

Lineer Regresyon Fonksiyonlarına Dayalı Çok Değişkenli Kalibrasyonlar ve Analitik Uygulamaları

Received : 14.06.2006

Revised : 01.11.2006

Accepted : 15.11.2006

Erdal Dinç* / Özgür Üstündağ*

1. Giriş

İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda bu aktif bileşiklerin hiçbir ayırma işlemi kullanmaksızın analizi analitik kimyanın ve diğer komşu branşların temel problemlerinden birisidir. Karışım halindeki numunelerin analizi için çeşitli kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı çalışmalarda da görülmektedir. Bazı durumlarda bahsedilen bu yöntemlerin de iyi sonuçlar vermediği de bir gerçektir. Sayılan bu nedenlerden dolayı daha düşük miktarlarda numunelerin analizi için gelişmiş analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen klasik analitik cihazlardan elde edilen verilerin çeşitli matematiksel algoritmalara tabi tutularak yöntemlerin hassasiyeti ve sonuçların doğruluğu artırılmaya çalışılmaktadır.

Örneğin yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) yöntemi, cihazın pahalı olması ve kromatografik şartların optimizasyonunun uzun zaman alması gibi dezavantajlara sahiptir. Diğer taraftan türev spektrofotometri gibi klasik grafik işlemlere dayanan yöntemler ikili karışımların analizi için kullanılabilmesine rağmen ikiden daha fazla aktif bileşiği içeren numunelerin analizinde yetersiz kalmaktadır.

Son zamanlarda kompleks karışımların analizi için temel bileşen regresyonu (Principal Component Regression → PCR) ve kısmi en küçük kareler (Partial Least Squares → PLS) yöntemleri hazır bilgisayar programları yardımıyla kullanılmaktadır¹⁻⁶. Bu yöntemler ölçüm verilerinin ortogonalleştirilmesi, çeşitli iç çarpım işlemleri ve aks değişimi

* Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 06100 Tandoğan, Ankara
iletişim için: dinc@pharmacy.ankara.edu.tr

gibi soyut matematiksel algoritmalara dayanmaktadır. Bu yöntemlerin dezavantajları kalibrasyon setlerinin hazırlanması, pahalı bilgisayar programları ve anlaşılması güç matematiksel işlemleri kapsamaktadır.

Gerek YBSK ve türev spektrofotometrisi, gerekse PCR ve PLS yöntemlerinin dezavantajlarını elimine etmek için lineer regresyon fonksiyonlarına dayalı Bivariate ve Multilinear Kalibrasyonlar kullanılabilir⁷⁻¹⁰. Bu Bivariate ve Multilinear Kalibrasyon yöntemleri iki veya daha fazla aktif bileşiğin analizine, YBSK yönteminde olduğu gibi herhangi bir ayırma işlemi yapmaksızın, ayrıca türev spektrofotometri ve bunun modifiye versiyonlarında da olduğu gibi herhangi bir grafik işlemi kullanmaksızın uygulanabilir.

López-de-Alba P. L. ve arkadaşları^{11,12} ve bir tez çalışmasında¹⁰ ikili karışımların kantitatif analizi için lineer regresyon fonksiyonlarına dayalı iki bilinmeyenli bir denklem sistemi oluşturarak bivariate kalibrasyon yöntemini önermişlerdir. Daha sonra bu yöntem Dinç tarafından geliştirilerek ve geliştirilerek n dalga boyunda, n sayıda aktif bileşiği içeren numunelerin analizi için kullanılmıştır^{8,10}. Dinç ve arkadaşları bu yöntemlerin ilaç analizlerinde uygulamalarını yapmışlardır^{10,13-16}.

Bu çalışmanın amacı, lineer regresyon fonksiyonlarına dayalı çok bileşenli kalibrasyon modellerinin algoritmalarının açıklanmasını ve bu yöntemlerin analitik uygulamalarının sunumunu kapsamaktadır.

2. Teorik Açıklama Lineer Regresyon Analizi

Bir X bileşiğinin seçilen λ i dalga boyunda spektrofotometrik bir tayin için iki değişken (konsantrasyon ve absorbans) arasındaki bir lineer regresyon denklemi aşağıda verilen eşitlik ile tarif edilebilir:

$$A_{\lambda_i} = b_{\lambda_i} C_X + a_{\lambda_i} \quad (1)$$

Burada A, seçilen λ i dalga boyunda X bileşiğinin absorbansını, C_X X bileşiğinin konsantrasyonunu ($\mu\text{g}/\text{mL}$), b_{λ_i} lineer regresyon denkleminin eğimini, a_{λ_i} modellenen lineer regresyonun kesimini ifade etmektedir. Bu kesim değeri gerçek ve deneysel lineer regresyon doğruları arasındaki farkı göstermektedir.

2.1. Bivariate Kalibrasyon Yöntemi (İki Değişkenli Kalibrasyon Yöntemi)

Analiz edilecek maddelerin spektrumlarında maksimum, minimum ve omuzlara karşılık gelen kritik dalga boylarında lineer regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri kullanılarak Kaiser tekniğine göre en yüksek duyarlılığa sahip doğru denklemlerinin kullanımına dayalı olarak kurulan kalibrasyon modelidir.

Bu yöntemde, iki bileşenli (X ve Y) bir karışımın seçilen iki dalga boyundaki ($\lambda_1 = 1$ ve 2) absorbands değerleri aşağıdaki ifade edilen denklemlerle iki bileşenli bir karışımın analizi için yazılabilir.

$$\begin{aligned} A_{\text{mix}1} &= b_{x1} C_x + b_{y1} C_y + a_{XY1} \\ A_{\text{mix}2} &= b_{x2} C_x + b_{y2} C_y + a_{XY2} \end{aligned} \quad (2)$$

Burada $A_{\text{mix}1}$ ve $A_{\text{mix}2}$ seçilen iki dalga boyunda X ve Y nin karışımını absorbandslarını, $b_{x1,2}$ ve $b_{y1,2}$ sırasıyla X ve Y nin lineer regresyon denklemlerinin eğimlerini, a_{XY1} ve a_{XY2} iki dalga boyundaki lineer regresyon denklemlerinin kesimlerinin toplamlarını ($a_{XY1} = a_{x1} + a_{y1}$ ve $a_{XY2} = a_{x2} + a_{y2}$) temsil etmektedir.

Yukarıda yazılan denklemler (2) matris notasyonuna göre aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{mix}1} \\ A_{\text{mix}2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{x1} & b_{y1} \\ b_{x2} & b_{y2} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_x \\ C_y \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{XY1} \\ a_{XY2} \end{bmatrix} \quad (3)$$

Eğer absorbands matrisi (A_{kar}) ve kesim matrisi (a_{XY}) aynı boyutta olduğu düşünülürse $A_{\text{mix}} - a_{XY}$ farkından yeni bir matris elde edilir. Bunun için aşağıdaki denklem yazılabilir.

$$\begin{bmatrix} A_{\text{mix}1} - a_{XY1} \\ A_{\text{mix}2} - a_{XY2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{x1} & b_{y1} \\ b_{x2} & b_{y2} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_x \\ C_y \end{bmatrix} \quad (4)$$

ya da daha basit şekilde yazılacak olursa;

$$(A_{\text{mix}} - a_{XY})_{2 \times 1} = K_{2 \times 2} * C_{2 \times 1} \quad (5)$$

Lineer regresyonların eğim değerlerine karşılık gelen b matrisi K matrisi olarak adlandırılır.

$$K = \begin{bmatrix} b_{x1} & b_{y1} \\ b_{x2} & b_{y2} \end{bmatrix} \quad (6)$$

Bu durumda ikili karışımdaki X ve Y bileşenlerinin konsantrasyonlarını hesaplamak için $(A_{\text{mix}} - a_{XY})_{2 \times 1}$ matrisi, $K_{2 \times 2}$ matrisinin ters matrisi $(K^{-1})_{2 \times 2}$ ile çarpılırsa bu ifade aşağıdaki biçime dönüşür:

$$C_{2 \times 1} = (K^{-1})_{2 \times 2} * (A_{\text{mix}} - a_{XY})_{2 \times 1} \quad (7)$$

Bu işlem iki bileşenli karışımların analizi için bivariate kalibrasyon yönteminin matematiksel temelidir.

Burada açıklandığı gibi bu kalibrasyon modeli ikili karışımların çözümüne kolaylıkla uygulanabilir. Optimum dalga boyu setinin seçimi bu matematiksel yöntemin iki bileşenli bir karışıma uygulanmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle Kaiser tekniği bu bivariate kalibrasyon yönteminin uygulanmasında iyi bir duyarlılık ve seçicilik sağlanması için optimum dalga boyunun seçimi için uygulanır.

Duyarlılık matrisi (K (kare matris)) (denklem 6) iki bileşenli karışımlar için önceden seçilen dalga boylarının herbir çifti dikkate alınarak oluşturulur.

Karışımındaki X ve Y bileşenlerinin seçilen iki dalga boyundaki (λ_1 ve λ_2) lineer regresyon denklemlerinden elde edilen eğim değerlerinin K matrisi duyarlılık parametresi olarak dikkate alınır. Duyarlılık parametresi farklı iki dalga boyu setinin karşılaştırılması için kullanılır.

İki bileşenli bir karışımın analizinin duyarlılığı, duyarlılık matrisi K'nin determinantlarının mutlak değeri olarak tarif edilir. Bunun için farklı iki dalga boyu setlerine karşılık gelen K matrisinin determinant değerleri çalışılan dalga boyunun seçimi için hesaplanır. Hesaplanan maksimum determinant değeri optimum dalga boyu setinin seçimine olanak tanır. Bu yöntem herbir bileşik için seçilen iki dalga boyundaki lineer regresyon doğru denklemlerine dayanır.

2.2. Trivariate Kalibrasyon Yöntemi (Üç değişkenli kalibrasyon yöntemi)

Trivariate kalibrasyon yöntemi Kaiser² tekniği kullanılarak seçilmiş 3 dalga boyundaki lineer regresyon eşitliklerine matris matematiğinin uygulanmasını gerektirir. Yöntemin matematiksel algoritması takip eden basamaklarda açıklanmaktadır.

Eğer, 3 bileşenli (X, Y ve Z) karışımının absorbans değerleri 3 dalga boyunda ($\lambda_1 = 1, 2$ ve 3) ölçülmüş ise lineer regresyon fonksiyonlarına dayanarak aşağıdaki eşitlikler 3 bileşenin analiz için yazılabilir:

$$\begin{aligned} A_{\text{mix}_1} &= b_{X_1} C_X + b_{Y_1} C_Y + b_{Z_1} C_Z + a_{XYZ_1} \\ A_{\text{mix}_2} &= b_{X_2} C_X + b_{Y_2} C_Y + b_{Z_2} C_Z + a_{XYZ_2} \\ A_{\text{mix}_3} &= b_{X_3} C_X + b_{Y_3} C_Y + b_{Z_3} C_Z + a_{XYZ_3} \end{aligned} \quad (8)$$

Burada, $A_{mix 1}$, $A_{mix 2}$ ve $A_{mix 3}$ X, Y ve Z'nin karışımının 3 dalga boyundaki absorpsiyonlarını göstermektedir, $b_{X_{1,2 \text{ ve } 3}}$, $b_{Y_{1,2 \text{ ve } 3}}$ ve $b_{Z_{1,2 \text{ ve } 3}}$ ise X, Y ve Z'nin lineer regresyon eşitliklerinin ayrı ayrı eğimleridir ve $a_{XYZ 1}$, $a_{XYZ 2}$ ile $a_{XYZ 3}$ 3 dalga boyundaki lineer regresyon eşitliklerinin kesim noktalarının toplamıdır ($a_{XYZ1} = a_{X1} + a_{Y1} + a_{Z1}$, $a_{XYZ2} = a_{X2} + a_{Y2} + a_{Z2}$ and $a_{XYZ3} = a_{X3} + a_{Y3} + a_{Z3}$).

Eşitlik (8) matris notasyonunda aşağıdaki şekilde formüle edilebilir:

$$\begin{bmatrix} A_{mix 1} \\ A_{mix 2} \\ A_{mix 3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X 1} & b_{Y 1} & b_{Z 1} \\ b_{X 2} & b_{Y 2} & b_{Z 2} \\ b_{X 3} & b_{Y 3} & b_{Z 3} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \\ C_Z \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{XYZ 1} \\ a_{XYZ 2} \\ a_{XYZ 3} \end{bmatrix} \quad (9)$$

Eğer absorpsiyon matrisi, $A_{mix 1, 2 \text{ and } 3}$ ve kesim matrisi $a_{XYZ 1, 2 \text{ and } 3}$ aynı boyutta matrisler ise, $A_{mix} - a_{XYZ}$ fark matrisi A_{mix} 'ten karşılık gelen a_{XYZ} 'nin çıkarılmasıyla elde edilir.

Bu işleme göre takip eden eşitlik şu şekilde yazılabilir:

$$\begin{bmatrix} A_{mix 1} - a_{XYZ 1} \\ A_{mix 2} - a_{XYZ 2} \\ A_{mix 3} - a_{XYZ 3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X 1} & b_{Y 1} & b_{Z 1} \\ b_{X 2} & b_{Y 2} & b_{Z 2} \\ b_{X 3} & b_{Y 3} & b_{Z 3} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \\ C_Z \end{bmatrix} \quad (10)$$

yukarıdaki ifade daha da basitleştirilirse:

$$(A_{mix} - a_{XYZ})_{3 \times 1} = K_{3 \times 3} * C_{3 \times 1} \quad (11)$$

b ile gösterilen matris, K matrisi olarak adlandırılır ve lineer regresyon fonksiyonlarının eğim değerlerine karşılık gelir:

$$K = \begin{bmatrix} b_{X 1} & b_{Y 1} & b_{Z 1} \\ b_{X 2} & b_{Y 2} & b_{Z 2} \\ b_{X 3} & b_{Y 3} & b_{Z 3} \end{bmatrix} \quad (12)$$

Bu durumda, X, Y ve Z bileşenlerinin 3'lü karışımında bileşenlerin konsantrasyonlarının hesabı için, $(A_{mix} - a_{XYZ})_{3 \times 1}$ matrisi $K_{3 \times 3}$ 'ün invers matrisi $(K^{-1})_{3 \times 3}$ ile çarpılırsa aşağıdaki matematiksel ifade yazılabilir:

$$C_{3 \times 1} = (K^{-1})_{3 \times 3} * (A_{mix} - a_{XYZ})_{3 \times 1} \quad (13)$$

Bu işlem yöntemin üçlü karışım analizi için matematiksel temelini oluşturmaktadır.

kesimlerinin toplamlarıdır ($a_{XY1} = a_{X1} + a_{Y1}$, $a_{XY2} = a_{X2} + a_{Y2}$... ve $a_{XYn} = a_{Xn} + a_{Yn}$)

Yukarıdaki 14 nolu denklemler sistemi matris notasyonuna göre yazılacak olursa aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$\begin{bmatrix} A_{kar\ 1} \\ A_{kar\ 2} \\ \dots \\ \dots \\ A_{kar\ n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X\ 1} & b_{Y\ 1} \\ b_{X\ 2} & b_{Y\ 2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ b_{X\ n} & b_{Y\ n} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{XY\ 1} \\ a_{XY\ 2} \\ \dots \\ \dots \\ a_{XY\ n} \end{bmatrix} \quad (15)$$

A_{kar} ve a_{xy} matrisleri aynı boyutlarda olduğu için yukarıda verilen matris sistemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$\begin{bmatrix} A_{kar\ 1} - a_{XY\ 1} \\ A_{kar\ 2} - a_{XY\ 2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ A_{kar\ n} - a_{XY\ n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X\ 1} & b_{Y\ 1} \\ b_{X\ 2} & b_{Y\ 2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ b_{X\ n} & b_{Y\ n} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \end{bmatrix} \quad (16)$$

Bu verilen matris sistemi (16) özet olarak aşağıdaki gibi verilebilir:

$$(A_{kar} - a_{XYZ})_{nx1} = K_{nx2} * C_{2x1} \quad (16a)$$

Yukarıdaki bölümde bivariante kalibrasyon yönteminde açıklandığı gibi eğimlerin matrisi K matrisi olarak adlandırılır:

$$K_{nx2} = \begin{bmatrix} b_{X\ 1} & b_{Y\ 1} \\ b_{X\ 2} & b_{Y\ 2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ b_{X\ n} & b_{Y\ n} \end{bmatrix} \quad (17)$$

$(A_{kar} - a)_{nx1}$ ve K_{nx2} matrisleri K_{nx2} matrisinin transpozu $(K)_{2xn}$ ile çarpılırsa aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$(K)_{2xn} (A_{kar} - a)_{nx1} = (K)_{2xn} K_{nx2} * C_{2x1} \quad (18)$$

$$\begin{bmatrix} A_{mix1} \\ A_{mix2} \\ \dots \\ \dots \\ A_{mixn} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X1} & b_{Y1} & b_{Z1} \\ b_{X2} & b_{Y2} & b_{Z2} \\ \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots \\ b_{Xn} & b_{Yn} & b_{Zn} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \\ C_Z \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{XYZ1} \\ a_{XYZ2} \\ \dots \\ \dots \\ a_{XYZn} \end{bmatrix} \quad (21)$$

Yukarıdaki matris ifadesi sadeleştirilirse;

$$\begin{bmatrix} A_{mix1} & -a_{XYZ1} \\ A_{mix2} & -a_{XYZ2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ A_{mixn} & -a_{XYZn} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} b_{X1} & b_{Y1} & b_{Z1} \\ b_{X2} & b_{Y2} & b_{Z2} \\ \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots \\ b_{Xn} & b_{Yn} & b_{Zn} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_X \\ C_Y \\ C_Z \end{bmatrix} \quad (22)$$

Bu matris eşitliğinin daha kısa formu;

$$(A_{mix} - a_{XYZ})_{nx1} = K_{nx3} * C_{3x1} \quad (23)$$

Anlatılan bivariante ve trivariate regresyon kalibrasyon modellerinde, eğim değerlerinin matrisine K duyarlılık matrisi adını vermiştik:

$$K_{nx3} = \begin{bmatrix} b_{X1} & b_{Y1} & b_{Z1} \\ b_{X2} & b_{Y2} & b_{Z2} \\ \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots \\ b_{Xn} & b_{Yn} & b_{Zn} \end{bmatrix} \quad (24)$$

$(A_{mix} - a)_{nx1}$ ve K_{nx3} matrisleri, K_{nx3} matrisinin transpozu $(K')_{3xn}$ ile çarpılırsa, şu şekilde yazılabilir:

$$(K')_{3xn} (A_{mix} - a)_{nx1} = (K')_{3xn} K_{nx3} * C_{3x1} \quad (25)$$

Üçlü karışımındaki X, Y ve Z bileşenlerinin konsantrasyonları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir:

$$C_{3x1} = \left[(K')_{3xn} K_{nx3} \right]_{3x3}^{-1} * [(K')_{3xn} (A_{mix} - a_{XYZ})_{nx1}] \quad (26)$$

Burada, multivariate regresyon kalibrasyon modeli, matris matematiği olarak da bilinen lineer cebirin kullanımını içermektedir. Bu kalibrasyon yöntemi, n tane bileşen içeren çok bileşenli karışım analizlerine uygulanabilir.

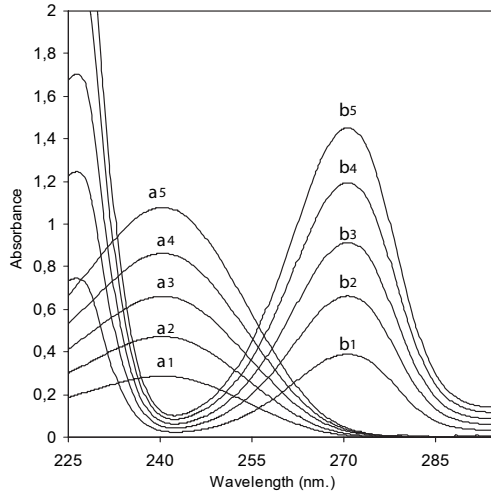
Bu yöntemlerin uygulamaları ile ilgili çalışmalardan bazılarının aşağıdaki bölümlerde sunulmaktadır.

3. Lineer Regresyona Dayalı Bi-, Tri- ve Multi-variate Kalibrasyon Yöntemlerinin Uygulamaları

3.1. Bivariate Kalibrasyon Yönteminin Uygulaması

Literatürlerden örnek olarak seçtiğimiz bir çalışmada^{10,18} Hidroklorotiazid-Spironolakton karışımının analizine bivariate kalibrasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu iki aktif bileşimin spektrumları Şekil 1'de görülmektedir.

Hidroklorotiazid-spironolakton karışımında bu iki bileşik için hazırlanan standart serinin konsantrasyonlarına karşı 10 dalga boyundaki absorpsiyonlarının ölçümü kullanılarak 10 lineer regresyon denklemi elde edilmiştir. Kritik noktalara karşılık gelen 10 dalga boyundaki lineer regresyon denkleminden faydalanarak Kaiser tekniği ile bulunan en duyarlı 2 dalga boyu olan 240 ve 270 nm'deki kalibrasyon fonksiyonları ile bivariate kalibrasyon yönteminin teorik açıklamasının yapıldığı bölümde 7 no'lu denklem kullanılarak iki etken maddenin miktar tayini yapılmıştır.



Şekil 1

Metanol ve 0,2 M, pH: 5 asetik asit – sodyum asetat (80:20) sisteminde spironolakton a1) 6 µg/mL, a2) 10 µg/mL, a3) 14µg/mL, a4) 18 µg/mL, a5) 20µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları ve hidroklorotiazid b1) 6 µg/mL, b2) 10 µg/mL, b3) 14µg/mL, b4) 18 µg/mL, b5) 20µg/mL çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları.

Bu uygulama için bivariate kalibrasyonda 6–20 µg/mL konsantrasyon aralığında hidroklorotiazid ve spironolaktonu içeren standart çözeltilerin 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm karşılık gelen dalga boylarındaki absorbansları okunarak regresyon analizi yapılmıştır elde edilen sonuçlar Tablo I'de görülmektedir.

TABLO I
Hidroklorotiazid ve spironolaktunun seçilen 10 dalga boyundaki doğru denklemleri ve lineer regresyon katsayıları.

λ	Hidroklorotiazid		Spironolakton	
	$A = m \times C + n$	r	$A = m \times C + n$	r
235	$A = 0,0261 \times C - 0,0171$	0,9938	$A = 0,0500 \times C - 0,0556$	0,9901
240	$A = 0,0066 \times C - 0,0113$	0,9952	$A = 0,0539 \times C - 0,0623$	0,9902
245	$A = 0,0063 \times C - 0,0124$	0,9949	$A = 0,0538 \times C - 0,1076$	0,9934
250	$A = 0,0119 \times C - 0,0180$	0,9947	$A = 0,0454 \times C - 0,1140$	0,9938
255	$A = 0,0228 \times C - 0,0263$	0,9943	$A = 0,0329 \times C - 0,0990$	0,9937
260	$A = 0,0402 \times C - 0,0410$	0,9945	$A = 0,0199 \times C - 0,0709$	0,9926
265	$A = 0,0607 \times C - 0,0573$	0,9942	$A = 0,0078 \times C - 0,0134$	0,9941
270	$A = 0,0727 \times C - 0,0697$	0,9941	$A = 0,0028 \times C - 0,0077$	0,9962
275	$A = 0,0638 \times C - 0,0592$	0,9944	$A = 0,0000 \times C + 0,0000$	0,0000
280	$A = 0,0360 \times C - 0,0359$	0,9946	$A = 0,0000 \times C + 0,0000$	0,0000

Buradaki uygulamada optimum iki dalga boyunu içeren dalga boyu setinin seçimi için duyarlılık matrislerinden 45 farklı çift hesaplanmıştır. Hidroklorotiazid–spironolakton karışımları için dalga boyu setinin seçimi Tablo II'de sunulmaktadır.

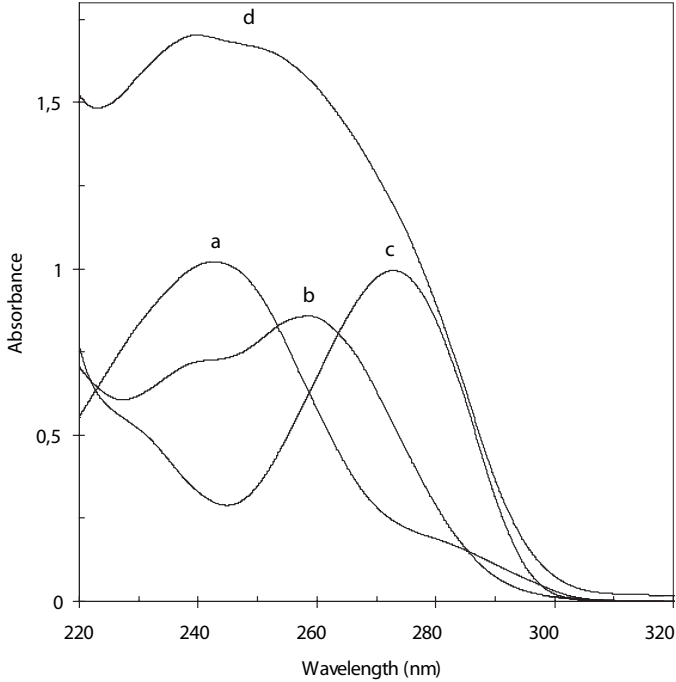
TABLO II
Duyarlılık matrislerinin ($K \times 10^{-2}$) determinantlarının mutlak değerlerini kullanarak hidroklorotiazid – spironolakton karışımları için dalga boyunun seçimi.

λ_1/λ_2	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280
235	0	10,8	10,9	5,9	2,8	14,9	28,3	35,6	31,9	18,0
240		0	0,1	3,4	10,2	20,4	32,2	39,0	34,4	19,4
245			0	3,5	10,2	20,4	32,2	38,9	34,3	19,4
250				0	6,4	15,9	26,6	32,6	28,9	16,3
255					0	8,7	18,2	23,3	21,0	11,8
260						0	8,9	13,3	12,7	7,1
265							0	4,0	5,0	2,8
270								0	1,8	1,0
275									0	0,0
280										0

Duyarlılık matrislerinin en yüksek mutlak determinant değerini veren optimum iki dalga boyu bu kalibrasyon modeli için 240 ile 270 nm'lerine karşılık gelen noktalar olduğu belirlenmiştir. Bu seçilen iki dalga boyunda hidroklorotiazid ve spironolaktonun lineer regresyon denklemleri Tablo 1'de görülmektedir. Bu iki dalga boyunda herbir bileşiğin kalibrasyon denklemleri kullanılarak teorik bölümde verilen algoritma-ya göre bu maddelerin 6–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyon aralığında bivariate kalibrasyonu kurulmuştur. Numunelerin 240 ve 270 nm lerde ölçülen absorbans değerleri kurulan bivariate kalibrasyonda yerine konularak hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktarları tayin edilmiştir. Bu yöntemin uygulanmasında yapılan matematiksel işlemlerde Microsoft Excel 2000 ve Maple V programları kullanılmıştır.

3.2. Trivariate Kalibrasyon Yönteminin Uygulaması

Bu yöntemin ilk uygulaması Dinç⁸ tarafından parasetamol, kafein ve metamizol karışımının analizi için yapılmıştır. Şekil 2'de görüldüğü gibi bu üç aktif maddelerin spektrumları aynı dalga boyu bölgelerinde girişim yapmaktadır. Bu üçlü karışımın analizi hiçbir ayırma işlemi yapılmaksızın ve herhangi bir grafik işlemi kullanmaksızın trivariate kalibrasyon yöntemi ile başarı ile yapılmıştır.



Şekil 2

Absorpsiyon spektrumu; a) 20 µg/mL parasetamol, b) 32 µg/mL metamizol, c) 20 µg/mL kafein ve d) karışım (0.1 M HCl'de).

Bu uygulamada 4-40 µg/ mL kafein, 8-40 µg/mL parasetamol ve 12-48 µg/mL metamizol içeren çözeltilerin standart bir serisi stok çözeltilerden hazırlanmıştır. Bu standart çözeltilerin spektrumları alınarak seçilen dalga boylarında konsantrasyon-absorbans ilişkisine dayanarak 9 lineer regresyon fonksiyonları hesaplanmıştır. Bunlar Tablo 3'de verilmektedir.

TABLO III
Lineer regresyon analizi ve 9 dalga boyundaki sonuçları

λ_i	Kafein			Parasetamol			Metamizol		
	Regresyon eşitliği	(r)	Regresyon eşitliği	(r)	Regresyon eşitliği	(r)	Regresyon eşitliği	(r)	
237	A = 0.0192 C - 0.0040	0.9999	A = 0.0606 C + 0.0123	0.9999	A = 0.0222 C - 0.0105	0.9999			
242	A = 0.0153 C - 0.0046	0.9999	A = 0.0636 C + 0.0122	0.9999	A = 0.0229 C - 0.0098	0.9999			
247	A = 0.0150 C - 0.0042	0.9999	A = 0.0618 C + 0.0131	0.9999	A = 0.0235 C - 0.0091	0.9999			
252	A = 0.0199 C - 0.0022	0.9999	A = 0.0545 C + 0.0115	0.9999	A = 0.0254 C - 0.0083	0.9999			
257	A = 0.0279 C + 0.0003	0.9999	A = 0.0433 C + 0.0063	0.9999	A = 0.0268 C - 0.0074	0.9999			
262	A = 0.0370 C + 0.0028	0.9999	A = 0.0316 C + 0.0057	0.9999	A = 0.0261 C - 0.0063	0.9999			
267	A = 0.0448 C + 0.0067	0.9999	A = 0.0218 C + 0.0050	0.9999	A = 0.0228 C - 0.0053	0.9999			
272	A = 0.0488 C + 0.0100	0.9999	A = 0.0158 C + 0.0048	0.9999	A = 0.0176 C - 0.0037	0.9999			
277	A = 0.0465 C + 0.0095	0.9999	A = 0.0128 C + 0.0046	0.9999	A = 0.0121 C - 0.0032	0.9999			

Üçlü karışımdaki kafein, parasetamol ve metamizol bileşenleri için lineer regresyon analizinde elde edilen eğim değerleri, duyarlılık matrisinin oluşturulması için kullanılmıştır (Tablo 4).

TABLO IV

Kafein, parasetamol ve metamizol için 9 dalga boyunda tek bileşenli regresyon analizinin duyarlılık değerleri (b_{CAF} , b_{PAR} ve b_{MET} kafein, parasetamol ve metamizol için regresyon eşitliklerinin eğimleridir

λ (nm)	bCAF _x 10-3	bMET _x 10-3	BPAR _x 10-3
237	19.2	22.2	60.6
242	15.3	22.9	63.6
247	15.0	23.5	61.8
252	19.9	25.4	54.5
257	27.9	26.8	43.3
262	37.0	26.1	31.6
267	44.8	22.8	21.8
272	48.8	17.6	15.8
277	46.5	12.1	12.8

Kaiser tekniğine göre duyarlılık matrislerinin determinantlarının mutlak değerleri, duyarlılığı en yüksek dalga boyunun seçiminde kullanılmıştır. Bu işlemde, optimum 3 dalga boyu setinin seçimi için duyarlılık matrislerinin farklı 168 üçlü çifti hesaplanabilir. Bu hesaplama işlemi 3 boyutlu uzayda çok büyük hacim gerektirir, diagonal duyarlılık değerleri burada gösterilmemiştir. Duyarlılık matrislerinin en yüksek determinant değerlerini veren optimum üç dalga boyu setinin 242, 262 ve 277 nm olduğu bulunmuştur. Seçilen bu 3 dalga boyu setinde, her bileşen için ayrı lineer regresyon eşitliği Tablo III'de görülmektedir.

Aşağıdaki eşitlikler trivariate regresyon kalibrasyon yöntemi için oluşturulmuştur:

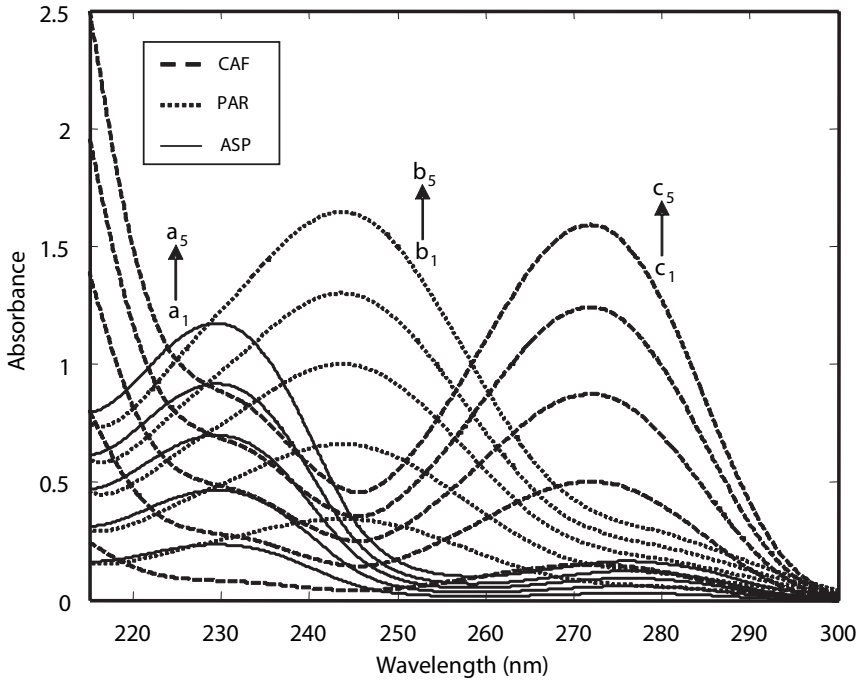
$$\lambda_1 = 242, \text{Amix}_1 = 0.0153C_{CAF} + 0.0636C_{PAR} + 0.0229C_{MET} - 0.0023$$

$$\lambda_2 = 262, \text{Amix}_2 = 0.0370C_{CAF} + 0.0316C_{PAR} + 0.0261C_{MET} + 0.0023 \quad (27)$$

$$\lambda_3 = 277, \text{Amix}_3 = 0.0465C_{CAF} + 0.0128C_{PAR} + 0.0121C_{MET} + 0.0109$$

Bu eşitlikler Bölüm 2.2. de trivariate regresyon kalibrasyon algoritmasının kurulmasında kullanılmıştır. Yapay karışımlar ve farmasötik preparat için 242, 262 ve 277 nm'de ölçülen absorbans değerleri kurulan kalibrasyon matrisinde yerine konularak kafein, parasetamol ve metamizol'ün miktarları tayin edilmiştir. Hesaplamalar matris matematiği olarak bilinen lineer cebir kullanılarak başarılmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada¹⁴ bu yöntemin kafein, parasetamol ve aspirin karışımının uygulamasında standart çözeltiler için elde edilen absorpsiyon spektrumları Şekil 3'de görülmektedir.



Şekil 3

Absorpsiyon spektrumu; parasetamol (.....), aspirin (-) konsantrasyon aralığı; (a1 = b1) 5 µg/mL, (a2 = b2) 10 µg/mL, (a3 = b3) 15 µg/mL, (a4 = b4) 20 µg/mL, ve (a5 = b5) 25 µg/mL, ve kafein (-----) (c1) 4 µg/mL µg/mL, (c2) 10 µg/mL, (c3) 16 µg/mL, (c4) 22 µg/mL ve (c5) 28 µg/mL (0.1 M HCl).

Kafein, parasetamol ve aspirin için 18 dalga boyunda hesaplanan lineer regresyon fonksiyonları Tablo 5'de görülmektedir.

TABLO V
18 dalga boyunda lineer regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları

λ	ASP			CAF			PAR								
	Regresyon eşitliği	r	SE (b)	SE (a)	SE (f)	Regresyon eşitliği	r	SE (b)	SE (a)	SE (f)					
222	A = 0.0396 C - 0.0020	0.9996	0.0101	0.0006	0.0096	A = 0.0468 C - 0.0753	1.0000	0.0045	0.0002	0.0047	A = 0.0353 C - 0.0062	0.9998	0.0065	0.0004	0.0062
224	A = 0.0426 C - 0.0020	0.9997	0.0101	0.0006	0.0096	A = 0.0405 C - 0.0658	1.0000	0.0036	0.0002	0.0038	A = 0.0387 C - 0.0076	0.9998	0.0067	0.0004	0.0064
226	A = 0.0449 C - 0.0016	0.9997	0.0102	0.0006	0.0098	A = 0.0370 C - 0.0605	1.0000	0.0029	0.0002	0.0030	A = 0.0421 C - 0.0085	0.9998	0.0071	0.0004	0.0067
229	A = 0.0466 C - 0.0010	0.9997	0.0104	0.0006	0.0099	A = 0.0342 C - 0.0562	1.0000	0.0024	0.0001	0.0025	A = 0.0470 C - 0.0102	0.9998	0.0088	0.0005	0.0084
232	A = 0.0455 C - 0.0011	0.9997	0.0099	0.0006	0.0095	A = 0.0321 C - 0.0528	1.0000	0.0019	0.0001	0.0020	A = 0.0516 C - 0.0125	0.9998	0.0095	0.0006	0.0090
235	A = 0.0411 C - 0.0015	0.9997	0.0088	0.0005	0.0084	A = 0.0289 C - 0.0469	1.0000	0.0019	0.0001	0.0020	A = 0.0566 C - 0.0143	0.9998	0.0101	0.0006	0.0096
240	A = 0.0280 C - 0.0041	0.9996	0.0075	0.0005	0.0071	A = 0.0217 C - 0.0359	1.0000	0.0010	0.0001	0.0011	A = 0.0631 C - 0.0170	0.9998	0.0114	0.0007	0.0109
244	A = 0.0161 C - 0.0058	0.9993	0.0057	0.0003	0.0054	A = 0.0178 C - 0.0300	1.0000	0.0007	0.0000	0.0007	A = 0.0649 C - 0.0177	0.9998	0.0120	0.0007	0.0114
248	A = 0.0086 C - 0.0078	0.9975	0.0059	0.0004	0.0056	A = 0.0186 C - 0.0317	1.0000	0.0008	0.0000	0.0009	A = 0.0620 C - 0.0177	0.9998	0.0110	0.0007	0.0105
251	A = 0.0060 C - 0.0083	0.9953	0.0056	0.0003	0.0053	A = 0.0225 C - 0.0376	1.0000	0.0016	0.0001	0.0016	A = 0.0572 C - 0.0165	0.9998	0.0100	0.0006	0.0096
254	A = 0.0047 C - 0.0083	0.9933	0.0052	0.0003	0.0050	A = 0.0281 C - 0.0457	1.0000	0.0022	0.0001	0.0023	A = 0.0506 C - 0.0154	0.9998	0.0087	0.0005	0.0083
258	A = 0.0041 C - 0.0083	0.9921	0.0050	0.0003	0.0048	A = 0.0370 C - 0.0594	1.0000	0.0033	0.0002	0.0034	A = 0.0406 C - 0.0111	0.9999	0.0065	0.0004	0.0062
262	A = 0.0044 C - 0.0083	0.9935	0.0048	0.0003	0.0045	A = 0.0466 C - 0.0747	1.0000	0.0048	0.0003	0.0051	A = 0.0307 C - 0.0065	0.9999	0.0050	0.0003	0.0048
266	A = 0.0051 C - 0.0081	0.9956	0.0046	0.0003	0.0044	A = 0.0550 C - 0.0865	0.9999	0.0065	0.0004	0.0068	A = 0.0223 C - 0.0034	0.9999	0.0032	0.0002	0.0030
270	A = 0.0060 C - 0.0080	0.9969	0.0045	0.0003	0.0043	A = 0.0598 C - 0.0936	0.9999	0.0064	0.0004	0.0067	A = 0.0169 C - 0.0013	0.9998	0.0029	0.0002	0.0027
272	A = 0.0063 C - 0.0078	0.9973	0.0045	0.0003	0.0043	A = 0.0603 C - 0.0937	0.9999	0.0069	0.0004	0.0072	A = 0.0152 C - 0.0008	0.9999	0.0024	0.0001	0.0023
276	A = 0.0067 C - 0.0075	0.9977	0.0043	0.0003	0.0041	A = 0.0570 C - 0.0885	0.9999	0.0066	0.0004	0.0069	A = 0.0129 C - 0.0000	0.9999	0.0018	0.0001	0.0018
280	A = 0.0063 C - 0.0074	0.9977	0.0041	0.0002	0.0039	A = 0.0482 C - 0.0763	0.9999	0.0056	0.0003	0.0059	A = 0.0115 C - 0.0006	0.9999	0.0016	0.0001	0.0015

A = analizi yapılan bileşenin absorsansı
r = regresyon eşitliğinin korelasyon katsayısı
SE (b) = eğimin standart hatası
SE (a) = kesimin standart hatası
SE (f) = korelasyon katsayısının standart hatası
C = analizi yapılan bileşenin konsantrasyonu

Üçlü karışımdaki parasetamol, kafein ve aspirin bileşenleri için lineer regresyon analizinde elde edilen eğim değerleri, duyarlılık matrisinin oluşturulması için kullanılmıştır (Tablo VI).

TABLO VI

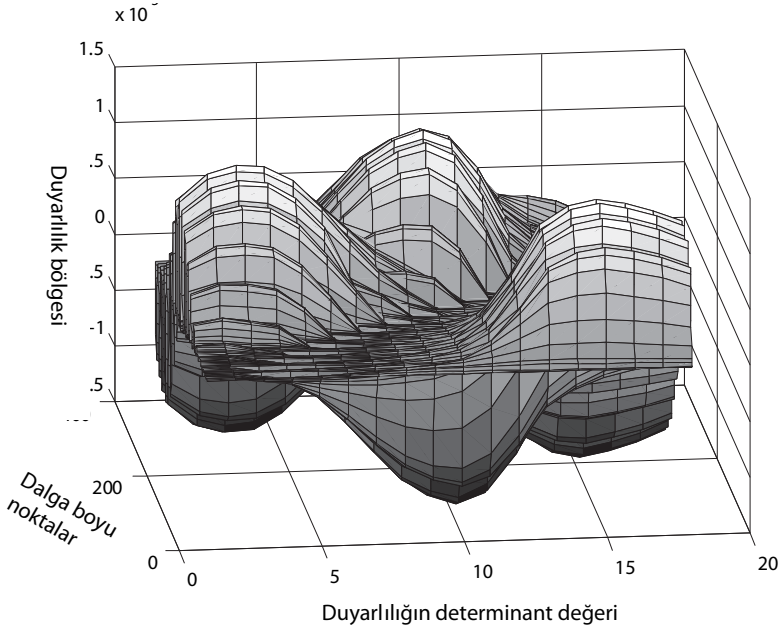
Parasetamol, kafein ve aspirin için 18 dalga boyunda tek bileşenli regresyon analizi ile elde edilen duyarlılık değerleri

λ (nm)	$B_{ASP} \times 10^{-3}$	$B_{CAF} \times 10^{-3}$	$B_{PAR} \times 10^{-3}$
222	39.6	46.8	35.3
224	42.6	40.5	38.7
226	44.9	37.0	42.1
229	46.6	34.2	47.0
232	45.5	32.1	51.6
235	41.1	28.9	56.6
240	28.0	21.7	63.1
244	16.1	17.8	64.9
248	8.6	18.6	62.0
251	6.0	22.5	57.2
254	4.7	28.1	50.6
258	4.1	37.0	40.6
262	4.4	46.6	30.7
266	5.1	55.0	22.3
270	6.0	59.8	16.9
272	6.3	60.3	15.2
276	6.7	57.0	12.9
280	6.3	48.2	11.5

Kaiser tekniğine göre duyarlılık matrislerinin determinantlarının mutlak değerleri, duyarlılığı en yüksek dalga boyunun saptanmasında kullanılmıştır. Bu işlemde, optimum 3 dalga boyu setinin seçimi için duyarlılık matrislerinin farklı 816 üçlü çifti oluşturulabilir. Kaç adet duyarlılık matrisi oluşturulabileceği aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$C_n^p = \frac{p!}{(p-n)!n!} \quad (27)$$

Burada, C_n^p duyarlılık matrislerinin üçlü çifterinin sayısını, p dalga boyu sayısını ve n ise bileşen sayısını göstermektedir. Bu hesaplama işlemi 3 boyutlu uzayda çok büyük hacim gerektirir, diagonal duyarlılık değerleri Şekil 4'de görülmektedir.



Şekil 4

Kaiser tekniği kullanılarak, 3 boyutlu uzayda, 816 duyarlılık matrisinden elde edilen ve 6 en yüksek determinant değerine karşılık gelen optimum üçlü dalga boyu seti (6 maksimum, 229, 248 ve 272 nm dalga boylarına karşılık gelen negatif ve pozitif determinat değerlerini göstermektedir).

Duyarlılık matrislerinin en yüksek determinant değerlerini veren optimum üç dalga boyu seti, 229, 248 ve 272 nm olarak kalibrasyon modeli için bulunmuştur. Seçilen bu 3 dalga boyu setinde, her bileşen için ayrı lineer regresyon eşitliği Tablo 5'de görülmektedir. Aşağıdaki eşitlik seti trivariate regresyon kalibrasyon yöntemi için oluşturulmuştur:

$$\begin{aligned}
 \lambda_{229}, A_{\text{mix1}} &= 0.0466 \cdot C_{\text{ASP}} + 0.0470 \cdot C_{\text{PAR}} + 0.0342 \cdot C_{\text{CAF}} - 0.0470 \\
 \lambda_{248}, A_{\text{mix2}} &= 0.0086 \cdot C_{\text{ASP}} + 0.0620 \cdot C_{\text{PAR}} + 0.0186 \cdot C_{\text{CAF}} - 0.0218 \\
 \lambda_{272}, A_{\text{mix3}} &= 0.0063 \cdot C_{\text{ASP}} + 0.0152 \cdot C_{\text{PAR}} + 0.0603 \cdot C_{\text{CAF}} - 0.1007
 \end{aligned} \quad (28)$$

Oluşturulan kalibrasyon sentetik karışımların ve tabletlerin analizine uygulanmıştır.

3.3. Multivariate Kalibrasyon Yönteminin Uygulaması

3.3.1. Multivariate Kalibrasyon Yönteminin İkili Karışımlara Uygulaması

Hidroklorotiazid–spironolakton karışımının analizi için 225-295 nm dalga boyu aralığındaki spektrumlarında kritik dalga boylarına karşılık gelen 235 nm'den 280 nm'ye kadar 10 dalga boyunda elde edilen lineer regresyon fonksiyonlarına dayalı olarak kurulan multivariate kalibrasyon yöntemi ile Bölüm 2.3. de 19 nolu denklem kullanılarak karışımlardaki hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktar tayinleri yapılmıştır.

Bu yöntemde kalibrasyon için 6–20 µg/mL doğrusal çalışma aralığında hidroklorotiazid ve spironolaktonu içeren çözeltilerin standart serileri için okunan absorbans değerlerinden yararlanılarak hidroklorotiazid ve spironolaktonun Tablo VII' de 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'ye karşılık gelen dalga boylarındaki lineer regresyon denklemleri hesaplanmıştır.

TABLO VII

Hidroklorotiazid ve spironolaktonun seçilen 10 dalga boyundaki doğru denklemleri ve lineer regresyon katsayıları.

λ	Hidroklorotiazid		Spironolakton	
	$A = m \times C + n$	r	$A = m \times C + n$	r
235	$A = 0,0261 \times C - 0,0171$	0,9938	$A = 0,0500 \times C - 0,0556$	0,9901
240	$A = 0,0066 \times C - 0,0113$	0,9952	$A = 0,0539 \times C - 0,0623$	0,9902
245	$A = 0,0063 \times C - 0,0124$	0,9949	$A = 0,0538 \times C - 0,1076$	0,9934
250	$A = 0,0119 \times C - 0,0180$	0,9947	$A = 0,0454 \times C - 0,1140$	0,9938
255	$A = 0,0228 \times C - 0,0263$	0,9943	$A = 0,0329 \times C - 0,0990$	0,9937
260	$A = 0,0402 \times C - 0,0410$	0,9945	$A = 0,0199 \times C - 0,0709$	0,9926
265	$A = 0,0607 \times C - 0,0573$	0,9942	$A = 0,0078 \times C - 0,0134$	0,9941
270	$A = 0,0727 \times C - 0,0697$	0,9941	$A = 0,0028 \times C - 0,0077$	0,9962
275	$A = 0,0638 \times C - 0,0592$	0,9944	$A = 0,0000 \times C + 0,0000$	0,0000
280	$A = 0,0360 \times C - 0,0359$	0,9946	$A = 0,0000 \times C + 0,0000$	0,0000

Multivariate regresyon kalibrasyonu için 225–295 nm spektral aralıkta 235 nm'den 280 nm'ye kadar 10 dalga boyunda herbir bileşik için Tablo 7'de hesaplanan lineer regresyon fonksiyonları kullanarak Tablo 8'deki multivariate regresyon kalibrasyon denklem seti elde edilmiştir.

TABLO VIII

Karışımındaki hidroklorotiazid ve spironolakton için seçilen 10 dalga boyunda elde edilen multivariate regresyon kalibrasyon denklem seti.

	λ	Denklem Seti
1	235	$A_{k1} = 0,0261 \times C_{HCT} + 0,0500 \times C_{SP} - 0,0727$
2	240	$A_{k2} = 0,0066 \times C_{HCT} + 0,0539 \times C_{SP} - 0,0735$
3	245	$A_{k3} = 0,0063 \times C_{HCT} + 0,0538 \times C_{SP} - 0,1201$
4	250	$A_{k4} = 0,0119 \times C_{HCT} + 0,0454 \times C_{SP} - 0,1320$
5	255	$A_{k5} = 0,0228 \times C_{HCT} + 0,0329 \times C_{SP} - 0,1253$
6	260	$A_{k6} = 0,0402 \times C_{HCT} + 0,0199 \times C_{SP} - 0,1119$
7	265	$A_{k7} = 0,0607 \times C_{HCT} + 0,0078 \times C_{SP} - 0,0707$
8	270	$A_{k8} = 0,0727 \times C_{HCT} + 0,0028 \times C_{SP} - 0,0774$
9	275	$A_{k9} = 0,0638 \times C_{HCT} + 0,0000 \times C_{SP} - 0,0592$
10	280	$A_{k10} = 0,0360 \times C_{HCT} + 0,0000 \times C_{SP} - 0,0359$

Bu kalibrasyon için Tablo 7'deki multivariate regresyon kalibrasyon denklem seti kullanılarak 10 dalga boyunda Bölüm 2.3. de verilen algoritmaya göre bu maddelerin 6–20 $\mu\text{g/mL}$ doğrusal konsantrasyon aralığında multivariate regresyon kalibrasyonu kurulmuştur.

Yöntemin yapay karışımların analizine ve farmasötik preparatlara uygulanması ile hidroklorotiazid ve spironolaktonun miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Multivariate Kalibrasyon Yönteminin Üçlü Karışımlara Uygulanması

Bu yaklaşım, aslında trivariate regresyon kalibrasyonuna benzerdir, fakat multivariate kalibrasyon yöntemi 3 dalga boyu yerine n dalga boyunda işlemleri içerir. Bu nedenle, kafein, parasetamol ve metamizol

içeren üçlü karışımın lineer regresyonunu oluşturabilmek için 220-320 nm spektral aralıkta, kritik noktalar dediğimiz maksimum, minimum ve omuzlara karşılık gelen 9 dalga boyu (237, 242, 247, 252, 257,262, 267, 272, 277) seçilmiştir. Tablo 3'de görüldüğü gibi, kafein, parasetamol ve metamizol için her bileşenin 9 adet lineer regresyon fonksiyonu, bu dalga boylarında 0. derece absorbans değerleri ölçülerek oluşturulmuştur.

Multivariate kalibrasyon için kullanılan fonksiyonlar aşağıda verilmektedir:

$$\begin{aligned}
 \lambda_1 &= 237, \text{Amix}_1 = 0.0192C_{\text{CAF}} + 0.0606C_{\text{PAR}} + 0.0222C_{\text{MET}} - 0.0023 \\
 \lambda_2 &= 242, \text{Amix}_2 = 0.0153C_{\text{CAF}} + 0.0636C_{\text{PAR}} + 0.0229C_{\text{MET}} - 0.0022 \\
 \lambda_3 &= 247, \text{Amix}_3 = 0.0150C_{\text{CAF}} + 0.0618C_{\text{PAR}} + 0.0235C_{\text{MET}} - 0.0003 \\
 \lambda_4 &= 252, \text{Amix}_4 = 0.0199C_{\text{CAF}} + 0.0545C_{\text{PAR}} + 0.0254C_{\text{MET}} + 0.0010 \\
 \lambda_5 &= 257, \text{Amix}_5 = 0.0279C_{\text{CAF}} + 0.0433C_{\text{PAR}} + 0.0268C_{\text{MET}} - 0.0008 \quad (29) \\
 \lambda_6 &= 262, \text{Amix}_6 = 0.0370C_{\text{CAF}} + 0.0316C_{\text{PAR}} + 0.0261C_{\text{MET}} + 0.0023 \\
 \lambda_7 &= 267, \text{Amix}_7 = 0.0448C_{\text{CAF}} + 0.0218C_{\text{PAR}} + 0.0228C_{\text{MET}} + 0.0064 \\
 \lambda_8 &= 272, \text{Amix}_8 = 0.0488C_{\text{CAF}} + 0.0158C_{\text{PAR}} + 0.0176C_{\text{MET}} + 0.0110 \\
 \lambda_9 &= 277, \text{Amix}_9 = 0.0465C_{\text{CAF}} + 0.0128C_{\text{PAR}} + 0.0121C_{\text{MET}} + 0.0109
 \end{aligned}$$

Bölüm 2.3.2. de anlatıldığı gibi, yukarıdaki denklem seti kullanılarak elde edilen multivariate kalibrasyon, kafein, parasetamol ve metamizol içeren üçlü karışımlar ve iki farmasötik dozaj formuna uygulanmıştır.

Bu yöntemler, diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında avantajları aşağıda sıralanmıştır:

Bivariate Kalibrasyon Yönteminin Avantajları

- i)** Basit kalibrasyon algoritmasına sahip olmasıdır.
- ii)** Ölçüm yapılacak dalga boyunun duyarlılığı en yüksek iki dalga boyunun kullanılması nedeniyle güvenilir sonuçlar elde edilmektedir.
- iii)** Çalışma dalga boyunun iyi seçilmesi koşuluyla bütün ikili karışımlara uygulanabilir.
- iv)** Doğrudan absorbans ölçümleri kalibrasyon için yeterlidir.

Multivariate Kalibrasyon Yönteminin Avantajları

- i)** Basit kalibrasyon algoritmasına sahiptir.
- ii)** Birden fazla seçilen kritik dalga boyunda çalışma olanağı vermesi nedeniyle hatalı dalga boylarının eliminasyonu mümkündür.
- iii)** İki veya daha fazla aktif bileşik içeren kompleks karışımların analizi mümkündür.
- iv)** Yöntemin uygulanması için doğrudan absorbands değerlerinin ölçülmesi yeterlidir.

Özet

Son yıllarda, kimyasal ayırma, ekstraksiyon ve spektrumların türevi gibi bir ön işlem gerektirmeksizin, iki veya daha fazla etkin bileşiği içeren karışımların aynı anda miktar tayini için kemometrik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, analitik uygulamalar için kemometrik kalibrasyon algoritmalarının bazıları son derece soyut ve karmaşıktır. Bu nedenlerle, son derece basit matematiksel metodolojiye sahip olan bivariate kalibrasyon (iki değişkenli kalibrasyon), trivariate kalibrasyon (üç değişkenli kalibrasyon) ve multivariate kalibrasyon (çok değişkenli kalibrasyon) yöntemleri, karmaşık kemometrik kalibrasyon yöntemleri yerine, çok bileşenli karışımların kantitatif analizi için kullanılabilir. Bu iki, üç ve çok bileşenli kalibrasyonlar, yüksek duyarlılığa sahip seçilmiş dalga boyu setlerinden elde edilen kalibrasyon fonksiyonlarının kullanımına dayanır. Bu çalışma ile analitik kimyada, iki, üç ve çok bileşenli kalibrasyonların, çok bileşenli karışımların analizine uygulanması sunulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Spektrofotometri; Lineer regresyon fonksiyonları; Çok değişkenli kalibrasyonlar; kombine preparatların analizi.

Summary

Multivariate Calibrations Based on Linear Regression Functions and Their Analytical Applications

In recent years, the chemometric methods have been widely used for the simultaneous quantitative analysis of mixtures containing two or more active compounds without requiring any priory step such as chemical separation, extraction and derivation of spectra. However, some of chemometric calibration algorithms are very abstract and complex for

analytical applications. For these reasons, the bivariate, trivariate and multivariate calibrations having very simple mathematical methodology can be used, instead of complex chemometric calibration methods, for the quantitative resolution of multi-component mixtures. The bi-, tri- and multi-variate calibrations are based on the use of linear regression functions obtained from the selected wavelength sets having higher sensitivity. This study presents the application of bi-, tri- and multi-variate calibrations to multicomponent determination in analytical chemistry.

Key words: Spectrophotometry; Linear regression functions, multivariate calibrations; combined pharmaceutical preparation analysis.

KAYNAKLAR

1. Kaiser H., Zur definition von selectivität, spezifität und empfindlichkeit von analysenverfahren Anal. Chem., 260, 252 (1972).
2. Dinç, E., Baydan, E., Kanbur M., Onur, F., Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods, Talanta, 58, 579 (2002).
3. Dinc, E., ve Baleanu, D. Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril ana hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods, J. Pharm. Biomed. Anal. 30, 715 (2002).
4. Dinç, E., ve Kanbur, M. Spectrophotometric multicomponent resolution of a veterinary formulation containing oxfendazole and oxytetracycline by multivariate calibration-prediction techniques, J. Pharm. Biomed. Anal. 28, 779 (2002).
5. Dinç, E., Spectral analysis of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by three chemometric techniques, Anal. Lett., 35, 1021 (2002).
6. Dinç, E., Serin, C., Demiröz F.T., Doğanay, T., Dissolution and assaying of multicomponent tablets by chemometric methods using computer-aided spectrophotometer, Int. J. Pharm., 250, 339 (2003).
7. Dinç, E., Baleanu, D., Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques, IL Farmaco, 57, 33 (2002).
8. Dinc, E. Linear regression analysis and its application to the multivariate spectral calibrations for the multiresolution of a ternary mixture of caffeine, paracetamol and metformin in tablets, J. Pharm. Biomed. Anal. 33, 605 (2003).
9. López-de-Alba P. L., López-Martínez L., Michelini-Rodríguez L. I., Wróbel K., Amodor-Hernández J., Extraction of sunset yellow and tartrazine by ion-pair formation with adogen-464 and their simultaneous determination by bivariate calibration and derivative spectrophotometry, Analyst. 122, 1575 (1997).
10. Üstündağ, Ö., Hidroklorotiazid içeren farmasötik preparatlardaki etken maddelerin kemometrik yöntemlerle miktar tayini, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, (2003).

11. **López-de-Alba P. L., Wróbel K., López-Martínez L., Yepez-Murrieta M.L., Amador-Hernández J.**, Application of the bivariate spectrophotometric method for the determination of metronidazole, furazolidone and di-iodohydroxyquinoline in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 16, 349 (1997).
12. **López-Martínez L., López-de-Alba P. L., de-León-Rodríguez L. M., Yepez- Murrieta M. L.**, Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulphamethoxy pyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 77 (2002).
13. **Dinc, E., Ozdemir, A.** Multivariate spectral calibration technique based on regression analysis for the quantitative multiresolution of a ternary mixture containing paracetamol, ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets, *Die Pharmazie*. 59, 700 (2004).
14. **Dinc, E., ve Ozdemir, A.** Mathematical algorithms applied to the multi-linear regression functions for the multicomponent determination of pharmaceutical dosage form containing three-component mixtures, *Chem. Pharm. Bull.* 53, 899 (2005).
15. **Ustundag, O., Dinc, E.** Simultaneous resolution of a binary mixture of captopril and hydrochlorothiazide in tablets by bivariate and multivariate spectral calibrations, *Die Pharmazie* 58, 623 (2003).
16. **Dinc, E., Baleanu, D.**, Bivariate and multivariate spectral resolutions of a mixture of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by using linear regression lines, *Revista de Chimie* 56, 937 (2005).
17. **Dinç, E., Ragno, G., Loele G., Baleanu, D.**, Fractional wavelet analysis for the simultaneous quantitative resolution of lacidipine and its photo-degradation product by continuous wavelet transform and multilinear regression calibration (in press), *Journal of AOAC International* (2006).
18. **Dinç, E., Üstündağ, Ö.**, Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spirinolactone in tablets by chemometric analysis methods, *IL Farmaco*, 58, 1151 (2003).

YAZAR İNDEKSİ / AUTHOR INDEX

Durmuş, Saadet	1
Yalçın, Funda Nuray	13
Ersöz, Tayfun	13
İclal, Saraçoğlu	13
Dönmez, A.Ali	13
Gümüşel, Bülent	23
Kandilci, H.Burak	23
Uçar, Gülberk	23
Acar, Aylin	39
Yeğenoğlu, Selen	39
Elçi, Burcu	57
Erik, Sadık	57
Vaңcelik, Serhat	65
Çalıkoğlu, Okşan	65
Güraksın, Asuman	65
Beyhun, Ercüment	65
Tatli, I. Irem	77
Akdemir, Zeliha S.	77
Dinç, Erdal	87
Üstündağ, Özgür	87

ANAHTAR KELİME İNDEKSİ

Phlomis physocalyx	13
Lamiaceae	13
Feniletanoit glikozitleri	13
Filinozit D.....	13
Filizozit E	13
Monoamine oksidase	23
İskemi-reperfüzyon hasarı	23
İskemik önkoşullama.....	23
Reaktif oksijen türleri	23
Hidrojen peroksit.....	23
Antioksidan enzimler	23
Sağlık ekonomisi	39
Farmakoekonomi.....	39
Sağlık harcamaları	39
İlaç harcamaları	39
Maliyet	39
Tıbbi bitkiler.....	57
Etnobotanik	57
Halk ilaçları.....	57
Güdül.....	57
Ankara	57
Pratisyen hekim.....	65
Reçeteleme	65
Akılcı ilaç kullanımı	65
Verbascum türleri.....	77
Scrophulariaceae.....	77
Sitotoksik aktivite.....	77
Spektrofotometri.....	87
Lineer regresyon fonksiyonları	87
Çok değişkenli kalibrasyonlar	87
Kombine preparatların analizi.....	87

KEY WORD INDEX

Rivastigmin.....	1
Differential pulse voltammetry	1
Pharmaceutical dosage form	1
Phlomis physocalyx	13
Lamiaceae	13
Phenylethanoid glycosides	13
Phlinoside C	13
Phlinoside E	13
Monoamine oxidase	23
Ischemia-reperfusion injury	23
Ischemic preconditioning	23
Reactive oxygen species	23
Hydrogen peroxide	23
Antioxidant enzymes.....	23
Health economics	39
Pharmacoeconomics	39
Health expenditures.....	39
Drug expenditures	39
Cost.....	39
Medicinal plants	57
Ethnobotany.....	57
Folc medicine.....	57
Güdül.....	57
Ankara	57
General practitioner.....	65
Prescribing	65
Rational drug use	65
Verbascum species	77
Scrophulariaceae	77
Cytotoxic activity	77
Spectrophotometry	87
Linear regression functions.....	87
Multivariate calibrations	87
Combined pharmaceutical preparation analysis.....	87