE, ASP ve KAF karışımlarının laboratuvar örnekleri ile iyi bir kesinlik ve doğrulukla ölçülmesini mümkün kılar. Kullanılan kemometrik metotların yanında geliştirilen yeni oran-türev metodu hızlı, kolay ve herkes tarafından uygulanabilecek bir metottur. Elde edilen tüm istatistiki sonuçların karşılaştırılmasından da bu metodun diğer üçlü karışımlara uygulanabileceğini göstermektedir.

8.4 Sonuçlar

İlaç analizleri insan sağlığı ile ilgili bir durum olması nedeni ile gerek üretim sırasında ve sonrasında, gerekse ilacın canlı üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile rutin kontrolleri yapılmak zorundadır. Bu nedenle, ilaç analizlerinde etken maddelerin analizi önemlidir. Analizin daha hızlı ve doğru bir şekilde yapılabilmesini sağlamak amacı ile en kısa sürede, en ucuz işlemler ve en basit teknikler esas alınarak metod geliştirilmelidir. İlaç analizlerinde en çok kullanılan yöntemler kromatografik ve spektroskopik yöntemlerdir. Günümüzde, herhangi bir kimyasal ayrıştırma gerektirmeden etken maddelerin eş zamanlı kantitatif tayininde kemometrik metodların da kullanımı kısa zaman ve az maliyeti nedeni ile yerini almıştır.

Bu çalışmanın amacı, üçlü ilaç karışmaları için oran ve türev metodu ile sıfır kesim noktası elde etme ve bu noktalara göre oluşturulan kalibrasyon grafikleri yardımı ile bilinmeyen madde miktarını tayin etmek ve elde edilen sonuçları kemometrik metodlarla elde edilen sonuçlarla karşılaştırmaktır; elde edilen sonuçlar bu geliştirilen yeni metodun yeterliliğini kanıtlamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] YILDIZ, A., GENÇ, Ö., BEKTAŞ, S., Enstrümantal Analiz Yöntemleri, 2. Baskı, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1997.
- [2] SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., ve NIEMAN, T.A., Analitik Kimya Temelleri, 7. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, 1999.
- [3] MARKOUPPOULOU, C. K., MALLIOU, E. T., and DOURELLIS, J. E. Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets. *Il Farmaco*. 29(2004) 627-636; 16 April 2004.
- [4] ALTINÖZ, A., ve DURSUN, Ö. Ö. Determination of nimesulide in pharmaceutical dosage forms by second order derivative UV spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 22 (2000) 175-182; 1999.
- [5] SÖZGEN, K., ve TÜTEM, E. Second derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of cobalt, nickel and iron using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. *Talanta*. 62 (2004) 971-976; 2003.
- [6] FERRARO, M. C. F., CASTELLANO, P. M. and KAUFMAN, T. S. Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixture and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 34 (2004) 305-314; 2003.
- [7] EL-RAGEHY, N. A., ABBAS, S. S. and EL-KHATEEB, S. Z. Stability indicating spectrophotometric methods for determination of glafenine using first derivative of ratio spectra and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*. 461 (2002) 155-168; 2002.
- [8] ERK, N. Quantitative analysis of chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in nasal drops by differential-derivative spectrophotometric, zero-crossing first derivative UV spectrophotometric and absorbance ratio methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 23 (2000) 1023-1031; 2000.

- [9] KARA, D. ve ALKAN, M. Determination of acidity constants of acid-base indicators by second derivative spectrophotometry. *Spectrochimica Acta Part A*. 56 (2000) 2753-2761; 2000.
- [10] EL-GİNDY, A., ASHOUR, A., ABDEL-FATTAH, L. and SHABANA M. M. Spectrophotometric determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in binary mixture using second derivative, second derivative of the ratio spectra and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 25 (2001) 299-307; 2000.
- [11] TALSKY, G. *Derivative Spectrophotometry*, Germany, 1994.
- [12] GÜNZLER, H. and WILLIAMS, A. *Handbook of Analytical Techniques*. Germany, 1992.
- [13] EL-GİNDY, A., EMARA, S. and HADAD, G. M. Determination of certain drugs in binary mixtures formulations by second derivative ratio spectrophotometry and LC. *Il Farmaco*. 59 (2004) 703-712; 2004.
- [14] ERK, N. and ALTUN, M. L. Spectrophotometric resolution of metronidazole and miconazole nitrate in ovules using ratio spectra derivative spectrophotometry and RP-LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 25 (2001) 115-122; 2000.
- [15] HADAD, G. M., EL-GİNDY, A. and MAHMOUD, W. M. M. HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy methods for the simultaneous determination of ambroxol and doxycycline in capsule. *Spectrochimica Acta Part A*. xxx (2000) xxx-xxx; 2007.
- [16] FERRARO, M. C. F., CASTELLANO, P. M. and KAUFMAN, T. S. Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 34 (2004) 305-314; 2003.
- [17] Nİ, Y., Qİ, Z. and KOKOT, S. Simultaneous ultraviolet-spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 82 (2006) 241-247; 2005.
- [18] KRAMER, R. *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*. 51. Marcel Dekker Inc. New York, 1998.

- [19] SOROURADDİN, M. H., RASHİDİ, M. R., GHORBANİ-KALHOR, E. and ASADPOUR-ZEYNALİ, K. Simultaneous spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations by multivariate calibration methods. *Il Farmaco*. 60 (2005) 451-458; 2005.
- [20] BRERETON, R.G. *Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Willey. England, 2003.
- [21] HEMMATTEENEJAD, B., AKHOND, M. and SAMARİ, F. A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline and phenol: Effect of wavelength selection. *Spectrochimica Acta Part A*. 67 (2007) 958-965; 2006.
- [22] KARPİNSKA, J. and MULARCZYK, B. The analysis of the zero-order and second derivative spectra of retinol, acetate, tocopherol acetate and coenzim Q₁₀ and estimation of their analytical usefulness for their simultaneous determination in synthetic mixtures and pharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A*. 60 (2004) 2189-2194; 2003.
- [23] MORELLİ, B. Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 33 (2003) 423-433. 2003.
- [24] MORELLİ, B. Derivative spectrophotometry in the analysis of mixtures of cefotaxime sodium and cefadroxil monohydrate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32 (2003) 257-267; 2002.
- [25] EL-SAHARTY, Y. S., HASSAN, N. Y., METWALLY, F. H. Simultaneous determination of terbinafine HCl and triamcinolone acetonide by UV derivative spectrophotometry and spectrodensitometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28 (2002) 569-580; 2001.
- [26] RADHAKRİSHNA, T., NARASARAJU, A., RAMAKRİSHNA, M. and SATYANARAYANA, A. Simultaneous determinations of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometrics methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32 (2003) 359-368; 2002.

- [27] SALEM, M.Y., EL-BARDÍCY, M.G., EL-TARRAS, M.F. and EL-ZANFALLY, E.S. Simultaneous determination of domperidone maleate and cinnarizine in a binary mixture using derivative ratio spectrophotometry and classical least squares calibration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30 (2002) 21-33; 2002.
- [28] ÖZDEMİR, A. and KORKMAZ, A. Comparative study of electrospray mass spectrometry and first derivative method and validation by HPLC method. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 15, No. 2, 2007.
- [29] BEBAWY, L. I. Application of TLC-densitometry, first-derivative UV-spectrophotometry and ratio derivative spectrophotometry for the determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 27 (2002) 737-746; 2001.
- [30] EL-GİNDY, A., EL-ZEANY, B., AWAD, T. and SHABANA M. M. Spectrophotometric determination of trifluoperazine HCl and isopropamide iodide in binary mixture using second derivative and second derivative of ratio spectra methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 26 (2001) 203-210; 2001.
- [31] SENA, M. M., POPPI R., J. N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 34 (2004) 27-34; 2003.
- [32] METWALLY, F., H. Simultaneous determination of Nifuroxazide and Drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by bivariate and multivariate spectral analysis. *Spectrochimica Acta Part A*. xxx (2007) xxx-xxx; 2007.
- [33] ERK, N. Simultaneous determination of doxolamide HCl and timolol maleate in eye drops by two different spectroscopic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28 (2002) 391-397; 2001.
- [34] PAROJCÍĆ, J., VASÍLJEVIĆ, D., IBRIĆ, S. and DJURIĆ, Z. Tablet disintegration and drug dissolution in viscous media: Paracetamol IR tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 355 (2008) 93-99; 2008.
- [35] MEDİNA, A. R., CORDOVA, M. L. F., BARRALES, P. O. and DÍAZ, A. M. Flow-through UV spectrophotometric sensor for determination of acetyl salicylic acid in pharmaceutical preparations. *International Journal of Pharmaceutics*. 216 (2001) 95-104 ; 2001.

- [36] WILKINSON, R. KEIFER, J. and NIAS, A. H. W. Effects of post-treatment with caffeine on the sensitivity to ultraviolet light irradiation of two lines of HeLa cells. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. 10 (1970) 67-72; 1970.
- [37] DİNÇ, E. The spectrophotometric multicomponent analysis of a ternary mixture of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol by the double divisor-ratio spectra derivative and ratio spectra-zero crossing methods. Talanta. Talanta 48 (1999) 1145-1157.

ÖZGEÇMİŞ

Arzu ÇETİN, 20.08.1977 yılında Sakarya ili Sapanca ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sapanca'da tamamladı. 1995 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü (İngilizce hazırlıklı) kazandı ve 2000 yılında bu bölümden mezun oldu. 2005 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Sakarya ilinde matematik öğretmeni olarak görev yapmaktadır.