

**T.C.**  
**HİTİT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ANTİFUNGAL İLAÇLARIN TERS FAZ SIVI  
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE ANALİZLERİ İÇİN  
METOT OPTİMİZASYONU**

**Fatma BAŞARAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**  
**Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI**

**HAZİRAN 2012**  
**ÇORUM**

Fatma Başaran tarafından hazırlanan "Bazı Antifungal İlaçların Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemle Analizleri İçin Metot Optimizasyonu" tez çalışması 25. /...08 /2012 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliğı ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nurullah Şanlı

Yrd. Doç. Dr. Senem Şanlı

Yrd. Doç. Dr. İlknur Tosun



Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun...23.09.2012...tarih ve ....2012...107.....sayılı kararı ile Fatma Başaran'ın Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans derecesi alması onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ali Kılıçarslan  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

FATMA BAŞARAN



# BAZI ANTİFUNGAL İLAÇLARIN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE ANALİZLERİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU

Fatma BAŞARAN

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2012

## ÖZET

Bu çalışmada, mantar enfeksiyonu tedavisinde önemli bir yere sahip olan fentikonazol, itrakonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol, ornidazol, tinidazol ve tiokonazolun iyonlaşma sabitleri su ve su-organik çözücü karışımlarında ters faz sıvı kromatografik ve spektroskopik yöntemler ile tayin edilmiştir. Spektrofotometrik metot, nötral ve iyonik türlerin farklı absorbans özelliklerine sahip olması prensibine dayanır. Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır. Bu kriterler sağlandığında elde edilen sonuçların kesinliği oldukça iyidir. Buna ilave olarak, iyonlaşma sabitleri iyonlar arası etkileşimler olmaksızın doğrudan ölçülebilir. HPLC ile iyonlaşma sabitlerinin tayini, günümüzde sıvı kromatografik yöntemle ayrılmaları istenen bileşiklerin ayrılmalarının optimizasyonunda ilk aşamadır. İyonlaşma sabitlerinin hesaplanmasında gerekli grafikler yanı sıra bu amaç için geliştirilmiş bilgisayar programlarından yararlanılmıştır. HPLC yöntemlerinde elde edilen veriler ile ayırmanın optimizasyonu sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Spektroskopik Yöntem, İyonlaşma sabitleri, fentikonazol, izokonazol, itrakonazol, mikonazol, ketokonazol, ornidazol, tinidazol, tiokonazol.

# REVERSE PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF SOME ANTIFUNGAL DRUGS OPTIMIZATION METHOD

Fatma BAŞARAN

HITIT UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

JUNE 2012

## ABSTRACT

In this study, which has an important place in the treatment of fungal infection fenticonazole, itraconazole, izoconazole, ketoconazole, miconazole, ornidazole, tinidazole, and tioconazol ionization constants of water and water-organic solvent mixtures were determined by reversed-phase liquid chromatographic and spectroscopic methods. Spectrophotometric method is based on the principle that neutral and ionic species have different spectra. When all these criterias met, the precision of the following results was good enough. Moreover, the true dissociation constants can be measured directly without inter-ionic effects having to be considered. Determination of ionization constants by HPLC is the first step of optimization liquid chromatographic method. For calculation of ionization constants, graphics and computer programs developed for this purpose were used. Optimization of separation was setup by the data obtained from HPLC methods.

**Key words:** HPLC, spectroscopic method, ionization constants, fenticonazole, izoconazole, itraconazole, miconazole, ketoconazole, ornidazole, tinidazole, tioconazole

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yardımlarıyla beni yönlendiren tez danışmanım, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Senem Şanlı'ya çok teşekkür ederim.

Değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Nurullah Şanlı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen arkadaşım Arş. Gör. Bediha Akmeşe çok teşekkür ederim.

Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümündeki bütün hocalarıma ve Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Akbaş'a teşekkür ederim.

Sonsuz bir sabırla bugünlere kadar gelmemi sağlayan, desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, İngilizce öğretmenim kuzenim Sinem Barut'a teşekkür etmeyi borç bilirim.

**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Mantar Enfeksiyonları.....	3
2.2. Antifungal İlaçlar.....	5
2.3. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal Farmakolojik Özellikleri.....	8
2.3.1. Fentikonazol.....	8
2.3.2. İtrakonazol.....	9
2.3.3. İzokonazol nitrat.....	11
2.3.4. Ketokonazol.....	12
2.3.5. Mikonazol.....	13
2.3.6. Ornidazol.....	15
2.3.7. Tinidazol.....	16
2.3.8. Tiokonazol.....	17
2.4. Kullanılan Etken Maddeler Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	18
2.5. Su Organik Çözücü Karışımlarında pK <sub>a</sub> Tayini.....	21
2.5.1. Spektroskopik yöntemler.....	21
2.5.2. Sıvı kromatografik yöntemle pK <sub>a</sub> tayini.....	23

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	41
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	43
3.4.1. Spektroskopik Titrasyonlar.....	43
3.4.2. Kromatografik Çalışmalar.....	45
3.5.Yöntem.....	46
3.5.1. Spektroskopik Titrasyonlar.....	46
3.5.2. HPLC Yönteminin Optimizasyonu.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	48
4.1. Çalışılan Bileşiklerin ACD-Lab ve SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri.....	48
4.2. İlaçların Spektroskopik Yöntemle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini.....	51
4.3. HPLC Yöntemiyle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini.....	71
4.4. Fentikonazol, İzokonazol, Ketokonazol, Mikonazol ve Tiokonazol için Geliştirilen HPLC-DAD Yöntemine Ait Analiz Bulgular.....	77
4.4.1.HPLC Sisteminin Optimizasyonu.....	77
5. SONUÇ.....	82
5.1. İlaçların pK <sub>a</sub> Değerlerinin Spektroskopik ve HPLC Yöntemi İle Tayini...82	
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	88



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....	6
Çizelge 2.2. Etki mekanizmasına göre sınıflandırılması.....	6
Çizelge 2.3. Kullanıldığı hasta grubuna göre sınıflandırılması.....	7
Çizelge 2.4. Asetonitril-su karışımında 0,05 M KHP için pHs değerleri.....	39
Çizelge 3.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri.....	42
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	43
Çizelge 4.1. Çalışılan bileşiklerin pH=5,5 de, çeşitli ACN-H <sub>2</sub> O ortamları için kromatografik verileri (t <sub>R</sub> : alıkonma zamanı, k: kapasite faktörü, α: seçicilik).....	78
Çizelge 4.2. Çalışılan bileşiklerin pH=6 da, çeşitli ACN-H <sub>2</sub> O ortamları için kromatografik verileri (t <sub>R</sub> : alıkonma zamanı, k: kapasite faktörü, α: seçicilik).....	79
Çizelge 4.3. Çalışılan bileşiklerin pH=5,5 de çeşitli ACN-H <sub>2</sub> O ortamları için kromatografik verileri.....	80
Çizelge 4.4. Çalışılan bileşiklerin pH=6 da çeşitli ACN-H <sub>2</sub> O ortamları için kromatografik verileri.....	80
Çizelge 5.1. Su, % 10 ve % 20 ACN-su (v/v) karışımına ait spektroskopik titrasyon verileri.....	82
Çizelge 5.2. Fentikonazol, izokonazol, ketokonzol, mikonazol ve tiokonazolun iyonlaşma sabiti değerleri.....	83

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Fentikonazolün molekül yapısı.....	8
Şekil 2.2. İtrakonazolün molekül yapısı.....	9
Şekil 2.3. İzokonazol nitratin molekül yapısı .....	11
Şekil 2.4. Ketokonazolün molekül yapısı.....	12
Şekil 2.5. Mikonazolün molekül yapısı .....	13
Şekil 2.6. Ornidazolün molekül yapısı.....	15
Şekil 2.7. Tinidazolün molekül yapısı.....	16
Şekil 2.8. Tiokonazolün molekül yapısı.....	17
Şekil 2.9. Spektroskopik bir çalışmada (a) $A - \lambda/\text{nm}$ ve (b) log absorbanı farkı - pH grafikleri ( $A'$ : moleküler türün absorbanı; $A''$ : iyonik türün absorbanı).....	22
Şekil 2.10. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi.....	25
Şekil 2.11. Sıvı-sıvı dağılım kromatografisinde çözülmüş maddenin ayırımı.....	26
Şekil 2.12. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT).....	28
Şekil 2.13. HPLC için bir pistonlu pompa.....	30
Şekil 2.14. Sıvı kromatografide bir kromatogram.....	34
Şekil 2.15. Ayırma gücü ( $R_s$ ) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi.....	37
Şekil 4.1. Protonlanmış izokonazol iyonlaşma şeması.....	48
Şekil 4.2. Protonlanmış itrakonazol iyonlaşma şeması .....	49
Şekil 4.3. Protonlanmış ketokonazol iyonlaşma şeması .....	49
Şekil 4.4. Protonlanmış mikonazol iyonlaşma şeması.....	50
Şekil 4.5. Protonlanmış ornidazol iyonlaşma şeması.....	50
Şekil 4.6. Protonlanmış tinidazol iyonlaşma şeması.....	51
Şekil 4.7. Protonlanmış tiokonazol iyonlaşma şeması.....	51

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.8. Su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği .....	52
Şekil 4.9. Su ortamında fentikonazol için elde edilen spekturum taraması.....	53
Şekil 4.10. Su ortamında ketokonazol için elde edilen spektrum taraması.....	53
Şekil 4.11. Su ortamında mikonazol için elde edilen spekturum taraması.....	54
Şekil 4.12. Su ortamında tiokonazol için elde edilen spekturum taraması.....	54
Şekil 4.13. Su ortamında fentikonazol için elde edilen STAR grafiği.....	55
Şekil 4.14. Su ortamında itrakonazol için elde edilen STAR grafiği.....	56
Şekil 4.15. Su ortamında izokonazol için elde edilen STAR grafiği .....	56
Şekil 4.16. Su ortamında ketokonazol için elde edilen STAR grafiği.....	57
Şekil 4.17. Su ortamında ketokonazol için elde edilen STAR grafiği .....	57
Şekil 4.18. Su ortamında ornidazol için elde edilen STAR grafiği .....	58
Şekil 4.19. Su ortamında tinidazol için elde edilen STAR grafiği .....	58
Şekil 4.20. Su ortamında tiokonazol için elde edilen STAR grafiği .....	59
Şekil 4.21. % 10 ACN-su (h/h) ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği.....	60
Şekil 4.22. %10 ACN-su (h/h) ortamında itrakonazol için elde edilen spekturum taraması.....	60
Şekil 4.23. %10 ACN-su (h/h) ortamında izokonazol için elde edilen spekturum taraması.....	61
Şekil 4.24. %10 ACN-su (h/h) ortamında ornidazol için elde edilen spekturum taraması.....	61
Şekil 4.25. %10 ACN-su (h/h) ortamında tinidazol için elde edilen spekturum taraması.....	62
Şekil 4.26. %10 ACN-su (h/h) ortamında fentikonazol için elde edilen STAR grafiği.....	62
Şekil 4.27. %10 ACN-su (h/h) ortamında itrakonazol için elde edilen STAR grafiği.....	63
Şekil 4.28. %10 ACN-su (h/h) ortamında izokonazol için elde edilen STAR grafiği.....	63

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.29. %10 ACN-su (h/h) ortamında ketokonazol için elde edilen STAR grafiği.....	64
Şekil 4.30. %10 ACN-su (h/h) ortamında mikonazol için elde edilen STAR grafiği.....	64
Şekil 4.31. %10 ACN-su (h/h) ortamında ornidazol için elde edilen STAR grafiği.....	65
Şekil 4.32. %10 ACN-su (h/h) ortamında tinidazol için elde edilen STAR grafiği.....	65
Şekil 4.33. %10 ACN-su (h/h) ortamında tiokonazol için elde edilen STAR grafiği.....	66
Şekil 4.34. % 20 ACN-su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği.....	67
Şekil 4.35. %20 ACN-su (h/h) ortamında fentikonazol için elde edilen STAR grafiği.....	67
Şekil 4.36. %20 ACN-su (h/h) ortamında itrakonazol için elde edilen STAR grafiği.....	68
Şekil 4.37. %20 ACN-su (h/h) ortamında izokonazol için elde edilen STAR grafiği.....	68
Şekil 4.38. %20 ACN-su (h/h) ortamında ketokonazol için elde edilen STAR grafiği.....	69
Şekil 4.39. %20 ACN-su (h/h) ortamında mikonazol için elde edilen STAR grafiği.....	69
Şekil 4.40. %20 ACN-su (h/h) ortamında ornidazol için elde edilen STAR grafiği.....	70
Şekil 4.41. %20 ACN-su (h/h) ortamında tinidazol için elde edilen STAR grafiği.....	70
Şekil 4.42. %20 ACN-su (h/h) ortamında tiokonazol için elde edilen STAR grafiği.....	71
Şekil 4.43. Fentikonazolun %65 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği .....	72
Şekil 4.44. İzokonazolun %65 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği .....	72

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.45. Ketokonazolun %65 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	73
Şekil 4.46. Mikonazolun %65 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	73
Şekil 4.47. Tiokonazolun %65 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği .....	74
Şekil 4.48. Fentikonazolun %70 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	74
Şekil 4.49. İzokonazolun %70 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği .....	75
Şekil 4.50. Ketokonazolun %70 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği .....	75
Şekil 4.51. Mikonazolun %70 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği .....	76
Şekil 4.52. Tiokonazolun %70 (h/h) ACN-H <sub>2</sub> O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	76
Şekil 4.53. Ketokonazol (2 µg/ml), tiokonazol (2 µg/ml), izokonazol (2 µg/ml), mikonazol (2 µg/ml) ve fentikonazol (2 µg/ml) analizi için elde edilen kromatogram. (65:35 (v/v) ACN-su; 15 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH =5,50; akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 25°C). Görüntüleme 210 nm'de yapılmıştır.....	81
Şekil 4.54. Ketokonazol (2 µg/ml), tiokonazol (2 µg/ml), izokonazol (2 µg/ml), mikonazol (2 µg/ml) ve fentikonazol (2 µg/ml) analizi için elde edilen kromatogram. (65:35 (v/v) ACN-su; 15 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH =6,0; akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 25°C). Görüntüleme 210 nm'de yapılmıştır.....	81

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklama

<b>k</b>	Kapasite faktörü
<b>R</b>	Korelasyon katsayısı
<b>R<sub>s</sub></b>	Ayırma gücü
<b>t<sub>R</sub></b>	Alıkonma zamanı
<b><math>\alpha</math></b>	Seçicilik

### Kısaltmalar

### Açıklama

<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>BSS</b>	Bağıl Standart Sapma
<b>DAD</b>	Diode Array Dedektör
<b>HPLC</b>	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
<b>NLREG</b>	Nonlinear Regression
<b>ODS</b>	Oktadesilsilika
<b>SPARC</b>	“Performs Automated Reasoning in Chemistry”
<b>UV- Vis</b>	Ultraviyole ve Görünür Işık
<b>UV</b>	Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

En basit bitkisel canlılar olarak tanımlanan mantarların diğer canlıların doku ve organlarında çoğalması ve hasar oluşturması ile ortaya çıkan belirti ve bulgulara mantar enfeksiyonu adı verilmektedir. Ketokonazol, itarakonazol, fentikonazol, mikonazol, tiokonazol, tinidazol, izokonazol ve ornidazol bu hastalık için kullanılan ilaçlardır. İmidazol ve triazol türevi bu antifungal ilaçlar geniş spektrumlu ve fungistatik etkili tamamen sentetik ajanlardır.

İyonlaşma sabitleri,  $pK_a$ , bileşiklerin en önemli fizikokimyasal özelliğidir ve bileşiğin iyonlaşma özelliğini belirleyen temel parametredir. Bu parametrenin bilinmesi herhangi bir bileşikle çalışmalara başlamadan önce takip edilecek deneysel yolu tayin etmek için gerekmektedir.

Çalışılan ilaçlar, kanda ve infüzyon çözeltilerindeki davranışları bu bileşiklerin iyonlaşma sabitlerine ( $pK_a$ ), infüzyon çözeltisinin pH'sına ve ilacın bu çözeltilerdeki yüzde iyonlaşmasına bağlıdır. Özellikle biyolojik aktivitenin, dokulara nüfusun, biyolojik taşınmanın ve reaksiyon oranlarının anlaşılması ve miktarının belirlenmesinde iyonlaşma sabitleri anahtar parametrelerdir.

Bu öngörülen çalışmada incelenmek üzere mantar enfeksiyonu tedavisinde kullanılan ilaçlardan sekiz tanesi seçilmiştir. Çalışmanın temel amacı, mantar enfeksiyonu tedavisinde yer alan fentikonazol, ketokonazol, mikonazol, itrakonazol, ornidazol, tiokonazol, tinidazol ve izokonazol'un iyonlaşma sabitlerini su ve su-organik çözücü karışımlarında ters faz sıvı kromatografik (HPLC) ve spektroskopik yöntemler ile tayin edilmesidir.

Bir sonraki aşamada  $pK_a$  değerleri tayin edilen bu maddelerin, HPLC yöntemi ile bir arada tayinleri için metot geliştirilmiştir. Günümüzde ters faz sıvı kromatografi giderek önem kazanan teknikler arasındadır. Bu yöntemde ayırmanın optimizasyonunda maddelerin iyonlaşma sabitlerinin bilinmesi gereklidir. Su-organik çözücü karışımlarında HPLC veya spektroskopik yöntemle iyonlaşma sabiti tayini, elektrot kalibrasyonunun yapılabilmesi, bu amaçla geliştirilmiş çeşitli grafik programların mevcut olması, hatta bu hesaplamalarda kullanılacak bilgisayar

programlarının geliştirilmiş olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bu konu ile ilgili kaynaklar incelendiğinde mantar enfeksiyonu tedavisinde kullanılan bu etken maddelerin su organik çözücü karışımlarındaki  $pK_a$  değerleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu çalışma ile mantar tedavisinde kullanılan bu ilaçların  $pK_a$  sabitleri geniş bir aralıkta tayin edilmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin HPLC yöntemi ile analizlerinde optimum koşul belirlenmiştir



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Mantar Enfeksiyonları

Mantar enfeksiyonu cilt hastalıkları içinde çok büyük bir hasta grubunu oluşturmaktadır. Mantar hastalığı genellikle kıl, deri ve tırnak gibi keratinize dokulara yerleşen kaşıntı, kızarıklık, sulanma ve pullanma şeklinde kendini gösteren bir mikrobik enfeksiyondur.

En basit bitkisel canlılar olarak tanımlanan mantarların diğer canlıların doku ve organlarında çoğalması ve hasar oluşturması ile ortaya çıkan belirti ve bulgulara mantar enfeksiyonu adı verilmektedir. Mantarlar en basit canlılar olduklarından çoğalmaları için ısı, nem ve besin yeterli olmaktadır. Vücut ısısı çoğalmaları için gerekli ısıyı oluşturmakta, ter ise gerekli suyu sağlamakta, besin özellikle derinin en üst tabakasında bulunan ölü hücreler olmaktadır

#### Yüzeysel deri enfeksiyonu

Mantarların deri ve ağız içi dahil iç organlarımızı örten mukoza dediğimiz dokulara travma ya da zedelenme sonucu yerleşmeleri ve çoğalmaları ile oluşmaktadır

Bu tür enfeksiyon yapan mantarlar çoğunlukla vücut savunma sistemine karşı dayanıksız olan ve bu nedenle daha çok saçlı deri ve derinin üst katmanları gibi yüzeysel dokularda enfeksiyon yapan küf mantarlarıdır. İnsanlarda en sık bu tür mantar enfeksiyonları görülmektedir.

#### Sistemik derialtı enfeksiyonlar

Mantar hücrelerinin solunması ve akciğer dokusuna yerleşip kan yolu ile diğer organlara taşınması ile oluşabilmektedir. Maya mantarları gibi daha güçlü mantar türleri tarafından oluşmaktadır. Bu tür enfeksiyonlar bira fabrikasında çalışanların mantar hücrelerini solumaları ya da kanser, AIDS gibi bağışıklık sistemini zayıflatan hastalığı olanlarda görülebilmektedir.

Mikotik hastalıklar,

1. Bulaşıcı deri ve saç hastalıkları (Dermatofitik mantar enfeksiyonları)

2. Bulaşıcı olmayan ve toprak ya da hava yolu ile gecen sistemik enfeksiyonlar

3. Bulaşıcı olmayan ve besin yolu ile gecen toksinlerin neden olduğu hastalıklar (kana karışan fungi toksinlerinin oluşturduğu kan zehirlenmeleri)(Anonim, 2007)

#### Fungal enfeksiyonların artış nedenleri

Yakın zamanlara kadar, fungal enfeksiyonlar sık gözlenmiyordu, ancak geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı sonucu patolojik olmayan bakteriyel popülasyonların zarar görmesi veya yok olması ile insidans arttı. Buna neden olan bir başka faktör de AIDS, bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaç kullanımı, kanser kemoterapisi ile bağışıklık sistemleri zayıflamış insanların sayısının artmasıdır. Bu şekilde normalde bağışıklık sistemi sağlam olan insanların kolayca baş edebileceği mantar enfeksiyonları gibi ‘‘fırsatçı enfeksiyonların’’ prevalansı arttı

Genel olarak fungal enfeksiyonların tedavisi bakteriyel enfeksiyonlardan daha zordur ve daha uzun sürer. Tekrarlamasını önlemek için, lezyonlar iyileştikten sonra bile antifungal ilaçların uzun bir süre daha kullanılması gerekebilir (Süzer, 2010).

#### Tedavi açısından diğer enfeksiyonlardan farkı

- Uzun tedavi gerekir.
- Tekrarlama olasılığı fazladır.
- Cilt ve mukoza enfeksiyonları iyi yanıt verir.
- İlaçların zararlı etkileri daha fazladır.
- İmmun yanıt normal ise, her fungal enfeksiyonda ilaç kullanmak gerekmez.
- Sistemik derin fungal enfeksiyonlarda laboratuvar olanakları ve uzmanları tarafından tedavi yapılmalıdır.

#### Mantar enfeksiyonu tanısı

Çoğunlukla yuzeyel mantar enfeksiyonu tanısı muayene ile konabilmektedir. Özellikle deri ve saçlı deri enfeksiyonuna neden olan küf mantarlarının yaptığı yuzeyel enfeksiyonların ortası soluk, etrafı halka şeklinde kızamık lezyonlardır. Tırnakta oluşan mantar enfeksiyonlarında üst tabakaların mantarlar tarafından yenmesine bağlı tırnağın un gibi olması ya da sararması, yer yer çizgilerin oluşması

şeklinde görülebilir. Kadınlarda % 10- 20 oranında görülen ve gebelik döneminde % 8 oluşabilen vajinal kandidiazis denen mantar enfeksiyonu görülmektedir.

Muayene ile tanı konamadığı durumlarda, mantar hücresinin mikroskop ile incelenmesi, kültürde üretilmesi, Wood ışığı denen ultraviyole ışık ile lezyonun incelenmesi, boyama yöntemleri ve kimyasal yöntemler ile dokunun incelenmesi mümkün olabilmektedir (Anonim, 2007).

## **2.2. Antifungal İlaçlar**

Antifungal ilaçlar, küf veya maya mantarlarının neden olduğu lokal ve sistemik enfeksiyonlarda kullanılan ilaçlardır

Fungal hastalıkların tedavisinin zaman alması ve sabır istemesinin yanı sıra tedavinin planlanmasında da etkenin ve hastanın immün durumunun iyi bilinmesi gerekmektedir. 1950'li yıllara kadar iyot, fenol türevleri, salisilik asit ve türevleri ile benzoik asit gibi karbonik asitler kullanılmıştır. 1951 yılında, hem oral, hem de topikal etkili polyen antibiyotik nistatin bulunmuş olup, 1956'da polyen bir antibiyotik olan amfoterasin B'nin bulunması sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olmuştur. 1957 yılında, sitostatik madde olarak üretilen flusitozin, fungal hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. 1958'de, yüzeysel mikozların tedavisinde kullanılabilecek oral antifungal olan griseofulvin bulunmuştur. 1969 yılında, imidazol türevlerinden klotrimazol ve mikanozol, 1977'de ketakonazol ve 1980'li yıllarda geniş etki alanına sahip flukanazol ve itrakonazol piyasaya sürülmüştür. Son 10 yılda çeşitli topikal ve sistemik antifungal ilaçlar üretilmiştir (Bayel, 2006).

### Antifungal ilaçların sınıflandırılması

Antifungal ilaçları üç şekilde sınıflandırabiliriz:

- Kimyasal yapılarına göre
- Etki mekanizmalarına göre
- Kullanıldığı hasta grubuna göre

**Çizelge 2.1.** Kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Fadil, 2009)

Poliyenler	Amfoterisin B, Nistatin, Endomisin, Griseofulvin
Azoltürevleri (imidazoller- Triazoller)	Ketokonazol, Mikonazol, Flukonazol, İtrakonazol, Tiokonazol, Bifonazol, Oksikonazol, Klotrimazol, izokonazol, Ekonazol, Sulkonazol, Bukonazol Varikonazol, Fentikonazol
Allilamin	Terbinafin, Naftifin
Primidin türevleri	5- Florositozin
Ekinokandinler	Kaspofungin, Micafungin

**Çizelge 2.2.** Etki mekanizmasına göre sınıflandırılması (Bayel, 2006)

Etki Mekanizması	İlaçlar
Nükleik asit sentezini inhibe edenler	Florositozin
Nükleus bölünmesini etkileyenler. Fungal mitozun inhibisyonu yoluyla etkili olur	Griseofulvin
Fungal hücre membranının esas sterolü olan ergosterole bağlanarak fungal hücrelerin ölümüne neden olurlar	Polyenler
Ergosterol biyosentezini inhibe ederek etkili olurlar	Allilaminler
Lanosterolden ergosterol sentezini inhibe ederek mantar hücresinin üremesini durdururlar	İmidazol ve triazollar

**Çizelge 2.3.** Kullanıldığı hasta grubuna göre sınıflandırılması (Fadil, 2009)

Tedavi türü	İlaçlar
Local tedavide	Amfoterisin B, Nistatin, Pimarisin, Klotrimazol, Bifonazol, Ekonazol, İzokonazol, Oksikonazol, Fentikonazol, Terbinafin, Naftifin, Griseofulvin
Sistemik tedavide	Ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, vorikonazol, Flusitozin, Ekinokandinler, mikonazol

#### İmidazol ve triazol türevi antifungal ilaçlar

İmidazol türevi antifungal ilaçlar 1978 yılından bu yana üretilmekte olup geniş spektrumlu ve fungistatik etkili tamamen sentetik ajanlardır.

İmidazol türevi antifungal ilaçlardan sonra, yapıcı onlara benzeyen N-substitüe triazol türevi fungistatik ilaçlar geliştirilmiştir. İmidazol ve triazol türevi antifungallara ortak bir adla azoller denilir. Triazol türevleri, imidazol türevleri ile aynı antifungal etki alanına ve aynı etki mekanizmasına sahiptir. Triazol türevleri, sistemik verilişte imidazol türevlerine göre üç noktada üstünlük gösterirler. Triazol türevi ilaçlar;

- a) Daha yavaş metabolize edildikleri için etkileri daha uzun sürer ve doz aralıkları daha uzundur.
- b) İnsan hücrelerindeki sterol sentezi üzerinde daha az etkilidirler; bu nedenle direkt toksik etkileri azdır.
- c) İmidazol türevi ilaçların sistemik uygulamada gösterdikleri yan etkileri göstermezler.

İmidazol (ketokonazol, mikonazol) ve triazol (flukonazol, itrakonazol) türevi antifungal ilaçlar sitokrom P450 ve 14-alfa-demetilaz enzimlerini inhibe ederler. Bu enzim fungide lanosterol bileşiğini ergosterole çevirmektedir. Bu şekilde bu dönüşüm engellenir. Ergosterolde fungal hücre duvarı sentezi için gerekli mantar

hücrelerinin sitoplazma membranındaki ana sterol bileşiğidir. Bu grup ilaçlar insanlarda steroid sentezini de bloke etmektedirler.

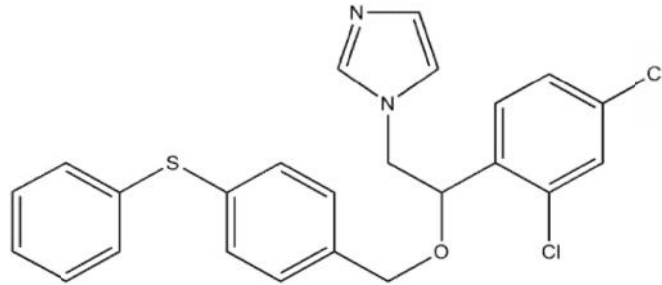
Sonuç olarak mantar hücrelerinin büyümeleri önlenir ve hücre geçirgenliği bozulur. Bu grup ilaçların antibakteriyal etkisi yoktur.

İmidazol grubu antifungallar arasında yer alan fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, tiyokonazol vulvovaginal kandidozun tedavisinde vaginal tablet, fitil, krem veya merhem şeklinde; bifonazol, izokonazol, klotrimazol, ketokonazol, mikonazol, oksikonazol, sulkonazol ve tiyokonazol saçsız deri ve tırnak mantarlarında krem, merhem, losyon, pudra veya tırnak solüsyonu şeklinde kullanılır (İlkit, 2000).

### 2.3. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal Farmakolojik Özellikleri

#### 2.3.1 Fentikonazol

##### Formül



**Şekil 2.1.** Fentikonazolün molekül yapısı

##### Kapalı formül



##### Sistemik adı

1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-{[4-(phenylsulfany)phenyl]methoxy} ethyl]-1H imidazole

### Farmakodinamik özellikleri

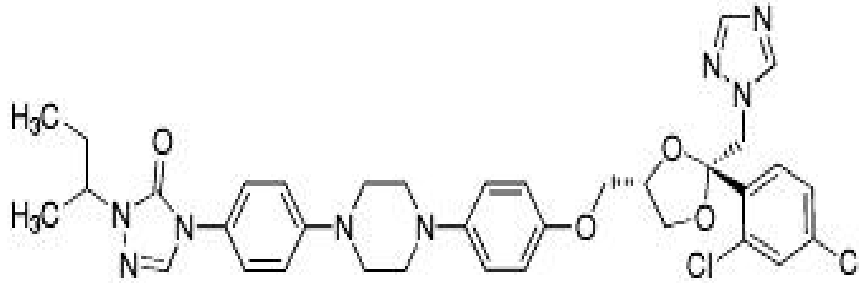
Fentikonazol geniş spektrumlu bir antimikotik ajandır. Fentikonazol doğrudan hücre membranını etkiler. Oksidatif enzimleri bloke ederek, peroksidlerin birikimine ve mantar hücresinin nekrozuna neden olur. Fentikonazol, Candida albicans ile deri ve mukoz membranların mikotik enfeksiyonlarından sorumlu diğer ajanlar üzerine yüksek fungostatik ve fungusid etki gösterir. Aynı zamanda gram pozitif mikroorganizmalar üzerine de antibakteriyel etki gösterir. Ayrıca in-vivo ve in-vitro olarak Trichomonas vaginalis'e etkili olduğu da gösterilmiştir.

### Farmakokinetik özellikleri

İnsan ve hayvanlar üzerindeki farmakokinetik testlerden transkütan absorpsiyonun kesinlikle olmadığı saptanmıştır.

### **2.3.2. İtrakonazol**

#### Formül



**Şekil 2.2.** İtrakonazolün molekül yapısı

#### Kapalı formül



### Sistemik adı

1-(butan-2-yl)-4-{4-[4-(4-[(2R,4S)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazin-1-yl]phenyl}-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one

### Farmakodinamik özellikler

İtrakonazol triazol türevi sentetik bir antifungaldir. Diğer imidazol türevi antifungallere yapıca benzer. İtrakonazol ve en önemli metaboliti olan hidroksi itrakonazol çoğu mantar türüne (küf mantarları ve dermatofitler dahil) etkilidir. Trichophyton ve Microsporum suşları, Epidermophyton floccosum, Candida suşları, Pityrosporum suşları ve Aspergillus suşlarına, etkili olduğu gösterilmiştir. İtrakonazol in-vitro koşullarda mantar hücrelerinin zarında bulunan ve bu hücreler için yaşamsal öneme sahip ergosterol sentezini inhibe ederek etkisini gösterir.

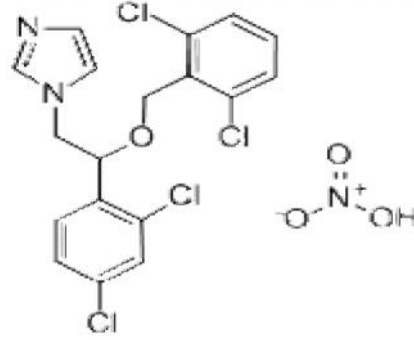
### Farmakokinetik özellikler

100 mg'lık tek dozun ağızdan alınmasından 3-4 saat sonra pik plazma değerlerine ulaşılır. İtrakonazolun biyoyararlanımı yemeklerden hemen sonra alınması halinde en yüksektir. Yarılanma ömrü yaklaşık 24 saattir. Plazma proteinlerine % 99 bağlanır. Başta deri olmak üzere, keratinli dokular ile ter veya vajen salgısı gibi vücut sıvılarına plazma konsantrasyonlarının katları şeklinde; yüksek düzeyde geçer ve tedavi kesildikten sonra bu dokulardaki düzeyleri devam eder (Epidermiste 2-4 hafta, vajen sıvısında 2-3 gün).



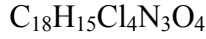
### 2.3.3. İzokonazol nitrat

#### Formül



**Şekil 2.3.** İzokonazol nitratın molekül yapısı

#### Kapalı formül



#### Sistemik adı

1-[2-(2,4-Dichlorophenyl)-2-[(2,6-dichlorophenyl)methoxy]ethyl]-1H-imidazole mononitrate

#### Farmakodinamik özellikler

İzokonazol derinin yüzeysel mantar hastalıklarının tedavisi için geliştirilmiş bir ilaçtır. Antimikrobiyal etki spektrumu çok geniştir. Hem dermatofitleri ve maya ya da maya benzeri mantarları (Pityriasis versicolor amillerini içeren), hem de küf mantarlarını etkiler. Ayrıca Erythrasma'nın amillerine ve gram pozitif bakterilere karşı da etkilidir.

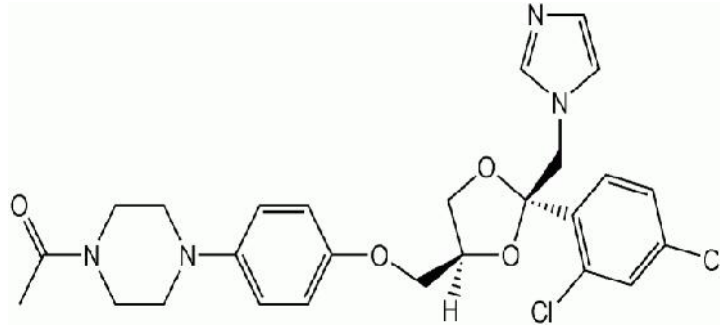
#### Farmakokinetik özellikler

İzokonazol, deriye hızla penetre olur. En geç 1 saat içinde ciltte maksimum etken madde konsantrasyonlarına ulaşılır ve bu seviye en az 7 saat sürer. Etken madde düzeyleri stratum korneum tabakasında ve epidermiste en önemli patojenlere (dermatofitler, küf ve maya mantarları) karşı minimum inhibitör ve biyosidal

antimikotik konsantrasyonlarını birkaç kez aşar ve deride de bu değerlere ulaşır. İzokonazol, deride metabolizması sonucu inaktive edilmemektedir. Perkutan absorpsiyon sonucu sistemik yüklenme çok azdır. İzokonazol organizmada tümüyle metabolize edilerek böbrek ve safra yolu ile olmak üzere hızla elimine edilir. Total dozun %75'i 24 saat içinde itrah edilir.

### 2.3.4. Ketokonazol

#### Formül



Şekil 2.4. Ketokonazolün molekül yapısı

#### Kapalı formül



#### Sistemik adı

1-[4-(4- {[ (2S,4R)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazin-1-yl]ethan-1-one

#### Farmakodinamik özellikleri

Ketokonazol, imidazol grubundan bir antifungaldir. Mantar hücre duvarının yapısında bulunan ergosterolün sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Etki spektrumunda bulunan duyarlı mikroorganizmalar: Kandida, torulopsis, kriptokokus, pitirosporom, blastomiçes, histoplasma, koksidioides, parakoksidioides, geotrişum, Drekslera longirostrata, epidermofiton, subkutan mikoz etkenleri (Petriellidium

boydii, Hendersonula toruloidea, madurella, Basidiobolus ranarum, Fonsecaea pedrosoi).

### Farmakokinetik özellikleri

Ketokonazol'un emilimi, yemekle birlikte alındığında, molekülün lipofilik özelliği nedeniyle artmaktadır. Oral yoldan 200 mg ketokonazol uygulanmasının ardından maksimum serum konsantrasyonuna 2 saat sonra ulaşılmaktadır. Günlük 200 mg'lık dozların tekrarlanması ile 3-4 mg/ml ortalama plazma düzeyine erişilir. Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 8 saattir. Plazma proteinlerine %99 oranında bağlanır.

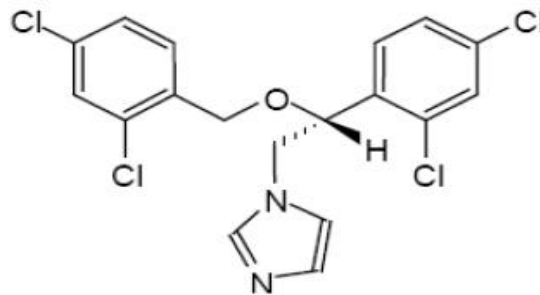
Ketokonazol, imidazol çekirdeğinin oksidasyonu ve oksid bileşenlerin degradasyonu ile veya oksidatif O-dealkilasyonu veya piperazin halkasının oksidatif degradasyonu ile metabolize edilmektedir.

Eliminasyon idrar ve dışkı ile 4 günde olmaktadır. Yaklaşık %13'ü idrarla ve %57'si dışkı ile atılmaktadır. Beyin omurilik sıvısına geçen ketokonazol miktarı ihmal edilebilir düzeydedir.

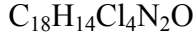
Zayıf dibazik madde olduğundan çözünmesi ve emilmesi için mide asidi gereklidir. Aklorhidrik hastalarda asit artırıcı içeceklerle alındığında emilimi artırılabilir.

### **2.3.5. Mikonazol**

#### Formül



**Şekil 2.5.** Mikonazolün molekül yapısı

Kapalı formülSistemik adı

1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl)methoxy]ethyl]imidazole

Farmakodinamik özellikleri

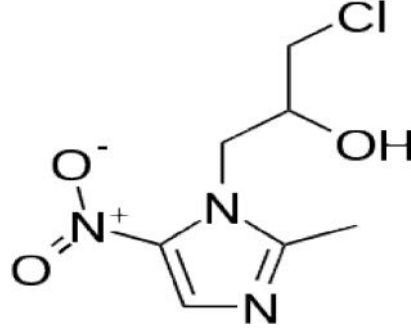
Mikonazol, antimikrobiyal aktiviteye sahip olan imidazol türevi antifungal ajandır. Mikonazol, dermatofitlere, mayalara ve diğer patojen insan mantarlarına ayrıca bazı gram-pozitiflere, karşı etkilidir. Mikonazol, ergosterol sentezinin pro-maddesi olan lanosterolün 14a- demetilasyonunu inhibe etmek suretiyle ergosterol sentezini inhibe eder, buna bağlı olarak hücre membranının diğer lipidik kompozisyonu modifiye olur. Böylece hücre membranı selektif bariyer görevini yerine getiremez ve mikonazol, patojen ajanın nekrozuna neden olur. Mikonazolun spektrumu insan için patojen olan çoğu mantarları içerir: dermatofitler, mayalar, Aspergillus'ler, dimorflar ve diğer mantarlar ve ayrıca bazı gram-pozitif bakteriler. Mikonazol yüksek konsantrasyonlarda fungusit etki gösterir.

Farmakokinetik özellikleri

Topikal uygulandığında mikonazol, stratum korneumda birkaç gün sonra tespit edilebilir. Mikonazol, eser miktarda sistemik dolaşımına geçer (maksimum uygulanan dozun %1-2'si). Mikonazol, genel olarak mikrobiyolojik açıdan etkisiz olan metabolitler halinde gaita ile atılır. Absorbe olanların %90'ı plazma proteinlerine bağlıdır.

### 2.3.6. Ornidazol

#### Formül



Şekil 2.6. Ornidazolün molekül yapısı

#### Kapalı formül



#### Sistemik adı

1(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitro imidazole; alpha-(chloromethyl)-2-methyl-5-nitro-1H-Imidazole-1-ethanol

#### Farmakodinamik özellikler

Ornidazol, antiprotozoal ve antibakteriyel özellikte 5-nitroimidazol türevidir. Bakteri ve diğer mikroorganizma hücrelerine pasif difüzyon ile girerek duyarlı bakteri ve protozoon hücre DNA' sına bağlanarak DNA sentezini inhibe eder ve hücre ölümüne neden olur.

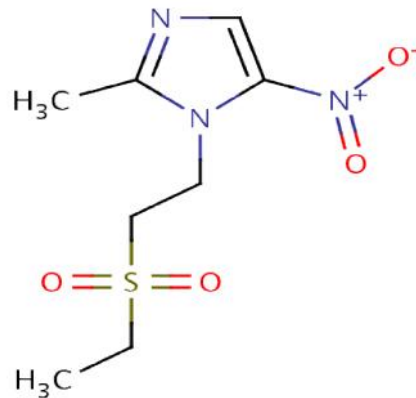
Ornidazol, Trichomonas vaginalis, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia ve Giardia intestinalis gibi parazitlerle oluşan parazitozlara, Bacteroides, Clostridium ve Fusobacterium gibi anaerobik bakteriler veya anaerob koklar gibi anaerobik patojenlere karşı etkilidir. Bu etkinlik hem in vitro deneysel koşullarda hem de in vivo olarak gösterilmiştir. Parazitler üzerindeki etkisi düşük serum ve doku konsantrasyonlarında gerçekleşir.

### Farmakokinetik özellikler

Ornidazol, gastrointestinal kanaldan kolaylıkla absorbe olur ve oral yoldan tek doz (1,5 g) uygulamasından sonra 2 saat içinde doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır. Bu değer 24 saatte 9 mcg/ml ve 48 saat sonra 2,5 mcg/ml'ye düşer. Ortalama yarı ömrü 12-14 saattir. Ornidazol plazma proteinlerine düşük oranda (yaklaşık % 15) bağlanmaktadır. Vücut doku ve sıvılarına, serebrospinal sıvı da dâhil olmak üzere yaygın olarak dağılır. Karaciğerde metabolize olur. Oral yoldan alınan dozun 2/3'lik kısmı idrarla, 1/3'lük kısmı ise feçesle konjüгат ve metabolitleri olarak atılır. Ornidazol ve metabolitlerinin eliminasyonunda safra yolu ile boşaltım önemli olabilir.

### **2.3.7. Tinidazol**

#### Formül



**Şekil 2.7.** Tinidazolün molekül yapısı

#### Kapalı formül



#### Sistemik adı

1-[2-(ethanesulfonyl)ethyl]-2-methyl-5-nitro-1H-imidazole

Tinidazol, substitue imidazol bileşiklerinin antiprotozoal ve antianaerobik aktiviteye sahip bir türevidir. Oral alımdan sonra hızla ve tam olarak absorbe edilir. Sağlıklı

gönüllülerde, oral tek doz 2 g alımından 2 saat sonra, doruk plazma konsantrasyonları 40-51 mcg/mL arasında değişmektedir. Değerler, 24 saat sonra, 11 - 19 mcg/mL arasındadır.

Tinidazol vücut dokularına geniş bir şekilde dağılır ve kan-beyin bariyerini de geçerek tüm dokularda etkili konsantrasyonlara ulaşır. Görünür dağılım hacmi yaklaşık 50 lt.'dir. Plazmadaki tinidazolun takriben %12'si plazma proteinlerine bağlıdır.

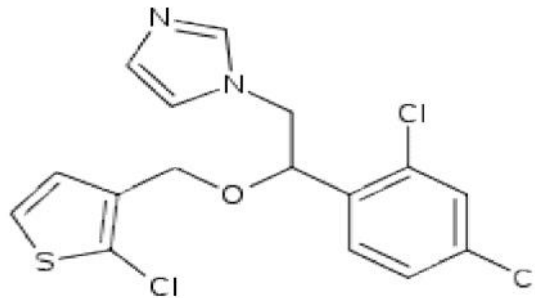
Tinidazol karaciğer ve böbreklerden atılır. Sağlıklı kişilerdeki çalışmalar, verilen dozun %60-65'inin 5 gün zarfında böbreklerden itrah edildiğini ve verilen dozun %20-25'inin değişmemiş tinidazol halinde olduğunu göstermiştir. Dozun yaklaşık %12'si dışkı ile atılır.

Böbrek yetmezliği olan (kreatinin klirensi <22 mL/min) hastalarda tinidazolin farmakokinetik parametrelerinde istatistiksel anlamlı bir değişme görülmez. Bundan dolayı bu hastalarda doz ayarlaması gerekmez.

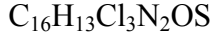
Tinidazolun anaerobik bakterilere ve protozoalara karşı etki mekanizması ilacın mikroorganizma hücresi içine penetrasyonu ve bunu takiben DNA iplikçiklerine hasar vermesi veya sentezinin inhibisyonu yoluyla. Tinidazol hem protozoa ve hem de zorunlu anaerobik bakterilere karşı etkilidir.

### 2.3.8. Tiokonazol

#### Formül



Şekil 2.8. Tiokonazolün molekül yapısı

Kapalı formülSistemik adı

1-{2-[(2-chlorothiophen-3-yl)methoxy]-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl}-1H-imidazoleN<sub>2</sub>OS

Farmakodinamik özellikleri

Tiokonazol, imidazol sınıfı bileşiklerin bir üyesidir. Tiokonazol beyaz kristalize katı madde halindedir. Suda çok az, metanol, etanol ve kloroformda iyi çözünür. Tiokonazol sentetik geniş spektrumlu antifungal bir ajan olup ayrıca Stafilokok ve Streptokok türleri dahil bir çok gram pozitif organizmalara karşı anti-bakteriyel aktivitesi de vardır. Invitro olarak, patojen dermatofit, maya ve diğer mantarlara karşı fungusiddir. Tiokonazolün sık rastlanan bütün antropofilik ve zoofilik dermatofit enfeksiyonları; özellikle Trichophyton rubrum ve Trichophyton mentagrophytes, kandidiyazis, pitriasis versikolor ve bakteriyel enfeksiyonlardan Corynebacterium minutissimum'un neden olduğu eritasmada etkili olduğu bulunmuştur. Tiokonazol kullanımı ile cilt enfeksiyonlarında semptomatik rahatlama, azalma, tedavinin ilk birkaç gününde ortaya çıkar.

Farmakokinetik özellikleri

Deriye tatbik edildikten sonra sistemik absorpsiyonun ihmal edilecek kadar az olduğu gösterilmiştir.

**2.4. Kullanılan Etken Maddeler Üzerine Yapılan Çalışmalar**

Abdel-Moety ve arkadaşları (2003); klotrimazol, ketokonazol ve flukonazolün ilaç preperatlarından tayini için ters faz sıvı kromatografik metot geliştirmişlerdir. Ayrımlar; ters faz kolon Bondapak C18 (10 µm, 25 cm x 4,6 mm), hareketli faz olarak asetonitril ve 25 mM trihidroksimetil aminometan (fosfat tamponu pH = 7) (55:45) karışımı kullanılarak, UV 260 nm'da gerçekleştirilmiştir. Bu üç maddelerin akış hızları değiştirilerek bu maddeler birbirlerine iç standart olmasını sağlamıştır.



Özkan ve arkadaşları (2003); farmasötik dozaj formlarında metronidazol mikonazolün ters faz sıvı kromatografisi kullanılarak tayini yapılmıştır. Bu çalışmada UV dedektörü kullanılmıştır. M-Bondapak C18 ters faz kolonunun (300 mm x 3,9 mm) kullanıldığı bu çalışmada, hareketli faz olarak metanol: su (40: 60), akış hızı 1 mL/dakika ve iç standart olarak sulfametoksazol kullanılmıştır. Fotodiyot dizisi dedektörü 250 nm dalga boyuna ayarlanarak kullanılmıştır. Kalibrasyon aralığı 10-70 µg/mL metronidazol için, 1-20 µg/mL mikonazol için saptanmıştır. Bu çalışmada vajinal ovüller kullanılmıştır.

Bajad ve arkadaşları (2002); fare plazmasında piperin ve ketokonazolün tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz C18 kolonda, 1mL/dakika akış hızında ve hareketli faz olarak (25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=4,5): asetonitril (50:50) kullanılarak yapılmıştır. Foto diyot dizisi dedektörün kullanıldığı yöntemde piperin için 340 nm, ketokonazol için 231 nm de ölçüm yapılmıştır. Tayin limitleri ise piperin için 2 ng, ketokonazol için 4 ng olarak bulunmuştur. Piperinin tayin alt sınırı değeri 10 ng, ketokonazol'un ise 12 ng tespit edilmiş ve gün içi ile günler arası yapılan deney sonuçları değerleri % 8 den daha az bulunmuştur.

Vertzoni ve arkadaşları (2006); köpek plazmasındaki ketokonazol tayini için, UV dedektörü kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi geliştirmişlerdir. Köpek plazmasının içindeki ketokonazolun belirlenmesi için 240 nm de izokratik yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem kullanılmıştır. 9-Asetilantrazen iç standart olarak kullanılmıştır. Hypersil BDS-C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm partikül boyutu) ve Hypersil BDS-C18 (10 mm x 4 mm, 5 µm partikül boyutu) kolonları kullanılmıştır. Mobil faz metanol: su: dietilamin 76/26/0,1 (v/v/v) oranlarındadır. Akış hızı 1mL/dakikadır. Enjeksiyon hacmi 50 µL dir. Ölçüm 240 nm de yapılmıştır. ketokonazolün ve 9-Asetilantrazen elüsyon zamanları yaklaşık 9 ve 8 dakikadır. Kalibrasyon grafiği 0,015-10 µg/mL aralığında çizilmiştir. Geri kazanım % 95'den fazladır.

Redmann ve arkadaşları (2005); alerjik bronkopulmoner aspergillozlu çocuklarda kistik fibrozun hidroksiittrakonazol konsantrasyonu ve plazmik itrakonazolun florometrik algılama ile HPLC yöntemi kullanılarak saptamışlardır. Çocuklardan alınan 100 µL lik plazmanın içindeki itrakonazol ve hidroksiittrakonazolun miktar

taini için basit ve hızlı yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Mobil faz olarak metanol (%75 v/v): su (%25 v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 1mL/dakika olarak ayarlanmıştır. C<sub>18</sub> Symmetry<sup>TM</sup> (3,9 mm i.d.x 150 mm) kolonu kullanılmış ve sıcaklık 30°C ayarlanmıştır. Protein çöktürme metodu kullanılarak, 100 µL iç standart çözelti (555 µg/L asetonitril içinde) 100 µL plazmaya ilave edilmiş ve içine 10 µL (%20 w/v) çinko sülfat eklenmiştir. İtrakonazol, hidroksiittrakonazol ve iç standart; 4,7, 8,3 ve 12,5. dakikalarda birbirinden ayrılmıştır. Florometrik dedektör ile 250 nm ve 380 nm de çalışılmıştır. Geri kazanma oranı % 87,1 - % 96,7 dir.

Cavrını ve arkadaşları (1992); içerisinde izokonazolün yer aldığı 8 adet imidazol türevi antimikotik etken maddeyi Hypersil C-18 (5 µm, 250 x 4,6 mm), Spherisorb-CN (5 µm, 250 x 4,6 mm), Chrompher-B (5 µm, 150 x 4,6 mm) ile doldurulmuş kolonlarda ayırarak aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. İzokonazol ve ketokonazolün rutin analizlerinde Hypersil kolonları ve hareketli faz olarak metanol: 0.05 M trietilamin fosfat tamponu (pH = 7) (85:15, v/v) kullanılmış, akış hızı ise 1 mL/dakika seçilmiştir. Çalışmada iç standart olarak klotrimazol kullanılmıştır. Deteksiyon ise 230 nm'de yapılmıştır. Yöntemin krem prepatlarına başarıyla uygulandığı çalışmada belirtilmektedir. Seçilen ticari preparatdan izokonazolün ortalama geri kazanımı, % 101,53 ve BSS değeri ise % 1,0 olarak hesaplanmıştır.

Wang ve arkadaşları (2007); kremlerde izokonazol nitrat tayini için bir kromatografik yöntem önermişlerdir. Çalışmada Zorbax C 18 kolon, mobil faz olarak %2 amonyum asetat- metanol- asetonitril (270:375:355) karışımı, 2,0 mL/dakika akış hızında, kullanılmış, UV dedektör 235 nm'ye ayarlanmıştır. Kalibrasyon aralığı 40-250 µg/mL (r= 0.9999, n= 6), geri kazanım değeri, % 101,1 (BSS=%1.1) bulunmuştur.

Hamdy ve arkadaşları (2010); plazmada, midazolam ve ketokonazolün yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile eş zamanlı tayinini yapmışlardır. Diazepam iç standart olarak kullanılmıştır. UV dedektör kullanılmıştır. Dalga boyu 220 nm olarak belirlenmiştir. Kromatografik ayırma Symmetry C<sub>18</sub> kolonunda (3,5 µm, 150 mm x 4,6 mm) gerçekleştirilmiştir. Ön kolon olarak C<sub>18</sub> (5 µm, 2 cm x 4 mm) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz aetonitril ve su 45/55 (v/v) oranlarında,

tampon olarak 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Akış hızı 1mL/dakika dır. İnsan ve fare plazmasındaki ketokonazol ve midazolamın kalibrasyon grafiği 25-25,000 ve 5-10,000 ng/mL aralığında doğrusaldır.

De Zan ve arkadaşları (2009); krem formülasyonlarda mikonazol nitrat tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırma ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm partikül boyutu) kolonunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak su, metanol ve asetonitril kullanılmıştır (30:30:40). İç standart olarak sulfametoksazol kullanılmıştır. Elüsyon süresi 15 dakikadır. Kolon sıcaklığı 25°C dir. UV dedektöründe algılama 232 nm de yapılmıştır.

## 2.5. Su-Organik Çözücü Karışımlarında pK<sub>a</sub> Tayini

Su-organik çözücü karışımları, suda çözünmeyen bileşiklerin asitlik ve bazlık sabitlerinin tayinlerinde tercihli olarak kullanılmaktadır. Bu ortamların sıvı kromatografik ve kapiler elektroforetik ayırmalarda kullanılması ve bileşiklerin ayırmadaki davranışlarında iyonlaşma sabitlerinin etkin olmasından dolayı su-organik çözücü karışımlarındaki iyonlaşma sabitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İyonlaşma sabitlerinin tayininde alternatif yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar:

- 1) Potansiyometrik yöntemler
- 2) Spektroskopik yöntemler
- 3) Sıvı kromatografik yöntemler
- 4) Elektroforetik yöntemlerdir.

### 2.5.1. Spektroskopik yöntemler

İyonlaşma sabitleri spektrofotometrik ölçümler ile de tayin edilebilir (Polster ve Lachmann, 1989). Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır. Bu tayinde aşağıdaki bağıntı esas alınmaktadır:

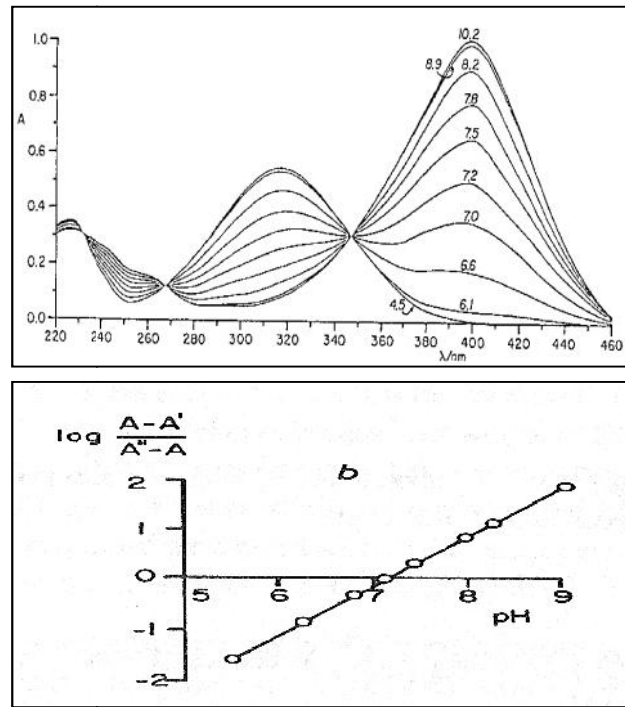
$$pK_a = pH + \log \frac{A_{obs} - A_M}{A_I - A_{obs}} \quad (2.1.)$$

Bu bağıntıda  $A_M$  moleküler formun,  $A_I$  iyonlaşmış türlerin absorpsiyon değerlerini ifade etmektedir. Absorpsiyon pH a karşı grafiğe geçirilerek veya  $\log \frac{(A-A')}{(A''-A)}$  pH ya karşı grafiklenerek kesim noktasından  $pK_a$  değerleri bulunabilir. (Şekil 2.9.)

Spektrofotometrik yöntemin avantaj ve dezavantajları şunlardır:

- 1) Yöntemin doğruluğu ve kesinliği yeterlidir.
- 2)  $10^{-5} - 10^{-6}$  M derişim çalışma için uygundur.
- 3) Çalışılan bileşikler saf olmalıdır.
- 4) Yapıda en az bir tane kromofor grubun bulunması ve bunun absorpsiyon özelliklerinin yeterli olması gereklidir.

Nötral ve iyonlaşmış formların spektral özelliklerinin yeterince farklı olması gerekir.



**Şekil 2.9.** Spektroskopik bir çalışmada (a)  $A - \lambda/\text{nm}$  ve (b)  $\log$  absorpsiyon farkı - pH grafikleri ( $A'$ : moleküler türün absorpsiyonu;  $A''$ : iyonik türün absorpsiyonu)

Spektroskopik yöntemle tayinde günümüzde DAD sistemleri kullanılmakta ve bu sistemler LC-DAD ve CE-DAD olarak ayırma yöntemleri ile kombine olarak kullanılmaktadır (Beltran ve ark., 2003). Absorbanstaki en büyük değişme, pH' nın  $pK_a$  civarında olduğu koşulda gözlenir. Bu yaklaşımla suda az çözünen ilaçların  $pK_a$  değerleri tayin edilebilmektedir (Akay ve ark., 2002). Bu amaçla geliştirilmiş bilgisayar programları, pH ile dalga boyu ve absorbans arasındaki ilişkiyi temel alır (Ando ve Heimbach, 1997; Allen ve ark., 1998; Mitchell ve ark., 1999). Spektroskopik yöntemle elde edilen veriler, potansiyometrik yöntemle elde edilen verilerle uyumludur.

### 2.5.2. Sıvı kromatografik yöntemle $pK_a$ tayini

Yöntem, özellikle sıvı kromatografik ayırmada yararlanılan organik çözücü–su karışımlarına uygulanabilmektedir. Çalışılan bileşiklerin alıkonma davranışları ile hareketli faz pH'sı arasındaki ilişkilerden yararlanılarak iyonlaşma sabitleri tayin edilir. Kapasite faktörünün pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir (Poole ve Poole, 1997; Hardcastle ve Jano, 1998). Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin  $pK_a$  sabitlerinin tayininde ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir.

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

- Bileşiğin saf olması gerekmez.
- ppm ve ppb düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.
- Çalışılan ortam su-organik çözücü ikili karışımıdır.
- Bu ortamlardaki pH standardizasyonunun bilinmesi gereklidir.

### Kromatografi

Kromatografi birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, karışımların, birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan, birçok yöntemi kapsayan yöntemlerin genel adıdır (Skoog, 1998). Yüzlerce

maddenin karışımı bile kromatografi yöntemiyle analiz edilebilir. Kromatografi terimi ilk olarak Mikhail Tswett tarafından 1906 yılında kullanılmıştır. Daha sonraları analitik çalışmaların birçoğunda kromatografi yer almıştır.

Kromatografik ayırmada örnek, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınır. Hareketli faz, katı bir yüzeyde ya da kolonda sabitleştirilmiş ve hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinden geçirilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasını hedefler.

Örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Örneğin kolon boyunca hareketi sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengelerin dağılımına bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır (Hamilton, 1982; Bidlingmeyer, 1992). İyonik etkileşimler,

- a) İyonlar arasındaki kulomb çekim kuvvetleri
- b) İyon-indirgenmiş iyon etkileşimleri
- c) Dipol-dipol etkileşimleri
- d) Dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri
- e) Nötral atom ya da moleküller arası kuvvetlerdir (London kuvvetleri).

Dipol-dipol etkileşimleri, dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri ve nötral atom ya da moleküller arası kuvvetler Van der Waals kuvvetleri olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca en iyi koşulların sağlanabilmesi için, sabit faz yapısı, hareketli faz bileşimi ve sıcaklığın dağılıma etkisi de ayarlanabilir.

Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter kendi adını taşıyan ve kromatografik kolondaki ayırma olaylarını matematiksel olarak tanımlayan bir eşitlik bulmuştur (Bidlingmeyer, 1992).

$$H=A+B/u+C \quad (2.2)$$

Eş. 1.1'de;

H: Tabaka yüksekliği (cm)

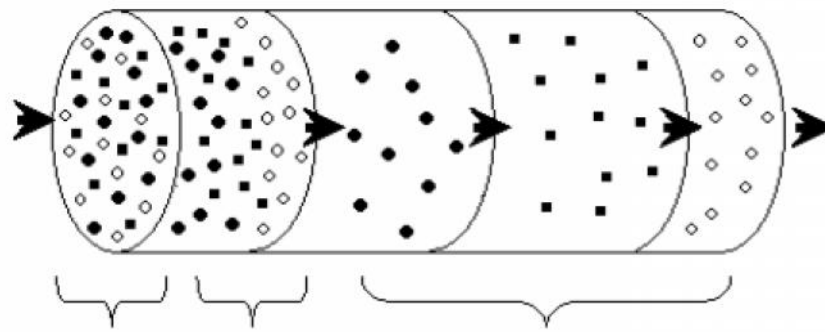
A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyon

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

Karışımın bulunan maddelerin kolon boyunca ayrılması ve hareketli faz akış hızıyla kolondan geçmesi Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



Karışım Ayrılma  
kolona başlar.  
yüklenir.

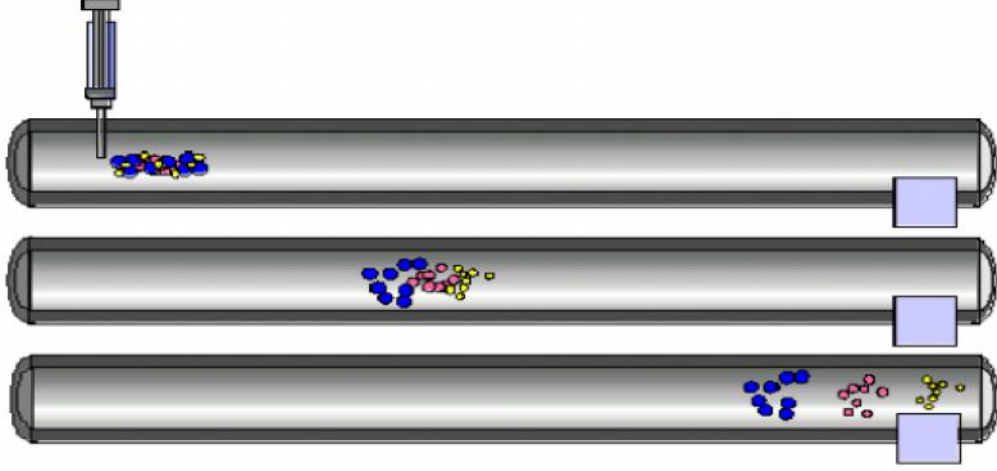
Ayrılma bitmiştir,  
maddeler dedektöre  
ayrı olarak gider.

**Şekil 2.10.** Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi

### Yüksek performans sıvı kromatografisi

Kromatografi, bir karışımın bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz ya da mobil faz adı verilir. Hareketli fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde

sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür ve zamana karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir.



**Şekil 2.11.** Sıvı-sıvı dağılım kromatografisinde çözünmüş maddenin ayrımı

Sıvı kromatografik teknikler içinde ters- faz sıvı kromatografisi en yaygın kullanılanıdır. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda tutunmaları farklı olan türlerin ayırımında kullanılır. Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesil silan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca C8 ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Ters-faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır.

HPLC’ nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

- HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nitel ve nicel analiz amaçları için kullanılabilir.
- Analiz süresi oldukça kısadır.



- Duyarlık çok yüksektir. 10 µg'lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

### *Normal ve ters faz dolguları*

Hareketli ve sabit fazların polarlıkları söz konusu olduğu zaman, dağılma kromatografisi ikiye ayrılır. Eskiden sıvı-sıvı kromatografisinde sabit faz olarak silikaya veya alüminaya bağlanmış su, trietilen glikol gibi oldukça polar, hareketli faz olarak da heksan, i-propil eter gibi daha az polar olan maddeler kullanılırdı. Geçmiş çalışmalara bir hürmetin ifadesi olarak, günümüzde bunlara normal faz kromatografisi denilmektedir. Ancak, günümüzde daha çok ters-farz kromatografisi kullanılmaktadır. Ters-faz kromatografisinde sabit faz polar olmayan bir hidrokarbon, hareketli faz ise su, metanol, asetonitril, alkilamin, gibi polar maddedir. Normal faz kromatografisinde polarlıkları  $A > B > C$  olan üç maddeden önce C elüe olur. Onu B ve A takibeder. Çünkü, polarlığı daha az olan C, polarlığı az olan hareketli fazda, polarlığı çok olan sabit faza göre, daha çok çözünür ve dolayısıyla kolondan daha kısa zamanda çıkar.

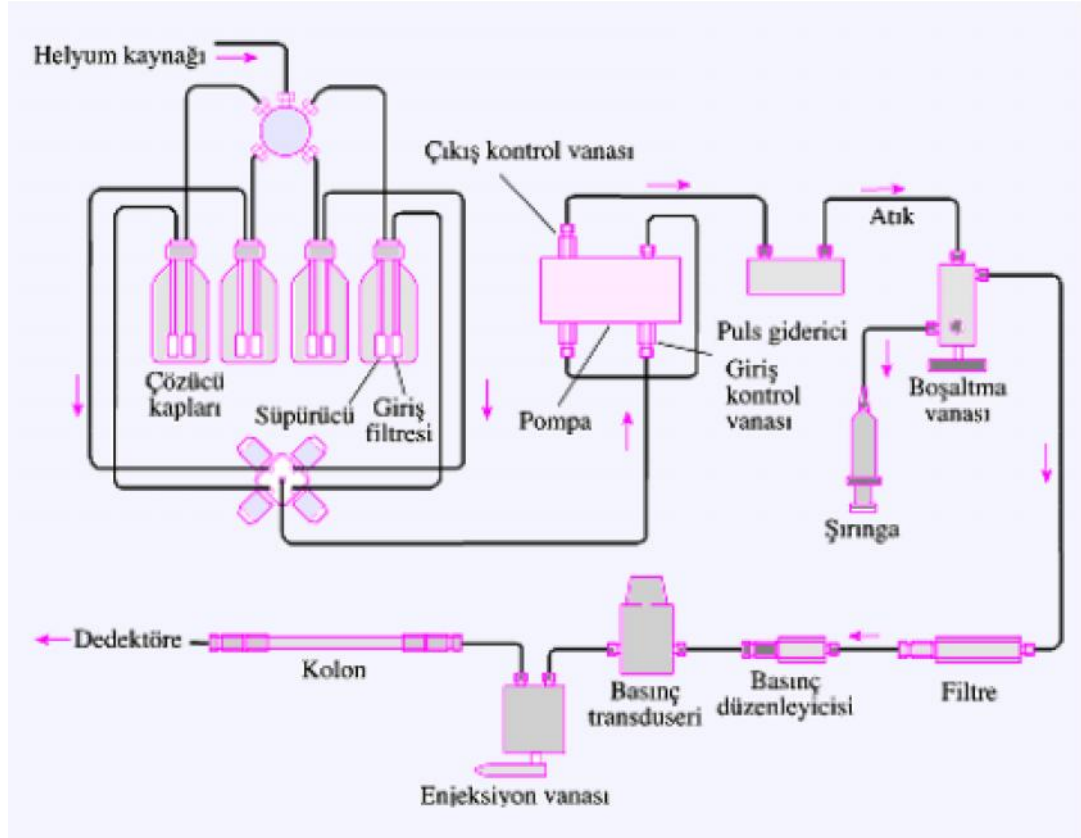
Ters-faz kromatografisindeyse, normal faz kromatografisindekinin tam tersi olur. Polarlığı en yüksek olan A maddesi ilk önce elüe olur. Çünkü çözücü polardır (Gündüz, 2007).

İlaç analizlerinde genel olarak ters-faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedeni, ilaçların genellikle daha apolar yapıda olmaları, ters-faz sıvı kromatografisinin uygulamasının ve sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücülerin daha ucuz olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulmasıdır.

### Sıvı kromatografi cihazları

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 1,7 ile 10 m arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 2.12'de tipik

bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının çeşitli kısımları şematik olarak gösterilmiştir



**Şekil 2.12.** Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü(PerkinElmer Corporation, Norwalk, CT)

### Hareketli faz hazneleri ve çözücü sistemleri

Modern bir YPSK cihazı, bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, bulunabilecek tozların ve kolonda ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözülmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu çözülmüş gazlar kolonda kabarcıklar oluşturarak pik genişlemesine; ayrıca, çoğu zaman gerek gaz kabarcıkları gerekse tozlar, dedektörle girişim yaparak performansında azalmaya sebep olurlar. Çoğunlukla bu sistemler, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de içerirler. Çözücü hazneye doldurmadan önce uygulanacak diğer bir

yol, çözücüyü, vakum altında bir milipor süzgeçten süzmektedir. Bu uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniğe gradient elüsyon adı verilir. Bu teknikte iki çözücünün oranı önceden programlanmış olarak bazen sürekli bazen de kademeli bir şekilde değiştirilir. Elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, bazen sürekli olarak, bazen de bir seri basamaklar şeklinde çözücülerin oranı değiştirilir. Modern YPSK cihazları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler, gradient elüsyonla ayrılabilen, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

Hareketli faz su ve/veya sulu tampon içeriyorsa kimyasal bozunmanın yanı sıra mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkayabilir. Bu nedenle, YPSK analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz kullanılır (Gümüştas, 2009).

### Pompa

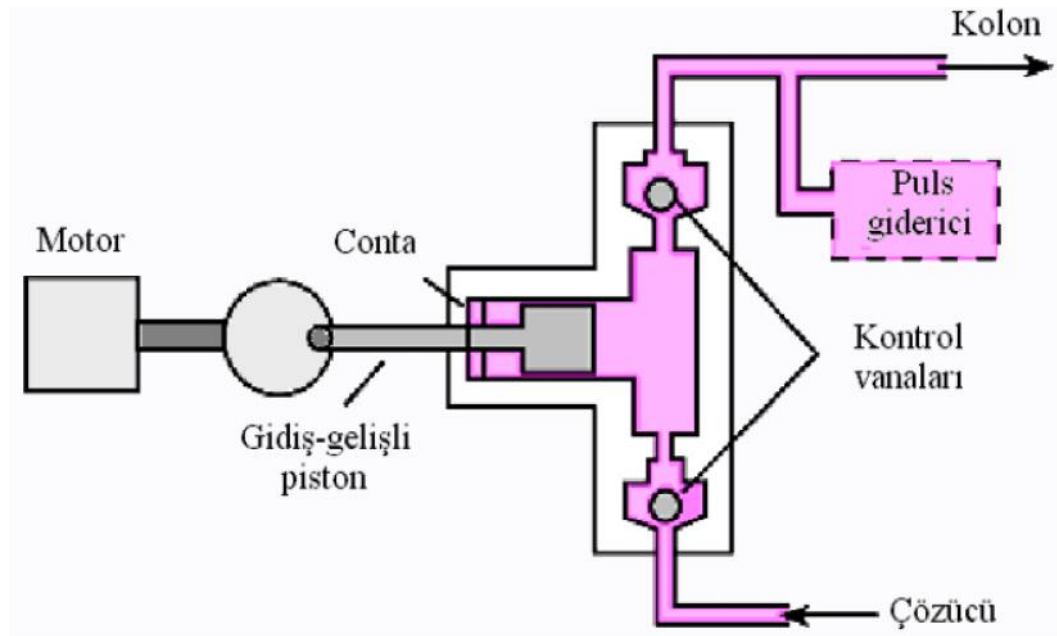
Bir HPLC sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

1. 400 atm'e kadar basınç üretimi,
2. Puls içermeyen basınç çıkışı,
3. 0.1-10 mL dk-1 aralığında akış hızları,
4. % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
5. Korozyona dayanıklı parçalar.

Bir HPLC sisteminde kullanılan pompalar sabit hacim pompaları ve sabit basınç pompaları olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir. Çalışma farklılığına bağlı olarak ise; pistonlu pompalar, şırınga pompalar ve pnömatik pompalar olmak üzere üçe ayrılırlar.

### *Pistonlu pompalar*

Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Ticari olarak satılan HPLC sistemlerinin yaklaşık %90'ında pistonlu pompalar kullanılır (Şekil 2.13).



**Şekil 2.13.** HPLC için bir pistonlu pompa

### *Şırınga pompalar*

Şırınga pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdümlü mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettir. Bu pompalar da viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler. Ayrıca çıkış akımı pulssuzdur. Dezavantajları; sınırlı çözücü kapasitesi (250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlüklerdir.

### *Pnömatik pompalar*

En basit pnömatik pompalarda sıvı, sıkıştırılmış bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmiş, portatif bir kap içine konur. Bu tip pompalar, pahalı değildir ve pulssuzdur, ancak kapasitesi sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür ve çıkış hızı çözücü viskozitesi ile kolon geri basıncına bağlıdır (Şanlı, 2009).

### Dedektörler

Dedektör yüksek performanslı sıvı kromatografisinde, cihazın en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da mevcuttur (Skoog, 1998; Hamilton, 1982; Bidlinmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988). Bir dedektörde bulunması gerekli önemli karakteristikler;

- a) Duyarlılık,
- b) Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,
- c) İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- d) Üniversal ve akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı,
- e) Doğru cevap, koşulların değişiminden etkilenmeme,
- f) Numuneyi tahrip etmeme,
- g) Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacim,
- g) Ucuzluk ve kolay kullanımdır.

Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler 2 başlık altında toplanabilir.

- a) Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti, yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.

b) Analit Özellikli Dedektörler: UV absarbansı, floresans şiddeti, vb. analitin sahip olduğu ama hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir.

Bu çalışmada UV/Görünür Bölge Diode Array Dedektörü kullanıldığından, sadece bu dedektörden bahsedilecektir

#### *Ultraviyole-Görünür bölge dedektörü*

Absorbans ölçen dedektörler olup HPLC’de kullanılan dedektörlerin yaklaşık % 60’ını oluşturmaktadırlar. Lambert-Beer yasası geçerlidir. DAD dedektörün en büyük avantajı; spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak olduğu söylenebilir.

Hareketli faz, UV/VIS fotometre ya da spektrofotometrenin bulunduğu Z şeklindeki küçük bir akış hücresinden geçirilir. Kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek için, bu gibi hücrelerin hacimleri mümkün olduğunca düşük tutulmaktadır. Hacimler 1-10 µL ve hücre uzunluğu 2-10 mm arasında sınırlandırılmıştır. Bu tip hücreler, yaklaşık 600 psi’den büyük basınçlarda çalışmazlar. Bunun sonucu olarak, bir basınç düşürme düzeneği genellikle gereklidir.

Hücreden geçen analit, bir miktar UV ışınını absorblar ve dedektör tarafından bu absorbsiyona bağlı olarak bir sinyal oluşturulur Bu sinyal, analit derişimi ile orantılıdır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm’de ışımaya yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörler de ise döteryum lambası kullanılır. Dalga boyunun her bir bileşene göre ayarlanabilmesi nedeni ile seçimli bir dedektör türü olan UV- görünür bölge dedektör sisteminde seçilen çözücülerin UV-ışınlarını absorbladığı dalga boylarına dikkat edilmeli ve seçilen çalışma dalga boyu çözücünün absorbsiyon yaptığı dalga boyu değerinden yüksek olmalıdır. Bu durum özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için son derece önemlidir. Ayrıca elue edicinin pH değerinin UV-görünür bölge spektrumunu etkileyeceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

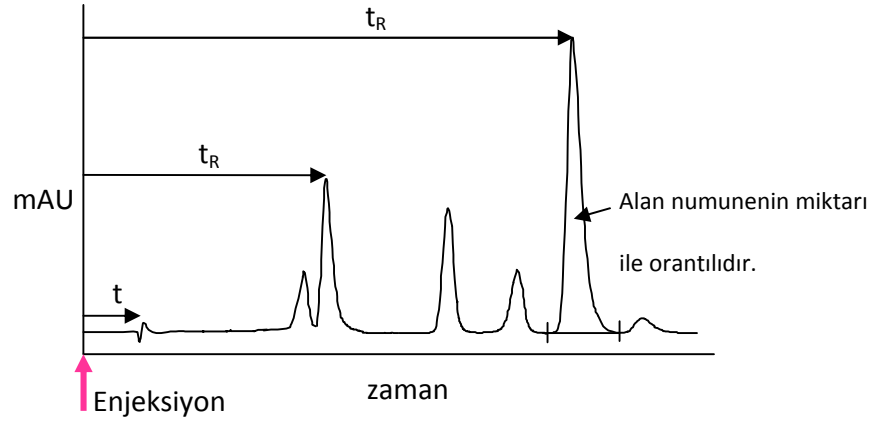
En güçlü ultraviyole spektrofotometrik dedektörler diyod-dizili cihazlardır. Bu cihazlar, spektrumun tamamı için gerekli olan verileri yaklaşık bir saniyede toplayabilmektedir. Böylece, her bir kromatografik pik için spektral veriler, analit kolondan çıkarken toplanıp saklanabilir. Türlerin teşhisine ve kantitatif tayin için şartların seçimine yardımcı olan bu spektrum şekli, üç boyutlu grafik olarak verilebilmektedir.

İdeal UV dedektörün karakteristikleri şunlardır:

- Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- Band genişletme etkisi küçüktür.
- Çok güvenilirdir.
- Örnek çözeltiyi bozmaz.

#### Kromatografide temel kavramlar

Bir kromatografik sisteminde verilerin yorumlanmasında esas alınan kromatogramdır. Kromatogram; tayini yapılan örneğin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir detektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafikdir. Sekil 2.14'de iki bileşenli bir örneğe ait kromatogram ve kromatografik gösterimler belirtilmiştir.



**Şekil 2.14.** Sıvı kromatografide bir kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında kullanılan başlıca parametreler şunlardır;

1. Alıkonma zamanı,  $t_R$
2. Kapasite faktörü,  $k$
3. Seçicilik,  $\alpha$
4. Etkin tabaka sayısı,  $N$
5. Ayırma gücü,  $R_s$

*Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü*

Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı,  $t_R$ , ile tanımlanır. Kromatografik karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen,  $k$ , yararlanılır. Kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.3)$$

Burada  $t_R$  bileşene,  $t_0$ , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır.  $k$  değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini;  $k$  değerinin küçük olması, bileşenin hareketli faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. HPLC ayırmalarında  $k$ ,



mümkün olduğunca 1-10 arasında tutulmalıdır.  $k$  çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayıramaz;  $k$  çok büyükse ayırma işlemi çok zaman alır.  $k$  değerlerinin bu aralıkta olması, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.

Kapasite faktörü uygulanan yönteme, her maddenin kendi fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir.

### *Seçicilik ( $\alpha$ )*

Seçicilik, esas olarak kullanılan sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterse de hareketli faz bileşimi de, seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden biridir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi Eş. 2.4'de gösterilmiştir. Burada kolonda daha uzun süre tutunan maddeye ait kapasite faktörünün kolonda daha kısa süre tutunan maddeye ait kapasite faktörüne oranlanması ile hesaplanır. Bu tanıma göre seçicilik daima 1'den büyüktür.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad (2.4)$$

### *Teorik tabaka sayısı ( $N$ )*

Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir.  $N$ 'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolunun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Tavsiye edilen değer  $N > 2000$ 'dir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir.

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (2.5)$$

Burada;

$N$  :Teorik tabaka sayısı

$t_R$  :Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$  :Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

*Ayırma gücü ( $R_s$ )*

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) kavramıyla ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pik için  $R$  değeri 1,5 iken tam ayırım olmakta,  $R=1,325$  iken maddelerden biri diğeri içine % 0,3 oranında girmiş durumda,  $R = 1$  iken, maddelerden biri diğeri içine % 4 oranında girmiş durumda ve  $R= 0,75$ 'de ayırım olmamaktadır. Ayırma gücü için geliştirilen bağıntı, aşağıda verilmiştir.

$$R_s = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}} \quad (2.6)$$

Burada;

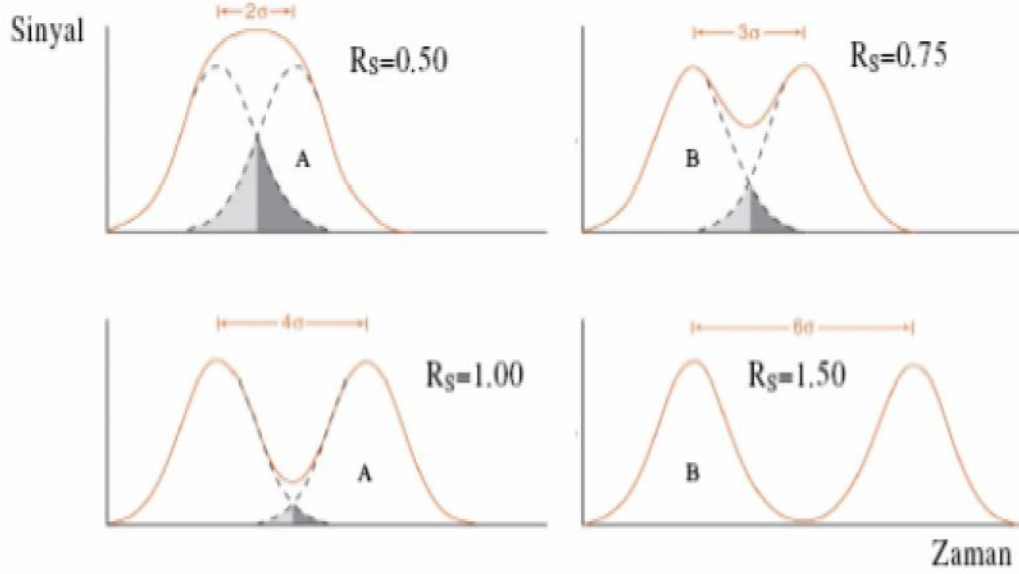
$R_s$  :Pik çifti için ayırma gücü,

$t_1$  :Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

$t_2$  :İkinci pikin alıkonma zamanı, s,

$W_{0,5}$  :Birinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği,

$W_{p0,5}$  :İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişliğidir.



**Şekil 2.15.** Ayırma gücü ( $R_s$ ) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi

#### Ters-faz sıvı kromatografide pH ve seçicilik

Ters-faz sıvı kromatografi metoduyla analizi yapılan maddelerin çoğu, karboksilik asit, sülfonik asit veya amino grupları gibi, iyonlaşabilen gruplara sahiptir. Maddelerin alıkonma zamanı, büyük ölçüde fonksiyonel grupların iyonlaşmasına bağlıdır. Aynı analitin iyonlaşmış ve nötral şeklinin alıkonma zamanı arasında yaklaşık 30 kat farklılık olabilmektedir. İyonlaşma derecesi hareketli fazın pH'sıyla belirlenir. Eğer iyi bir kromatografik seçicilik ve tekrarlanabilir alıkonma isteniyorsa, iyonlaşma derecesini etkileyen faktörleri anlamak gereklidir. Bu faktörlerden en önemlilerine aşağıda değinilmiştir.

#### İyonlaşma ve pH

İyonlaşan analitlerin alıkonması iyonlaşma derecesine bağlıdır. Ters-faz sıvı kromatografide, analitin iyonlaşmamış türü, iyonlaşmış türünden daha yüksek alıkonma zamanına sahiptir. Eğer analit birden fazla iyonlaşma basamağına sahipse; daha yüksek iyonlaşma derecesi basamağında, daha düşük alıkonma zamanı gösterir. Analitin iyonlaşma derecesi, çözeltinin pH'sına ve iyonlaşma basamaklarındaki pK değerine bağlıdır. Ters-faz sıvı kromatografide iyonlaşmış tür daima düşük alıkonma

zamanına sahiptir. Bu yüzden, bazik türler için, asidik ortamda, asidik türler için ise bazik ortamda alıkonma en düşüktür. Diğer yandan, yüksek alıkonma zamanı analit nötral formdayken de gözlenir. Analitlerin kapasite faktörleri ve iyonlaşma dereceleri arasındaki bağıntı,

$$k = k_0 + k_1 \cdot d / (1 + d) \quad (2.7)$$

olarak verilmektedir. Burada  $k$ , analitin kapasite faktörünü,  $k_0$  ve  $k_1$  protonlanmış ve nötral formun kapasite faktörünü,  $d$  ise deprotonasyon derecesini ifade eder.  $d$ ;

$$d = 10^{\text{pH} - \text{pK}} \quad (2.8)$$

olarak ifade edilir. Bu eşitlikte  $\text{pH}$ , hareketli fazın  $\text{pH}$  değeri ve  $\text{pK}_a$  bileşiğin iyonlaşma basamağına ait  $\text{pK}$  değeridir. İki değerlikli bileşikler için eşitlik benzer şekilde yazılabilir. Asit, baz veya zwitter iyon için eşitlik,

$$k = (k_0 + k_1 \cdot d_1 + k_2 \cdot d_1 \cdot d_2) / (1 + d_1 + d_1 \cdot d_2) \quad (2.9)$$

olarak yazılabilir. Çalışılan bileşiklerin hareketli fazdaki  $\text{pK}$  değerlerinin doğru olarak bilinmesi, alıkonmanın belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bileşiğin  $\text{pK}'$ sının  $\pm 2$   $\text{pH}$  biriminde, yapı yaklaşık % 99 iyonlaşmış veya moleküler formdadır. Bu  $\text{pH}$  aralığının dışında alıkonma  $\text{pH}$  değişimi ile fazla değişmez. Bundan dolayı  $\text{pH}$  kontrolü tekrarlanabilir alıkonma zamanlarının elde edilmesinde oldukça önemlidir.

#### Hareketli fazda $\text{pH}$ standardizasyonu

Kromatografik ayırmada hareketli faz  $\text{pH}'$ sı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmalarında önemli bir faktördür. Bilindiği gibi kapasite faktörü, çözünenin nötral ve iyonik formlarının kapasite faktörlerinin hareketli fazda bu formların mol kesirlerine göre ağırlıklı ortalamasıdır.

Sıvı kromatografide kullanılan hareketli fazların  $\text{pH}'$ sı, önceleri sulu çözeltinin  $\text{pH}'$ sı olarak alınmıştır. Oysa HPLC çalışmalarında su hiçbir şekilde tek başına hareketli faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer ile birlikte kullanılır. Bundan dolayı organik modifiyer ilavesi ile  $\text{pH}$  değişimini göz

önüne almak gerekir (Roses ve ark., 1996; Augiar de ve ark., 1997). HPLC hareketli fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonytril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Barbosa ve ark., 1999; Barbosa ve Sanz-Nebot, 1995; Covington ve ark., 1985). Sulu faz pH'sının ölçümü çok daha kolaydır, ancak su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması seçimli solvasyona çok bağımlıdır ve çözüneneye göre değişir. Bu nedenle HPLC hareketli fazına ve su ortamına ait pK veya pK<sub>a</sub> değerleri farklıdır (Bosch ve ark., 1998). Organik çözücü-su karışımlarında ortamın dielektrik sabitinin azalması nedeniyle aktivite katsayıları dikkate alınmaktadır. pH'nın sudaki pH yerine hareketli fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir.

Su-organik çözücü karışımlarında elektrot kalibrasyonu için referans değer pH standart çözeltisi (RVS) olarak 0,05 mol/kg potasyum hidrojen fitalat (KHP) çözeltisi kullanılmaktadır (Rondinini ve ark., 1987). Asetonytril-su ortamında (% 70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standart pH değerleri belirlenmiştir ve değerler Çizelge 2.4'de verilmiştir (Rondinini ve Nese, 1987).

**Çizelge 2.4.** Asetonytril-su karışımında 0,05 M KHP için pHs değerleri

t, °C	Asetonytrilin ağırlıkça yüzdesi, % w/w ve mol kesri, x				
	5; 0,0226	15; 0,0719	30; 0,1583	50; 0,3050	70; 0,5059
15	4,163	4,533	5,001	5,456	6,159
25	4,166	4,533	5,000	5,461	6,194
40	4,178	4,542	5,008	5,475	6,236

Asetonytril-su ve metanol-su gibi çözücü karışımlarında standart referans tampon çözeltilerinin bu ortamlara ait pH değerleri, pH<sub>s</sub>, bilindiği için bu karışımlarda pH ölçümleri pH'nın tanımına uygun olarak aşağıdaki bağıntı dikkate alınarak yapılır.

$$\text{pH}_x = \text{pH}_s + \frac{E_s - E_x}{g} \quad (2.10)$$

Burada  $\text{pH}_x$ , X çözeltisinin pH değeri,  $\text{pH}_s$ , referans standart çözeltinin pH değeri,  $E_s$  ve  $E_x$  sırasıyla referans standart çözeltinin ve X çözeltisinin e.m.k değerleri ve  $g$ , Nerst sabitidir ( $g = (\ln 10)RT/F$ ).

Hareketli fazın pH'sı, alıkonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Hareketli faz pH'sı, çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve hareketli faz katkılarının davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. Hareketli fazın pH optimizasyonu, çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha komplikedir. Zira pH'nın değişmesi ile sadece iyonlaşan çözünen yapıların seçicilik ve alıkonma özellikleri değişmez, aynı zamanda pik genişliği ve pik simetrisi de değişir. Bu nedenle ayırmanın hesabında pik simetrisinin de göz önüne alınması gerekir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin spektroskopik ve HPLC yöntemiyle tayininde ve bu bileşikler için ayırmanın optimizasyonunda kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar

##### Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve iyonlaşma sabitlerinin tayininde, Shimadzu marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (CBM 20A), pompa (LC20 AD), dedektör (SPDM 20A Foto Diyod Dizi), kolon fırını (CTO 20 AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU 20 A) bulunmaktadır. Optimum koşul 25°C olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada X Terra C-18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) kolonu kullanılmıştır. Ayırmada X Terra C-18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Bu kolon bazik bileşikler için sıklıkla kullanılan pH aralığı 1–12 olan, end-capped yeni kuşak bir kolondur.

##### pH / İyon metre

Spektrofotometrik titrasyonlarda ve HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ iyon analiz cihazı kullanılmıştır. Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık su banyosu (HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) kullanılarak, 25°C ± 0,1°C sıcaklıkta, çalışılmıştır.

##### UV spektrofotometresi

Spektroskopik titrasyonlar, Perkin Elmer Lambda 25 model cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylede kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan bileşikler Çizelge 3.1' de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışılan bileşikler ve özellikleri

<b>Bileşik adı</b>	<b>Kapalı formül ve mol kütlesi</b>	<b>Maksimum absorbands yaptığı dalga boyu</b>
Fentikonazol	$C_{24}H_{20}Cl_2N_2OS$ 455,4 g/mol	210 nm
İtrakonazol	$C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$ 705,64 g/mol	210 nm
Ketokonazol	$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ 531,43 g/mol	210 nm
Mikonazol	$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ 416,129 g/mol	210 nm
Ornidazol	$C_7H_{10}ClN_3O_3$ 219,63 g/mol	318 nm
Tinidazol	$C_8H_{13}N_3O_4S$ 247,27 g/mol	210 nm
Tiokonazol	$C_{16}H_{13}Cl_3N_2OS$ 387,71 g/mol	210 nm
İzokonazol nitrat	$C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$ 479,15 g/mol	210 nm

Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri, Çizelge 3.2’de verilmiştir.



**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

<b>Adı</b>	<b>Kullanım amacı</b>	<b>Açıklama</b>
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH'sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Urasil	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	pH metre için kalibrasyon çözeltisi	Merck (Referans Değer Standardı)
Asetonitril	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam	Merck , HPLC saflığında
Hidroklorik asit	Hücre kalibrasyonu, baz çözeltisinin ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidroksit	Titrant	Merck, ayarlı çözelti (Titrisol)
Potasyum klorür	İyonik şiddet ayarlayıcı	Merck, analitik saflıkta
Fosforik asit	Hareketli faz pH'sının ayarlanmasında kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta

### 3.3. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.3.1. Spektroskopik titrasyonlar

##### Su ortamı

30 mL'lik stok ortam için 27 mL saf su alınmış, üzerine 3 mL 1 M KCl çözeltisinden ilave edilmiştir.

#### %10 (h/h) Asetonitril -Su ikili karışımı

30 mL'lik stok ortam için 24 mL saf su alınmış, üzerine 3 mL 1 M KCl çözeltisinden ve 3 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril-su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

#### %20 (h/h) Asetonitril -Su ikili karışımı

30 mL'lik stok ortam için 21 mL saf su alınmış, üzerine 3 mL 1 M KCl çözeltisinden ve 6 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

#### İyonik şiddet ayarlayıcı

Her bir ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. Bu amaçla yukarıda hazırlanışı belirtilen çözücü karışımına 0,1 M derişimi sağlayacak şekilde 1 M'lık KCl çözeltisinden ilave edilmiştir.

#### Asit çözeltisi

1 M standart hidroklorik asit (Titrisol) çözeltisi, ortamın organik modifiyer yüzdesine uygun olarak 0,1 M'a seyreltilmiştir.

#### Baz çözeltisi

1 M standart KOH (Titrisol) çözeltisi, çalışılan organik modifiyer-su ikili karışımında 0,025 M olacak şekilde seyreltilerek, asit çözeltisi ile ayarlanmış ve titrant olarak kullanılmıştır.

#### Potasyum Asit Fitalat çözeltisi

$2 \cdot 10^{-3}$  M KHP çözeltisi çalışılan ortama uygun şekilde hazırlanmış ve KOH ayarında kullanılmıştır.

#### İlaç çözeltileri

Çalışmada kullanılan tüm ilaç çözeltileri, yaklaşık  $1 \cdot 10^{-5}$  M olacak şekilde çalışılan ortamda hazırlanmıştır.

### 3.3.2. Kromatografik çalışmalar

#### Çalışılan bileşiklerin HPLC ayırımında kullanılan çözeltileri

Çalışılan bileşiklerin her birinden 0,0025 g, 25 mL asetonitrilde çözülerek 100 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Her bir stok çözeltiden 10 ppm olacak şekilde hareketli faz ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için ikişer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir.

#### %65 (h/h) Asetonitril-Su ikili karışımı

200 mL hareketli fazın hazırlanmasında 130 mL asetonitril alınmış ve üzerine 70 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(%85 (a/a); 98 g/mol; 1,685 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış, NaOH'den (1 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

#### %70 (h/h) Asetonitril-Su ikili karışımı

200 mL hareketli fazın hazırlanmasında 140 mL asetonitril alınmış ve üzerine 60 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(%85 (a/a); 98 g/mol; 1,685 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış, NaOH'den (1 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

#### Urasil çözeltisi

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi %0,01 (a/h) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. Urasilin hazırlanan bu çözeltisinden 20 µL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü t<sub>0</sub> alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu 254 nm'dir.

### Potasyum Hidrojen Fitalat çözeltisi

$C_6H_4(COOK)(COOH)$ , primer standart pH referans çözeltisi olarak kullanılmıştır. 2 saat  $110^{\circ}C$ 'da kurutulmuştur. 0,05 molal derişimde hazırlanmış ve çalışılan ortamlara özgü pH referans değerleri kullanılmıştır.

Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmışlardır.

## **3.4. Yöntem**

### **3.4.1. Spektroskopik titrasyonlar**

Spektroskopik çalışmalarda;

Potasyum asit fitalat çözeltisi kullanılarak KOH çözeltisinin ayarı, HCl çözeltisinin ayarlı baz ile titrasyonu ve böylece elektrodun  $E_0$  ve eğim değerlerinin hesaplanması,  $1,0 \cdot 10^{-5}$  M'lık çalışılan bileşiğin su, %10 (h/h), %20 (h/h) asetonitril-su ikili karışımında hazırlanan çözeltilerinin titrasyonu, titrasyonla ilgili verilerin değerlendirilmesi ve STAR programı ile  $pK_a$  değerinin tayini (Araştırma bulgularında verilmiştir) yapılmıştır.

Bileşiklerin protonasyon sabitlerinin spektroskopik yöntemle tayininde su, %10 (h/h) ve %20 (h/h) asetonitril-su ikili karışımında çalışılmıştır. Bu ortamlarda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. KCl derişimi 0,1 M olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışılan ortamlarda kullanılan çözücü karışımında, önce KHP çözeltisi ile KOH derişimi ayarlanmış ve bu ayarlı baz ile asit çözeltisi titre edilmiştir. Bu titrasyonlar ile, mV değerlerinden pH değerlerine geçebilmek için  $E_0$  standart potansiyeli belirlenmiştir. Bu amaçla kuvvetli asitlere özgü Gran fonksiyonu kullanılmıştır.

Bileşiklerin protonlanmış  $1,0 \cdot 10^{-5}$  M'lık çözeltilerinden 30 mL, çift cidarlı hücreye konulmuş ve çeşitli pH' larda spektrum taramaları alınmıştır. Spektrumlar tek tek kaydedilmiş ve STAR programı ile  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır.

### 3.4.2. HPLC yönteminin optimizasyonu

HPLC sistemine bileşikleri enjekte etmeden önce, sistemin dengelenmesi ve kanallarda bulunan havanın giderilmesi amacıyla hazırlanan hareketli faz kanallardan geçirilir. Böylece kolon şartlandırılır ve sistem basıncı uygun hale getirilir.

Geliştirilecek yöntem için en iyi ayırımın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar saptanmıştır. Bu amaçla fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mokonazol ve tiokonazolün ters-faz sıvı kromatografisiyle ayırımında; sabit faz seçimi, hareketli faz organik düzenleyici oranı (asetonitril oranı; %65 ve %70 (h/h)), hareketli fazın pH seçimi (3,0-8,0 arası), ve hareketli fazın akış hızının (1,0 mL/dk) etkileri incelenmiştir.

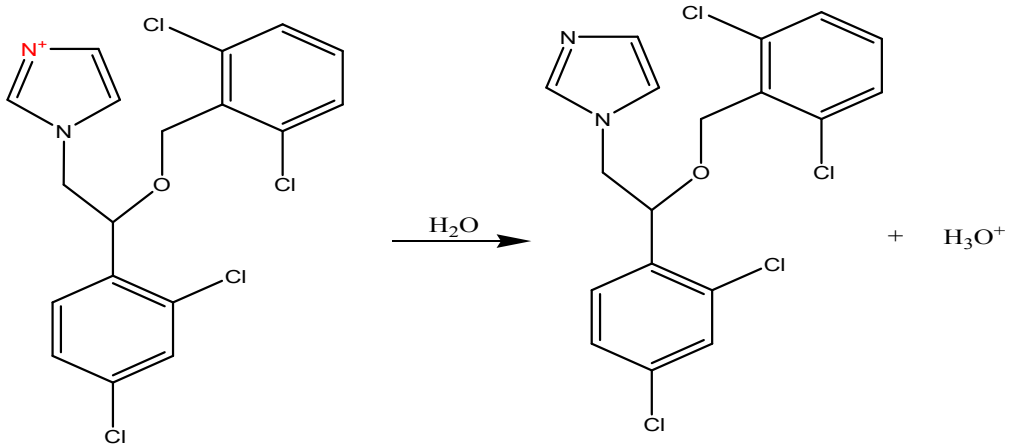
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Çalışılan Bileşiklerin ACD-Lab ve SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

Çalışılan bileşiklerin  $pK_a$  değerlerinin hesaplanmasında ACD Lab (ACD/ $pK_a$ ) ve SPARC programı kullanılarak molekülün yapısına bağlı olarak beklenen değerler hesaplanmıştır. Bu hesap programı, substitue grupların etkisini de inceleyerek olası iyonlaşma formlarını vermektedir. Ancak bilindiği gibi elde edilen veriler su ortamı içindir.

#### İzokonazol için iyonlaşma sabiti

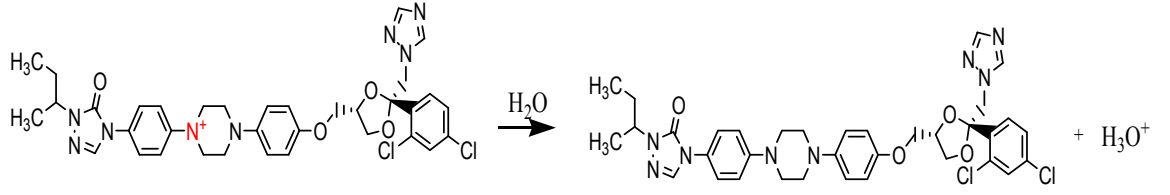
İzokonazol için iyonlaşma şeması Şekil 4.1’de iki aşamalı olarak verilmiştir. İzokonazol’un SPARC programı ile hesaplanan  $pK_a$  değerleri 5,57 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 6,66 (0,12) dir.



**Şekil 4.1.** Protonlanmış izokonazol iyonlaşma şeması

#### İtrakonazol için iyonlaşma sabiti

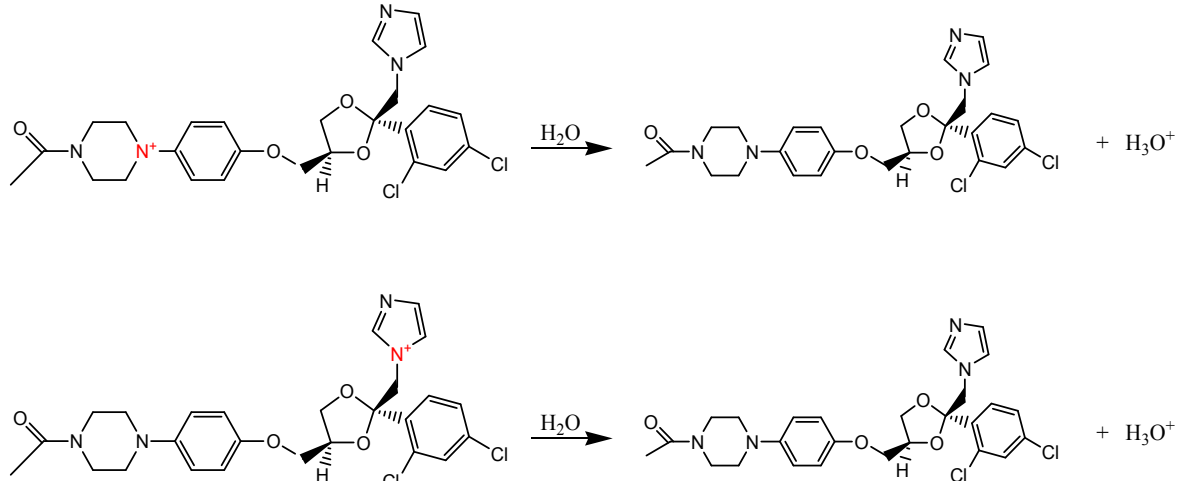
İtrakonazol için iyonlaşma şeması Şekil 4.2’de verilmiştir. İtrakonazol’un SPARC programı ile hesaplanan  $pK_a$  değeri 4,22 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 5,13 (0,40) dür.



**Şekil 4.2.** Protonlanmış itrakonazol iyonlaşma şeması

Ketokonazol için iyonlaşma sabiti

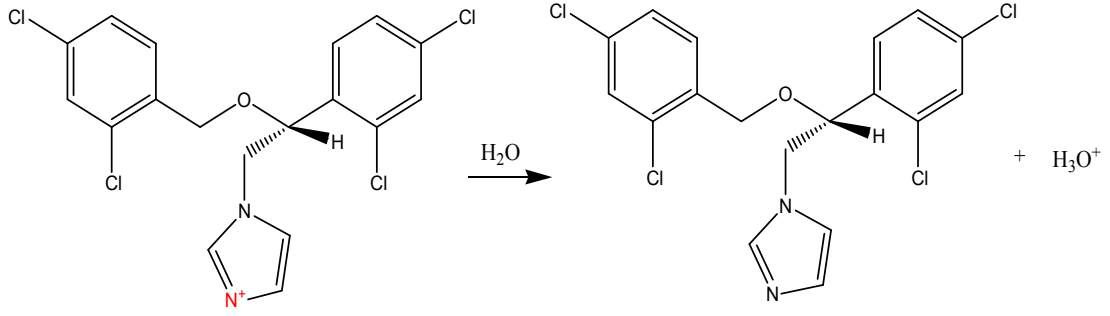
Ketokonazol için iyonlaşma şeması iki aşamalı olarak Şekil 4.3’de verilmiştir. Ketokonazolun SPARC programı ile hesaplanan  $pK_a$  değerleri 2,57 ve 5,50 olarak verilmiştir. ACD Lab değerleri ise 2,92 (0,40) ve 6,54 (0,12) dır.



**Şekil 4.3.** Protonlanmış ketokonazol iyonlaşma şeması

Mikonazol için iyonlaşma sabiti

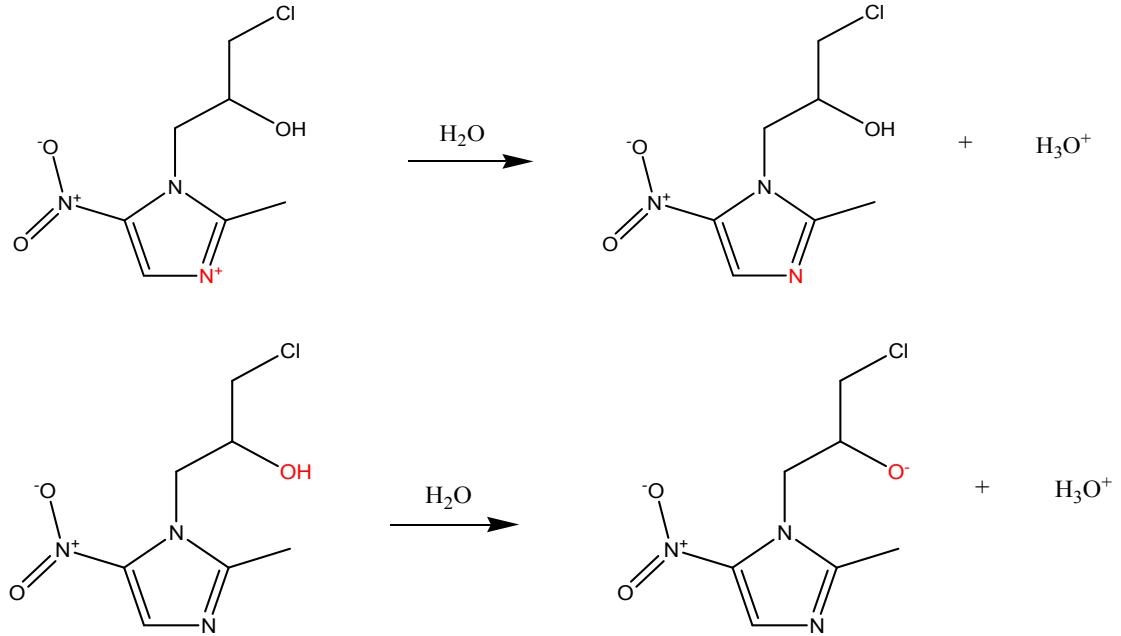
Mikonazol için iyonlaşma şeması Şekil 4.4’de verilmiştir. Mikonazolun SPARC programı ile hesaplanan  $pK_a$  değeri 5,57 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 6,66 (0,12) dır.



**Şekil 4.4.** Protonlanmış mikonazol iyonlaşma şeması

#### Ornidazol için iyonlaşma sabiti

Ornidazol için iyonlaşma şeması iki aşamalı olarak Şekil 4.5’de verilmiştir. Ornidazolun SPARC programı ile hesaplanan pK<sub>a</sub> değerleri 2,08 ve 12,47 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 2,72 (0,35) dir.

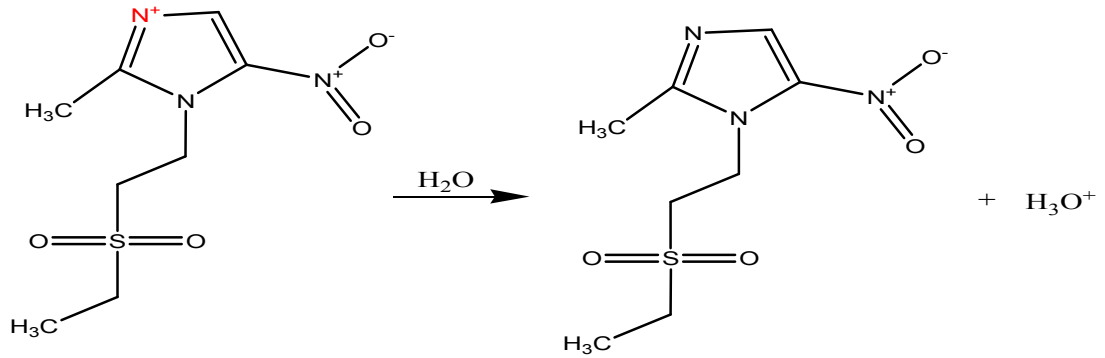


**Şekil 4.5.** Protonlanmış ornidazol iyonlaşma şeması

#### Tinidazol için iyonlaşma sabiti

Tinidazol için iyonlaşma şeması Şekil 4.6’de verilmiştir. Tinidazolun SPARC programı ile hesaplanan pK<sub>a</sub> değeri 1,59 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 2,30 (0,34) dur.

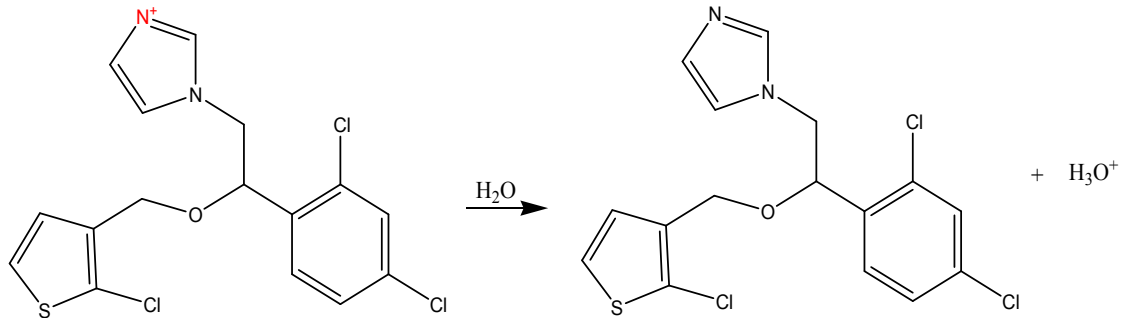




**Şekil 4.6.** Protonlanmış tinidazol iyonlaşma şeması

#### Tiokonazol için iyonlaşma sabiti

Tiokonazol için iyonlaşma şeması Şekil 4.7’de verilmiştir. Tiokonazolun SPARC programı ile hesaplanan  $pK_a$  değeri 5,60 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 6,71 (0,12) dir.



**Şekil 4.7.** Protonlanmış tiokonazol iyonlaşma şeması

#### Fentikonazol için iyonlaşma sabiti

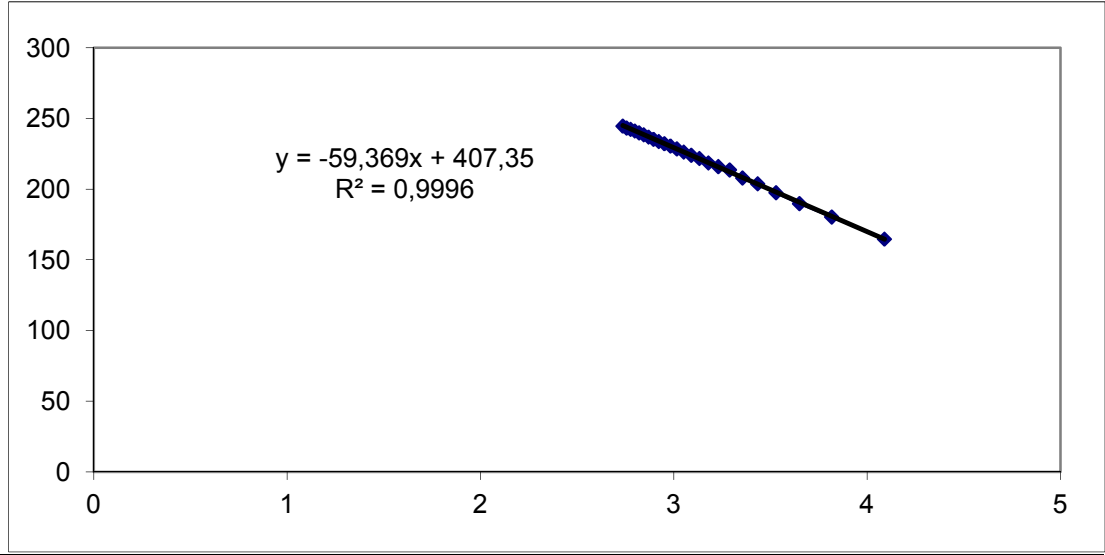
ACD Lab değeri ise 6,69 (0,12) dur.

## 4.2. İlaçların Spektroskopik Yöntemle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

### Su ortamında titrasyonlar

Fentikonazol, itrakonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol, ornidazol, tinidazol ve tiokonazol su ortamında spektroskopik titrasyonları yapılarak  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon için  $2 \cdot 10^{-3}$  M potasyum asit fitalat çözeltisi su ortamında hazırlanarak 0,025 M KOH ile titre edilerek ayarlanmıştır. Ayarlı KOH çözeltisi ile

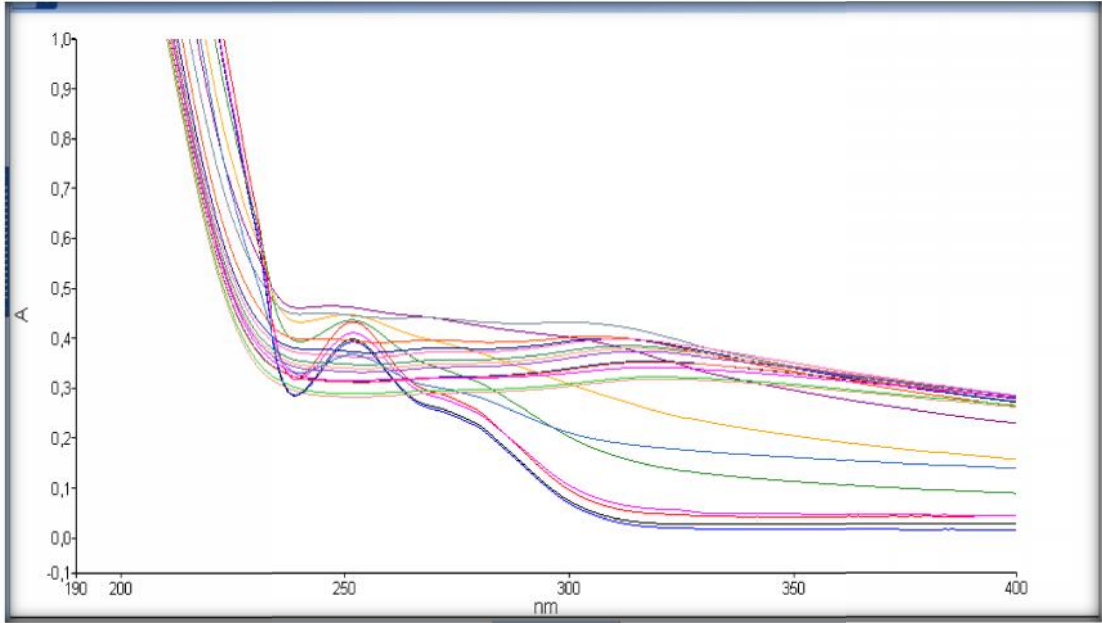
HCl (30 mL) çözeltisi (0,1 M KCl) titre edilerek  $E_0$  ve eğim değerleri hesaplanmıştır. Bu deney üç kez tekrar edilerek üç deneyin ortalaması alınmıştır. Aşağıda, örnek olarak KOH-HCl titrasyonu için çizilen pH- mV grafiği verilmiştir. Bu grafikten görüleceği üzere eğim 59,369;  $E_0$  ise 407,35' dir.



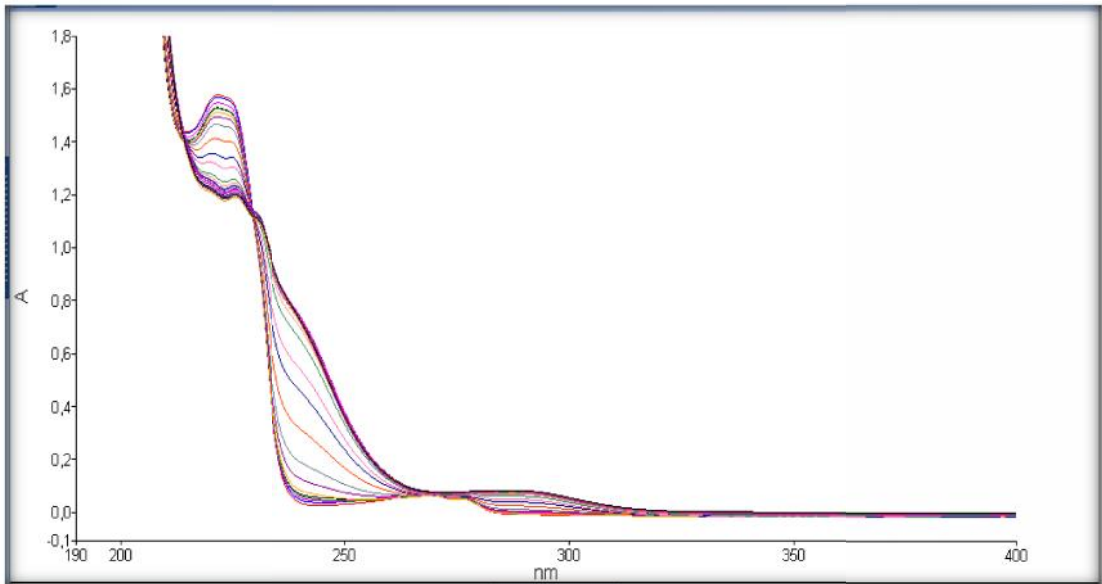
**Şekil 4.8.** Su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği

Spektrofotometrik yöntemde bileşikler pH 1-9 arası titre edilmiş ve yaklaşık 25 (0,3 pH birimi aralığı ile) spektrum taraması alınmıştır.

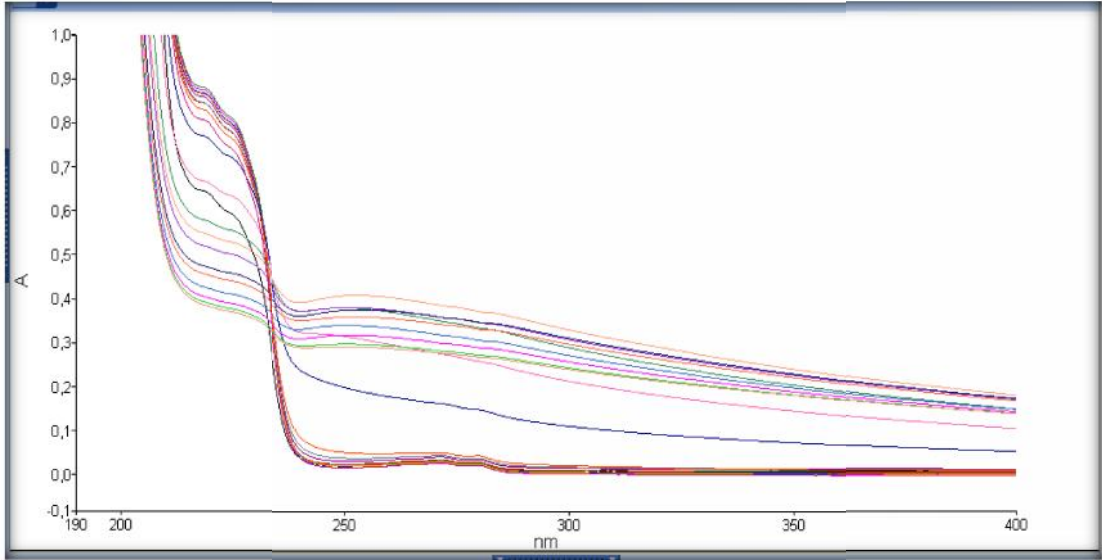
Farklı pH'larda spektrum taramaları aşağıda verilmiştir.



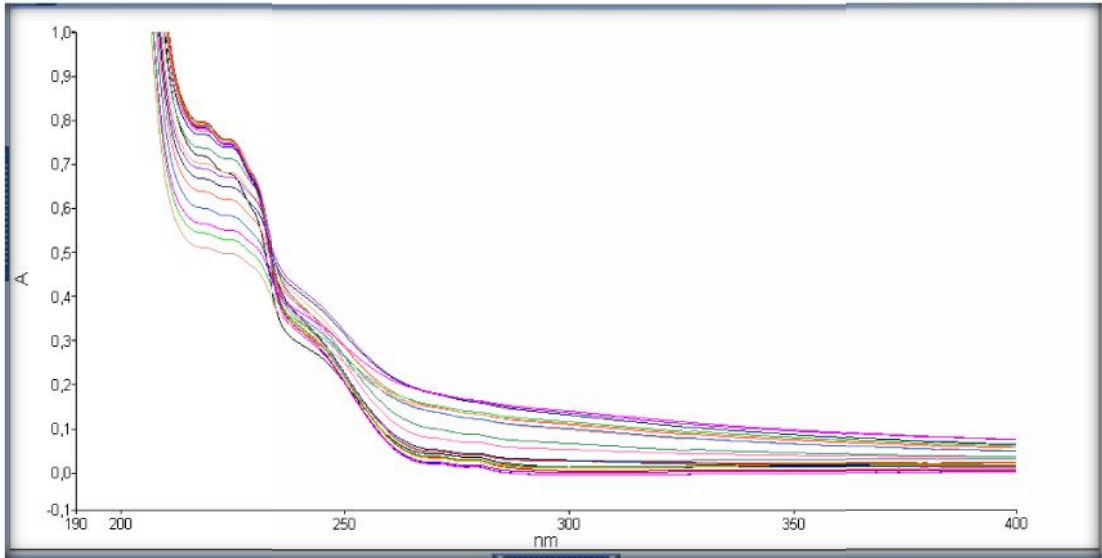
Şekil 4.9. Su ortamında fentikonazol için elde edilen spektrum taraması



Şekil 4.10. Su ortamında ketokonazol için elde edilen spektrum taraması



**Şekil 4.11.** Su ortamında mikonazol için elde edilen spekturum taraması



**Şekil 4.12.** Su ortamında tiokonazol için elde edilen spekturum taraması

Verilerin değerlendirilmesinde STAR (Beltran vd., 1993) programı kullanılmıştır. Bu program, her bir spektrum ve dalga boyu için deneysel ve hesaplanan absorbans değerleri arasında minimum farkı elde edene kadar, Gauss-Newton algoritmasını kullanarak, iyonlaşma sabitlerini hesaplar. Kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

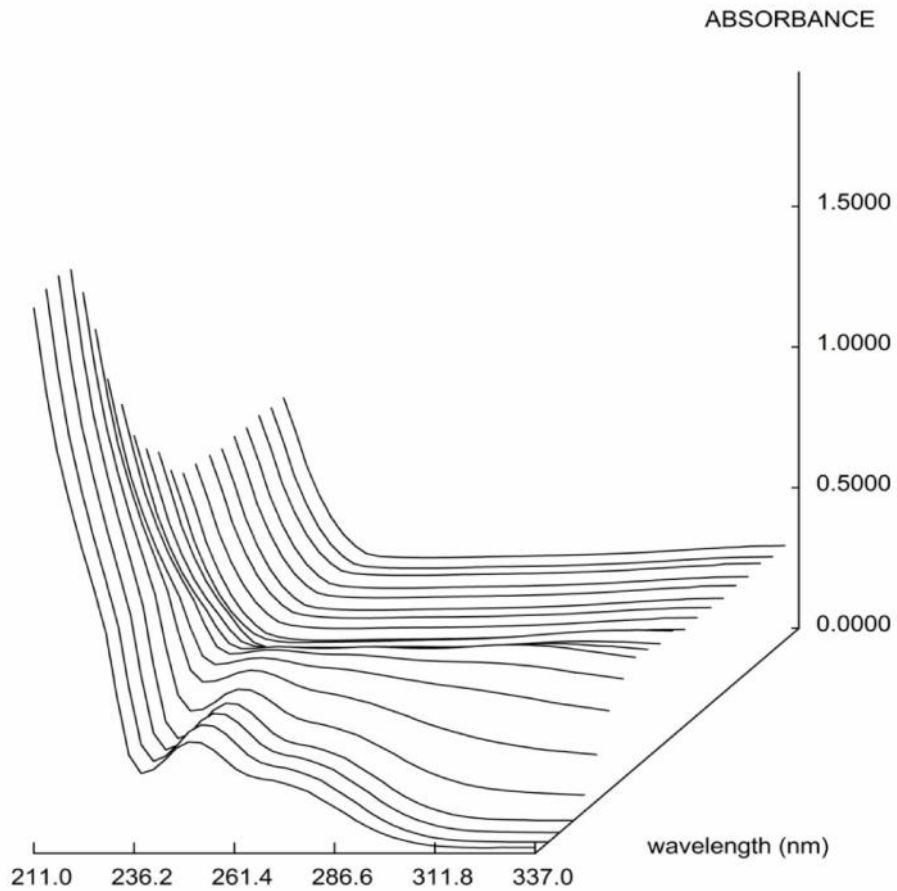
ns nw

$$U_{\text{abs}} = \sum_{i=1} \sum_{j=1} (A_{i,j,\text{exp}} - A_{i,j,\text{calc}})^2 \quad (4.1)$$

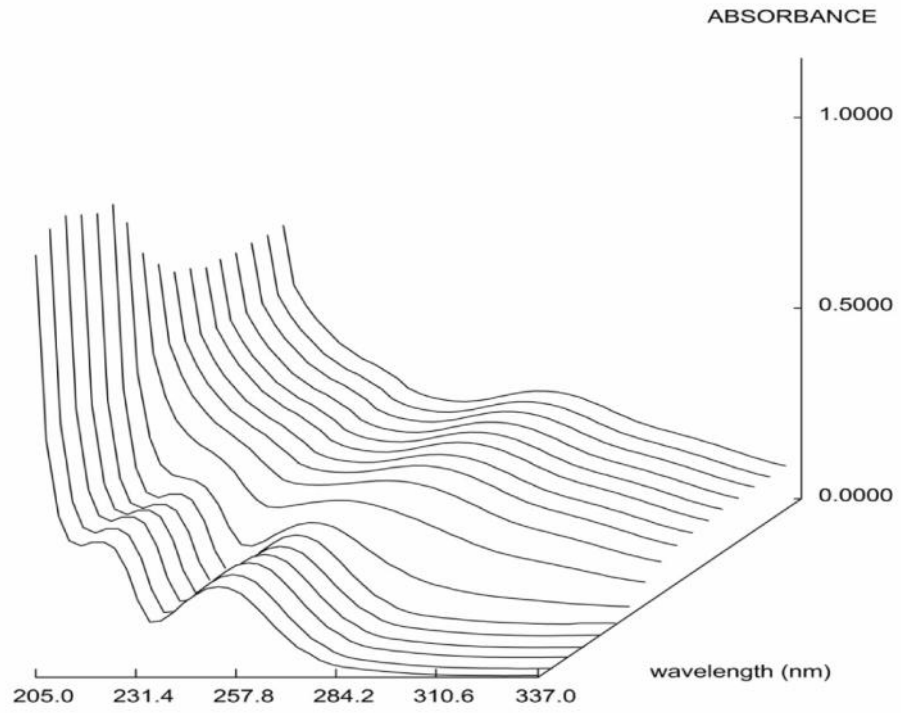
$i=1$   $j=1$

Burada ns ve mw sırasıyla spektrum ve dalga boyunun sayısını,  $A_{i,j,\text{exp}}$  ve  $A_{i,j,\text{calc}}$ , spektrum  $i$ 'deki  $j$  dalga boyu için deneysel ve hesaplanan absorbans değerlerini gösterir. Hesaplanan absorbans değerleri üç basamakla elde edilir: Program önce tahmin edilen iyonlaşma sabiti ve deneysel şartlara göre her bir spektrum için kütle denkliklerini çözer. Sonra çoklu lineer regresyon prosedürü, her bir bilinmeyen türün molar absorbansını tayin eder ve son olarak da absorbans değerleri, tahmin edilen türlerin derişimi ve ilgili olan molar absorbanslardan tekrar hesaplanır.

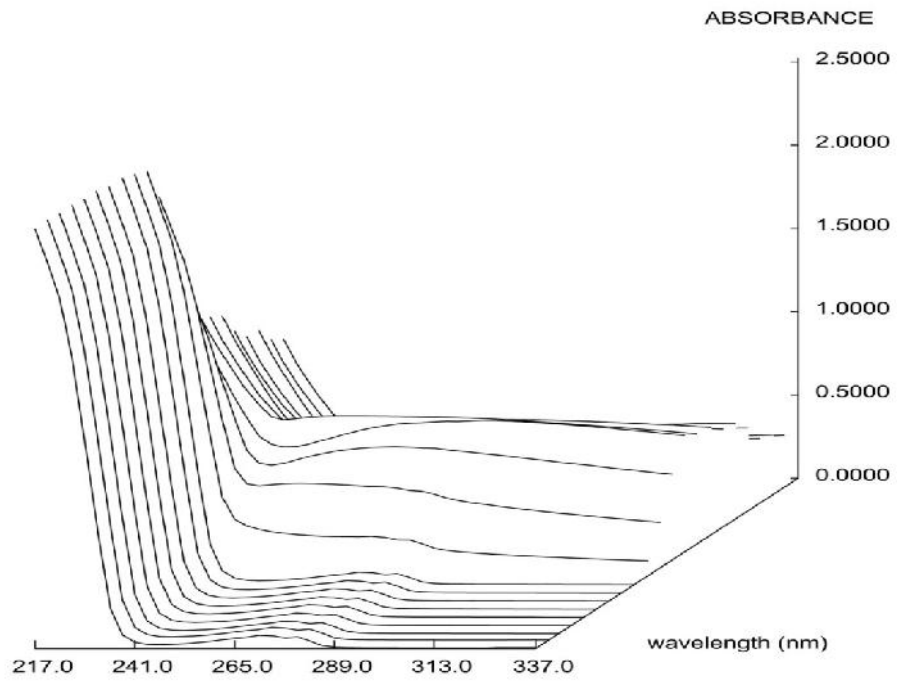
STAR programı ile çizilen grafikler sırası ile aşağıda verilmiştir.



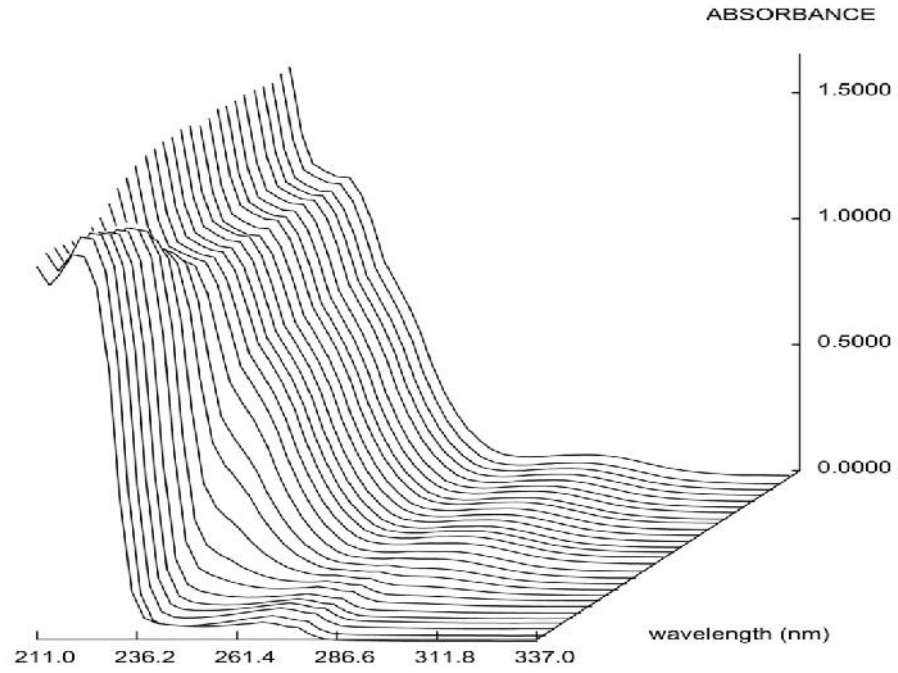
**Şekil 4.13.** Su ortamında fentikonazol için elde edilen STAR grafiği



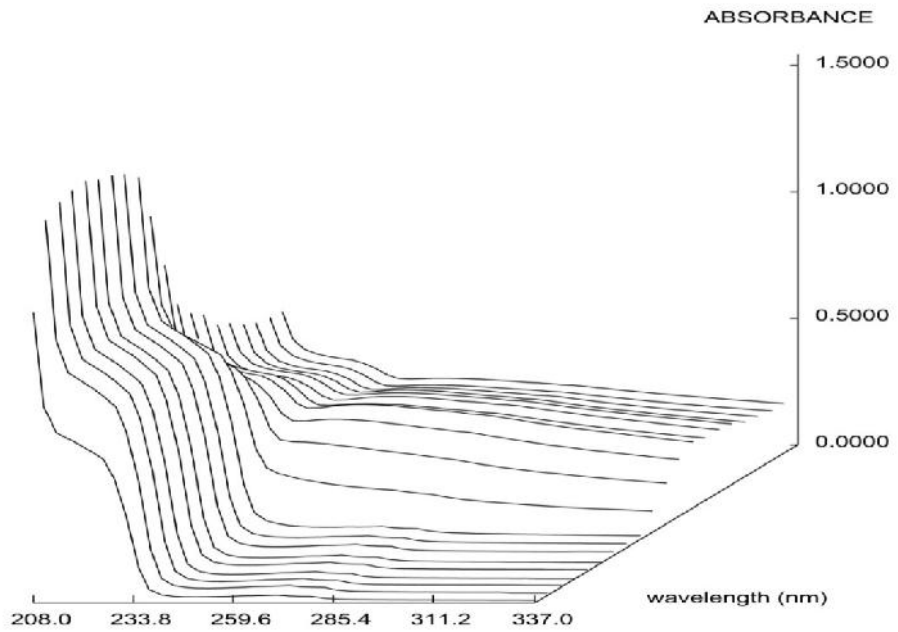
Şekil 4.14. Su ortamında itrakonazol için elde edilen STAR grafiği



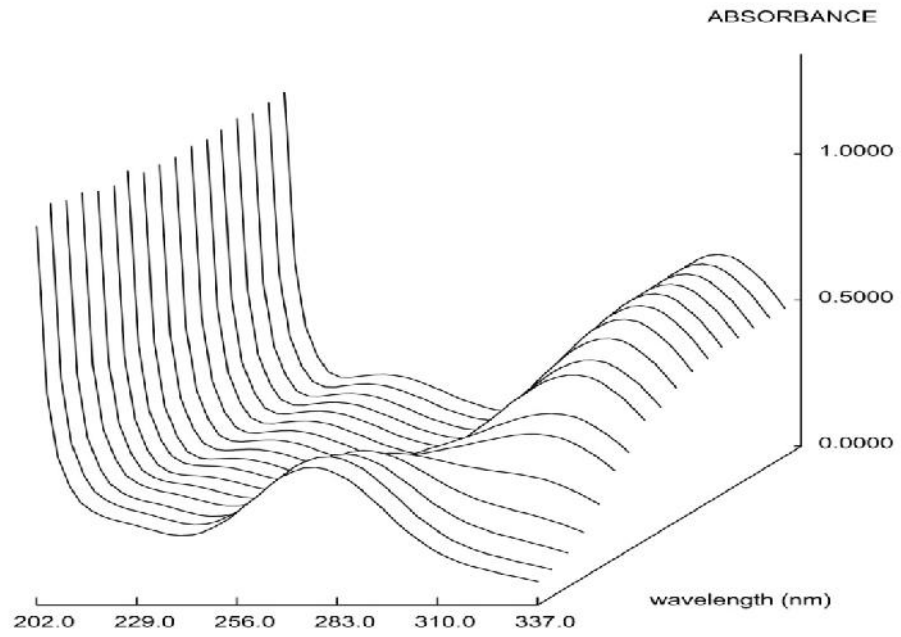
Şekil 4.15. Su ortamında izokonazol nitrat için elde edilen STAR grafiği



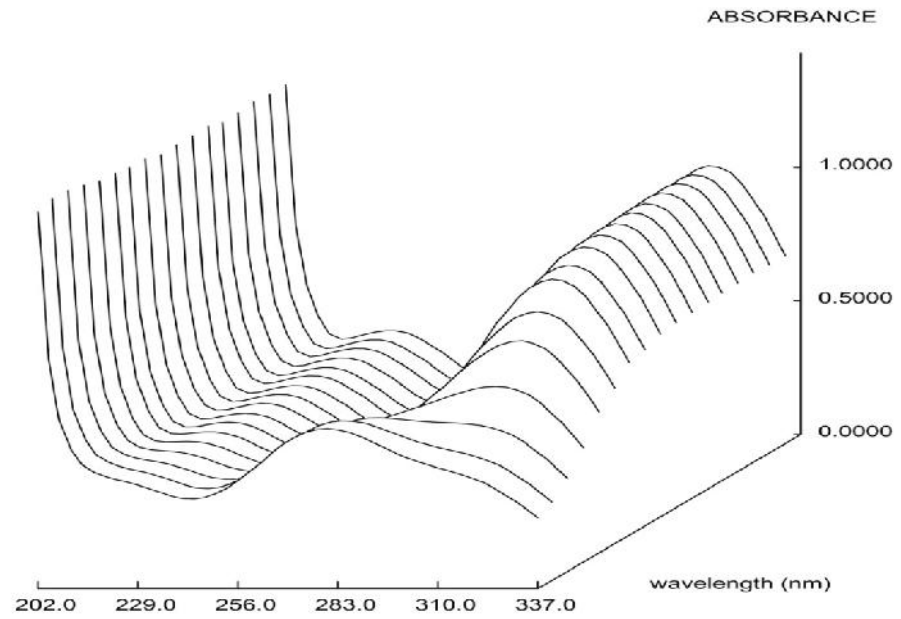
Şekil 4.16. Su ortamında ketokonazol için elde edilen STAR grafiği



Şekil 4.17. Su ortamında mikonazol için elde edilen STAR grafiği

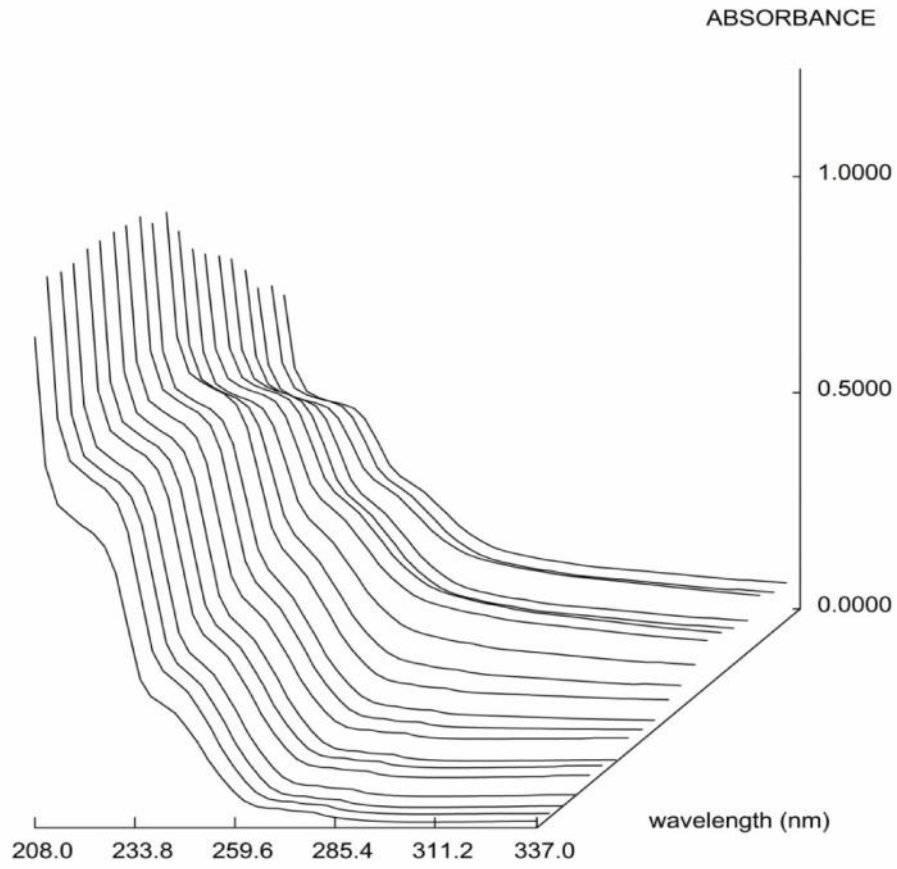


Şekil 4.18. Su ortamında ornidazol için elde edilen STAR grafiği



Şekil 4.19. Su ortamında tinidazol için elde edilen STAR grafiği

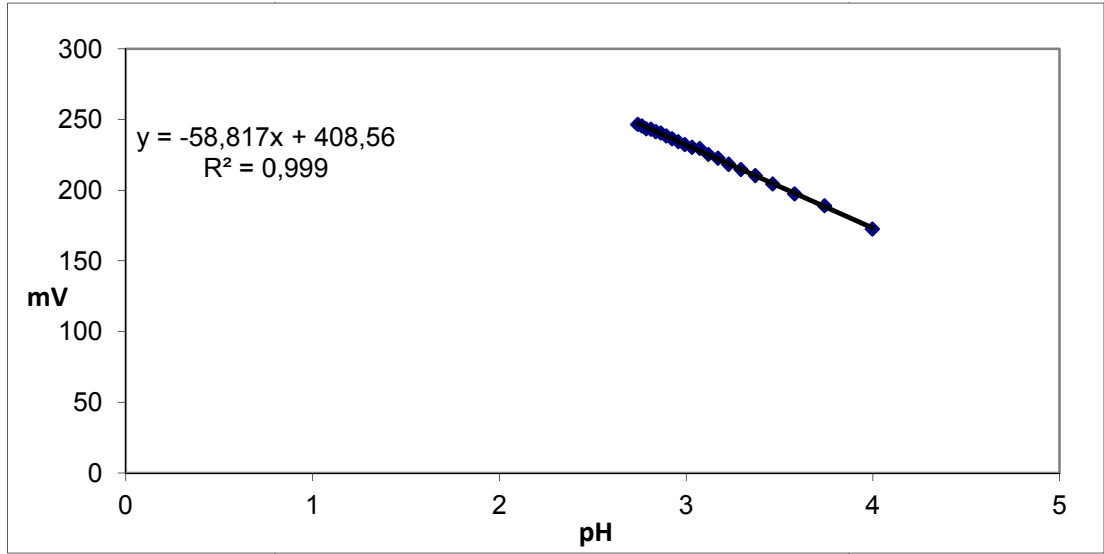




**Şekil 4.20.** Su ortamında tiokonazol için elde edilen STAR grafiği

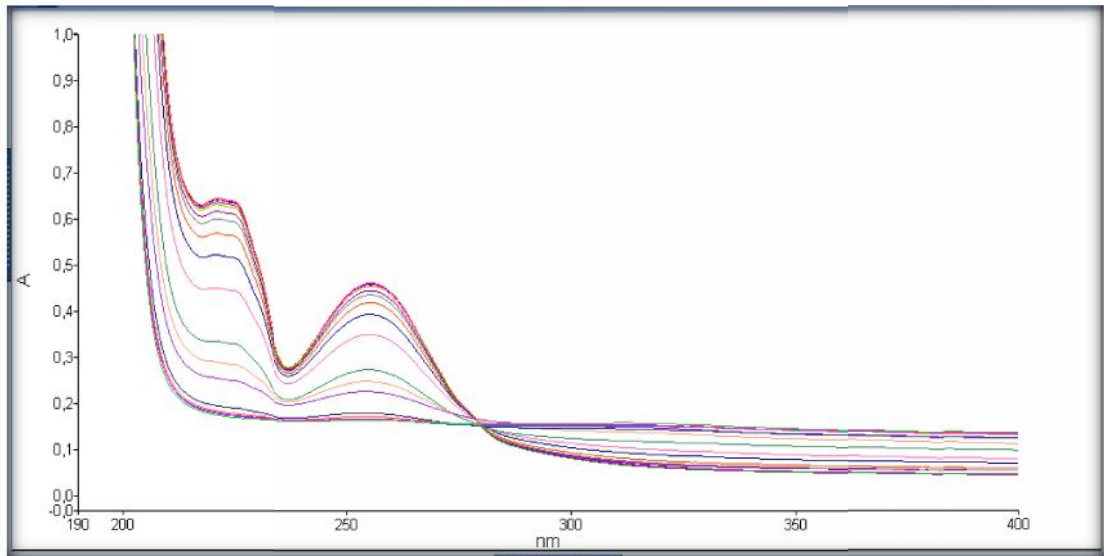
#### % 10 ACN-su (h/h) Karışımında Titrasyonlar

Fentikonazol, itrakonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol, ornidazol, tinidazol ve tiokonazol %10 (h/h) su-asetonitril ikili karışımlarında spektroskopik titrasyonları yapılarak su-asetonitril karışımında  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon için  $2 \cdot 10^{-3}$  M potasyum asit fitalat çözeltisi %10 ACN-su ortamında hazırlanarak 0,025 M KOH ile titre edilerek ayarlanmıştır. Ayarlı KOH çözeltisi ile HCl (30 mL) çözeltisi (0,1 M KCl) titre edilerek  $E_0$  ve eğim değerleri hesaplanmıştır. Bu deney üç kez tekrar edilerek üç deneyin ortalaması alınmıştır. Aşağıda, örnek olarak KOH-HCl titrasyonu için çizilen pH- mV grafiği verilmiştir. Bu grafikten görüleceği üzere eğim 58,817;  $E_0$  ise 408,56' dır.

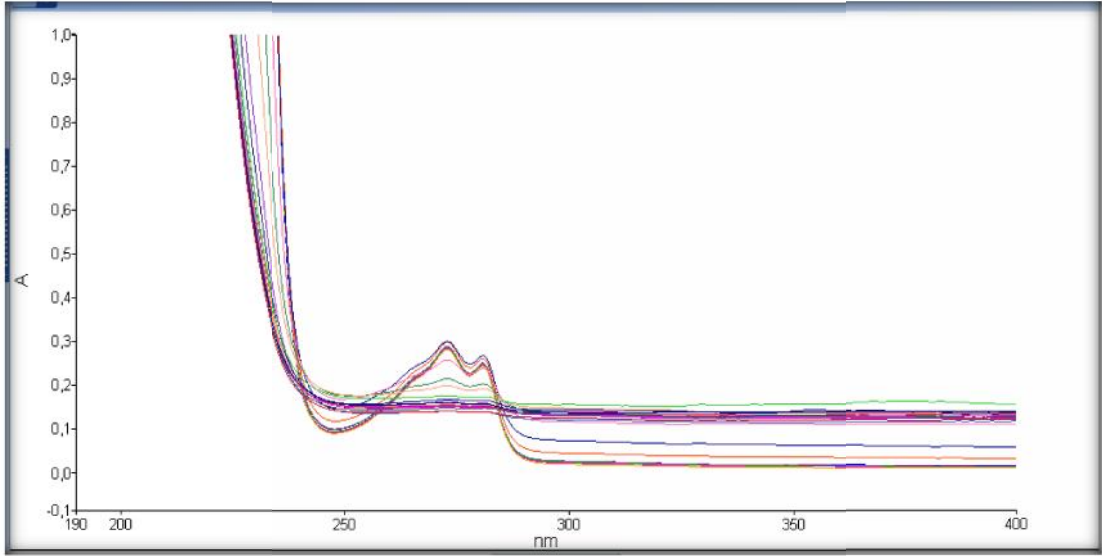


**Şekil 4.21.** % 10 ACN-su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği

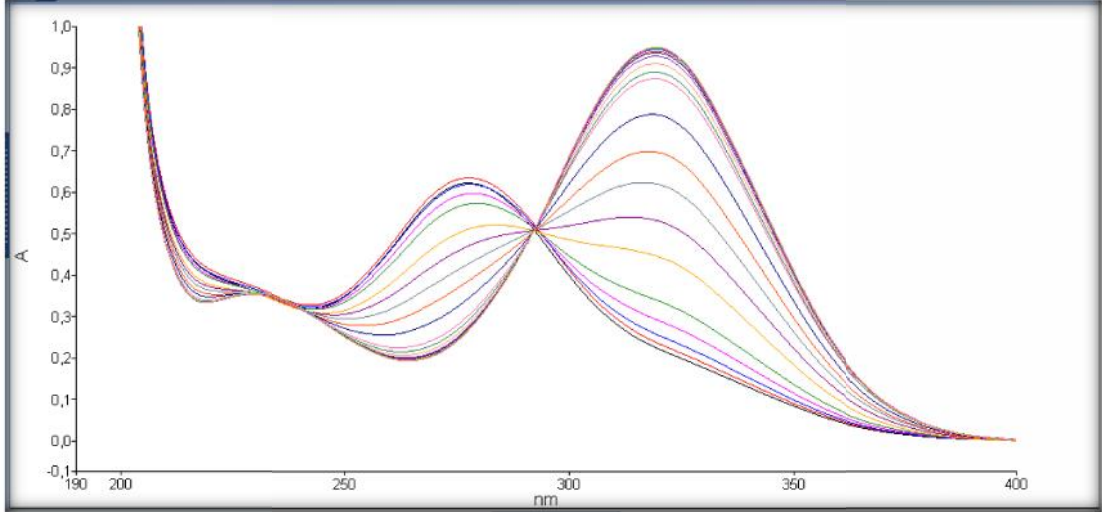
Farklı pH'larda spekturum taramaları aşağıda verilmiştir.



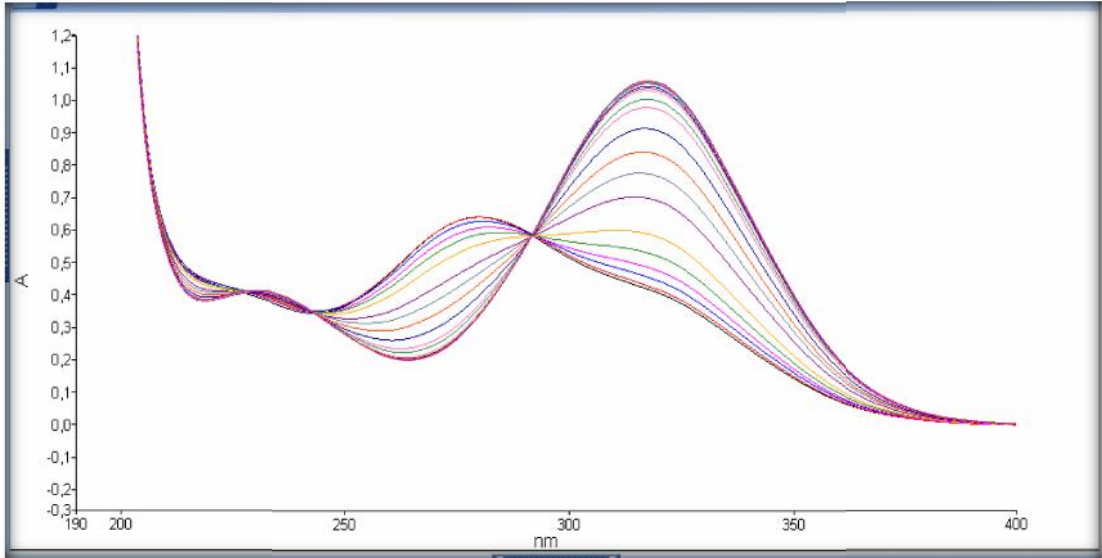
**Şekil 4.22.** %10 ACN-su (h/h) ortamında itraconazol için elde edilen spekturum taraması



**Şekil 4.23.** %10 ACN-su (h/h) ortamında izokonazol için elde edilen spekturum taraması

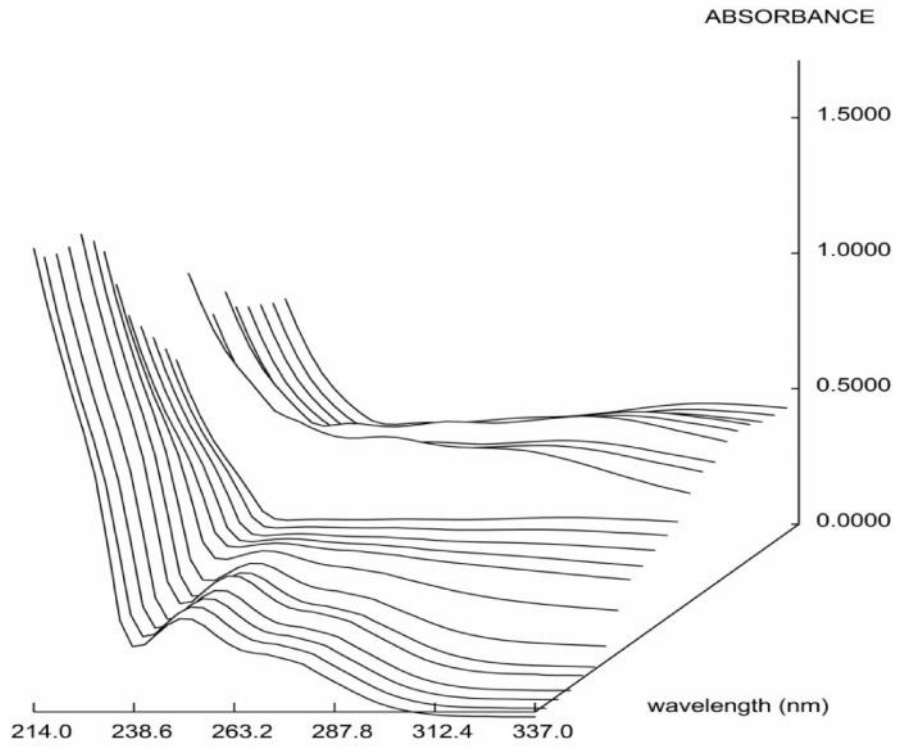


**Şekil 4.24.** %10 ACN-su (h/h) ortamında ornidazol için elde edilen spekturum taraması

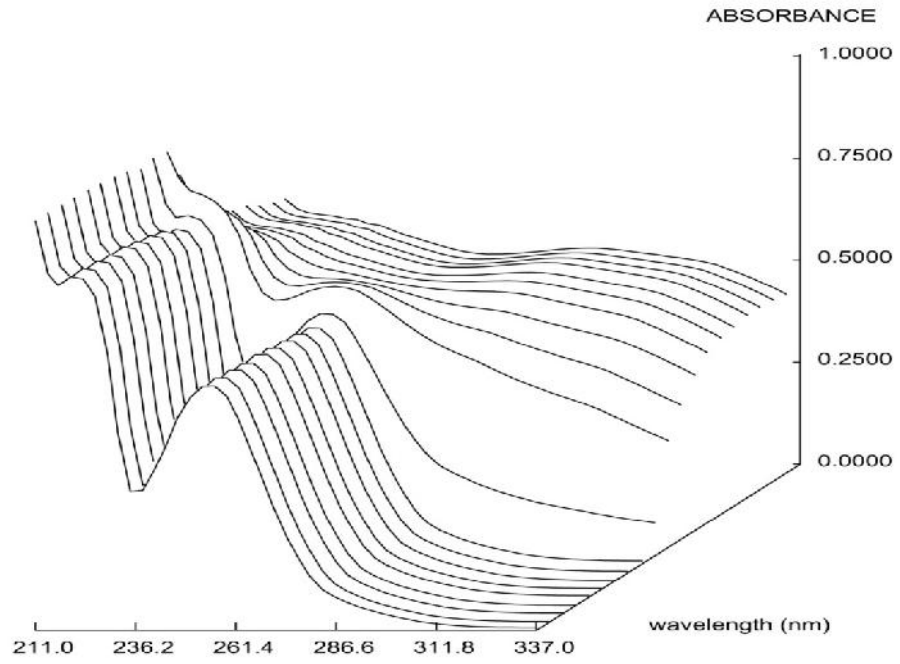


**Şekil 4.25.** %10 ACN-su (h/h) ortamında tinidazol için elde edilen spekttrum taraması

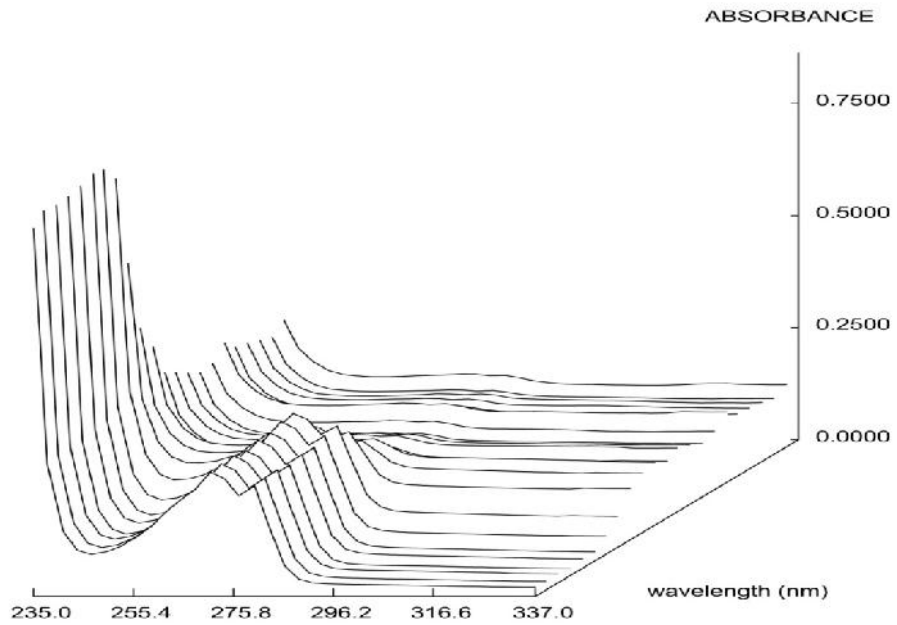
STAR programı ile çizilen grafikler sırası ile aşağıda verilmiştir.



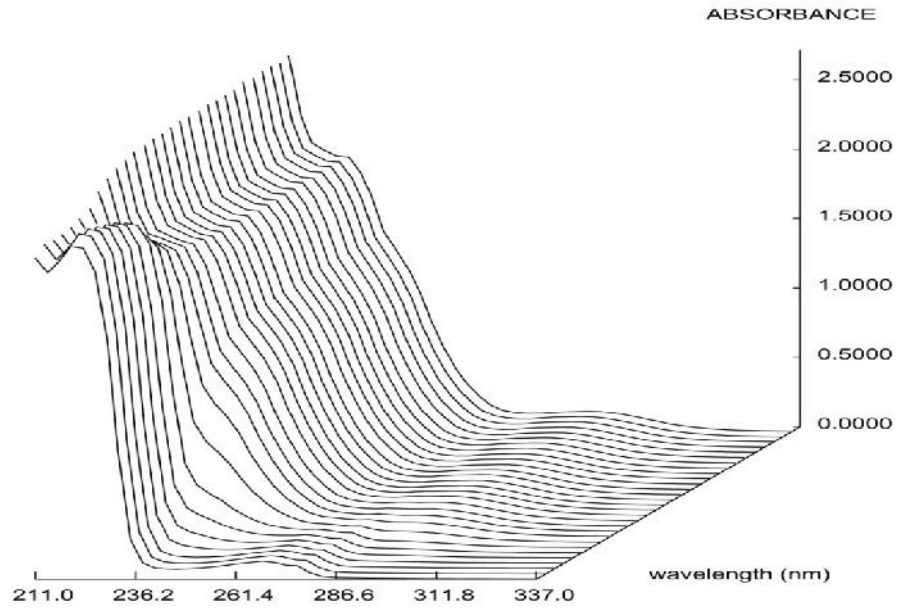
**Şekil 4.26.** %10 ACN-su (h/h) ortamında fentikonazol için elde edilen STAR grafiği



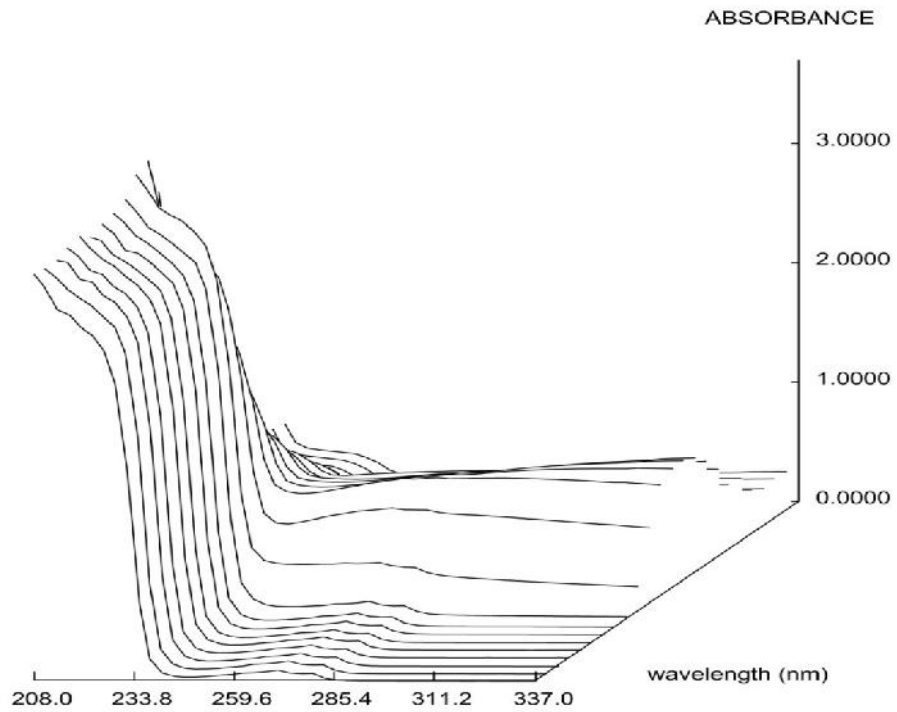
Şekil 4.27. %10 ACN-su (h/h) ortamında itrakonazol için elde edilen STAR grafiği



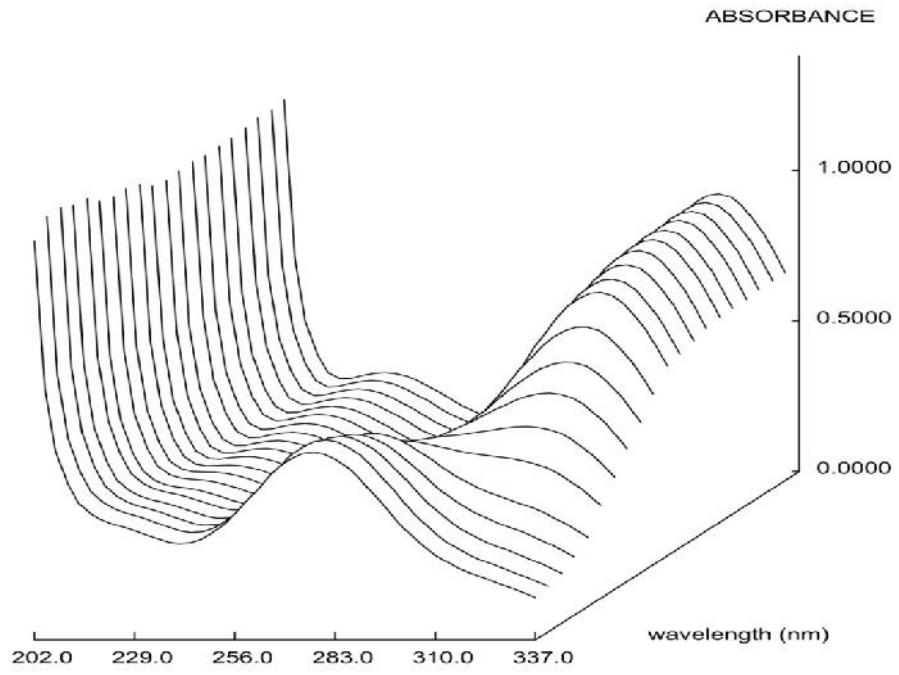
Şekil 4.28. %10 ACN-su (h/h) ortamında izokonazol için elde edilen STAR grafiği



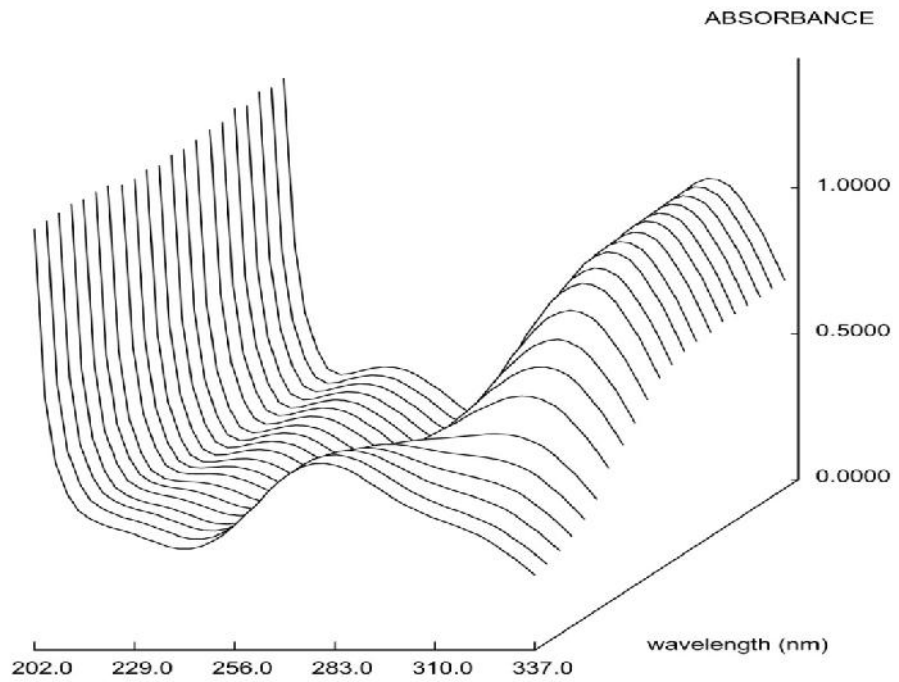
Şekil 4.29. %10 ACN-su (h/h) ortamında ketokonazol için elde edilen STAR grafiği



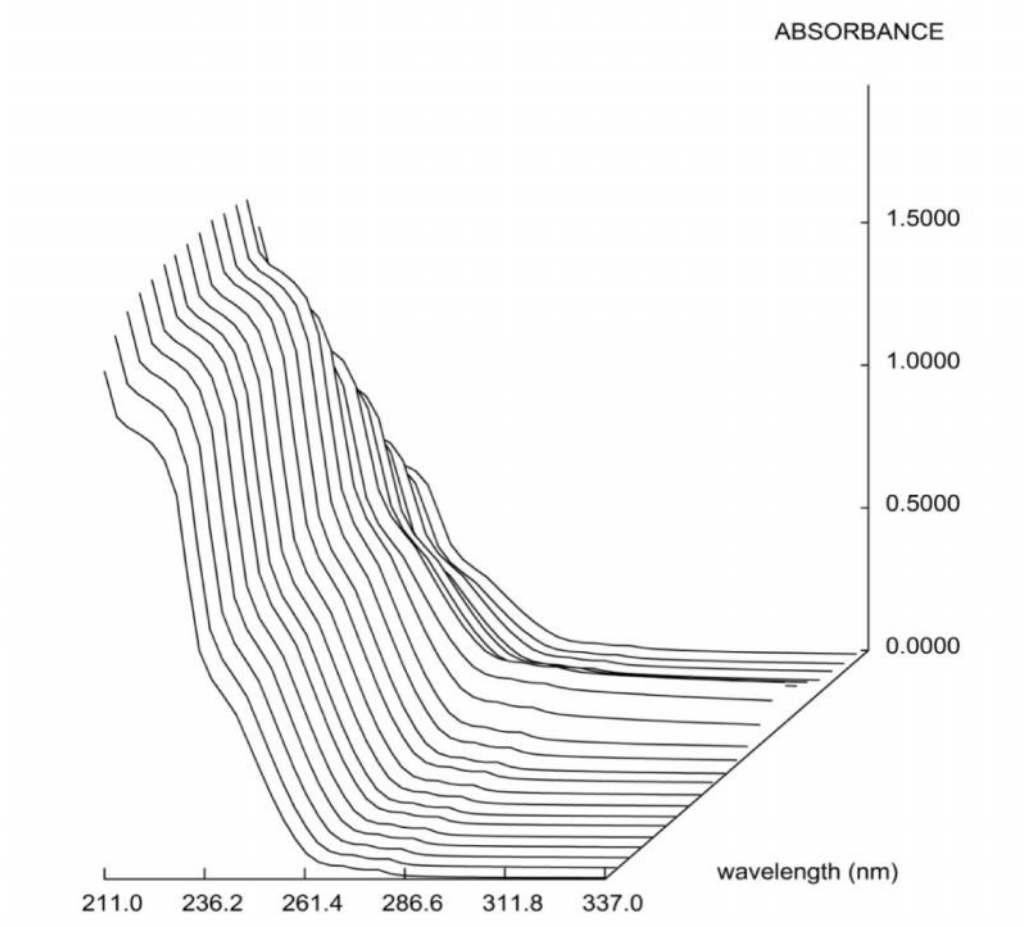
Şekil 4.30. %10 ACN-su (h/h) ortamında mikonazol için elde edilen STAR grafiği



Şekil 4.31. %10 ACN-su (h/h) ortamında ornidazol için elde edilen STAR grafiği



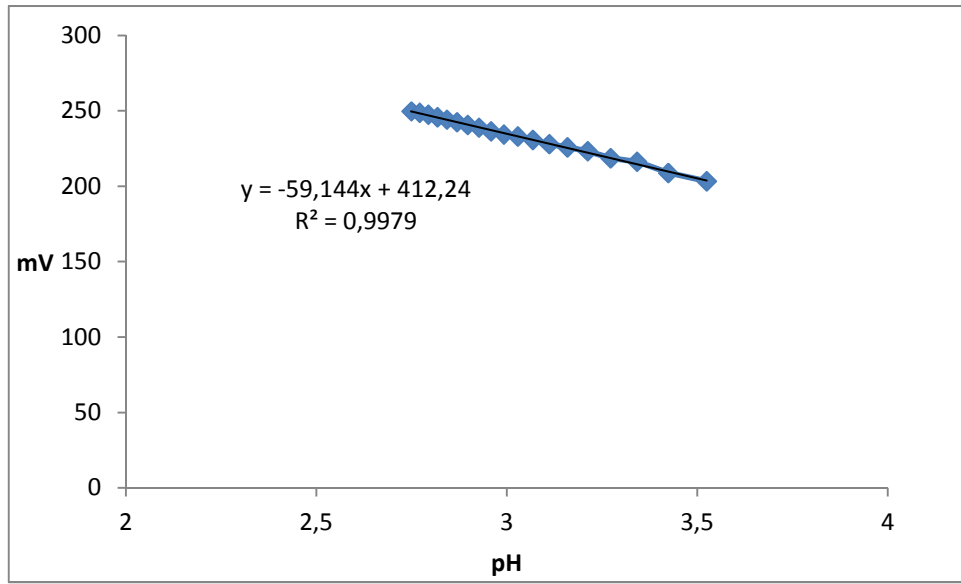
Şekil 4.32. %10 ACN-su (h/h) ortamında tinidazol için elde edilen STAR grafiği



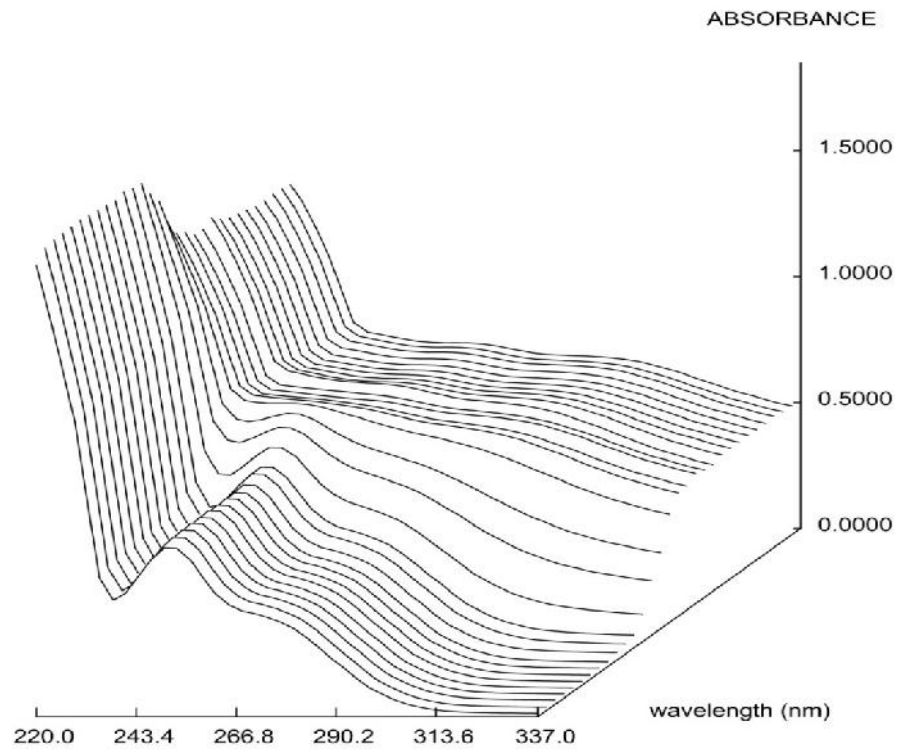
**Şekil 4.33.** %10 ACN-su (h/h) ortamında tiokonazol için elde edilen STAR grafiği  
% 20 ACN-su (h/h) karışımında titrasyonlar

Fentikonazol, itrakonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol, ornidazol, tinidazol ve tiokonazol %20 (h/h) su-asetonitril ikili karışımlarında spektroskopik titrasyonları yapılarak su-asetonitril karışımında pKdeğerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon için  $2 \cdot 10^{-3}$  M potasyum asit fitalat çözeltisi %20 ACN-su ortamında hazırlanarak 0,025 M KOH ile titre edilerek ayarlanmıştır. Ayarlı KOH çözeltisi ile HCl (30 mL) çözeltisi (0,1 M KCl) titre edilerek  $E_0$  ve eğim değerleri hesaplanmıştır. Bu deney üç kez tekrar edilerek üç deneyin ortalaması alınmıştır. Aşağıda, örnek olarak KOH-HCl titrasyonu için çizilen pH- mV grafiği verilmiştir. Bu grafikten görüleceği üzere eğim 59,144;  $E_0$  ise 412,24' dir.

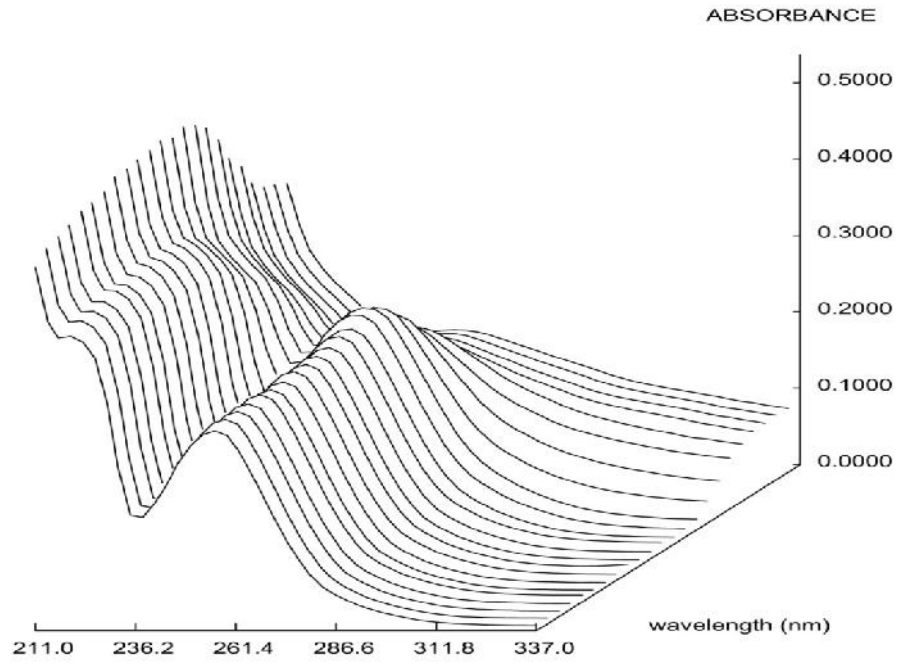




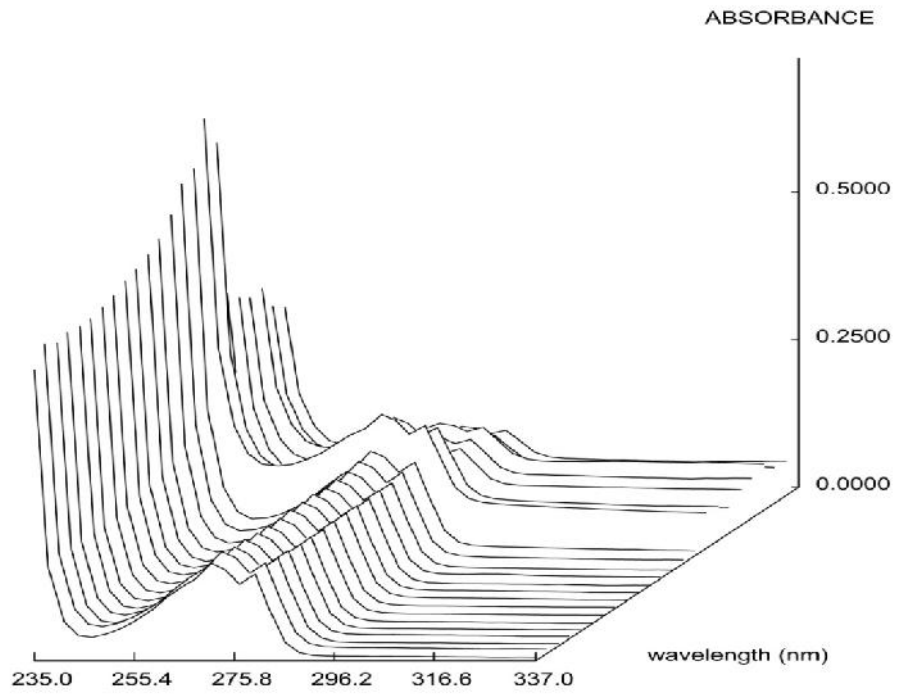
**Şekil 4.34.** % 20 ACN-su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği  
STAR programı ile çizilen grafikler sırası ile aşağıda verilmiştir.



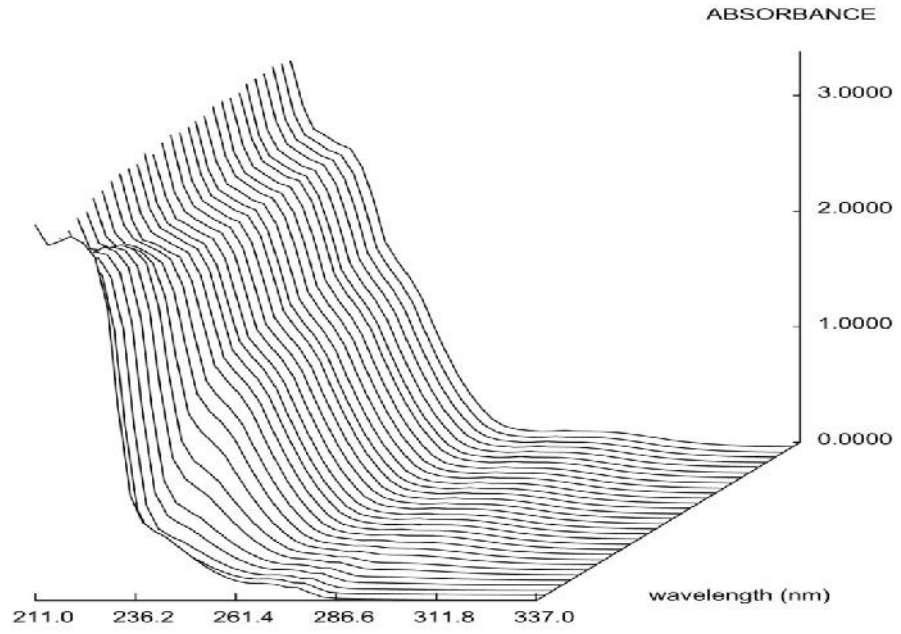
**Şekil 4.35.** %20 ACN-su (h/h) ortamında fentikonazol için elde edilen STAR grafiği



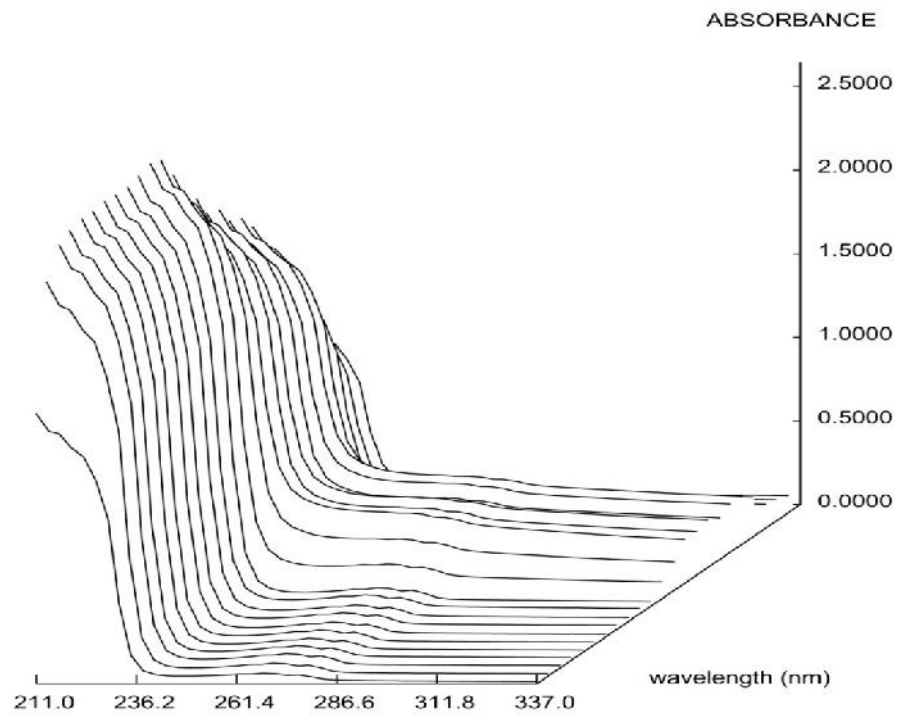
**Şekil 4.36.** %20 ACN-su (h/h) ortamında itrakonazol için elde edilen STAR grafiği



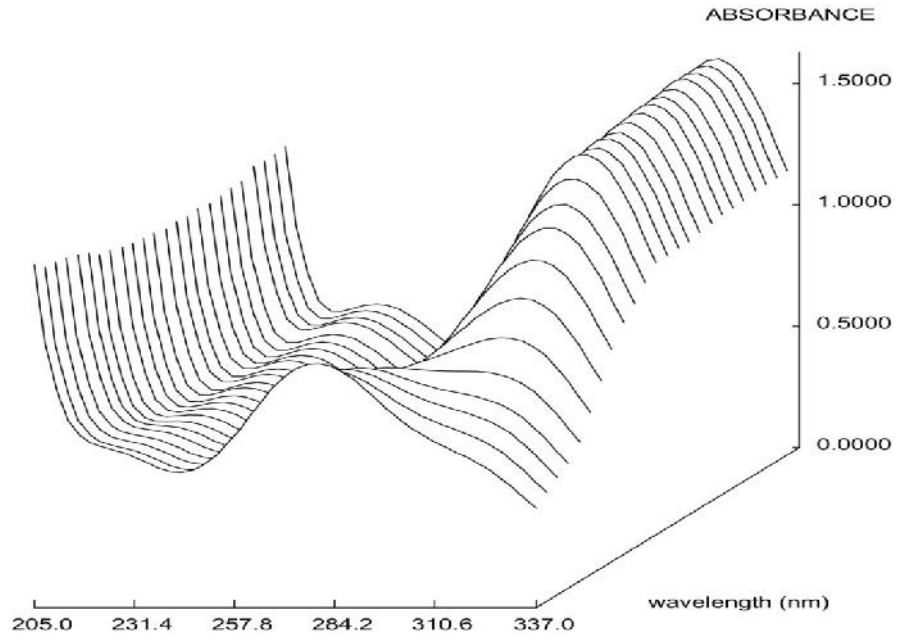
**Şekil 4.37.** %20 ACN-su (h/h) ortamında izokonazol için elde edilen STAR grafiği



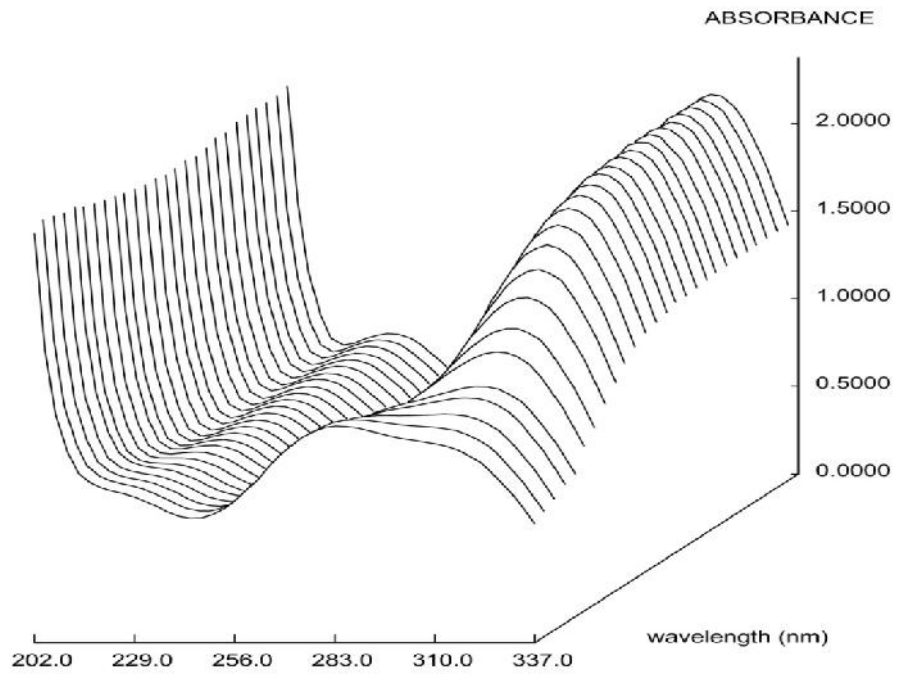
Şekil 4.38. %20 ACN-su (h/h) ortamında ketokonazol için elde edilen STAR grafiği



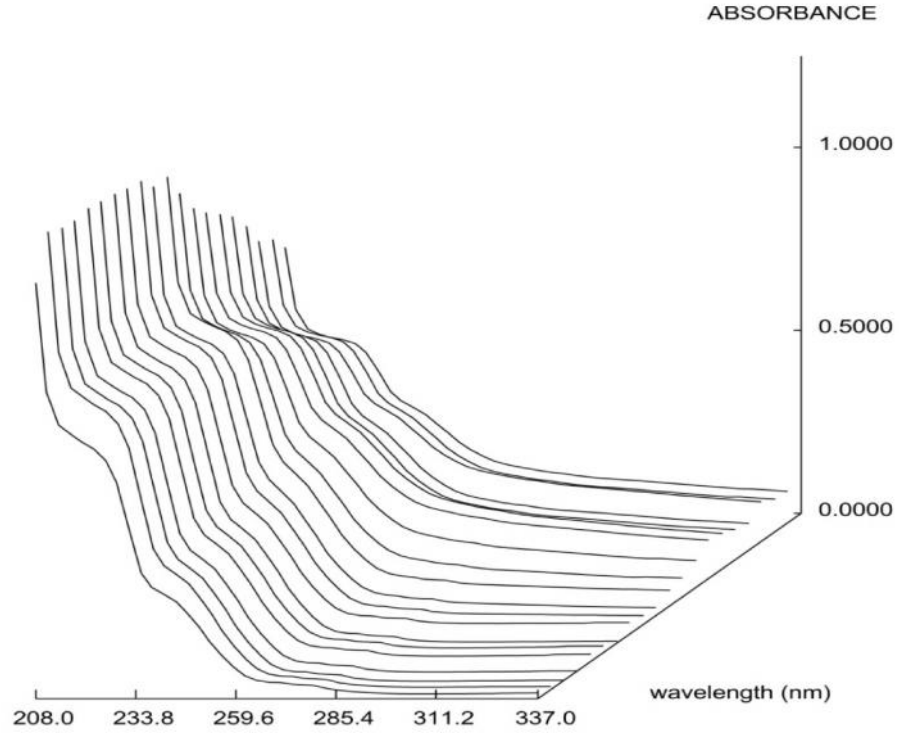
Şekil 4.39. %20 ACN-su (h/h) ortamında mikonazol için elde edilen STAR grafiği



**Şekil 4.40.** %20 ACN-su (h/h) ortamında ornidazol için elde edilen STAR grafiği



**Şekil 4.41.** %20 ACN-su (h/h) ortamında tinidazol için elde edilen STAR grafiği



**Şekil 4.42.** %20 ACN-su (h/h) ortamında tiokonazol için elde edilen STAR grafiği

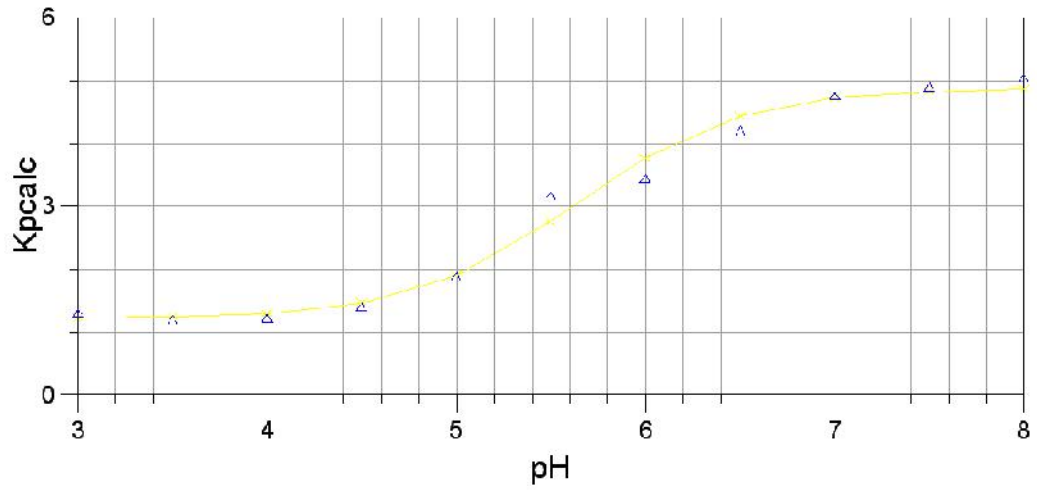
### 4.3. HPLC Yöntemiyle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

Bu bölümde fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazol su-asetonitril ikili karışımları kullanılarak gerçekleştirilen sıvı kromatografik çalışmalarında hareketli fazın pH'sına karşı kapasite faktörlerinin grafikleri aşağıda verilmiştir. Bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde NLREG programı kullanılmıştır (Sherrod, 2003). Çalışılan bileşiklerin NLREG grafikleri, %65, %70 (h/h) asetonitril-su karışımında elde edilmiştir. Çalışmada kolonun da pH sınırlaması göz önüne alınarak pH 3,0-8,0 aralığı seçilmiştir.

Çalışılan bileşiklerin % 65(h/h) asetonitril - su ikili karışımında HPLC yöntemi ile tayini

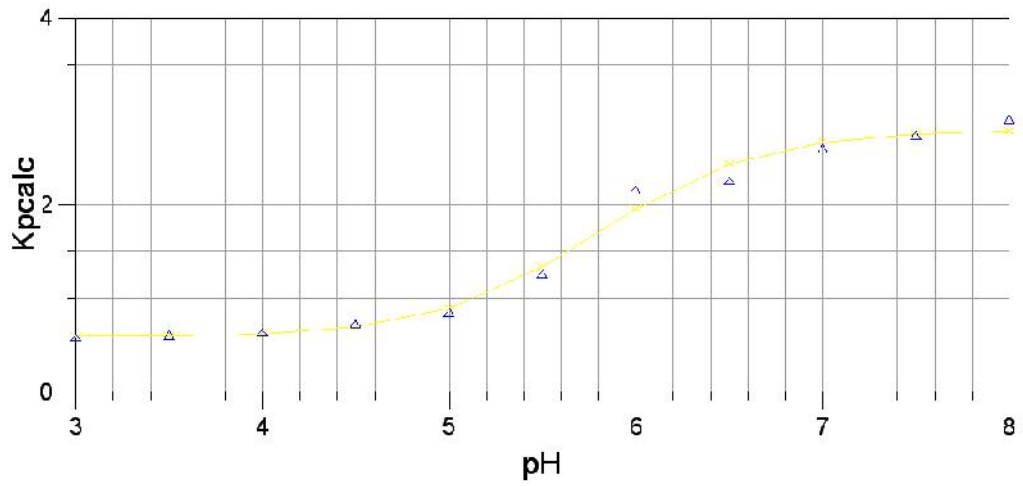
Fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazol için %65 (h/h) su-asetonitril ikili karışımlarında pH 3,0-8,0 aralığında elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 4.43, Şekil 4.44, Şekil 4.45, Şekil 4.46 ve Şekil 4.47 'da verilmektedir.

### pKa determination by k' LC



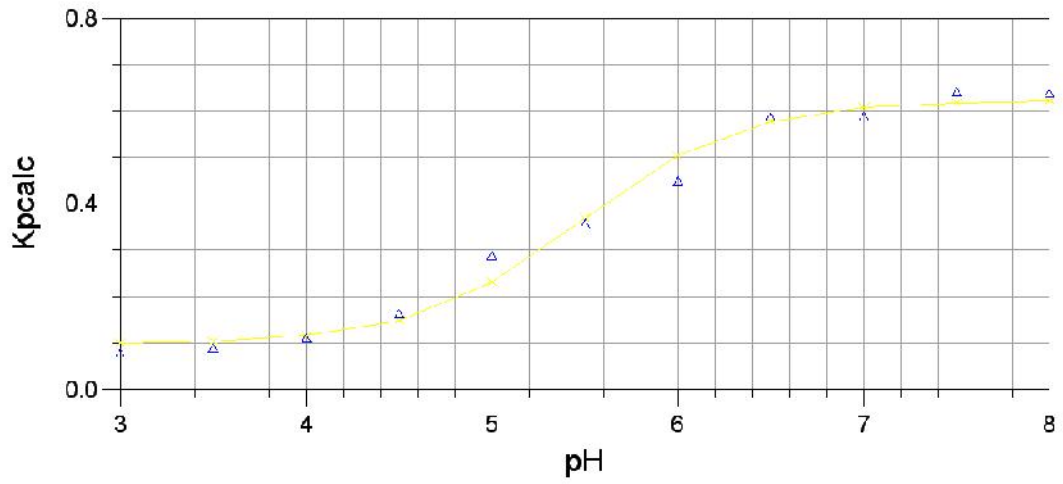
Şekil 4.43. Fentikonazolun %65 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

### pKa determination by k' LC



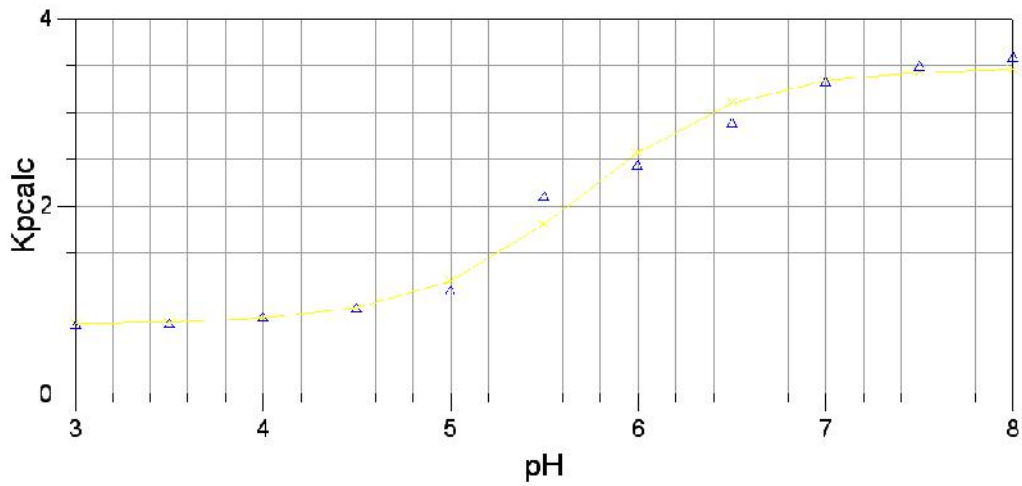
Şekil 4.44. İzokonazolun %65 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

### pKa determination by k' LC



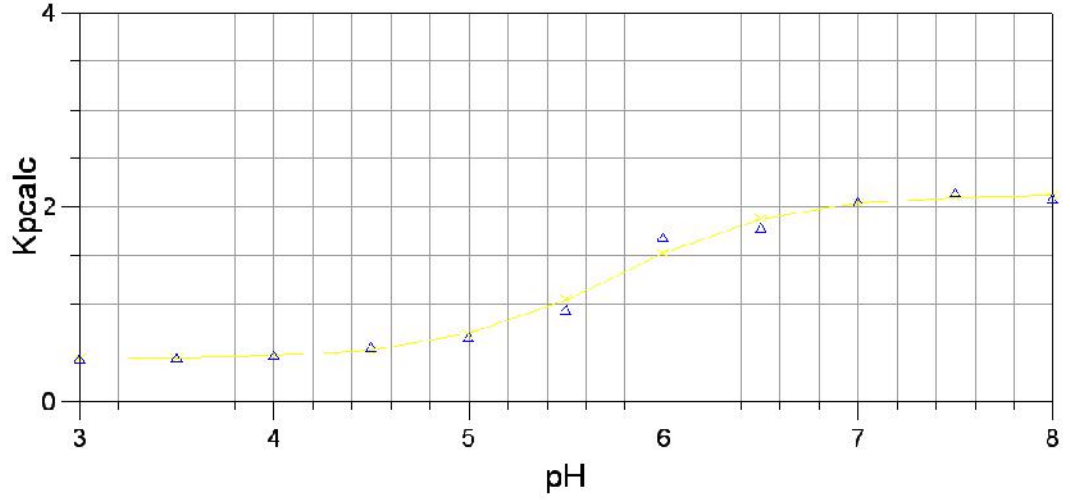
Şekil 4.45. Ketokonazolun %65 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

### pKa determination by k' LC



Şekil 4.46. Mikonazolun %65 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

### pKa determination by k' LC

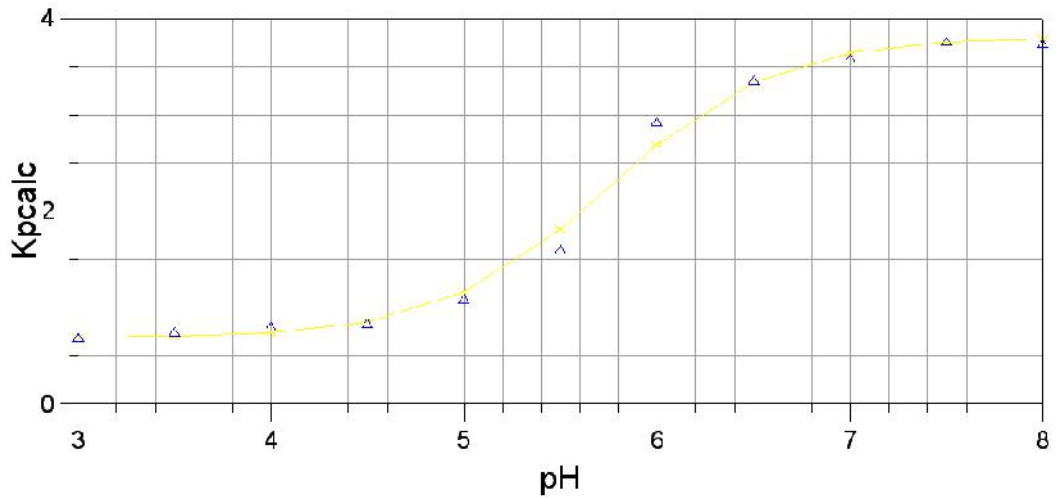


**Şekil 4.47.** Tiokonazolun %65 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

Çalışılan bileşiklerin % 70(h/h) asetonitril - su ikili karışımında HPLC yöntemi ile tayini

Fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazol için %70 (h/h) su-asetonitril ikili karışımlarında pH 3,0-8,0 aralığında elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 4.48, Şekil 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.51 ve Şekil 4.52 'de verilmektedir.

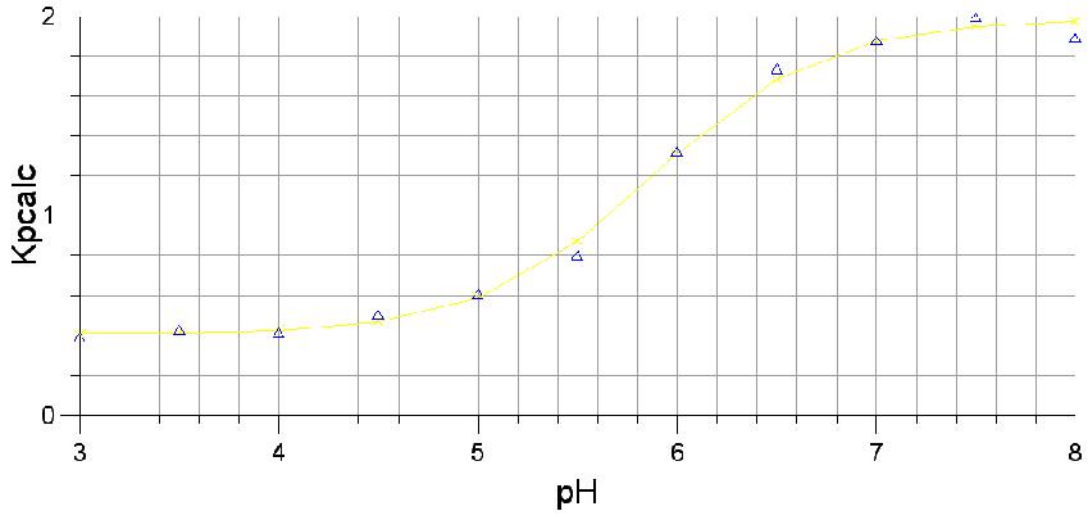
### pKa determination by k' LC



**Şekil 4.48.** Fentikonazolun %70 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

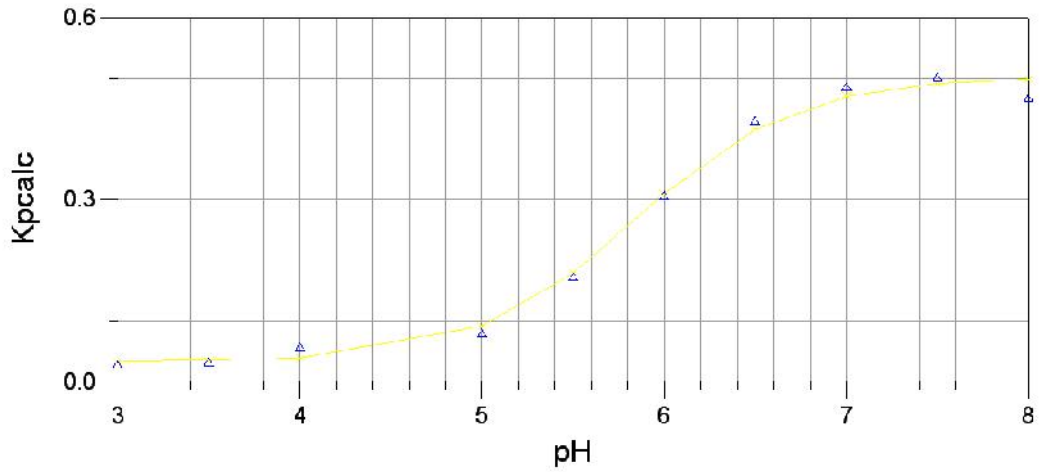


### pKa determination by k' LC



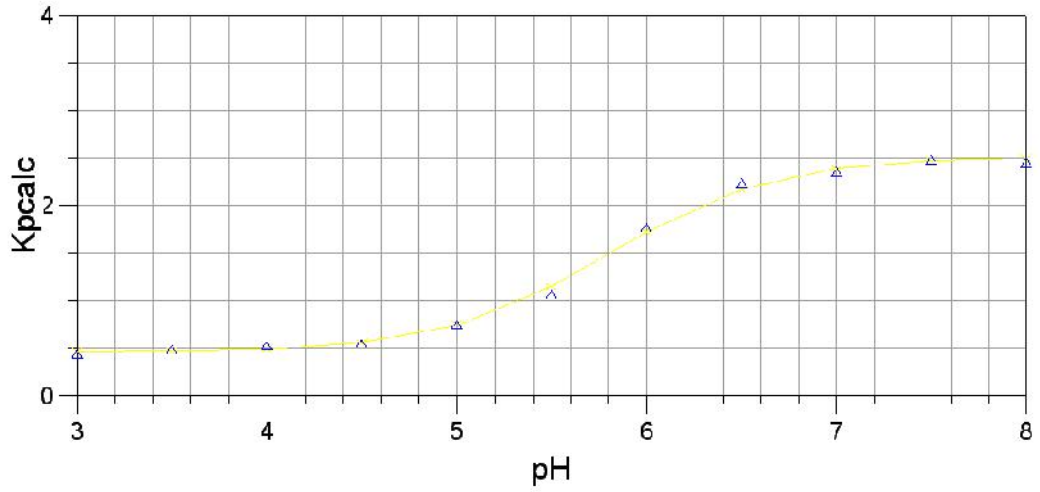
Şekil 4.49. İzokonazolun %70 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

### pKa determination by k' LC



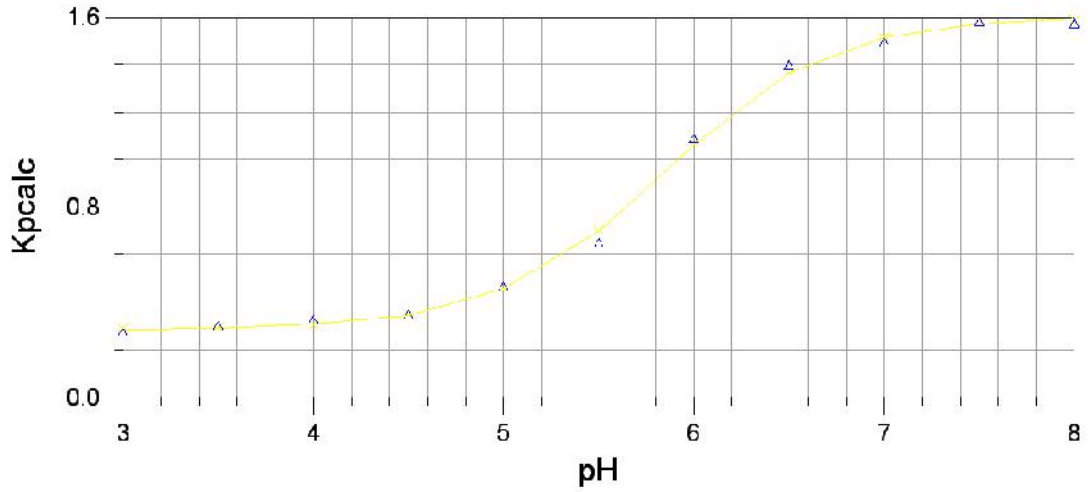
Şekil 4.50. Ketokonazolun %70 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

### pKa determination by k' LC



Şekil 4.51. Mikonazolun %70 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

### pKa determination by k' LC



Şekil 4.52. Tiokonazolun %70 (h/h) ACN-H<sub>2</sub>O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

#### **4.4. Fentikonazol, İzokonazol, Ketokonazol, Mikonazol ve Tiokonazol için Geliştirilen HPLC-DAD Yöntemine Ait Analiz Bulgular**

##### **4.4.1. HPLC sisteminin optimizasyonu**

Çalışılan ilaçların HPLC yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir.

##### Sabit faz seçimi

Geliştirilen yöntemde HPLC ile analiz için iki farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Kolon seçimi sırasında hareketli faz tampon çözeltisi olarak fosforik asit (pH 5,5), hareketli faz olarak asetonytril:su, 65:35 (h/h) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 20°C, hareketli faz akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazolun yukarıda verilen şartlarla kullanılan kolonlar sırasıyla Gemini 3U C-18 (250 mm x 4,6 mm) ve X Terra C-18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) dir. Bu bileşikler için elde edilen alıkonma zamanları, pik şekilleri ve kuyruklanma faktörleri dikkate alınarak X Terra C-18 kolon tercih edilmiştir. Bu kolonda silanol grupları polar kapatılmış olup bazik bileşikler için özellikle kullanılmalıdır. Klasik silika-bazlı kolonlara göre daha geniş pH ve sıcaklık kararlılığına sahiptir. Bu kolonun avantajları; bazik analitler önemli bir problem olan pik şeklinde düzelme ve buna bağlı olarak kuyruklanma faktöründe azalma ve yüksek pH kararlılığı (pH 2-12) dir.

##### Hareketli fazın belirlenmesi

Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik çözücü oranının etkisi, hareketli fazın pH'sı, akış hızı ve kolon sıcaklığının etkileri incelenmiştir.

### Hareketli fazın organik çözücü yüzdesinin belirlenmesi

İyi bir ayırım için en uygun asetonitril oranının saptanması amacıyla hareketli faz çözücü içeriği hacimce % 65 ve % 70 olacak şekilde değiştirilmiştir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, 15 mM, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=5,5 ve pH=6) içeren hareketli faz (1 mL/dk) 25°C kolon sıcaklığında kullanılmıştır. Hareketli fazın fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazolün alıkonmasındaki etkileri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Çalışılan bileşiklerin pH=5,5 de, çeşitli ACN-H<sub>2</sub>O ortamları için kromatografik verileri (t<sub>R</sub>: alıkonma zamanı, k: kapasite faktörü, α:seçicilik)

Bileşik adı	% 65			% 70		
	t <sub>R</sub>	k	α	t <sub>R</sub>	k	α
Ketokonazol	3,096	0,257	-	2,927	0,172	-
Tiokonazol	4,795	0,947	3,679	4,124	0,652	3,777
İzokonazol	5,325	1,163	1,227	4,505	0,805	1,234
Mikonazol	6,305	1,561	1,342	5,166	1,069	1,329
Fentikonazol	8,292	2,367	1,517	6,511	1,608	1,504

**Çizelge 4.2.** Çalışılan bileşiklerin pH=6 da, çeşitli ACN-H<sub>2</sub>O ortamları için kromatografik verileri ( $t_R$ : alıkonma zamanı, k: kapasite faktörü,  $\alpha$ : seçicilik)

Bileşik adı	% 65			% 70		
	$t_R$	k	$\alpha$	$t_R$	k	$\alpha$
Ketokonazol	3,463	0,407	-	3,211	0,307	-
Tiokonazol	5,653	1,297	3,185	5,134	1,090	3,547
İzokonazol	6,811	1,767	1,363	5,71	1,325	1,215
Mikonazol	7,727	2,140	1,210	6,803	1,770	1,336
Fentikonazol	10,18	3,136	1,466	8,448	2,440	1,378

Fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazol karışımlarının ayrı ayrı analizlerinde toplam analiz süresi göz önüne alınarak %65 (h/h) ACN-su karışımı çalışmalarda hareketli faz olarak kullanılmıştır.

#### Hareketli faz pH'sı, akış hızı ve kolon sıcaklığının belirlenmesi

Bu çalışmanın ilk aşamasında bileşiklerin  $pK_a$  değerlerinin belirlenmesi bize pik şekillerinin en düzgün ve ayırmanın en net olduğu pH'nın seçilmesi için yardımcı olmuştur. Diğer koşullar sabit tutulup (%65 ACN, 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 1 mL/dakika) hareketli faz pH'sı 5,5 ve 6,5 değerlerine ayarlanmıştır. Pik simetrileri incelenerek pik şekillerinin en düzgün ve alıkonma zamanlarının uygun olduğu pH değeri 5,5 ve 6 olarak seçilmiştir. Bu pH değerinde çalışılan bileşikler için, etkin tabaka sayısı, ayırma gücü ve kuyruklanma faktörü değerleri Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilmiştir.

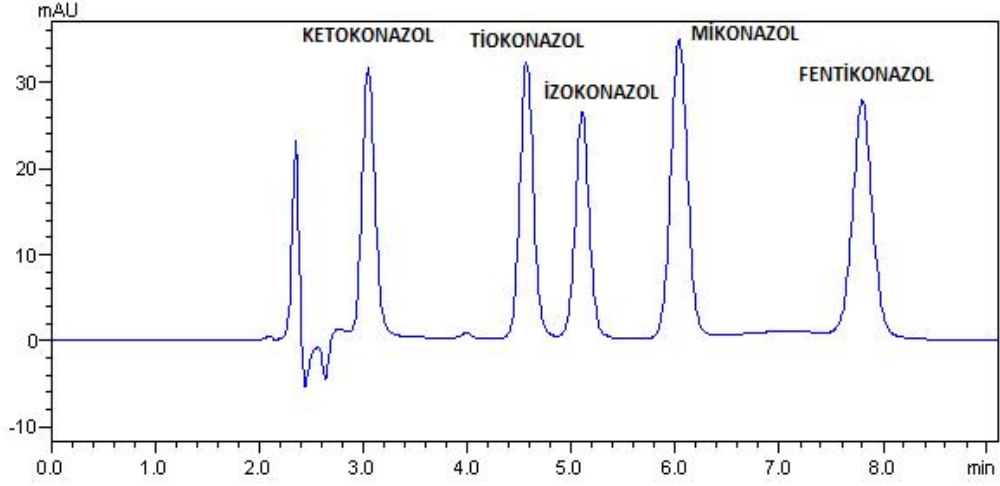
**Çizelge 4.3.** Çalışılan bileşiklerin pH=5,5 de çeşitli ACN-H<sub>2</sub>O ortamları için kromatografik verileri

Bileşik Adı	Kolon Etkinliği (N)	Ayrırma Gücü (R <sub>s</sub> )	Kuyruklanma Faktörü
Ketokonazol	3217	-	1,234
Tiokonazol	7447	7,644	1,136
İzokonazol	7556	2,163	1,177
Mikonazol	7983	3,472	1,112
Fentikonazol	9337	5,788	1,133

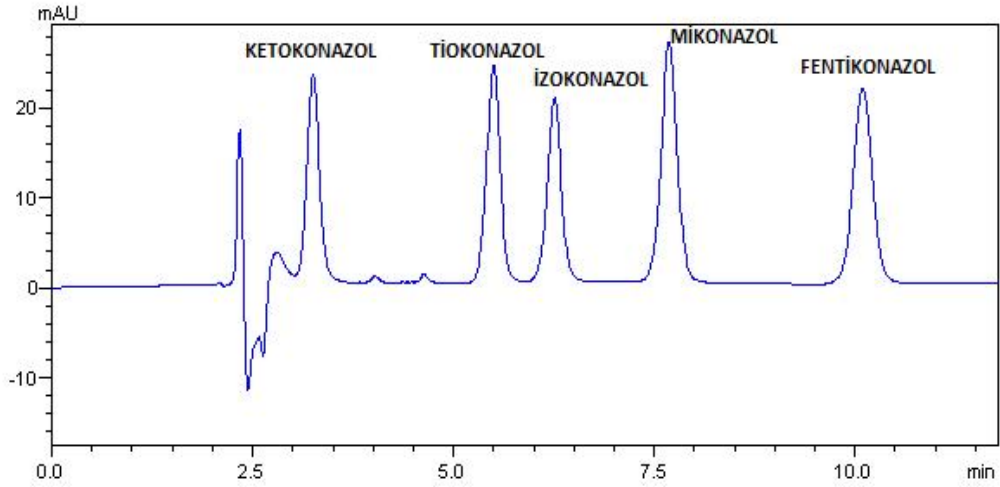
**Çizelge 4.4.** Çalışılan bileşiklerin pH=6 da çeşitli ACN-H<sub>2</sub>O ortamları için kromatografik verileri

Bileşik Adı	Kolon Etkinliği (N)	Ayrırma Gücü (R <sub>s</sub> )	Kuyruklanma Faktörü
Ketokonazol	4964	-	1,210
Tiokonazol	8499	8,928	1,117
İzokonazol	10346	4,323	1,103
Mikonazol	8532	2,737	1,327
Fentikonazol	10617	6,207	1,089

Şekil 4.53 ve Şekil 4.54’de bu koşullarda elde edilen kromatogramlar verilmiştir.



**Şekil 4.53.** Ketokonazol (2 µg/mL), tiokonazol (2 µg/mL), izokonazol (2 µg/mL), mikonazol (2 µg/mL) ve fentikonazol (2 µg/mL) analizi için elde edilen kromatogram. (65:35 (v/v) ACN-su; 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH =5,50; akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 25°C). Görüntüleme 210 nm’de yapılmıştır.



**Şekil 4.54.** Ketokonazol (2 µg/mL), tiokonazol (2 µg/mL), izokonazol (2 µg/mL), mikonazol (2 µg/mL) ve fentikonazol (2 µg/mL) analizi için elde edilen kromatogram. (65:35 (v/v) ACN-su; 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH = 6,0; akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 25°C). Görüntüleme 210 nm’de yapılmıştır.

## 5. SONUÇ

### 5.1. İlaçların pK<sub>a</sub> Değerlerinin Spektroskopik ve HPLC Yöntemi İle Tayini

Bu çalışmada, fentikonazol, izokonazol, itrakonazol, ketokonazol, mikonazol, ornidazol, tinidazol ve tiokonazolun iyonlaşma sabitleri, spektroskopik yöntemle tayin edilmiştir. Spektroskopik metot, çözünürlüğü çok düşük olan maddelerin pK<sub>a</sub> tayini için ideal bir yöntemdir ve bu yöntem ile bileşiklerin su ortamlarında pK<sub>a</sub> tayinleri yapılabilmektedir. Çözücü etkisini inceleyebilmek amacı ile %10 ve %20 (v/v) ACN-su ikili karışımlarında da çalışılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde STAR programı kullanılmıştır. Her bir bileşik için 3 titrasyon yapılmış olup değerler standart sapmalarıyla birlikte Çizelge 5.1’de verilmiştir.

**Çizelge 5.1.** Su, % 10 ve % 20 ACN-su (v/v) karışımına ait spektroskopik titrasyon verileri (210-337 nm arası)

Bileşikler	ACDLAB/SPARC	Su ortamı	% 10 ACN –su	% 20 ACN-su
Fentikanazol	6,69	5,791 (0,018)	5,589 (0,021)	5,401 (0,013)
İzokanozol	6,66 5,57	5,910(0,026)	5,839 (0,073)	5,721 (0,017)
İtrakanozol	5,13 4,22	2,942(0,015)	3,126(0,006)	3,221(0,012)
Ketokanozol	2,92 2,57	3,449(0,042)	3,302(0,046)	3,203(0,090)
	6,54 5,50	6,504(0,074)	6,302(0,045)	6,127(0,090)
Mikonazol	6,66 5,57	5,893 (0,024)	5,764 (0,034)	5,675 (0,023)
Ornidazol	2,72 2,08	2,290(0,002)	2,210(0,002)	2,129(0,005)
	12,47			
Tinidazol	2,30 1,59	1,833(0,003)	1,760(0,003)	1,630(0,004)
Tiokanozol	6,71 5,60	6,615 (0,03)	6,553 (0,028)	6,452 (0,030)

Bu tez çalışmasında, fentikonazol, izokonazol, ketokonzol, mikonazol ve tiokonazolun iyonlaşma sabitleri %65 ve %70 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarında sıvı kromatografi yöntemi ile tayin edilmiştir. Tayin edilen pK<sub>a</sub> değerleri, hareketli fazın pH değerini belirlemede oldukça önemlidir. Bileşiklerin alıkonmaları, kapasite faktörü (k)–pH grafikleri ile değerlendirilmiştir. Beklenildiği gibi sigmoidal davranış



gözenmiş ve  $pK_a$  değerlerinin hesaplanmasında NLREG programı kullanılmıştır. Çalışılan bileşiklerin tayin edilen  $pK_a$  ve asidik-bazık ortamda program ile hesaplanan kapasite faktörü değerleri standart sapmalarıyla birlikte Çizelge 5.2’ de verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** Fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazolün iyonlaşma sabiti değerleri

Bileşikler	70 % (v/v) ACN			65 % (v/v) ACN		
	$pK_a$	$k_{BH^+}$	$K_b$	$pK_a$	$k_{BH^+}$	$k_B$
<b>Ketokonazol</b>	5,585 (0,057)	0,032 (0,09)	0.500 (0.010)	5,475 (0,098)	0,098 (0,02)	0.623(0.017)
<b>Fentikonazol</b>	5,749 (0,063)	0,685(0,064)	3,807 (0,074)	5,642 (0,094)	1,215(0,116)	4,876(0,126)
<b>İzokonazol</b>	5,877 (0,049)	0,407(0,025)	1,987 (0,03)	5,792 (0,082)	0,585(0,059)	2,805 (0,069)
<b>Mikonazol</b>	5,797 (0,034)	0,463(0,023)	2,509 (0,028)	5,697 (0,087)	0,747(0,079)	3,473 (0,088)
<b>Tiokonazol</b>	5,841 (0,032)	0,289(0,013)	1,600 (0,01)	5,746 (0,077)	0,439(0,043)	2,134 (0,049)

Fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazol karışımlarının ayrı ayrı analizlerinde toplam analiz süresi göz önüne alınarak %65 (h/h) ACN-su karışımı çalışmalarda hareketli faz olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmanın ilk aşamasında bileşiklerin  $pK_a$  değerlerinin belirlenmesi bize pik şekillerinin en düzgün ve ayırımın en net olduğu pH’nın seçilmesi için yardımcı olmuştur. Diğer koşullar sabit tutulup (%65 ACN, 15 mM  $H_3PO_4$ ; 1 mL/dakika) hareketli faz pH’sı 5,5 ve 6,5 değerlerine ayarlanmıştır. Pik simetrisi incelenerek pik şekillerinin en düzgün ve alıkonma zamanlarının uygun olduğu pH değeri 5,5 ve 6 olarak seçilmiştir. Sonuç olarak analiz için belirlenen kromatografik şartlar; X Terra C-18 ters faz kolonu, 65:35 (v/v) asetonitril-su; 15mM fosfat tamponu (pH=5,5 ve pH=6); akış hızı 1 mL/dakikadır.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Moety, E.M., Khattab, F.I., Kelani, K.M., Abou Al-Alamein, A.M., 2003. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. II. *Farmaco*. 57, 931 – 938.
- Akay, M., A., Canel, E., Kılıç, E., Köseoğlu, F., 2002. Determination of the protonation constants of some substituted salicylideneanilines by the spectrophotometric method in ethanol-water mixtures. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 37-44.
- Allen, R., I., Box, K., J., Comer, J., E., A., Peake, C., Tam, K., Y., 1998. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 699 – 712.
- Ando, H., Y., Heimbach, T., 1997. pK<sub>a</sub> determination by using a HPLC equipped with DAD as a flow injection apparatus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 31 – 37.
- Anonim, 2004. Tiokonazol, <http://www.ilacabak.com/ilacgoster.php?Id=4970> (11.04.2012)
- Anonim, 2005. İtrakonazol, Ornidazol, <http://www.toprakilac.com.tr> (11.04.2012)
- Anonim, 2007. Antifungal ilaçlar, [http://medisinalkimya.net/jlms/docs/0007\\_9ffdb6f8374e697ba5d9beac353703d6.pdf](http://medisinalkimya.net/jlms/docs/0007_9ffdb6f8374e697ba5d9beac353703d6.pdf) (10.04.2012)
- Anonim, 2011. Fentikonazol, Ketokonazol, Mikonazol, Tinidazol, İzokonazol, <http://www.ilacpedia.com> (11.04.2012).
- Augiar de, P.F., Bourguignon, B., Massart, D.L., 1997. Comparison of models and desings for optimisation of the pH and the solvent strength in HPLC. *Analytica Chimica Acta*, 356, 7-18.
- Bajad, S., Johri, K.R., Singh, K., Singh, J., Bedi, L., K., 2002 Simple high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of ketokonazole and piperine in rat plasma and hepatocyte culture. *Journal of Chromatography A*, 949, 43-47.
- Barbosa, J. Sanz-Nebot, V., 1995. Assignment of reference pH-Values to primary standard buffer solutions for standardization of potentiometric sensors in acetonitrile-water mixtures. *fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 353: 148-155.

- Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., I., Toro, 1999. Chromatographic behaviour of ionizable compounds in liquid chromatography. Part 2. Standardization of potentiometric sensors and effect of pH and ionic strength on the retention of analytes using acetonitrile-water mobile phases. *Analytica Chimica Acta*, 389, 43-52.
- Bayel, İ., 2006. Terbinafin'in insan lenfosit kültürlerindeki etkilerinin kardeş kromatid değişimi yöntemi ile in vitro araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin.
- Beltran, J., L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barron, D., Ozkan, G., Barbosa, J., 2003. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic  $pK_a$  values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. *Analytica Chimica Acta*, 484, 253-264.
- Beltran, J.L., Codony, R., Prat, M.D., 1993. Evaluation of stability constants from multi-wavelength absorbance data: program STAR. *Analytica Chimica Acta*, 276, 441-454.
- Bidlingmeyer, B.A., 1992. *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 69-200.
- Bosch, E., Espinosa, S., Roses, M., 1998. Retention of ionizable compounds on high Performance liquid chromatography. III Variation of  $pK$  values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 824, 137-146.
- Cavriani, V., Di Pietra, A.M., Gatti, R., (1992). HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 10 (10 - 12), 873 - 879.
- Covington, A.K., Bates, R.G., Durst, R.A., 1985. Definition of pH Scales, Standard Reference Values, Measurements of pH and related terminology. *Pure and Applied Chemistry*, 57, 531.
- De Zan, M.M., Camara, S.M., Robles, C.J., Kergaravat, V.S., Goicoechea, C.H., (2009) Development and validation of simple stability-indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of miconazole nitrate in bulk and cream formulations. *Talanta*, 79, 762-767.
- Fadil, S., 2009. Statin ve kinolonların antifungal etkilerinin ve antifungal ilaçlarla arasındaki sinerjizmin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara
- Gümüştaş, M., 2009 ADE inhibitörü ve kalsiyum kanal blokörü kombinasyonu ilaçların YPSK yöntemi ile aynı anda analizi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara

- Gündüz, T., 2007. *İnstrümental Analiz*. 10. Baskı. Gazi Kitabevi, Ankara.
- Hamdy, A.D., Brocks, R.D., 2010. High performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of midazolam and ketoconazole in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 617-622.
- Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. *Introduction to HPLC*. 2<sup>nd</sup> edition, Chapman and Hall, New York, 1-160.
- Hardcastle J., Jano I., 1998. Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data. *Journal of Chromatography B*, 71, 739-756.
- İlkit, M., 2000. Yüzeysel mikozların tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlar, [http://www.ankemdernegei.org.tr/ANKEMJOURNALPDF/ANKEM\\_14\\_3\\_28\\_0\\_285.pdf](http://www.ankemdernegei.org.tr/ANKEMJOURNALPDF/ANKEM_14_3_28_0_285.pdf) (10.04.2012).
- Meyer, R. V. (1988), *Practical HPLC*, John Wiley & Sons, Toronto, Canada, 35-42.
- Mitchell, R. C., Salter, C., J., Tam, K., Y.1999. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants. Part III, resolution of multiprotic ionization systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20, 289 - 295.
- Özkan, S., Akay, C., Şentürk, Z., Cevheroğlu, Ş., 2002. Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *II. Farmaco*, 57, 953-957.
- Poole, C.P., Poole, S.W., 1997. *Chromatography Today*. Fifth impression. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.
- Polster J., Lachmann H., 1989. *Spectrometric titrations: Analysis of chemical equilibria*. VCH, Weinheim, pp 433, Germany.
- Redmann, S., Charles B. G., 2005. A rapid HPLC method with fluorometric detection for determination of plasma itraconazole and hydroxyitraconazole concentrations in cystic fibrosis children with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Biomedical Chromatography*.
- Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., 1987. Reference Value Standard and Primary Standard for pH Measurements in Organic Solvents and Water+Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure & Applied Chemistry*, 59 (11), 1549-1560.
- Rondinini, S., Nese, A., 1987. Standard pH Values for Potassium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions in Acetonitrile-Water Mixtures up to 70 wt % at Various Temperatures. *Electrochimica Acta*, 2(10), 1499-1505.

- Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Katrin, S., Bosch, E. 1996. Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength and mobile phase composition on retention of weak acids. *Analytical Chemistry*, 68, 4094-4100.
- Sewel, P. A., Clarke, B., Kealey, D., 1987. *Chromatographic separations*, John Wiley and Sons Inc., London, UK, 13-80.
- Sherrod, P.H. NLREG. Version 4.0–nonlinear regression analysis and curve fitting program.
- Skoog–Holler–Niemann, 1998. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, USA, 673-766.
- Süzer, Ö., 2010. Antifungal ilaçlar, [http://www.ctf.edu.tr/farma/onersuzer/pdf/tr/26\\_Antifungaller.pdf](http://www.ctf.edu.tr/farma/onersuzer/pdf/tr/26_Antifungaller.pdf) (13.04.2011).
- Şanlı, S., 2009. Makrolid kalıntılarının sütte analizi için sıvı Kromatografik yöntemin optimizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. Isparta.
- Wang, H., Zhang, S., 2007. Study on the content of isoconazole nitrate and determination of its related substances in isoconazole nitrate cream by HPLC. *Zhongguo Yaopin Biaozhun*. 8(3), 60-62.
- Vertzoni, M.V., Reppas, C., Archontaki, H.A., 2006. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of ketoconazole in canine plasma. *Journal of chromatography B*, 839, 62-67.

**ÖZGEÇMİŞ****Kişisel Bilgiler**

Soyadı, Adı : BAŞARAN , Fatma  
Uyruğu : T.C.  
Doğum Yeri ve Tarihi : 16.09.1982 – Çorum  
Medeni Hali : Evli  
Telefon No : 05052338466  
Email : [fatoskimya@hotmail.com](mailto:fatoskimya@hotmail.com)

**Eğitim**

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lise	Eti Lisesi	1999
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	2006

**İş Deneyimi**

Yıl	Yer	Görev
2006-2008	Nobel İlaç	Tıbbi ilaç mümessili
2008-2010	Chiesi İlaç	Tıbbi ilaç mümessili
2011-	Ströer-Kentvizyon	Satış yönetmeni

**Yabancı Dil**

İngilizce