

PAPER DETAILS

TITLE: Kemometri Çok Degiskenli Kalibrasyon Yöntemleri

AUTHORS: Erdal DINÇ

PAGES: 61-92

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/842139>

Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Received : 21.05.2007
Revised : 22.06.2007
Accepted : 08.07.2007

Erdal Dinç*^o

1. Giriş

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

Kemometri kelime olarak, 1970'li yıllarda istatistik ve matematiksel yöntemler ile birlikte bilgisayar ve yazılımların kullanıldığı kimyadaki uygulamaları için sözü edilmeye başlanmıştır. Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürüldü ve 1974 yılında uluslararası kemometri derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapıldı. İzleyen yıllarda, dünyada, ulusal ve uluslararası kemometri konferanslarının da organize edildiği gözlenmektedir.

Bugün analitik kimyada kemometri disiplininin tanımı, konuları ve çözüm getirdiği problemler için artan yoğunlukta ve çok sayıda kitabının

* Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 06100 Tandoğan, Ankara-Türkiye

^o Corresponding author. E. Dinç E-mail: dinc@pharmacy.ankara.edu.tr

yayınlandığı görülmektedir¹⁻¹⁹. Bu disiplinin ortaya atıldığı günden itibaren kemometrik yöntemler ve uygulamaları ile ilgili derleme makaleler ve öğretici ders notları yayınlanmıştır²¹⁻²².

Bu kemometrik yöntemlere rağbet edilmesi, kimya ve de analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunmasına bağlanabilir. Yapılan bilimsel çalışmaların sonucu yayınlanan makaleler göstermiştir ki son 15 yıl içinde analitik problemlerin çözümü için gelişmiş analitik cihazlardan elde edilen çok değişkenli ve çok boyutlu ölçüm verilerinin işlenmesi için kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılarıdır.

Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik (descriptive and inference statistics), sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (Artificial intelligence methods), resim işleme (image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

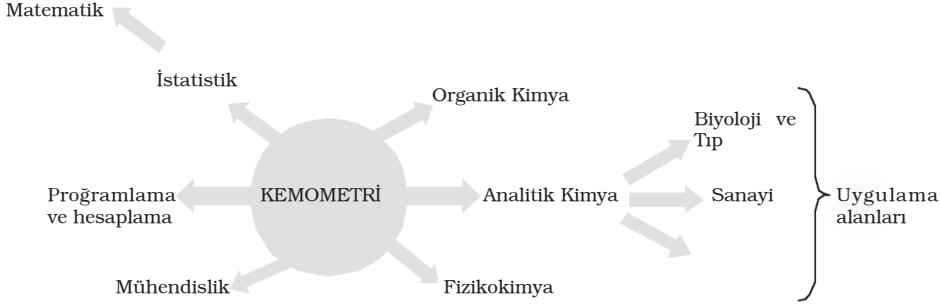
Kemometri disiplininde temel olarak üzerinde vurgu yapılan istatistik-matematik yöntemler üzerindedir. Rastgele (düzensiz) veriler, sırasıyla istatistiğin tanımlayıcı ve açıklayıcı yöntemleriyle karakterize ve test edilirler. Analitik verilerin işlenmesinde, istatistik ve uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır.

Sinyallerin işlenmesi, düzleştirme (smoothing), filtreleme (filtering), türev ve integrasyon için kullanılan algoritmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Fourier ve dalgacık dönüşümü gibi yöntemler sinyal işlemek için kullanılan yöntemlerdir^{23,24}.

Yüksek verimli deneysel çalışmalar, deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanır. Deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirmeler matematiksel modeller veya tasarımlar vasıtasıyla başarılabılır. Deneysel tasarım ve optimizasyon konusunda çok sayıda teknik bilgi notu ve kitap istatistikçiler tarafından yazılmıştır. Bu konuda ilk analitik uygulamalı kitaplardan biri Cornell tarafından yazılmıştır¹⁰.

Doğrusal olmayan kompleks sistemlerde kalitatif ve kantitatif analizlerde yapay zeka yöntemleri olarak yapay sinir ağları yöntemleri, kemometrik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılar olmakla birlikte, laboratuvar ve analiz çalışması yapan komşu branşlarda da kullanıldığı yayınlanan eğitici notlardan ve yayınlanan bilimsel makalelerden gözlenmektedir. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri şekil 1. de sunulmaktadır²⁰.



Şekil 1
Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler.

Yukarıdaki şemadan da (şekil 1) görüldüğü gibi kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektirdiği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB ve diğer paket programlar kullanılmaktadır.

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

Bu çalışmada, kemometrinin tanımı ve disiplin olarak ortaya çıkışı, konuları ve analitik çalışmalarda kompleks karışımların analizinde sıklıkla kullanılan klasik en küçük kareler (classical least-squares → CLS), ters en küçük kareler (inverse least-squares → ILS), temel bileşen

sayıda dalga boyunun absorbans ölçümleri kalibrasyonda kullanılabilir,

u) PCR ve PLS'ye göre basit bir matematiğe sahiptir.

b) Yöntemin dezavantajları; i) bu kalibrasyonda kalibrasyon karışımlarının her bileşen için tam olarak kompozisyonunun bilinmesi gerekir, ii) spektrofotometride grafik yöntemlerin uygulanmasında olduğu gibi CLS kalibrasyon için de birbiriyle etkileşen bileşenlerin bulunduğu karışımların analizi için uygun değildir.

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

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

$$C = P \times A \quad (16)$$

Bu 15 nolu denklem aşağıda verilen lineer denklem sistemi şeklinde yazılabilir:

$$\begin{aligned}
C_1 &= P_{11}A_1 + P_{12}A_2 + \dots P_{1w}A_w \\
C_2 &= P_{21}A_1 + P_{22}A_2 + \dots P_{2w}A_w \\
&\dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\
&\dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\
C_c &= P_{c1}A_1 + P_{cw2}A_2 + \dots P_{cw}A_w
\end{aligned}
\tag{17}$$

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

Yöntemin basit algoritması :

$$\begin{aligned} \mathbf{C}_{kxq} &= \mathbf{P}_{kxp} \mathbf{A}_{pxq} \\ \mathbf{P} &= \mathbf{C}_{kxq} \mathbf{A}^T (\mathbf{A}_{pxq} \mathbf{A}_{qxp}^T)^{-1} \\ \mathbf{C}_{\text{sample}} &= \mathbf{P}_{kxp} \mathbf{A}_{pxq} \end{aligned} \quad (18)$$

a) *Yöntemin avantajları; i)* numune için ölçülen absorbans değerleri, formülde yerine konduğu zaman doğrudan konsantrasyonu hesaplamak mümkündür, bu da hesaplamalarda zaman kaybını ortadan kaldırmaktadır, *ii)* analiz edilen bileşiklerin bilinmesi şartıyla bu kalibrasyon modeli çok kompleks karışımların analizine olanak tanır,

b) Yöntemin dezavantajları; i) kalibrasyon için kullanılan dalga boyunun seçimi zor ve zaman alıcı olabilir, ii) dalga boylarının sayısı kalibrasyon numunelerinin sayısı ile sınırlanan modeller kullanılır, iii) genellikle çok sayıda numune kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, çünkü katsayı matrisinin hesaplanmasında matris determinant değerinin "0" çıkması sonsuz çözüm gerektirmesi nedeniyle sakınca doğurur, bunu aşmak için de kalibrasyon setindeki seri sayısını artırmak gerekir, iv) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması ve bir ön kalibrasyon vasıtasıyla ölçüm son derece zor ve sıkıntılıdır.

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

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden birisi olan temel bileşen regresyon yöntemi, konsantrasyon seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir.

Burada açıklanan PCR algoritması Martens ve Naes (1984) tarafından verilen şemaya göre açıklanmaktadır. PCR kalibrasyonu kurulmasındaki basamaklar aşağıdaki biçimdedir:

Analiz edilecek maddenin konsantrasyon ve absorbans verilerinin varyans-kovaryansı bulunur. Varyans-kovaryans saçılma matrisinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A \quad (19)$$

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

$$b = P \cdot q \quad (20)$$

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

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_0 \quad (21)$$

Burada D diagonal matriks olup herbir öz değerin tersine eşittir. t_1 sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir :

$$t_1 = A_0 \cdot P_1 \quad (22)$$

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

$$a = C_0 - A_0^T \cdot b \quad (23)$$

Herbir aşamada elde edilen değerler 16 no'lu denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

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

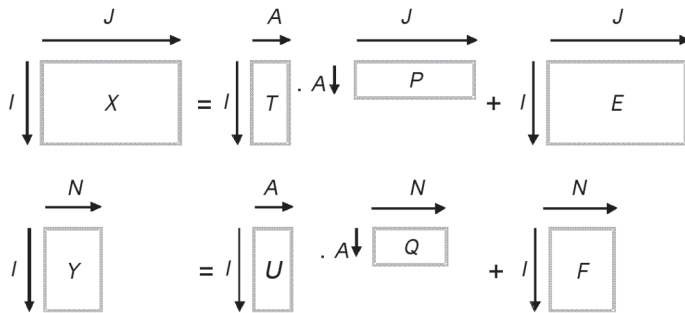
b) Yöntemin dezavantajları; i) hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır, ii) yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için), iii) kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere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

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

Kemometrik kalibrasyonlardan en yagın ve popöler olanı PLS yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonal-

ized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-orthogonalized PLS algorithm) gibi şekilleri vardır. Ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS algoritması arasındaki temel fark X den faktörlerin çıkarılmasındadır. PLS kalibrasyonunun PLS1 ve PLS2 şeklinde iki tipi söz konusudur. PLS1 de bir bileşik model içerisinde iken; PLS2 de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir.

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



Şekil 2
PLS2 kalibrasyonu

$$\begin{aligned}
 X &= T P^T + E \\
 Y &= U Q^T + F \\
 Y &= X B + F \\
 B &= W (P^T W)^{-1} Q^T
 \end{aligned}
 \tag{24}$$

Burada X= bağımlı değişken (örneğin absorban verileri), Y = bağımsız değişken (örneğin konsantrasyon), T = X için sayı matrisi, U= Y için sayı matrisi, P = X için yük matrisi Q= Y için yük matrisi, E = X-kalıntı matrisi, F=Y-kalıntı matrisi, W= max(kovaryans(E, F))

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorban değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanır .

a) *Yöntemin avantajları*; i) PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır, ii) tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon

işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir, *iii*) kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik konsantrasyonlarını yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır, *iv*) yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir, *v*) bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, *vi*) bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS'nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR'den daha iyi sonuçlar verir.

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

3.5. Kalibrasyon (konsantrasyon) setinin tasarımı

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

3.6. Çapraz validasyon işlemi (Cross-validation procedure)

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (standard error of calibration → SEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (standard er-

ror of prediction → SEP) gibi parametreler kullanılmaktadır. SEC ve SEP değerlerinin minumum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır. Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen konsantrasyon değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı (r), doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır¹⁻²².

PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemi (cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için karaların tahmin (tayin) hatalarının toplamı (prediction error sum of squares → PRESS) hesaplanır. Optimal faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler minumun PRESS değeri ve F-istatistidir¹⁻²².

4. Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulamaları

4.1. Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları

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

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

4.2. Çoklu bileşen analizi (Multicomponent analysis)

Son yıllarda, çoklu bileşen analizi, analitik kimyacılar için en önemli konulardan birisi oldu. Bu bağlamda, aynı anda miktar tayinlerinin klinik kimyası, ilaç analizi, kirlilik kontrolü vb. gibi değişik disiplinler ile ilgili aktif bileşikler içeren karışımların kantitatif analizi için oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonların absorpsiyon sinyallerine uygulanmasıyla çok bileşen analizlerinden elde edilen sonuçların doğruluğu, yöntem ve kullanılan analitik sinyallere bağlıdır²⁵.

Çoklu bileşen analizi için kombine farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin miktar tayinlerine kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulaması, bu alanda uğraşan araştırmacılar için ilgi odağı olmuştur. Örneğin üç farklı kombine farmasötik preparatta asetilsalisilik asit (ASA), asetaminofen (ASE) ve kafeini (KAF) hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın ve aynı anda kantitatif analizleri spektrofotometrik çoklu doğrusal regresyon ve PLS kalibrasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kalibrasyonu kurulmasında ASA, ASE ve KAF içeren konsantrasyon matrisi, sırasıyla 4-12 µg/mL, 2.0-10 µg/mL ve 0.9-6.0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Çalışmada son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir²⁶.

İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda, çoklu bileşen analizinde kemometrik kalibrasyon ya da çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, doğrudan absorbans sinyallerine uygulandığı gibi türev absorbans sinyallerine de uygulanabilir. PLS kalibrasyon yönteminin türev yöntemiyle kombine kullanımıyla üç bileşenli bir karışım için iki farklı deneysel tasarım test edilmiş ve sonuçlar tartışılmıştır. Bu kombine yöntem, ırmak sularındaki bileşiklerin tayinine uygulanmıştır²⁷.

Normal spektrofotometrik absorbans ve türev sinyalleri kullanımına dayanan iki kemometrik yöntemin (çoklu doğrusal regresyon→MULTI3 ve PLS2) performansı, asetilsalisilik asit-kafein-kodein ve asetaminofen-kafein-kodein içeren üçlü karışımların analizleri için test edilmiştir ve yöntemler farmasötik preparatlara uygulanmıştır²⁸.

Kemometrik kalibrasyon yöntemleriyle bazı veteriner preparatlarının analizi için normal ve türev absorbans spektrumları kullanılmıştır. Türev tekniği ile PLS yöntemin kombine kullanımının anlamlı avantajlar sağladığı belirtilmektedir²⁹. Bu sonuç, zemin çizgisi etkisinin ilişkili olduğu ölçüm hataları olarak karakterize edilen ve hata kovaryans matrislerindeki kovaryans işlemiyle indirgenmesi ve türevin filtre etkisinin bazı etkili gürültüyü kısmen gideren öngörüsüyle açıklanabilir. Bu yaklaşım bir dereceye kadar başarılı olurken, türevin filtre etkisi, hata kovaryans matrisinin az da olsa işlemler ile diagonalize olabilmeleri nedeniyle optimal değerlerin elde edildiği düşünülebilir.

Dört kemometrik kalibrasyon tekniği (CLS, ILS, PCR ve PLS) bir farmasötik preparattaki amilorid ve hidroklorotiyazitin, absorpsiyon ve birinci türev spektrofotometrik tayinlerine uygulanmıştır³⁰.

Çoklu bileşen analizinde değişik analitik cihazlar ile birlikte kemometrik kalibrasyon yöntemlerin uygulamalarını içeren tipik çalışmaları aşağıda bölümde ve çizelge 1'de sunulmaktadır.

Farklı farmasötik preparatlarda, krom (tris) pikolinat $[\text{Cr}(\text{pic})_3]$ 'ın hızlı, doğrudan ölçümü için bir Fourier transform (FT-IR) spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada, Lambert-Beer yasası ve iki kemometrik kalibrasyon (PLS ve PCR) verilerin işlenmesinde kullanılmışlardır³¹.

Ticari farmasötik preparatta teofilin anhidrit, guafenesin, difenhidramin hidroklorür, metilparaben, propilparaben, sodyum benzoatın miktar tayinleri için PLS1 ve PCR kalibrasyonları uygulanmıştır. Kalibrasyon yöntemleri, 220-270 nm spektral dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 0.4$ nm aralıklar ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan PLS1 ve PCR kalibrasyonları ile yapay ve ticari preparattaki 6 aktif bileşiğin kantitatif analizi yapılmıştır. Kemometrik sonuçlar, geliştirilen HPLC yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır³².

Çok kanallı deteksiyonlu spektrofotometrik verilerin analizine uygulanan, çok değişkenli kalibrasyon kullanarak idrarda iki fluorokinolin (siprofloksasin ve ofloksasin) ve iki nonsteroid antiinflamatuar ilacın (diklofenak ve mefenamik asit) kantitatif analizi gerçekleştiriliyor. Yöntemin esası fluorimetrik sinyallerin birinci ve ikinci türeve verilerinin kullanımına dayanmaktadır³³.

Mebeverin HCl (MB) ve sülprid (SU) kombinasyonundaki bu etken maddelerin analizi için iki yöntem kullanılıyor. Bu yöntemlerden birincisi, spektrum oranları türev yöntemi, ikincisi klasik en küçük kareler (CLS) kalibrasyon yöntemidir. Kemometrik yöntemde iki aktif bileşiği içeren bir konsantrasyon seti 0.1 M HCl içerisinde hazırlanıyor. Konsantrasyon seti için 200-300 nm dalga boyu aralığında, absorpsiyon spektrumları çizdirilmektedir. Konsantrasyon seti verileri ve 200-300 nm aralığında, ölçülen absorbanslar arasındaki elde edilen lineer denklemler sisteminde oluşan kalibrasyon karışımlardaki MB ve SU bileşiklerinin tayini için kullanılmıştır³⁴.

İkili karışımdaki parasetamol (PAR) ve diklofenak (DIK) miktar tayinleri için herhangi bir ayırma işlemi yapmaksızın PLS1 yöntemi uygulanmıştır. Kemometrik kalibrasyon yöntemiyle üç farklı tablet preparatında PAR ve DIK kantitatif analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma için HPLC yöntemi kullanılmıştır³⁵.

Farmasötik numunelerdeki Fe(II) ve Fe(III) tayinleri için 1,10-fenantrolin and tiyosiyanat karışımı kullanılarak spektral olarak PC-ANN, PCR

ve PLS kalibrasyon yöntemleri geliştirmişlerdir. PC-ANN ve PLS ile elde edilen sonuçların kesinliği kısmen PCR nin sonuçlarınınkinden daha iyi olduğu bulunmuştur³⁶.

Bir farmasötik formülasyondaki atenolol, amilorid ve klortalidonun miktar tayinleri için üç yöntem geliştiriliyor. Bu yöntemler, HPLC, PCR ve PLS-1 dir. Kromatografik ayırım, ters faz C 18 kolon kullanılarak, asetonitril, 5 mM heptansülfonik asitinin sodyum tuzundan (20:80, v/v, pH=4.4) oluşan hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. Bu etken maddelerin analizi için 240-290 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda= 0.2$ nm aralıklar ile ölçülen absorbans değerlerinin ölçümüne dayanan, PCR ve PLS1 kemometrik yöntemleri uygulanmıştır³⁷.

Perfenazin (PER), amitriptilin HCl (AMI) ve imipramin HCl (IMP) içeren ikili ve üçlü tabletlerde içerik tek düzeligi ve çözünme testleri için çifte bölücü-spektrum oranları türev spektrumu (ÇBSOT) ve PLS yöntemleri geliştirilmiştir. ÇBSOT yönteminin sonuçlar PLS yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile istatistik olarak karşılaştırılmıştır³⁸.

Maltol (MAL), etil maltol (EMA), vanilin (VAN) and etil vanilin (EVA) maddeleri, gıda katkı maddeleridir. Bu maddelerin absorpsiyon spektrumlarının girişim yapması nedeniyle bir ön ayırma işlemi yapmaksızın karışımlardan onların klasik yöntemlerle tek tek miktar tayinleri oldukça zordur. Kemometrik yöntemler bu gıda katkı maddelerinin hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın kantitatif analizlerine uygulanmıştır. Bu MAL, EMA, VAN ve EVA bileşiklerin değişik derişimlerde içeren işlem setinin 200-350 nm de absorpsiyonlarından oluşan absobans veriler dizisi kullanılarak CLS, PCR, PLS ve yapay sinir ağları (artificial neural networks →ANNs) gibi yedi farklı kemometrik yöntem hesaplanmıştır. Bu kemometrik yöntemler, dört bileşigi içeren karışımların analiziyle test edilmiştir ve ticari gıda numunelerine başarıyla uygulanmıştır³⁹.

Farklı kemometrik yöntemler (CLS, PCR, PLS1) UV spektral veriler (OD) ve birinci türevleri (1D), amilorid hidroklorür, atenolol hidroklorotiyazid ve timol maleatın karışımlarını içeren numunelerinin aynı anda analizi için uygulanmıştır. Yöntemlerin performansları ANOVA testleri vasıtasıyla karşılaştırılmıştır. OD-PCR,OD-PLS1, 1D-PLS ve 1D-PLS1, tekrar edilebilir ve istatistiksel olarak benzer sonuçlar verdikleri ortaya konmuştur. Yöntemler valide edildikten sonra gerçek numunelere (ticari tablet preparatlarına) uygulanmıştır⁴⁰.

İkili karışımdaki atenolol (ATE) ve klortalidonun (KTD) miktar tayinleri, UV spektrum verilerinin kullanımına dayanan PLS1 yöntemiyle başarılmıştır. PLS1 kalibrasyonları ATE için 255-300 nm dalga boyu aralığında ve KTD için 253-268 nm dalga boyu aralığında absorbans ölçümleri kullanılarak oluşturulmuştur. Yapay karışımlarda, geri kazanım değerleri ATE ve KTD için sırasıyla 100.3 ± 1.0 ve 100.7 ± 0.7 olarak bulunmuştur. Daha sonra yöntem ATE ve CTD içeren tablet preparatlarının tek düzelik ve çözünme testlerine uygulanmıştır⁴¹.

Saf ve dozaj formlarda glafenin kantitatif analizi için spektrofotometrik kararlılık gösterme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada, spektrum oranları türev ve kemometrik yöntemler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır⁴².

Yukarıdaki çalışmaların dışında CLS, ILS, PCR ve PLS kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin, çeşitli analitik cihazlardan elde edilen verilerin kullanımına dayalı olarak, organik bileşiklerin analizinde, gıda analizinde, çevre analizindeki uygulamalarına ait özgün çalışmalar, aşağıdaki alt başlıklar ve karşılık gelen çizelgelerde sunulmaktadır.

4.3. Organik bileşiklerin kantitatif analizi

4.3. 1. Farmasötik analizdeki uygulamalar

Farmasötik preparatlar, sabit matriks bileşimi ile nisbeten yüksek seviyede bir, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren ticari formülasyonlardır. Farmasötik preparatların kantitatif analizinde CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri artan yoğunlukta kullanılmaktadır. Yardımcı maddelerin varlığında girişim yapan bileşikler içeren kombine farmasötik preparatların analizi, hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın, klasik analitik yöntemlerle mümkün değil iken kemometrik yöntemlerle çözümü son derece basit bir işlemdir. Bu nedenle kemometrik yöntemler, farmasötik numunelerin analizi için potansiyel araçlardır. Kemometrik yöntemler, farmasötiklerin kararlılık (stability) ve bozunma ürünlerinin miktar tayinlerinde de kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda iki veya daha fazla etkin maddeyi içeren tabletlerin çözünme hızı tayinlerinde kemometrik yöntemlerin başarıyla uygulandığı gözlenmiştir. Kemometrik yöntemlerin bazı farmasötik ve veteriner preparatların analizindeki uygulamaları çizelge 1 de verilmektedir.

Çizelge 1**Farmasötik ve veteriner preparatlarındaki bileşiklerin kantitatif analizi**

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Propranolol-dipiridamol-amilorid	Üç farklı tablet formülasyonunda etkin maddelerin aynı anda miktar tayinleri için modifiye paralel faktör analizi algoritması geliştirilmiştir.	43
Dopamin-askorbik asit	Dopamin-askorbik asit karışımının kantitatif analizi için doğrusal tarama voltametrik verilerin kullanımına dayanan CLS, PCR, PLS ve ortogonal sinyal doğrulama-PLS yöntemleri geliştirilmiştir. Dopamin ve askorbik asit bileşikleri için doğrusal çalışma olarak sırasıyla 3-350 ppm ve 5-350 olarak verilmektedir.	44
Fenilefrin-difenhidramin-nafazolin-metilparaben	Burun damlasında biri yardımcı madde olmak üzere 4 bileşiğin analizi için PLS1 ve bir melez kemometrik yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada başarılı sonuçlar elde edilmiştir.	45
Norfloksasin-tinidazol ve Norfloksasin-eritromisin	İki farklı antibakteriyel karışımının spektral kantitatif analizi için kemometrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada CLS ve PCR kalibrasyon yöntemleri uygulanmıştır. Çalışmada diğer geliştirilen analitik yöntemler birinci dereceden türev ve kolorimetrik yöntemlerdir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılıyor. F- ve t-test sonuçlarından anlamlı bir fark olmadığı belirtilmektedir.	46
Guafenesin-dekstrometorfan HBr-sodyum benzoat-fenilefrin HCl-klorfeniramin maleat-butylparaben (kar1) ve Guafenesin-dekstrometorfan HBr-sodyum benzoat-efedrin HCl -difenhidramin HCl (kar2)	İki farklı çok bileşikli kombinasyon, Guafenesin-dekstrometorfan HBr-sodyum benzoat-fenilefrin HCl-klorfeniramin maleat-butylparaben karışımındaki (kar1) ve Guafenesin-dekstrometorfan HBr-sodyum benzoat-efedrin HCl-difenhidramin HCl karışımındaki (kar2) etken maddelerin kantitatif analizi için HPLC ve kemometrik yöntemler geliştiriliyor. Spektral olarak kemometrik yöntemler (PCR ve PLS1), kar1 and kar2 için 210-240 ve 210-224 nm dalga boyu aralıklarında absorbans ölçümleri kullanılarak geliştirilmiştir. Etkin maddelerin kemometrik analizi hiç bir ayırma işlemi gerektirmeksizin yapılmıştır	47

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Asetik asit-monokloroasetik asit-trikloroasetik asitin	Karışımlardaki asetik asit, monokloroasetik asit ve trikloroasetik asitin aynı anda miktar tayinleri için ortogonal sinyal düzeltme (OSD) işlemi kullanan PLS kalibrasyonu geliştirilmiştir. Kalibrasyon modeli, üç asitin 16 değişik karışımını içeren setin kondüktometrik titrasyonları kullanılarak oluşturulmuştur. Çalışmada OSD-PLS sonuçlarının klasik PLS yaklaşımından daha iyi olduğu bulunmuştur.	48
Amoksisilin-klavulanik asit	Amoksisilin and klavulanik asit florimetrik miktar tayinleri PLS kalibrasyon ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yöntem, Clavucid, Augmentin, Pangamox, Eupeclanic ve Clamoxyl gibi ticari farmasötik preparatların analizine başarıyla uygulanmıştır	49
Sulfadiazin-sulfadimidin-sulfametoksazol-sulfanilamid-trimetoprim	Tabletlerdeki sulfadiazin, sulfadimidin, sulfametoksazol, sulfanilamid ve trimetoprim karışımlarının kantitatif analizleri için karşılaştırmalı olarak CLS, PCR ve PLS kalibrasyon modelleri geliştirilmiştir. Ortogonal konsantrasyon set tasarımıyla bileşiklerden hazırlanan ilaç karışımlarının pH = 9.9 da sulu etanolik çözeltilerini içeren numunelerin bir seti için 200-350 nm dalga boyu aralığında UV-spektrunları elde edilmiştir ve kalibrasyonlar absorpsiyon ölçümlerine dayalı olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada karışımların hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın analizi için kemometrik modellemeye ihtiyaç gösteren ilaçların UV spektrumlarının son derece girişim yaptıkları belirtilmektedir. Yöntemlerin ilaç maddelerinin analizine uygulandığında CLS yönteminin kısmen zayıf olmasına karşın PCR ve PLS kalibrasyonlarında geri kazanım değerlerinin 100'e yaklaştığı ortaya konmuştur. Kemometrik kalibrasyonlar için ham absorpsiyon verileri ve türev değerleri kullanılmıştır ve tayinlerde başarılı sonuçlar elde edilmiştir	50
Ofloksasin-norfloksasin-siprofloksasin	Ofloksasin, norfloksasin ve siprofloksasinden oluşan üç antibiyotiği içeren karışımda bu etkin ilaçların analizi için doğrusal taramalı sıyırma voltametri (linear sweep stripping voltammetry-LSV) geliştirilmiştir. Bu bileşiklerin voltamogramlarının girişim yapması nedeniyle etkin maddelerin analizi için CLS, PCR ve PLS ve ANN kalibrasyonları önerilmiştir. Voltametrik çalışmada pH=3.78 de olan Britton-Robinson tamponu ve civa elektrot kullanılmıştır. Diğer bir ANN kemometrik yöntemle % 8.1 bağıl tahmini hatayla ve % 101 ortalama geri kazanım ile başarılı kantitatif sonuçlara ulaşılmıştır	51

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Kortikosteroid-deksametazon sodyum-B6 -B12	Farmasötik formülasyonlardaki kortikosteroid deksametazon sodyum, B6 ve B12 vitaminlerini içeren üçlü karışımların kantitatif analizi için spektrofotometrik çok değişkenli kalibrasyon (PLS) yöntemi geliştirilmiştir.	52
Domperidon maleat-sinarizin	Çalışmada ikili karışımında hiç bir ayırma yapmaksızın domperidon maleat (DOM) and sinarizin (SIN) maddelerinin aynı anda miktar tayinleri için türev yöntemi, PLS ve PCR kalibrasyon modelleri geliştirilmiştir. Türev yönteminde DOM and SIN için doğrusal çalışma aralığı ve ortalama % geri kazanım değerleri sırasıyla 2.5-30 µg/mL, 5-25 µg/mL ve 100.06, 99.93 olarak bulunmuştur. Kemometrik analizde, her bir bileşiğin 5-25 µg/mL konsantrasyon aralığında içeren 10 karışımdan oluşan işlem seti PLS ve PCR kalibrasyonlarının hesaplanması için kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemler DOM ve SIN miktar tayinlerine başarıyla uygulanmıştır	53
Oksfendazol-oksiklozanid	Bir veteriner preparatında hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın ve aynı anda oksfendazol (OXF) and oksiklozanid (OXC) bileşiklerinin spektrofotometrik miktar tayinleri için dört kemometrik kalibrasyon (ILS, CLS, PCR ve PLS) yöntemi uygulanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonlar, farklı derişimlerde OXF ve OXC içeren konsantrasyon setinin 285-350 nm dalga boyu aralığında 14 noktadaki absorbans değerlerini ölçümüyle elde edilen verilerin kullanımıyla hesaplanmıştır. Geliştirilen kemometrik yöntemlerle laboratuvarında hazırlanan karışımların ve ticari veteriner formülasyonunun kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir	54
Hidroklorotiyazid-kaptopril	Hidroklorotiyazid(HCT)ve kaptopril(KTP) bileşiklerini içeren bir karışımında bu etkin maddelerin aynı anda miktar tayinleri için spektrofotometrik doğrusal regresyon fonksiyonları ve ILS, CLS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Yöntemler yapay karışımların analiziyle valide edildikten sonra HCT ve KTP bileşiklerini içere farmasötik tabletlerin analizine uygulanmıştır.	55

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Asetaminofen ve kafein	Asetaminofen ve kafein içeren farmasötik preparatlardaki etkin maddelerin analizi için CLS ve PCR kemometrik kalibrasyon yöntemleri uygulanmıştır. Etkin maddelerin 0.1 N HCl içerisinde hazırlanan karışım çözeltilerine karşılık gelen konsantrasyon setinin orijinal spektrumlarında 215-285 nm dalga boyu arasında seçilen 15 dalga boyundaki absorbans ölçümleriyle kalibrasyonlar hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemlerle yapay ve ticari numunelerin analizi başarıyla yapılmıştır. Kemometrik yöntemlerin sonuçları, HPLC yöntemi sonuçlarıyla istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.	56
Silazapril-hidroklorotiyazid	CLS, ILS, PCR ve PLS yöntemleriyle tabletlerdeki silazapril ve hidroklorotiyazid'in aynı anda analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu iki ilacı içeren 0.1 M HCl ve metanol (1:1) de hazırlanan kalibrasyon setinin UV spektrumlarından 222 ve 276 nm dalga boyu aralığında 15 dalga boyu noktasındaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Kemometrik kalibrasyonlar, absorbans ve konsantrasyon verilerin matrisinden hesaplanmıştır. Yöntemler tabletlerin analizine uygulanmıştır.	57
benazepril hidroklorür-hidroklorotiyazid	Farmasötik tabletlerdeki benazepril hidroklorür (BA) ve hidroklorotiyazid (HCT)'in spektral olarak aynı anda miktar tayinleri için üç farklı kemometrik kalibrasyon (CLS, ILS ve PCR) yöntemleri uygulanmıştır. Kemometrik analiz için 0.1 M NaOH içerisinde 0-22 µg/mL HCT and 0-361 µg/mL BA içeren çözeltilerine karşılık gelen konsantrasyon set hazırlanmıştır. Konsantrasyon setinin 220-350 nm dalga boyu aralığındaki spektrumlarda 24 noktada absorbansı ölçülmüştür. CLS, ILS ve PCR kalibrasyonlar konsantrasyon ve absorbans setleri arasındaki ortak lineer ilişkiden hesaplanmıştır.	58
Parasetamol-propifenazon-kafein	Parasetamol (APAP), propifenazon (PP), and kafein (CAF) içeren tabletlerin disolusyonu USP paddle yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Üç kemometrik yöntem (CLS, PCR ve PLS), tabletlerdeki APAP, PP ve CAF bileşiklerinin aynı anda kantitatif analizleri için uygulanmıştır. Aynı kemometrik yöntemler, üç ilacın girişim yapan spektrumları için hiç bir grafik işlem ve hiç bir ayırma işlemi kullanmaksızın tabletlerdeki bu etkin maddelerin aynı anda çözünme testlerine ve tablet tek düzelik testlerine uygulanmıştır.	59

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Klordiazepoksid- klidinyum bromür	Bir ikili karışımdaki klordiazepoksid (KLP) ve klidinyum bromür (KLB) bileşiklerin aynı anda ve hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın spektral olarak miktar tayinleri için PCR, PLS ve ANN kalibrasyonları kullanılmıştır. Çalışmada KLP ve KLB için sırasıyla metanol ve 0.1 M NaOH (60:40, v/v) içerisinde 0-25 µg/mL and 0-30 mg/mL içeren konsantrasyon seti ve bu set için 210-400 nm dalga boyu aralığında ölçülen absorbans değerlerinden oluşan absorbans matrisi kullanılarak kemometrik kalibrasyonlar hesaplanmıştır. Üç kemometrik yöntem başarıyla yapay karışımlara ve farmasötik preparata uygulanmıştır.	60
Hidroklorotiyazid- spironolakton	Hidroklorotiyazid (HCT) ve spironolakton (SP) içeren farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için CLS, ILS, PCR ve PLS kemometrik yöntemleri kullanmışlardır. Kemometrik kalibrasyon yöntemleri, HCT ve SP için hazırlanan konsantrasyon seti ve bu set için orijinal ve birinci türev spektrumlarında 220-290 nm'ler aralığında 15 noktadaki dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Yöntemler farmasötik preparatlara uygulanmıştır.	61
Asetaminofen - Kloroksazon	Kemometrik yöntemler (ILS, PCR ve PLS), asetaminofen ve Kloroksazon içeren farmasötik preparatların kantitatif analizine uygulanmıştır. Kalibrasyon için etken maddelerin 210 -310 nm arasındaki orijinal spektrumlarından 14 dalga boyu seçilmiştir. Matlab 7.0 bilgisayar programı kullanılarak verilerin değerlendirilmeleri yapılmıştır. Geliştirdikleri HPLC yöntemiyle kemometrik hesaplamalarda bulunan verileri karşılaştırmışlardır.	62
Hidroklorotiyazid- losartan potasyum	Hidroklorotiyazid (HCT) ve losartan potasyumu (LST) içeren farmasötik preparat bu etkin maddelerin analizi için CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri multiwavelength photodiode-array dedektör kullanılarak 250, 255, 260, 265, and 270 nm dalga boylarında elde edilen çoklu kromatogram verilerine uygulanmıştır. Kemometrik kalibrasyonalar (HPLC-CLS, HPLC-ILS, HPLC-PCR ve HPLC-PLS) ile elde edilen sonuçlar tek dalga boyundaki ölçümlerine dayalı HPLC sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.	63

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Metamizol-asetaminofen-kafein	Farmasötik preparatlardaki metamizol (MET), asetaminofen (ASE) ve kafein (KAF)'in spektrofotometrik analizi için ILS ve PCA yöntemleri geliştirmişlerdir. Bu etkin maddeleri içeren karışımlardan oluşan konsantrasyon matrisi ve bu matris için 225-285 nm dalga boyu aralığında $\Delta\lambda = 5$ nm aralıklarla 13 noktadaki okunan absorbans değerleri kullanılarak kemometrik kalibrasyonlar oluşturulmuştur. Her iki kalibrasyon yöntemi karşılaştırmalı olarak yapay ve ticari preparatlardaki MET, ASE ve KAF bileşiklerinin analizine başarıyla uygulanmıştır.	64
Acetaminofen- kafein	Bir kombine formülasyondaki asetaminofen ve kafeini içeren analjezik tabletlerin aynı anda analizi için PLS spektrofotometrik yöntemin kullanımı sunulmaktadır.	65
Kodein fosfat, asetilsalisilik asit-kafein	Kodein fosfat, asetilsalisilik asit ve kafeini içeren üçlü karışımın analizi için ILS ve PCR kemometrik yöntemler geliştirilmiştir. Kalibrasyonlar için bu üç etkin maddelerin rastgele derişimlerdeki karışımlarından oluşan konsantrasyon seti hazırlanmıştır. Bu setin 220-290 nm dalga boyu aralığında 15 noktada absorbans ölçüm değerlerinden kalibrasyonlar oluşturulmuştur. Yöntemler yapay ve ticari farmasötik preparatın analizine uygulanmıştır.	66
Trimetoprim-sulfametoksazol	Veteriner preparatlarındaki trimetoprim (TMP) ve sulfametoksazol'un (SMX) kantitatif analizleri YBSK-kemometrik kalibrasyonlarla gerçekleştirilmiştir. TMP ve SMX bileşiklerini içeren konsantrasyon seti için 220, 230, 240, 250 ve 260 nm dalga boylarında elde edilen kromatografik veriler kullanılarak kemometrik kalibrasyonlar oluşturulmuştur. YBSK-CLS, YBSK-PCR ve HPLC yöntemleri yapay karışımların ve ticari veteriner preparatlarının analizine başarıyla uygulanmıştır.	67
Enalapril maleat-hidroklorotiyazid	İki bileşenli bir karışımın analizi için YBSK verilerinin kullanımına dayanan kemometrik kalibrasyonların yöntemleri uygulanmıştır. YBSK sistemindeki photodiode array (PDA) detection sistemi sayesinde 230 (A), 240 (B), 250 (C), 250 (D), 240 (E) dalga boylarında aynı anda kromatogramların kayıtları alınmıştır. Konsantrasyon seti için elde edilen çoklu kromatografik veriler arasında kemometrik kalibrasyonlar hesaplanmıştır. Bu çalışmada enalapril maleat ve hidroklorotiyazid'in kromatografik ayırımında losartan internal standart olarak kullanılmıştır. HPLC-kemometrik kalibrasyon yöntemleri ile başarıyla iki ilacı içeren tabletlerin analizi gerçekleştirilmiştir.	68

Kaynak numarası = K.No

4.3.2. Gıdalardan renk maddelerinin analizi

Kemometrik yöntemlerin gıda ya da içeceklerde, renk maddelerinin analizine artan yoğunlukta uygulandıkları gözlenmektedir. Gıdalarda bulunan renklendiriciler maddeler, özellikle gıdalara çekicilik vermek amacıyla kullanılmaktadır. Eğer bazı renklendiriciler aşırı derecede tüketilirse, sağlık açısından zararlıdırlar. Bu nedenle renk maddelerinin analizi analitik kimya açısından önemlidir. Gıda numunelerinde analizi işleminde bazı maddelerin izolasyonu için ön işlemler kullanılabilir. Genelde renklendirici maddelerin numunelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaları analizi kolaylaştırmaktadır. Gıda yada renklendiricilerin analizinde CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemlerinin bazı tipik uygulamaları çizelge 2 de sunulmaktadır.

Çizelge 2

Kemometrik yöntemlerin gıda analizindeki uygulamaları

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Sunset yellow-tartrazin	Ticari preaparlarda renk maddesi olarak kullanılan sunset yellow (SUN) and tartrazin (TAR)'in 335-575 nm dalga boyu aralığında 0.5 nm intervals aralıklarla 480 noktadaki absorbanlarını sürekli dalgacık dönüşüm katsayıları kullanılarak PCR ve PLS kalibrasyonları kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dalgacık dönüşüm katsayıları x-blok ve konsantrasyon seti y-blok olarak kullanılmıştır. PCR ve PLS Yöntemler ticari preparatların analizine uygulanmıştır.	69
Sunset yellow-tartrazin-allura red	Alkolsüz toz içekte sunset yellow (SUN), tartrazin (TAR) ve allura red (ALL) 'in kantitatif analizi için grafik ve nümerik yöntemler geliştirilmiştir. Nümerik yöntemler olarak CLS ve PCR kalibrasyonları, SUN, TAR ve ALL renk maddeleri için sırasıyla 0-8 µg/mL, 0-8 µg/mL ve 0-8 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan karışım çözeltileri için 375-550 nm dalga boyu aralığında 7 noktada ölçülen absorban değerleri hesaplanmıştır ve yöntem yapay karışımlara ve ticari toz içeceklerin analizine uygulanmıştır.	70
Allura red-sunset yellow-tartrazin-eritrosin-amarant-brilliant	Allura red, sunset yellow, tartrazin, eritrosin, amarant ve brilliant gibi renk maddeleri tek başına ya da ikisini birlikte içeren toz içeceklerdeki bu maddelerin miktar tayinleri için universal kalibrasyon matrisi önerilerek spektral olarak PLS kalibrasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar resmi spektrofotometrik yöntemin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.	71

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Tartrazin-allura red	Tartrazin (TAR) and allura red (ALL) içeren ikili karışımın analizi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve CLS, PCR ve PLS kalibrasyonlarının kombine kullanımıyla analiz edilmiştir. Yöntemin uygulamasında TAR ve ALL içeren konsantrasyon matrisi y-blok ve beş farklı dalga boyunda elde edilen kromatografik veriler x-blok arasındaki matematiksel ilişkiye dayanan kemometrik kalibrasyonlar hesaplanmıştır. Kromatografik ayrımlarda, 1.9 mL/min akış hızında Waters Symmetry (R) C18 kolon (5 µm 4.6 x 250 mm) and 0.2 M asetat tamponu (pH = 5), asetonitril, metanol and bidistile su (55:20:10 v/v) kombinasyonu kullanılmıştır.	72

4.3.3. Biyolojik sıvılardaki uygulamalar

Biyolojik sıvılar, çok kompleks ve düşük konsantrasyon seviyesinde bileşikler ile karakterize edilirler. Genellikle biyolojik sıvıların doğrudan spektrofotometrik analizinde duyarlılık ve seçicilik, klinik amaçlar için düşüktür. Spektral olarak kemometrik yöntemlerin biyolojik sıvıların analizinde kullanımında ekstraksiyon, zenginleştirme, sıvı veya katı faz ekstraksiyonu gibi ön işlemler gereklidir. Bütün bu güçlüklerle rağmen spektral olarak kemometrik yöntemler ile biyolojik sıvıların analizi çalışmaları vardır. Biyolojik sıvıların analizinde HPLC-kemometrik uygulamalarına ait çalışmalarda gözlenmektedir. Kemometrik yöntemlerin biyolojik sıvıların analizindeki tipik çalışmalardan bazıları çizelge 3 de özetlenmiştir.

Çizelge 3

Kemometrik yöntemlerin biyolojik sıvıların analizindeki uygulamalar

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Karbamazepin-fenitoin	Serumda karbamazepi ve fenitoin'in miktar tayinleri spektral olarak PLS1 kalibrasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kemometrik sonuçlar HPLC yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. PLS1 yöntemi sonuçları, HPLC sonuçlarıyla karşılaştırılabilir olduğu belirtilmektedir.	73
Furosemid-triamterene	İdrarda ve farmasötik preparatlarda furosemid ve triamteren'in kantitatif analizi için floresans verilerinin kullanımına dayanan çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri uygulanmıştır.	74

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Klorzoksazon- parasetamol	İnsan serumunda ve tabletlerde klorzoksazon and paracetamol miktar tayinleri için çok değişkenli kalibrasyonların 225, 240, 255, 270 and 285 nm'lerdeki HPLC verilerine uygulamasıyla kurulan HPLC-CLS, HPLC-PCR ve HPLC-PLS kalibrasyonları kullanılmıştır. Bu çalışmada kromatografik ayırım ve tayinler için 0.1 M amonyum karbonate (60:40, v/v) karışımı mobil faz, Waters Symmetry (R) trademark C ₁₈ kolum (5 µm 4.6 x 250 mm) ve 0.8 mL/dak akış hızı kromatografik koşullar olarak verilmektedir.	75
Naproksin-salisilat	İnsan serumunda naproksin (NP) ve salisilatın (SAL) aynı anda miktar tayinleri için florimetrik ölçümlere dayalı olarak iki farklı çok değişkenli kalibrasyon (PLS1 ve NAP (net analyte preprocessing) yöntemlerini kullanmışlardır. İnsan serumlarının NH ₃ ile alkali yapıldıktan sonra floresans spektrumlarını elde etmek için 315 nm uyarma dalga boyu olarak kullanılmıştır. Çalışmada NP ve SAL için sırasıyla konsantrasyon aralıkları 50-200 ng/mL ve 100-300 nm/mL olarak verilmiştir.	76
Karbaril-propoksür- karbofuran	Meyve sularında ve bitki numunelerindeki karbaril (CAB), propoksür (PRO) ve karbofuran (CAF) miktar tayinleri için eş zamanlı floresans yöntemi (synchronous fluorescence method) ile CLS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu üç bileşiğin floresans spektrumları ciddi bir şekilde girişim yaptığı için karışımlardan maddelerin miktar tayinleri olanaklı değildir. CLS ve PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleriyle karışımdaki CAB, PRO ve CAF bileşiklerinin hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın miktar tayinleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.	77

4.3.4. Çevre analizindeki uygulamalar

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin çevre analizindeki uygulamaları, analitik kimya açısından önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle bu yöntemlerin yeraltı sularındaki, bazı kalıntılarda, bitki numunelerinde ve ticari preparatlardaki pestisitlerin analizinde uygulandığı gözlenmektedir. Çalışmalarda analiz için, katı faz ekstraksiyonu kullanılmaktadır. Spektrofotometrik yöntemler ile kemometrik kalibrasyonların kombine olarak pestisitlerin analizine başarıyla uygulanmıştır. Yapılan çalışmalardan özgün olanlarından bazılarının özeti çizelge 4 de verilmektedir.

Çizelge 4
Kemometrik yöntemlerin çevre analizindeki uygulamalar

Bileşikler	Açıklamalar	K.No
Propoksür- isoprokarb-karbaril -karbofuran	Karbamatın dört pestisitinin (propoksür, isoprokarb, karbaril and karbofuran) voltametrik davranışları incelenerek bu bileşiklerin aynı anda miktar tayinleri için bileşiklerin alkali hidrolizleriyle elektroaktif fenol türevlerinin oluşmasıyla anodik voltametrik davranışlarına dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Perklorik asit varlığında diferansiyel voltametrik yöntemin uygulanmasıyla, dört bileşiğin 712, 888, 664 ve 688 mV'da pik potansiyellerinden belirgin voltametrik oksidasyon dalgalarının olduğu bulunmuştur. Her bir bileşik için doğrusal çalışma aralığı 1.0-30 mg/L olarak verilmektedir. Dört bileşiğin voltametrik piklerinin girişim yaptığı gözleniyor. Bu kompleks voltamogramlarının kantitatif analizini kolaylaştırmak için dört farklı kemometrik kalibrasyon yöntemi (CLS,PCR,PLS ve ANN) önerilmiştir. Bu yöntemler farklı su numunelerinde bu dört pestisit miktar tayinleri için uygulanmıştır.	78
Tetrametrin- propoksür- piperonil butoksit	Bir insektisit formülasyonundaki tetrametrin (TRM), propoksür (PPS) and piperonil butoksit (PPR) 'in kantitatif analizi için bu maddelerin hazırlanan konsantrasyon setinin UV-spektrumlarının sürekli dalgacık dönüşüm (SDD) spektrumları kullanılarak PCR ve PLS kalibrasyonları geliştirilmiştir. Kalibrasyonlarda SDD-katsayıları (x-blok) ve konsantrasyon seti (y-blok) olarak kullanılmıştır. SDD ile PCR ve PLS kalibrasyonlarının birlikte kullanımı SDD-PCR ve SDD-PLS kalibrasyonları olarak adlandırılmıştır. Önerilen bütün yöntemler ile yapay karışımların ve ticari insektisit formülasyonunun analizinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir.	79
İprodion- prosimidon- klorotalonil	Absorpsiyon spektrofotometri ve HPLC verilerinin kullanımına dayanan PLS yöntemi, karışımlardaki iprodion (IP), prosimidon (PR) ve klorotalonil (KL) miktar tayinlerine uygulanmıştır. Birinci dereceden türev spektrum verileri PLS yöntemde kullanılmıştır. Yöntemler yeraltı sularında ve kalıntılarda IP, PR ve KL bileşiklerini analizi gerçekleştirilmiştir.	80
Atrazine - degradasyon ürünü desetilatrazin-2- hidroksinin	Yeraltı sularında atrazine ve onun degradasyon ürünü desetilatrazin-2-hidroksinin miktar tayinleri için türev, spektrum oranlar türev ve PLS kalibrasyon yöntemlerini uygulamışlardır. PLS yönteminin daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir.	81

4.4. İnorganik analizlerdeki uygulamalar

Çok değişkenli CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyonlarının inorganik maddelerin analizlerinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Sanayi ürünlerinde, gıda ve ilaç preparatlarında, çevre numunelerinde katyonların, anyonların ve iyon gruplarının miktar tayinleri için uygun bir reaktif ile oluşturdukları kompleks bileşikler üzerinden spektrofotometrik yöntemlerle veya spektrofotometrik ölçümlere dayalı olarak kemometrik kalibrasyonlar kullanılmaktadır. Elementlerin ya da iyonların kantitatif analizi için yapılan bazı tipik çalışmalar çizelge 3 de sunulmaktadır.

Çizelge 5

Kemometrik yöntemlerin inorganik analizdeki uygulamalar

Elementler yada iyonlar	Açıklamalar	K.No
Fe(II) ve Fe(III)	Spektral olarak PLS kalibrasyon yöntemiyle karışımlardaki Fe(II) ve Fe(III) analizi gerçekleştiriliyor. Yöntem, pH= 4.5 de demir iyonlarının ve kromojenik reaktif olarak 1,10-fenantrolin ile 5-sulfosalisilik asit arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Kalibrasyon, Fe(II) ve Fe(III)'ün sırasıyla 0.1-7.0 µg/mL and 0.5-14.0 µg/mL içeren 34 kalibrasyon seti ve 400-600 nm dalga boyu aralığında absorbans ölçümlerinden hesaplanmıştır. PLS yöntemi farmasötik numunelerdeki Fe(II) ve F(III) iyonlarının tayinlerine başarıyla uygulanmıştır.	82
Zn(II) ve Ni(II)	Su numunelerinde çinko ve nikelin kantitatif analizlerinde polarografik olarak CLS, PCR ve PLS kemometrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada polarogram oranlarının birinci ve ikinci türev yöntemleri de uygulanmıştır. Çalışmada 0.13-9.30 µg/ml Zn(II) and 0.20-12.25 µg/ml Ni(II) aralığında mümkün olan kompozisyonlarda 10 karışımdan oluşan kalibrasyon seti, kemometrik kalibrasyonları geliştirmek için kullanılmıştır. polarogramlar ve akımları, 2 mV aralıklarla -920 ile 1052 mV potansiyel aralığında kayıt edilerek bilgisayarda hafızaya alınmıştır. Yöntemler Cd, Co, Ph, Fe, Mn, Ca, Mg, Cu ve Al varlığında uygulanmıştır.	83
Co(II) ve Cr(III)	Sudaki Co(II) ve Cr(III) iyonlarının aynı anda miktar tayinleri için akış-enjeksiyon kemilüminesans (flow-injection chemiluminescence Đ CL) sistem ile kısmi en küçük kareler (PLS) kalibrasyonu geliştirilmiştir. Co(II) and Cr(III)'ün CL şiddeti, reksiyon ortamının farklı pH'larında ölçülerek kayıt edilmiştir ve elde edilen verilere PLS algoritması uygulanmıştır. Çalışmadaki konsantrasyon aralığı Co(II) için 2×10^{-7} - 8×10^{-10} ve Cr(III) için 2×10^{-6} - 4×10^{-9} g/mL olarak verilmektedir	84

Elementler yada iyonlar	Açıklamalar	K.No
Uranyum ve toryum	Uranyum (UR) ve toryumun (TO) aynı anda miktar tayinleri için pH= 3 de UR ve TO ile Arsenazo III'ün kompleks oluşumuna dayanan bir spektrofotometrik yöntem ile PLS kalibrasyon geliştirilmiştir. Kalibrasyon, UR ve TO'nun sırasıyla 0.10-21.00 ve 0.25-18.50 µg/mL konsantrasyon aralığında 25 farklı karışımından oluşan konsantrasyon matrisi ile 600-760 nm dalga boyu aralığında ölçülen absorbans matrisi arasındaki matematiksel ilişkiye dayanmaktadır. Yöntem, yapay ve gerçek numunelerden UR ve TO'un miktar tayinlerine uygulanmıştır.	85
İyodat and periyodat	Sudaki iyodat ve periyodatın aynı anda miktar tayinleri için tek değişkenli ve çok değişkenli kalibrasyonlar uygulanmıştır. Bu çalışmada spektrofotometrik yöntem, sülfürik asit ortamında periyodat ve iyodat ile pirogallol kırmızısının reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon spektrofotometrik olarak 470 nm de pirogallol kırmızısının absorbansındaki artışın ölçümüyle gözlenmiştir. Kalibrasyon eğrileri, iyodat ve periyodat için sırasıyla 0.1-12 and 0.1-14 µg/mL olarak verilmektedir. PLS ve OSD-PLS için kalibrasyon matrisi 35 karışım ile tasarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.	86

5. Sonuçlar

Bu çalışma kapsamından da görüldüğü gibi analitik çalışmalarda iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren kompleks karışımların analizinde CLS, ILS, PCR ve PLS gibi kemometrik kalibrasyonlar son derece başarılı sonuçlar vermektedir. Dolayısıyla çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerine, analitik kimyacıların ve komşu branşlardaki meslektaşlarımızın ilgisi artırmıştır. Diğer taraftan kemometrik kalibrasyonların bütün analitik cihazlardan elde edilen çok değişkenli verilere uygulanabilmesi, yöntemlerin esnek ve çok yönlü kullanım özelliklerini ortaya koymaktadır. Bütün bunlara rağmen, yöntemlerin teorik prensipleri, algoritmaları ve analitik uygulamaları hakkında Türkçe kitap ve kaynakların yok denecek kadar az olması bakımından bu çalışma başlangıç olacağına inanılarak yazılmıştır.

Summary

Chemometrics: Multivariate Calibration Methods

Chemometrics in analytical chemistry is the discipline that uses statistics and applied mathematics together with computer to obtain maximum chemical information from multivariate analytical data. Some

specific areas of chemometrics are that experimental design, pattern recognition, multivariate calibration, statistical methods and signal processing methods. This review focuses mainly on the general principles and applications of chemometric calibrations or multivariate calibrations in analytical chemistry. Multivariate calibrations are obtained by applying chemometric algorithms to the concentration set and its corresponding multivariate measurements. In chemometrics, various mathematical algorithms for the multivariate calibrations have been used or proposed. In this context, mathematical algorithms for classical least-squares (CLS), inverse least-squares (ILS), principal component regression (PLS) and partial least-squares (PLS), which are very popular, were briefly explained within this write-up. In the following steps, their typical applications in the previous published articles were scanned and presented.

Keywords: Chemometrics; CLS; ILS; PCR; PLS; Multicomponent analysis

Özet

Kemometri: Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri

Analitik kimyada kemometri, çok değişkenli analitik verilerden maksimum kimyasal bilgi elde edebilmek için istatistik ve uygulamalı matematik ile birlikte bilgisayarın kullanıldığı bir disiplindir. Kemometrinin özel alanlarından bazıları; deneysel tasarım, yapı tanıma, çok değişkenli kalibrasyon, istatistiksel yöntemler ve sinyal işleme yöntemleri. Bu çalışma temel olarak, kemometrik kalibrasyonların yada çok değişkenli kalibrasyonların genel prensipleri ve analitik kimyadaki özgün uygulamaları üzerine odaklanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonlar, kemometrik algoritmaların derişim seti ve karşılık gelen çok değişkenli ölçüm verilerine uygulanmasıyla elde edilirler. Kemometride, çok değişkenli kalibrasyonlar için çeşitli matematiksel algoritmalar kullanılmaktadır yada önerilmektedir. Bu bağlamda, bunlardan yaygın olarak kullanılan klasik en küçük kareler (classical least-squares→ CLS), ters en küçük kareler (inverse least-squares → ILS), temel bileşen regresyon (principal component regression→PCR) ve kısmi en küçük kareler (partial least-squares→ PLS) bu çalışmanın içinde kısaca açıklanmıştır. İzleyen basamaklarda, bu kalibrasyon yöntemlerinin analitik kimyadaki uygulamalarının yakın geçmişteki literatür taraması yapılarak sunulmuştur.

Anahtar kelime: Kemometri; CLS; ILS; PCR; PLS; Çoklu bileşen analizi

KAYNAKLAR

1. Massart, D. L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke J., Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A, Amsterdam, Elsevier (1997)
2. Vandeginste, B.M.G., Massart, D.L., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke J., Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part B, Amsterdam, Elsevier (1998)
3. Otto, M., Chemometrics: Statistics and Computer Applications in Analytical Chemistry, Weinheim, Wiley-VCH (1998)
4. Beebe, K.R., Pell, R.J., Seasholtz, M.B., Chemometrics: a Practical Guide, New York, Wiley (1998)
5. Kramer, R., Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis, New York, Marcel Dekker (1998)
6. Kowalski, B.R. (Editor), Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry, Dordrecht, Reidel, (1984)
7. Massart, D.L., Brereton, R.G., Dessy, R.E., Hopke, P.K., Spiegelman, C.H., Wegscheider, W. (Editors), Chemometrics Tutorials, Amsterdam, Elsevier (1990)
8. Brereton, R.G., Scott, D.R., Massart, D.L., Dessy, R.E., Hopke, P.K., Spiegelman, C.H., Wegscheider, W. (Editors), Chemometrics Tutorials II, Amsterdam, Elsevier (1992)
9. Meloun, M., Militky, J., Forina, M., Chemometrics for Analytical Chemistry, Vol. 1, Chichester, Ellis Horwood (1992)
10. Cornell, J.A., Experiments with Mixtures: Design, Models, and the Analysis of Mixture Data, New York, Wiley, 2nd edn (1990)
11. Brereton, R.G. (Editor), Multivariate Pattern Recognition in Chemometrics, Illustrated by Case Studies, Amsterdam, Elsevier (1992).
12. Joliffe, I.T., Principal Components Analysis, New York, Springer-Verlag (1987)
13. Malinowski, E.R., Factor Analysis in Chemistry, New York, Wiley, 2nd edn (1991)
14. Martens, H., Næs, T., Multivariate Calibration, Chichester, Wiley (1989)
15. Miller, J.N., Miller, J., Statistics for Analytical Chemistry, Hemel Hempstead, Prentice-Hall (1993)
16. Caulett, R., Boddy, R., Statistics for Analytical Chemists, London, Chapman and Hall (1983)
17. Gans, P., Data Fitting in the Chemical Sciences: by the Method of Least Squares, Chichester, Wiley (1992)
18. Jansson, P.A. (Editor), Deconvolution: with Applications in Spectroscopy, New York, Academic Press (1984)
19. Martens, H., Martens, M., Multivariate Analysis of Quality, Chichester, Wiley (2000)
20. Brereton, R.G., Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, UK, University of Bristol, John Wiley & Sons Ltd (2003)
21. Wold, S., Esbensen K., Geladi, P., Chemom. Intell. Lab. Syst., 2, 37 (1987)
22. Geladi, P., Kowalski, B.R., Anal. Chim. Acta, 185, 1 (1986)
23. Massart, D.L., Brereton, R.G., Dessy, R.E., Hopke, P.K., Spiegelman, C.H., Wegscheider, W. (Editors), Chemometrics Tutorials, Amsterdam, Elsevier (1990)
24. Brereton, R.G., Scott, D.R., Massart, D.L., Dessy, R.E., Hopke, P.K., Spiegelman, C.H., Wegscheider, W. (Editors), Chemometrics Tutorials II, Amsterdam, Elsevier (1992)
25. Bosch Ojeda, C., Sanchez Rojas, F., Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry, Analytica Chimica Acta, 518, 1 (2004)

26. Bautista, R.D., Aberásturi F.J., Jiménez A.I., Jiménez F., Simultaneous spectrophotometric determination of drugs in pharmaceutical preparations using multiple linear regression and partial least-squares regression, calibration, calibration and prediction methods, *Talanta*, 43, 2107 (1996)
27. Diaz, T.G., Valenzuela, M.I.A., Salinas, F., Multicomponent determination of the pesticide naptalam and its metabolites in river water, by applying partial least-squares calibration to the derivative spectrophotometric signals, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350, 692 (1994)
28. Bautista, R.D., Jiménez, A.I., Jiménez, F., Arias, J.J., Simultaneous determination of drugs in concentration ratios above 40:1 by application of multivariate calibration to absorbance and derivative spectrophotometric signals, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357, 449 (1997)
29. Hassouna, M.E.M., Least squares versus derivative spectrophotometric methods : determination of veterinary sulfa drugs, *Egypt. J. Chem.* 42, 375 (1999)
30. Dinc, E., Ustundag, O., Chemometric resolution of a mixture containing hydrochlorothiazide and amiloride by absorption and derivative spectrophotometry, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 29 (1-2), 371 (2002)
31. Bunaciu, A., Aboul Enein, H., Fleschin, Ş., FT-IR spectrophotometric analysis of chromium (tris) picolinate and its pharmaceutical formulations, *Analytical Letters*, 39, (7), 1401 (2006)
32. El-Gindy, A., Emara, S., Mostafa, A., Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2), 421, (2006)
33. Espinosa-Mansilla, A., Muñoz De La Peña, A., Cañada-Cañada, F., González Gómez, D., *Analytical Biochemistry*, 347 (2) 275, (2005)
34. Zayed, S.I.M., Simultaneous determination of mebeverine hydrochloride and sulpiride using the first derivatives of ratio spectra and chemometric methods, *Analytical Sciences*, 21(8), 985-989 (2005)
35. Castellano, P.M., Vignaduzzo, S.E., Maggio, R.M., Kaufman, T.S., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (7) 1711, (2005)
36. Zarei, K., Atabati, M., Kazemi, L., Simultaneous determination of Fe(II) and Fe(III) in pharmaceutical formulations with chromogenic mixed reagent by using principal component artificial neural network and multivariate calibration, *IL Farmaco*, 60(1), 37 (2005)
37. El-Gindy, A., Emara, S., Mostafa, A., HPLC and chemometric-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of atenolol, amiloride hydrochloride and chlorthalidone, *Farmaco*, 60(3), 269 (2005)
38. Markopoulou, C.K., Malliou, E.T., Koundourellis, J.E., Application of two chemometric methods for the determination of imipramine, amitriptyline and perphenazine in content uniformity and drug dissolution studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 249 (2005)
39. Ni, Y., Zhang, G., Kokot, S., Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks, *Food Chemistry*, 89(13), 465 (2005)
40. Ferraro, M.C.F. , Castellano, P.M. , 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 (2) 305 (2004)
41. Ferraro, M.C.F. , Castellano, P.M. , Kaufman, T.S., Chemometrics-assisted simultane-

- ous determination of atenolol and chlorthalidone in synthetic binary mixtures and pharmaceutical dosage forms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 7, 1159 (2003)
42. El-Ragehy, N.A., Abbas, S.S., 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 (1), 155 (2002)
 43. Cao, Y.Z., Mo, C.Y., Long, J.G., Chen, H., Wu, H.L., Yu, R.Q., Spectrofluorometric resolution of closely overlapping drug mixtures using chemometrics methods, *Analytical Sciences*, 18 (3), 333 (2002)
 44. Rouhollahi, A., Rajabzadeh, R., Ghasemi, J., Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid by linear sweep voltammetry along with chemometrics using a glassy carbon electrode, *Microchimica Acta*, 157 (3-4), 139 (2007)
 45. Goicoechea, H.C., Olivieri, A.C., Chemometric assisted simultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples, *Analytica Chimica Acta*, 453 (2), 25, 289 (2002)
 46. Mohamed AEMI, Abdelmageed OH, Refaat IH, Determination of two antibacterial binary mixtures by chemometrics-assisted spectrophotometry, *J. AOAC International* 90 (1), 128 (2007)
 47. El-Gindy, A., Emara, S., Mesbah, M.K., Hadad, G.M., New validated methods for the simultaneous determination of two multicomponent mixtures containing guaiphenesin in syrup by HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy, *Analytical Letters*, 39 (14), 2699 (2006)
 48. Ghorbani, R., Ghasemi, J., Abdollahi, B., Conductometric simultaneous determination of acetic acid, monochloroacetic acid and trichloroacetic acid sin orthogonal signal correction-partial least squares, *Journal of Hazardous Materials* 131 (1-3), 13 (2006)
 49. Munoz de la Pena, A., Acedo-Valenzuela, M.I., Espinosa-Mansilla, A., Sanchez-Maque-da, R., Stopped- flow fluorimetric determination of amoxycillin and clavulanic acid by partial least-squares multivariate calibration, *Talanta* 56, 635 (2002)
 50. Ni, Y.N., Qi, Z.B., Kokot, S., Simultaneous ultraviolet-spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 82 (1-2) 241 (2006)
 51. Ni Y.N., Wang, Y.R., Kokot, S., Simultaneous determination of three fluoroquinolones by linear sweep stripping voltammetry with the aid of chemometrics, *Talanta*, 69 (1), 216 (2006)
 52. Nepote, A.J., Damiani, P.C., Olivieri, A.C., Chemometrics assisted spectroscopic determination of vitamin B6, vitamin B12 and dexamethasone in injectables, *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 31 (4), 621 (2003)
 53. Salem, M.Y., El-Zanfaly, E.S., El-Tarras, M.F., Simultaneous determination of domperidone and cinnarizine in a binary mixture using derivative spectrophotometry, partial least squares and principle component regression calibration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375 (2), 211, (2003)
 54. Dinc, E., Kanbur, M., Spectrophotometric multicomponent resolution of a veterinary formulation containing oxfendazole and oxclozanide by multivariate calibration-prediction techniques, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (3-4), 779 (2002)
 55. Üstundag, Ö., Dinç, E., Simultaneous resolution of a binary mixture of captopril and hydrochlorothiazide in tablets by bivariate and multivariate spectral calibrations, *Pharmazie* 58 (9), 623 (2003)
 56. 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)
57. Dinç, E., Baleanu, D., Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 30 (3), 715 (2002)
58. Dinç, E., Spectral analysis of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by three chemometric techniques, *Analytical Letters*, 35 (6), 1021, (2002)
59. Dinç, E., Serin, C., Tugcu-Demiroz, F., Doganay, T., Dissolution and assaying of multi-component tablets by chemometric methods using computer-aided spectrophotometer, *International Journal of Pharmaceutics*, 250 (2), 339 (2003)
60. Dinç, E., Dermis, S., Baleanu, D., Simultaneous spectrophotometric determination of chlorthalidone and clidinium bromide in sugar coated tablets by partial least squares, principal component regression and artificial neural network, *Revista de Chimie*, 57 (3), 229 (2006)
61. Dinç, E., Üstündağ, Ö., Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spironolactone in tablets by chemometric analysis methods, *Il Farmaco* 58, 1151 (2003)
62. Dinç, E., Özdemir, A., Onur, F., Baleanu, D., Aksoy, H., Yücesoy, C., Spectrophotometric determination of acetaminophen and chlorzoxazone in tablets by multivariate calibration techniques, *Rev de Chim.* 57, 368 (2006)
63. Dinç, E., Ustundag, O., Application of multivariate calibration techniques to HPLC data for quantitative analysis of a binary mixture of hydrochlorothiazide and losartan in tablets, *Chromatographia* 61 (5-6), 237 (2005)
64. Dinç, E., Baleanu, D., Onur, F., Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by chemometric techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 949 (2001)
65. Abdürrezzak, B., Alper, M.A., Gönül K.K., Simultaneous determination of acetaminophen and caffeine in tablet preparations by partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration, *Talanta*, 39(8), 977 (1992)
66. Dinç, E., Baleanu, D., Onur, F., Simultaneous spectrophotometric analysis of codeine phosphate, acetylsalicylic acid, and caffeine in tablets by inverse least-squares and principal component regression techniques, *Analytical Letters*, 35 (3), 545 (2002)
67. Dinç, E., Bilgili, A., Hanedan, B., Simultaneous determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in veterinary formulations by chromatographic multivariate methods, *Pharmazie* 62 (3), 179 (2007)
68. Dinç, E., Ustundag, O., Ozdemir, A., Baleanu, D., A new application of chemometric techniques to HPLC data for the simultaneous analysis of a two-component mixture, *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28 (14), 2179 (2005)
69. Dinç, E., Baleanu, D., Ustundag, O., Tas, K., Chemometric calibration based on the wavelet transform for the quantitative resolution of two-colorant mixtures, *Revue Roumaine De Chimie*, 50 (4), 283 (2005)
70. 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 (3), 579 (2002)
71. Pedro Luis López-de-Alba, Katarzyna Wróbel-Kaczmarczyk, Kazimierz Wróbel, Leticia López-Martinez, Judith Amador Hernández, Spectrophotometric determination of allura red (R40) in soft drink powder using the universal calibration matrix for partial least squares multivariate method, *Anal. Chem. Acta*, 330, 19 (1996)
72. Dinç, E., Aktas, A.H., Baleanu, D., Ustundag, O., Simultaneous determination of tart-

- razine and allura red in commercial preparation by chemometric HPLC method, *Journal of food and drug analysis*, 14 (3), 284 (2006)
73. Rezaei, Z., Hemmateenejad, B., Khabnadideh, S., Gorgin, M., Simultaneous spectrophotometric determination of carbamazepine and phenytoin in serum by PLS regression and comparison with HPLC. *Talanta*, 65, 21 (2005)
74. Luis, M.L., Fraga, J.M.G., Jiménez, A.I., Jiménez, F., Hernández, O., Arias, J.J., Application of PLS regression to fluorimetric data for the determination of furosemide and triamterene in pharmaceutical preparations and triamterene in urine, *Talanta*, 62(2), 307 (2004)
75. Dinç, E., Özdemir, A., Aksoy, H., Baleanu, D., Chemometric approach to simultaneous chromatographic determination of paracetamol and chlorzoxazone in tablets and spiked human plasma, *Journal of Liquid Chromatography & Related technologies*, 29 (12), 1803 (2006)
76. Damiani, P.C., Borraccetti, M.D., Olivieri, A.C, Direct and simultaneous spectrofluorometric determination of naproxen ve salicylate in human serum assisted by chemometric analysis, *Anal. Chem. Acta*, 471, 87 (2002)
77. GNi, Y.N., Cao, D.X., Simultaneous synchronous fluorescence determination of carbaryl, propoxur, and carbofuran with multivariate calibration methods, *Spectroscopy Letters* 39 (5), 431 (2006)
78. Ni, Y.N., Qiu, P., Kokot, S., Simultaneous voltammetric determination of four carbamate pesticides with the use of chemometrics, *Analytica Chimica Acta* 537 (1-2), 321 (2005)
79. Dinç, E., Baleanu, D., Kanbur, M., Spectrophotometric multicomponent determination of tetramethrin, propoxur and piperonyl butoxide in insecticide formulation by principal component regression and partial least squares techniques with continuous wavelet transform, *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 49 (4), 218, (2004)
80. Vidal, J.L.M., Garcia, M.D.G, Galera, M.M., Frenich, A.G., Comparison of multicomponent determination of iprodione, procymidone and chlorothalonil by partial least squares modelling using spectrophotometric and high-performance liquid chromatography data, *Analytical Letters*, 30 (13), 2409 (1997)
81. Corbella, T.R., Rodriguez, D.M.A, Sanchez, M.J., Garcia M.F., Comparative study of the zero-crossing, ratio spectra derivative and partial least -squares methods applied to the simultaneous determination of atrazine and its degradation product desethylatrazin-2-hydroxy in ground waters, *Talanta*, 44, 673 (1997)
82. Niazi, A., Simultaneous spectrophotometric determination of Fe-II and Fe-III in pharmaceuticals by partial least squares with chromogenic mixed reagents, *Croatica Chemica Acta*, 79 (4), 573 (2006)
83. Moneeb, M.S., Polarographic chemometric determination of zinc and nickel in aqueous samples *Talanta* 70 (5), 1035 (2006)
84. Li, B.X., Wang, D.M., Lv, H., Zhang, Z.J., (Zhang, Zhujun) Chemometrics-assisted simultaneous determination of cobalt(II) and chromium(III) with flow-injection chemiluminescence method, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 65 (1): 67-72 (2006)
85. Niazi A, Spectrophotometric simultaneous determination of uranium and thorium using partial least squares regression and orthogonal signal correction, *Journal of The Brazilian Chemical Society* 17 (5): 1020-1026 (2006)
86. Ghasemi J, Saaipour S, Ensafi AA, Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of periodate and iodate based on their reaction with pyrogallol red in acidic media by chemometrics methods, *Analytica Chimica Acta* 508 (1): 119-126 (2004)