



Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan Memantin ve Donepezil Etken Maddelerinin Spektrofotometrik Verilerin Değerlendirilmesi ile Kemometrik Tayini

Güzide PEKCAN ERTOKUŐ^{1, a, ✉}, Burak Hasan AKDUMANLI^{1, b}

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Isparta, Türkiye
ORCID: ^a0000-0001-9230-5634; ^b0000-0002-8574-277X

✉ Sorumlu Yazar: guzideertokus@sdu.edu.tr

Özet: Alzheimer tedavisinde kullanılan memantin ve donepezil içeren ilaç numunesini analiz etmek için yapılmıő bu çalışmada, UV Görünür Bölge Spektroskopisi, kemometri tayini yöntemi ile birlikte kullanılmıştır. Memantin ve donepezil etken maddelerinin ultraviyole spektrumları ölçülerek kaydedilmiő, çalışılabilirlik saflık değerinde olduğu görülmüő ve analiz çalışması yapılmıştır. Uyguladığımız yöntemde, memantin ve donepezil için yüzde (%) geri kazanımı ortalaması sentetik karışım için ve ilaç numunesi için hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler, oldukça yüksektir. Kullanılan PLS ve PCR kalibrasyon tekniklerinden ulaőılan sonuçlara ANOVA testi yapılarak yöntemlerin kontrolü saęlanmıőtır. Geliőtirilmif yöntemler, tekrar edilebilir, duyarlılığı hassas ve doğru sonuç veren yöntemlerden biri olup memantin ve donepezil içeren ilaç numunelerinin analizinde önerilebilir.

Anahtar Sözcükler: *Donepezil, Memantin, Kemometri*

Chemometric Determination of Memantine and Donepezil Active Ingredients Used in the Treatment of Alzheimer's Disease by Evaluation of Spectrophotometric Data

Abstract: In this study, which was conducted to analyze the drug sample used in Alzheimer's treatment containing memantine and donepezil, UV Visible Spectroscopy was used together with the chemometry determination method. The ultraviolet spectra of the active ingredients of memantine and donepezil were measured and recorded, they were found to be of workable purity and analysis was carried out. In the method we applied, the mean percent (%) recovery for memantine and donepezil was calculated for the synthetic mixture and for the drug sample. The calculated values are quite high. The results obtained from the PLS and PCR calibration techniques used were controlled by the ANOVA test. The developed methods are one of the reproducible, sensitive and accurate methods and can be recommended for the analysis of drug samples containing memantine and donepezil.

Keywords: *Donepezil, Memantine, Chemometry*

1. Giriő

Alzheimer hastalığı en sık rastlanan nörodeğeneratif hastalıklardan birisidir. Bu hastalığın altında yatan temel patoloji sinaptik yetmezlik, nöron hasarı ve nöron kaybına bağlı ortaya çıkan ilerleyici beyin iőlev bozukluğudur (Yüksel, 2006). Tedavi altına alınması, kiőinin yaşamını daha rahat sürdürmesi açısından önemlidir. Tedavi yönteminde memantin ve donepezil gibi etken maddeler kullanılır. Kapalı formülü $C_{12}H_{21}N.HCl$ olan Memantin etken maddesinin IUPAC adlandırması 3,5-dimetiltrisiklo[3.3.1.1^{3,7}]dekan-1-amin iken; kapalı formülü $C_{24}H_{29}NO_3$ olan donepezil etken maddesinin IUPAC adlandırması ise 2 - [(1-benzilpiperidin-4-il) metil] -5,6-dimetoksi-2,3- dihidro-1 H-inden-1-on yapısındadır (Ravikumar vd., 2016). Bu çalışmada ilaç tablet numunesinde bulunan memantin ve donepezil etken maddelerinin tayini kemometrik yöntemle yapılmıştır. Kemometri yöntemi ile herhangi bir ön ayırma işlemi yapılmadan, güvenilir, hızlı bir şekilde nicel tayin yapılmıştır (Yongnian ve Gong, 1997). Ultra viyole spektrofotomerisinden elde edilen verilerdeki, absorbans ve derişim arasındaki iliőkiden faydalanılarak kemometrik model uygulanmıştır (Aktaş ve Sarıdağ, 2017).

Bu çalışmada literatüre kazandırılmak istenilen, daha önce yapılan çalışmalar incelediğinde klasik yöntemlerin yanında istatistiğin kullanıldığı kemometrik yöntemlerin üstünlüğüdür (Kısmi en küçük kareler-PLS ve Temel bileşen regresyonu-PCR) (Dinç, 2009). Böylelikle daha güvenilir ve daha hassas metotlar elde edilmesi amaçlanmaktadır.

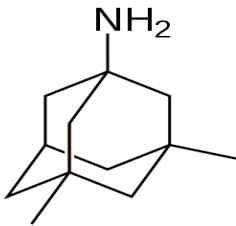
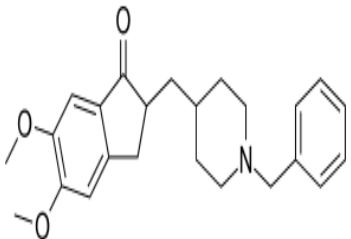
2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada, ultra-viyole spektrofotometrisi ve kemometri yöntemleriyle Alzheimer tedavisinde kullanılan ilaç etken maddeleri olan memantin ve donepezil miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler, kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ticari olarak alınan ilaç tablet numunesinde ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, Minitab 17 programı ile hesaplanmıştır.

Ultra-viyole spektrumları, bilgisayar tarafından kontrol edilen 1 cm uzunluğundaki hücre ile donatılan UV 1700 Pharmaspec Shimadzu spektrofotometresi kullanılarak belirlenen spektrum değerleri Alzheimer ilaçlarındaki memantin ve donepezil miktarını belirlemek için kemometrik metoda uygulanmıştır.

Deneylede analitik saflıkta olan kimyasallar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 1.' de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Formülleri

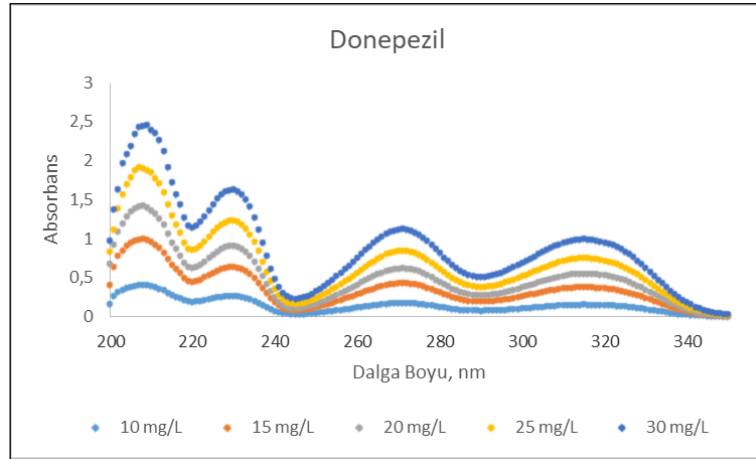
BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN FORMÜLÜ	BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN FORMÜLÜ
Memantin		Donepezil	

Çalışmada spektrofotometrik ölçümler için, memantin ve donepezil 25 mg/250 mL 0,1 M HCl olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çözücü olarak kullanılan çözelti, 0,1 M HCl çözeltisidir. İlaç etken maddelerinin çözücü ortamında daha iyi spektrum alınmaktadır. Memantin maddesinden 0,0248 g tartılarak bir miktar çözücüde çözüldükten sonra son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır. Donepezil maddesinden 0,0249 g tartılarak bir miktar çözücüde çözüldükten sonra son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

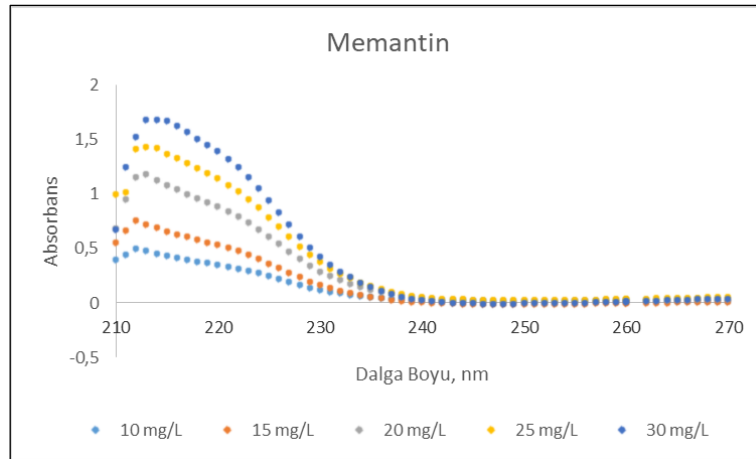
Bu çalışmada, spektrofotometrik ölçümlerle memantin ve donepezil maddelerinin, önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ticari olarak alınan tablet numunede ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, farklı kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk basamakta, UV spektrofotometre cihazının kalibrasyonu (sıfırlama işlemi) yapılmıştır. Kalibrasyon işlemi önce her iki hücre boş bırakılarak havaya karşı yapılmıştır. Sonra aynı işlem bu kez her iki ışık yoluna kullandığımız çözücümüz ile hazırlanan kör numunesi konularak yapılmıştır. Bütün okumalarda hep kör bu şekilde hazırlanmıştır. Kör seçimi yapılırken girişim etkilerini yok etmek için, kör olarak çözücü tercih edilmiştir. En son basamakta ise, tablet ilaç numunesi incelenir. İlaç numunesi hazırlanırken, pakette bulunan tüm tabletler agat havanda ezilerek inceltir ve karıştırılır. Bir tablet ağırlığında tartım yapılarak, çözücüde çözülür, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen hale getirilir ve absorbans okuması yapılır.

3. Bulgular

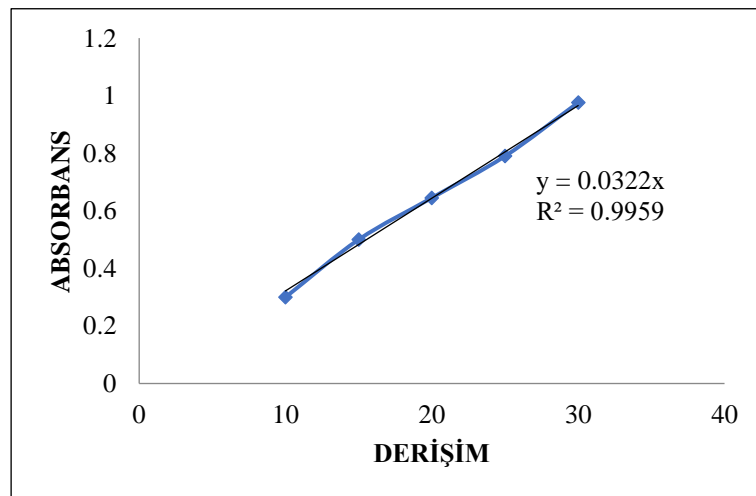
Donepezil ve memantin ilaç maddelerinden ayrı ayrı hazırlanan 100 mg/L lik çözeltilerden 5-30 mg/L aralığında tekli spektrumları alınmış (Şekil 1 ve 2) ve her bir maddenin maksimum absorbands dalga boyu belirlenmiştir. Donepezil ve memantin maddeleri için, absorbands-derişim arasındaki ilişki incelenmiştir (Şekil 3 ve 4).



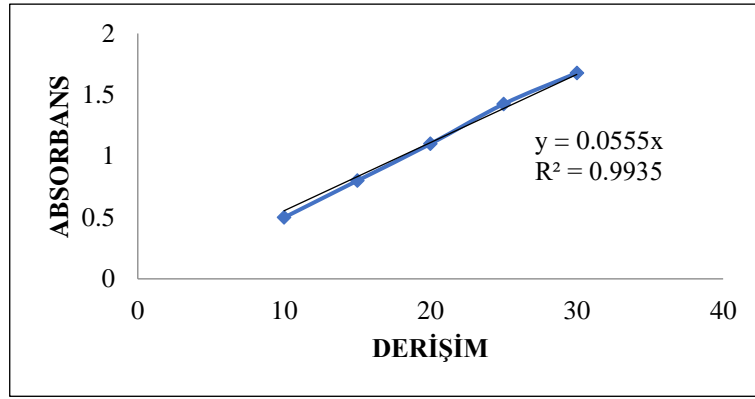
Şekil 1. Donepezil maddesinin absorpsiyon spektrumu



Şekil 2. Memantin maddesinin absorpsiyon spektrumu



Şekil 3. Donepezil maddesinin absorbands-derişim grafiği



Şekil 4. Memantin maddesinin absorbans-derişim grafiği

Donepezil ve memantin etken maddeleri için absorbans-derişim grafiklerinde, absorbans-derişim arasındaki doğrusal ilişki (Sharma vd., 2017) regresyon katsayısının (Miao vd., 2018) bire yakın olması ile doğrulanmıştır.

3.1. Yapay Karışımın Absorpsiyon Spektrumu

Donepezil ve memantin etken maddelerinden 10-30 mg/L aralığında (Tablo 2) 15 tane sentetik karışım çözeltisi hazırlanmıştır.

Tablo 2. Donepezil ve Memantin içeren yapay karışım seti

No	Donepezil mg/L	Memantin mg/L
1	10	10
2	15	10
3	20	10
4	25	10
5	30	10
6	15	15
7	20	15
8	25	15
9	30	15
10	20	20
11	25	20
12	30	20
13	25	25
14	30	25
15	30	30

3.2. Kemometrik Hesaplamalar

Son dönemlerde çok bileşenli karışımlardaki her bir bileşenin miktarını tayin etmek için kullanılan en iyi ve gözde metotlardan biri olan kemometrik tekniklerden bu çalışmada kullanılan yöntemler, kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR)'dir (Dinç ve Baleanu, 2002; Dinç vd., 2005). Absorbans ve derişim arasındaki bağıttan kurulan matris yardımıyla kemometrik model oluşturulur ve kemometrik hesaplamalar gerçekleştirilir (Aktaş ve Sarıdağ, 2017). En yaygın olan kemometrik yöntem, kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması ve ortogonalize olmayan PLS algoritması kullanılır. Klasik metotlara göre elde edilen sonuçlar daha güvenilirdir. Temel bileşen regresyon yöntemi adı verilen diğer bir kemometrik yöntem ise derişim seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi

esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir ve hesaplamalar bu esasa dayandırılır (Dinç, 2009). Elde edilen verilerin miktarını hesaplanabilen bir boyuta getirmek için kemometrik hesaplamalara geçmeden ön basamak olarak temel bileşen analizi (PCA) işlemi kullanılır (Saganowska ve Wesolowski, 2017). Temel bileşen analizi uygulanmasının amaçları, bir orijinal değişkeni temsil eden n sayıda orijinal aksı (doğruyu) yeni akslar haline dönüştürmektir. Bu dönüşüm işleminde yeni akslar, verilerin maksimum varyans yönelimleri boyunca uzanır ve yeni aksların özelliği, ortogonal olmalarıdır ve bu yeni değişkenler arasında korelasyon yoktur. Numune verilerinin varyansının çoğunu açıklamak için ihtiyaç olan yeni değişkenlerin sayısı (p), n sayıdaki orijinal akslardan daha azdır. Temel bileşen analizi, çok değişkenli verilerin boyutunu indirgemek veya verileri azaltmak için bir yöntem olarak kabul edilir. Aynı zamanda değişkenlerin doğrusal bileşenlerini ortaya çıkarır. Temel bileşen analizi ile elde edilen temel bileşenler yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisi diğer kemometrik regresyonlara ışık tutmaktadır.

Her bir kemometrik yöntem için hesaplanan geri kazanım ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri Tablo 3. ve 4. de gösterilmiştir. Kesinlik ve doğruluk değerleri kontrol edilmiştir. İlave edilen derişimlere karşı bulunan derişimler hesaplanırken, cross-validasyon işlemi uygulanarak, ilaç numunesinde hatanın önüne geçilmiştir (Porfire vd., 2015; Tarhan ve Kara, 2017).

Tablo 3. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki ilaç maddelerinin PLS kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçlar

Karışım No	İlave Edilen	Donepezil		İlave Edilen	Memantin	
		Bulunan	% Geri Kazanım		Bulunan	% Geri Kazanım
1	10	9,98	99,80	10	9,98	99,80
2	15	14,79	98,60	10	8,89	88,90
3	20	19,98	99,90	10	8,99	89,90
4	25	24,67	98,68	10	9,56	95,60
5	30	30,05	100,17	10	9,97	99,70
6	15	14,99	99,93	15	14,89	99,26
7	20	19,96	99,80	15	14,78	98,53
8	25	24,65	98,60	15	14,85	99,00
9	30	29,72	99,07	15	14,91	99,40
10	20	19,96	99,80	20	19,97	99,85
11	25	24,82	99,28	20	19,88	99,40
12	30	29,93	99,77	20	20,02	100,1
13	25	24,92	99,68	25	24,94	99,76
14	30	28,99	96,63	25	24,96	99,84
15	30	31	103,3	30	29,98	99,93
		Ortalama=99,54 BSS=1,38				Ortalama=97,93 BSS=3,64

Tablo 4. Sentetik olarak hazırlanan karışımındaki ilaç maddelerinin PCR kalibrasyonu ile hesaplanan sonuçlar

Karışım No	Donepezil			Memantin		
	İlave Edilen	Bulunan	% Geri Kazanım	İlave Edilen	Bulunan	% Geri Kazanım
1	10	8,89	88,90	10	10,02	100,20
2	15	15,04	100,27	10	9,95	99,50
3	20	19,85	99,25	10	9,92	99,20
4	25	24,67	98,68	10	9,87	98,70
5	30	29,92	99,73	10	8,97	89,70
6	15	14,86	99,07	15	14,57	97,13
7	20	18,97	94,85	15	15,05	100,33
8	25	24,56	98,24	15	14,88	99,20
9	30	29,83	99,43	15	14,96	99,73
10	20	19,98	99,9	20	19,95	99,75
11	25	24,89	99,56	20	19,86	99,30
12	30	30,01	100,03	20	19,97	99,85
13	25	24,87	99,48	25	24,96	99,84
14	30	29,97	99,90	25	24,95	99,80
15	30	29,31	97,70	30	29,97	99,90
			Ortalama=98,32 BSS=2,93			Ortalama=99,81 BSS=2,63

3.3. Kemometrik Yöntemler için ANOVA testi

PLS ve PCR kalibrasyon yöntemlerinin uygunluğunu doğrulamak amacıyla hesaplanan sonuçlara ANOVA testi (Bajpai vd., 2017) uygulanmıştır. PLS yönteminde donepezil için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=26 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,23 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,003 ve p-değeri 0,96; memantin için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=28 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,20 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,009 ve p-değeri 0,92 olarak hesaplanmıştır. PCR yönteminde donepezil için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=28 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,20 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,015 ve p-değeri 0,903; memantin için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=28 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,20 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,04 ve p-değeri 0,95 olarak hesaplanmıştır.

3.4. Yöntem Validasyonu

İkili ilaç maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS ve PCR kalibrasyonlarının kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir.

PRESS (Denklem 1) değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır (Uyanık, 2012). Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür. Validasyondaki diğer parametreler kalibrasyonun standart hatası: SEC (Denklem 2) ve tahminin kareler ortalamasının karekökü: RMSEC (Denklem 3) olarak ifade edilmiştir (Bilgili vd., 2014).

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (C_i^{IlaveEdilen} - C_i^{Bulunan})^2 \quad (1)$$

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^{IlaveEdilen} - C_i^{Bulunan})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$RMSEC = \sqrt{PRESS/n} \quad (3)$$

$C_i^{IlaveEdilen}$: Ortama ilave edilen gerçek derişim

$C_i^{Bulunan}$: Hesaplanan tahmini derişim

n: numune sayısı

Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) parametreleri birbiriyle ilişkilidir ancak farklı tanımlara sahiptir (Shrivasta ve Gupta, 2015).

$$LOD = 3Sa/m \quad (4)$$

$$LOQ = 10Sa/m \quad (5)$$

Hesaplanan LOD değerleri için değerlendirme yapılırken $LOQ > LOD$ ve $LOQ = LOD$ dikkate alınmıştır (Armbruster ve Pty, 2008) (Tablo5).

Tablo 5. Kemometrik Yöntemlerin Hesaplanan Validasyon Parametreleri

PARAMETRE	METOT	Donepezil	Memantin
Korelasyon Katsayısı	PLS	0,996	0,996
	PCR	0,997	0,998
SEC	PLS	0,820	0,77
	PCR	0,100	0,051
PRESS	PLS	0,162	0,171
	PCR	0,212	0,088
RMSEC	PLS	0,104	0,107
	PCR	0,119	0,077
LOD	PLS	1,370	0,745
	PCR	1,160	0,064
LOQ	PLS	4,170	0,256
	PCR	3,520	1,930

Tablo 6. İlaç numunesindeki sonuçlar (Doneptin)

NO	Donepezil (gram)		Memantin (gram)	
	PLS	PCR	PLS	PCR
1	0,0098	0,0097	0,0095	0,0096
2	0,0097	0,0095	0,0096	0,0097
3	0,0101	0,0099	0,0097	0,0098
4	0,0096	0,010	0,0095	0,0098
5	0,0095	0,0097	0,0099	0,0098
Ortalama	0,0098	0,0098	0,00096	0,00097
Standart Sapma	0,00023	0,00020	0,00017	0,00017

Doneptin ilaç numunesinde her bir tablette, 0,01 g donepezil, 0,01 g memantin bulunmaktadır. Tablo 6. incelendiğinde çalışmada elde edilen etken madde miktarları görülmektedir. Hesaplanan değerlerde standart sapma değerleri kabul edilebilen aralıktadır.

4. Tartışma ve Sonuç

Kemometrik hesaplamalarda Ultraviyole Spektroskopi verileri kullanılarak, ilaç maddesi içeren numunedeki ilaç etken madde miktarı belirlendi. Memantin ve Donepezil ilaç aktif bileşenlerinin UV spektrumları alınıp analizleri yapıldı. Yöntem, kemometrik yöntem kullanılarak Memantine ve Donepezil için istatistiksel olarak desteklendi. Bulunan değerler öncelikle temel bileşen analizi (PCA) yapılarak hesaplanabilir hale getirilmiştir. Daha sonra kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ve temel bileşen regresyon yöntemi (PCR) kemometrik yöntemleri uygulandı. Uygulanan PLS ve PCR metodunun doğru olduğunu denemek için iki metoda da ANOVA testi uygulandı. Tabletlerden hazırlanan ilaç örneğine geçmeden önce deneysel tasarım sırasında hazırlanan sentetik modelde de test sonuçları karşılaştırıldı. Sentetik modele eklediğimiz madde miktarı ile kemometrik programdan elde ettiğimiz deney bulguları karşılaştırıldı. F testi, serbestlik dereceleri grupları içinde ve arasında gerçekleştirildi. F testi sonucuna göre kullandığımız modeli ilaç numune karışımına uygulayıp uygulamayacağımıza karar verildi. Model, $F_H < F_T$ olduğunda uygulanır. Yöntemimizde Memantin ve Donepezil için % Geri Kazanım sentetik karışım için ortalama değerler bulunmuştur. Geri kazanım değerleri kabul edilebilir olarak hesaplandı ve çalışmaya uygun olarak standart sapmalar hesaplandı. PLS ve PCR yöntemleri uygulanmış ve bulunan değerlerin doğruluğu F testi ile ölçülmüştür. Hesaplanan F değerlerinin teorik değerlerden daha düşük olduğu görülmektedir. Karelerin toplamının (Karelerin Bazıları Öngörülen Residual Error → PRESS) ve standart kalibrasyon hatası (SEC) değerlerinin sıfıra yakın olması doğruluğu ve güvenilirliği artırmaktadır. Geliştirilen yöntemler tekrarlanabilir, son derece hassas ve doğru, hızlı sonuçlardır ve Memantine ve Donepezil içeren farklı ilaç örneklerinin analizi için önerilebilir.

Teşekkür

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından “FYL-2019-7352” kodlu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Kaynakça

Aktaş, A.H., Sarıdağ A.M. (2017). Liquid chromatografic-chemometric techniques for the simultaneous HPLC determination of lansoprazole, amoksisilin and clarithromisin in commercial preparation. *Journal of Chromatografic Science*, 1-7.

Armbruster, D.A., Pty, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation , *Clin Biochem Rev*, 29, 49-52.

Bajpai, V., Kumar, S., Singh, A., Singh, J., Negi, M.P.S., Bag, S.K., Kumar, N., Konwar, R., Kumar, B. (2017). Chemometric based identification and validation of specific chemical markers for goeographical, seasonal and gender variations in tinospora cordifolia stem using HPLC-ESI-QTOF-MS Analysis, *Photochemical Analysis*, 28 (4), 277-288.

Bilgili, A.V., Çullu, M.A., Aydemir, S. (2014). Tuzdan etkilenmiş toprakların yakın kızılötesi yansıma spektrometre ve elektromanyetik indüksiyon tekniği yardımıyla karakterize edilebilme potansiyelinin araştırılması, *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 18 (1), 32-45.

Dinç, E. (2009). Kemometrik İşlem ve Yöntemlerin Analitik Kimyadaki Tipik Uygulamaları, *Uygulamalı Kemometri Yaz Okulu Notları*, 13-17.

Dinç, E., Baleanu, D. (2002). Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 715-723.

Dinç, E., Özdemir, A., Baleanu, D. (2005). Comparative study of the continuous wavelent transform, derivative and partial least squares methods applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and asetilsalicylic acid in effervescent tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 569-575.

Miao, J., Forget, B., Smith, K. (2018). Predicting Correlation Coefficients for Monte Carlo Eigenvalue Simulations With Multitype Branching Process, *Annals of Nuclear Energy*, 112, 307-321.

Porfire A., Muntean, D., Achim, M., Vlase, L., Tomuta, I. (2015). Simultaneous Quantification of Simvastatin and Excipients in Liposomes Using Near Spectroscopy and Chemometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 40-49.

Ravikumar, R., Ganesh, M., Jang, H.T. (2016). Validated stability indicating simultaneous estimation of memantine and donepezil in pharmaceutical formulation by RP-HPLC-DAD, *DerPharmacia Lettre*, 8 (15), 79-87.

Saganowska, P., Wesolowski, M. (2017). Principal Component and Cluster Analyses as Supporting Tools for Co-Crystals Detection, *J.Therm.Anal.Calorim.*, 130, 45-55.

Sharma, D., Singh, R., Garg, R. (2017). Development and validation of stability indicating UV spectro-photometric method for the estimation of benzydamine hydrochloride in bulk and in pharmaceutical dosage form: a novel analytical technique for conducting in-vitro quality control tests, *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 9(2), 678-686.

Shrivastava, A., Gupta, V.B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientist*, 2 (1), 21-25.

Tarhan, I., Kara, A.A.I.H. (2017). Quantitative Determination of Free Fatty Acids in Extra Virgin Olive Oils by Multivariate Methods and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Considering Different Absorption Modes, *International Journal of Food Properties*, 1-8.

Uyanık, A. (2012). Analitik Kimyacılar İçin İstatistik ve Kemometri, *Pegem Akademi Yayıncılık*, 6. Baskı, 254-259.

Yongnian, N., Gong X. (1997). Simultaneous Spectrophotometric Determination of Mixtures of Food Colorants. *Analytica Chimica Acta*, 354, 163-171.

Yüksel, F. V. (2006, November 15). Demans Nedir?. <http://antalyapsikoloji.com>