

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İMİDAZOL GRUBU ANTİFUNGAL İLAÇLARIN KROMATOĞRAFİK
DAVRANIŞLARININ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN RPLC YÖNTEMİYLE
BELİRLENMESİ**

Zehra ÜSTÜN

**Danışman
Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2018**



© 2018 [Zehra ÜSTÜN]

TEZ ONAYI

Zehra ÜSTÜN tarafından hazırlanan "İmidazol Grubu Antifungal İlaçların Kromatografik Davranışlarının ve Bozunma Ürünlerinin RPLC Yöntemiyle Belirlenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

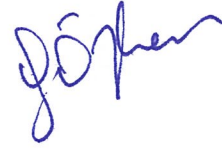
Danışman

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Güleren ALSANCAK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hale SEÇİLMİŞ CANBAY
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hakan AKTAŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Zehra ÜSTÜN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antifungal İlaçlar ile İlgili Temel Bilgiler	1
1.2. İmidazol Halkasını Bulunduran Bileşikler	2
1.3. Kromatografi.....	9
1.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)	10
1.3.2. HPLC’de kullanılan parametreler	13
1.3.3. Ters faz sıvı kromatografi (RPLC)	18
1.3.3.1. RPLC’de analitlerin alıkonması.....	18
1.3.3.2. RPLC’de kullanılan mobil fazlar.....	20
1.3.3.3. RPLC’de kullanılan tamponlar	22
1.4. İlaçların İyonlaşması ve Protonasyon Sabiti	24
1.4.1. İyonlaşma derecesi parametresini kullanarak alıkonmanın tahmini	26
1.4.2. Ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile bileşiklerin su ortamındaki pK _a tayini.....	28
2.4.2.1. Mol kesri - pK _a yöntemi	29
1.4.2.2. Solvatokromik çözücü parametresi yöntemi	29
1.4.2.3. Kamlet-Taft yöntemi	29
1.5. İlaç Analizlerinde Analitik Metodun Geliştirilmesi	30
1.6. Metot Validasyonu	34
1.7. Tezin Amacı.....	39
2. KAYNAK ÖZETLERİ	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM	52
3.1. Kimyasal Maddeler ve Farmasötik Ürünler	52
3.2. Cihazlar	52
3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon	53
3.3.1. Kolon seçimi.....	53
3.3.2. Dalga boyu seçimi	54
3.3.3. Kromatografik koşullar	54
3.3.4. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	54
3.3.5. Bileşikler için optimum ayırma koşulunun belirlenmesi.....	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	60
4.1. Bileşiklerin Optimum Dalga Boylarının Belirlenmesi	60
4.2. Bileşiklerin Chemicalize Programıyla Hesaplanan Fizikokimyasal Parametreleri.....	60
4.3. Bileşiklerin Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarındaki pK _a Değerlerinin Tayini	61

4.3.1. Tezde çalışılan bileşiklerin iyonlaşma derecesi parametresi ile alıkonmalarının hesaplanması.....	61
4.4. Bileşiklerin Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Tayini.....	82
4.4.1. Mol kesri - pK_a yöntemi	82
4.4.2. Mobil faz solvatokromik parametresi (ETN) yöntemi.....	82
4.4.3. Kamlet-Taft yöntemi	83
4.5. Metot Optimizasyonu.....	84
4.6. Metot Validasyonu	85
4.6.1. Sistem uygunluk verileri.....	85
4.6.2. Kalibrasyon ve duyarlılık	86
4.6.3. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları	87
4.6.4. Geri kazanım çalışmaları	88
4.6.5. Bozunma ürünlerinin belirlenmesi	91
4.6.5.1. Asit hidrolizi	93
4.6.5.2. Baz hidrolizi.....	96
4.6.5.3. Oksidatif bozunma	99
4.6.5.4. Fotolitik bozunma	102
4.6.5.5. Termal bozunma	104
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	108
5.1. Bileşiklerin Termodinamik pK_a Değerlerinin Tayini	108
5.2. Geliştirilen Metodun Validasyonu	111
5.3. Bileşiklerin Bozunma Davranışları	112
KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	120

ÖZET

Doktora Tezi

İMİDAZOL GRUBU ANTİFUNGAL İLAÇLARIN KROMATOĞRAFİK DAVRANIŞLARININ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN RPLC YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Zehra ÜSTÜN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Heterosiklik kimyada benzersiz bir yere sahip olan imidazoller ve türevleri son yıllarda kimya ve farmakolojide çok yönlü özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüşlerdir. İmidazol bileşikleri birçok alanda önemli rol oynamakta olup aynı zamanda birçok ilacın yapısında bulunmaktadır. Bu grubu içeren ilaçlar antifungal, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikanser, antiviral, antidiyabetik vb. gibi birçok durumda terapötik bir etkiye sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle, imidazol içeren ilaçların tüm klinik, farmakokinetik ve kimyasal çalışmaları, ilaç araştırmaları ve keşiflerinde son derece önem teşkil etmektedir.

Protonasyon sabiti (pK_a) değeri, bazik bir bileşiğin pH'a göre iyonlaşma durumunu tahmin etmek için kullanılan anahtar bir parametredir. Bu parametrenin bilinmesi ilaçların ADMET özelliklerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir çünkü özellikle emilim ve dağılım bileşiğin iyonlaşmasından büyük ölçüde etkilenir. Bu tez, altı adet imidazol grubu içeren ilaçların (klimbazol, lanokonazol, bifonazol, butokonazol, oksikonazol ve sertakonazol) alıkonma davranışları üzerine çözünenin iyonlaşma etkisini incelemekte ve asetonitril yüzdesi 35, 40, 45, 50 ve 55% (v/v) olan asetonitril-su karışımlarındaki kromatografik verileri kullanarak bileşiklerin pK_a değerlerini belirlemektedir. Bunu yaparken, pH değerleri aktivite katsayıları dikkate alınarak su yerine mobil faz olarak kullanılan hidroorganik karışımda ölçülmüştür. Suda çözünürlüğü az olan bu ilaçların, RPLC yöntemi ile asetonitril-su ikili karışımlarında elde edilen pK_a değerlerinden yararlanarak sudaki pK_a değerlerinin tahmin edilmesinde üç farklı yaklaşım kullanılmıştır. Ekstrapole edilen sonuçların Chemicalize programı ile hesaplanan pK_a değerleri ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

Tüm kromatografik ayırmalar 25°C'de, Pinnacle DB Cyano (5 μ m, 250 x 4,6 mm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Mobil fazın akış hızı ve çalışılan dalga boyu ise sırasıyla 1 mL/dakika ve 202 nm olarak belirlenmiştir. Ayrıca, su-asetonitril karışımı mobil fazların pH'sı ve alıkonma faktörü arasındaki ilişki kullanılarak

optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Bu ilişki incelendiğinde optimum ayırma koşulu pH'sı 7 olan (%45:55, v/v) asetonitril-su karışımı olarak belirlenmiştir. Geliştirilen metodun belirlenen referans değerlere uygunluğunun ölçülebilmesi için sistem uygunluk testleri yapılmış ve sonuçlar yeterli bulunmuştur. Geliştirilen RPLC yönteminin validasyonu doğrusalılık, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve geri kazanım parametreleri kullanılarak yapılmıştır. Her bir bileşik için doğrusal derişim aralıkları belirlenmiş ve korelasyon katsayıları 0,998'den büyük olacak şekilde bulunmuştur. Çalışılan bileşikler için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış ve bu şekilde metodun hassasiyetinin ve seçiciliğinin de yeterli olduğu görülmüştür. Gün içi ve günler arası çalışmalar sonucunda %RSD değerleri hesaplanmış ve her bir çalışma için %RSD değeri 1'in altında bulunmuştur. Bileşikler için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiş ve geri kazanım yüzdeleri hesaplanarak metodun doğruluğu belirlenmiştir. Belirlenen bu optimum ayırma koşulunda bileşiklerin topikal kremde, ticari şampuanda ve insan idrarında kantitasyonları gerçekleştirilmiştir.

Zorlanmış bozunma deneyleri, ilaçların kararlılığının belirlenebilmesi ve ilaçların bozunma davranışlarının anlaşılabilmesi amacıyla ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada ilaçların çeşitli stres koşulları altındaki (hidrolitik, oksidatif, fotolitik ve termal) bozunmalarının belirlenebilmesi için basit, spesifik ve doğru bir RPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bileşikler, oda sıcaklığında asit (0,1 M HCl) ve alkali (0,1 M NaOH) hidrolitik koşulların yanı sıra oksidatif bozunmaya (%3 (v/v) H₂O₂) tabi tutulmuştur. Buna ek olarak, fotolitik koşulda bileşikler 365 nm UV ışığında, benzer şekilde termal çalışmalarda ise iki farklı sıcaklığa (60°C ve 80°C) maruz bırakılmıştır. Çeşitli stres koşulları altında oluşan tüm bozunma ürünlerinin RPLC ile ayrımı Pinnacle DB Cyano kolon kullanılarak pH'sı 7 olan asetonitril-su ikili karışımında (%45:55, v/v) gerçekleştirilmiştir. Bütün stres koşulları altında bileşiklerde meydana gelen maksimum bozunmanın oksidatif koşulda meydana geldiği bozunma yüzdelerinin hesaplanması ile belirlenmiştir. Bu bileşiklere ait yapılmış çok az çalışma olduğundan bu tezin sonuçları literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: İmidazol, kromatografik davranış, pK_a değeri, zorlanmış bozunma, metod validasyonu, RPLC.

2018, 124 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR AND DEGRADATION PRODUCTS OF IMIDAZOLES FROM ANTIFUNGAL AGENTS BY USING RPLC METHOD

Zehra ÜSTÜN

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Imidazoles have occupied a unique position in heterocyclic chemistry and its derivatives have attracted considerable interests in recent years for their versatile properties in chemistry and pharmacology. Drugs containing this group and its derivatives have a therapeutic effect in many cases such as antifungal, antimicrobial, antiinflammatory, anticancer, antiviral, antidiabetic etc. Due to these properties, all clinic, pharmacokinetic and chemical studies of imidazole-containing drugs are extremely important in drug research and discovery.

The protonation constant (pK_a) value is a key parameter to predict the ionization state of a basic compound with respect to pH. Knowledge of this parameter is essential in the estimation of ADMET properties since absorption and distribution are highly affected by the ionization of the compound. This thesis examines the effect of solute ionization on the retention behaviour of imidazole group containing drugs (climbazole, itraconazole, bifonazole, butoconazole, oxiconazole and sertaconazole) and evaluates their pK_a values using chromatographic data in acetonitrile-water mixtures with acetonitrile percentages of 35, 40, 45, 50 and 55% (v/v). In doing so, the pH values were measured in the hydroorganic mixture, which was used as the mobile phase, instead of in water, taking into account the effect of activity coefficients. Three different approaches were evaluated and used to estimate the aqueous pK_a values of studied drugs sparingly soluble in water from their pK_a values in acetonitrile-water binary mixtures obtained by reversed phase liquid chromatography (RPLC). The extrapolated results are in good agreement with pK_a values calculated by Chemicalize program.

All chromatographic separations were carried out on a Pinnacle DB Cyano (5 μ m, 250 x 4.6 mm) column at 25°C. The flow rate of mobile phase and detection wavelength were 1 mL/min and 202 nm, respectively. Optimum separation conditions were determined using the relationship between

retention factors and pH of the water-acetonitrile mobile phases. The optimum assay conditions were acetonitrile-water binary mixture (45:55, v/v) and pH 7.0 as the mobile phase. System suitability tests were conducted to determine the suitability of the developed method conditions to the reference values and the results were found to be satisfactory. The validation of the developed RPLC method was performed using linearity, selectivity, accuracy, precision and recovery parameters. Linear concentration ranges were determined for each compounds and the correlation coefficients were found to be greater than 0.998. LOD and LOQ values were calculated for studied drugs and the sensitivity and selectivity of the method were found to be sufficient. As a result of the intra-day and inter-day precision studies, RSD% values were calculated and it was observed that each RSD% value were less than 1. The recovery studies of the compounds were carried out and the percentages of recovery values were calculated then accuracy of the method was found sufficient. Quantification of the compounds were carried out in the topical cream, commercial shampoo and human urine at the determined optimum condition.

Forced degradation is a used routinely in pharmaceutical development in order to develop stability-indicating methods that lead to quality stability data and to understand the degradation pathways of the drug substances and drug products. In the forced degradation study, simple, specific and accurate RPLC method was developed in order to study decomposition of studied drugs under the various stress conditions (hydrolytic, oxidative, thermal and photolytic). Compounds were subjected to acid (0.1 M HCl) and alkaline (0.1 M NaOH) hydrolytic conditions as well as to oxidative decomposition (3% (v/v) H₂O₂) at room temperature. In addition, in photolytic studies, the compounds were exposed to 365 nm UV light, similarly in thermal studies the compounds were exposed to two different temperatures (60°C and 80°C). The RPLC method that could separate all degradation products formed under various stress conditions involved a Pinnacle DB Cyano column and a mobile phase comprising of acetonitrile-water binary mixture (45:55%, v/v) at pH 7.0. In all the stress conditions applied to the compounds, the maximum degradation was determined by the calculated percentage of degradation values that occur in the oxidative condition. Since there are very little studies conducted on these compounds the results of the this thesis will contribute significantly to the literature.

Keywords: Imidazole, chromatographic behaviour, pK_a value, forced degradation, method validation, RPLC.

2018, 124 pages

TEŞEKKÜR

Akademik hayata adım atarken her yönüyle örnek aldığım, desteğini her an yanımda hissettiğim, karşılaştığım zorluklara her zaman çözüm üreten, her zaman hoşgörüsü ve desteğiyle beni yüreklendiren, tüm lisansüstü çalışmalarımda istisnasız emeği olan ve bulunduğum noktaya gelmemde en büyük paya sahip olan çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ebru Çubuk DEMİRALAY'a,

Engin bilgisiyle eğitici, öğretici ve yol gösterici olup, hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a,

Çalışmalarım boyunca bilgileri ve tecrübeleriyle bana destek olan lisansüstü çalışma arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi olarak her zaman arkamda olan, fedakarlıkları saymakla bitmeyecek değerli Annem, Babam ve Kardeşlerime, yürekten teşekkürü bir borç bilirim.

4628-D2-16No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Zehra ÜSTÜN
Isparta, 2018

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Etki şekillerine göre mantar ilaçlarının sınıflandırılması	1
Şekil 1.2. İmidazolün kimyasal yapısı	2
Şekil 1.3. İmidazolün asidik ve bazik grubuna ait iyonlaşması dengesi	3
Şekil 1.4. Gliksal ve formaldehit kullanılarak gerçekleştirilen imidazol sentezi.....	3
Şekil 1.5. Histidinin kimyasal yapısı	4
Şekil 1.6. Tezde çalışılan bileşiklerin kimyasal yapıları	5
Şekil 1.7. Klimbazolün iyonlaşma dengesi.....	5
Şekil 1.8. Bifonazolün iyonlaşma dengesi	6
Şekil 1.9. Lanokonazolün iyonlaşma dengesi	7
Şekil 1.10. Butokonazolün iyonlaşma dengesi	7
Şekil 1.11. Oksikonazolün iyonlaşma dengesi.....	8
Şekil 1.12. Sertakonazolün iyonlaşma dengesi	8
Şekil 1.13. HPLC sisteminin şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.14. Etkinliğin kromatogram üzerinde gösterimi	16
Şekil 1.15. Ayırma gücünü etkileyen parametrelerin kromatogram üzerinde gösterimi	17
Şekil 1.16. Kuyruklanma faktörlerine göre pik şekilleri.....	17
Şekil 1.17. RPLC’de kullanılan sabit fazlar	18
Şekil 1.18. Kimyasal yapının alıkonma zamanı ve sudaki çözünürlüğe etkisi....	19
Şekil 1.19. Asidik ve bazik bileşikler için mobil faz pH’sına karşı alıkonma değişiminin gösterimi	21
Şekil 1.20. Mobil faz pH’sı ve seçicilik arasındaki ilişki	22
Şekil 1.21. Mobil faz pH’sının pik şekline etkisi.....	22
Şekil 1.22. Hücre membranından molekül geçişleri.....	25
Şekil 1.23. Doğrusal kalibrasyon grafiği	35
Şekil 2.1. Kepek önleyici maddelerin alıkonma süreleri ile mobil faz pH arasındaki ilişki. (1) Oktopiroks (2) Klimbazol (3) Ketokonazol (4) Salisilik asit.....	45
Şekil 2.2. Sertakonazolün bozunması sonucunda meydana gelen bozunma ürünleri	50
Şekil 4.1. Bileşiklerin DAD dedektör kullanılarak belirlenmiş λ_{max} değerleri. A. Klimbazol, B. Lanokonazol, C. Bifonazol, D. Butokonazol, E. Oksikonazol, F. Sertakonazol	60
Şekil 4.2. 1,3-imidazolün yapısı	61
Şekil 4.3. Klimbazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler	69
Şekil 4.4. Lanokonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler.....	70
Şekil 4.5. Bifonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler	71
Şekil 4.6. Butokonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler.....	72

Şekil 4.7. Oksikonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler.....	73
Şekil 4.8. Sertakonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler.....	74
Şekil 4.9. Klimbazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi	76
Şekil 4.10. Lanokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi	77
Şekil 4.11. Bifonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi	78
Şekil 4.12. Butokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi	79
Şekil 4.13. Oksikonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi	80
Şekil 4.14. Sertakonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi	81
Şekil 4.15. Bileşiklerin mol kesri- pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerlerinin belirlenmesine ait grafikler.....	82
Şekil 4.16. Bileşiklerin ETN- pK_a ilişkisi kullanılarak sudaki pK_a değerlerinin belirlenmesine ilişkin grafikler.....	83
Şekil 4.17. Optimum ayırma koşulunda elde edilen kromatogramlar. A) 1-lanokonazol; 2-bifonazol; 3-oksikonazol(IS); 4-sertakonazol, B) 1-klimbazol; 2-bifonazol(IS); 3-oksikonazol; 4-butokonazol.....	85
Şekil 4.18. Bileşiklere ait kalibrasyon grafikleri.....	87
Şekil 4.19. A) Katkılandırılmamış idrar numunesi kromatogramı. B) Bileşiklerin üç farklı derişimde ($\mu\text{g/mL}$) katkılandırılmasıyla elde edilmiş numune kromatogram, 1-lanokonazol; 2-oksikonazol(IS); 3-butokonazol.....	89
Şekil 4.20. Klimbazol içeren Seboderm® %1 şampuanda gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız şampuan numune kromatogramı, 1-klimbazol (10 $\mu\text{g/mL}$); 2-bifonazol(IS) (2 $\mu\text{g/mL}$). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-klimbazol (20 $\mu\text{g/mL}$); 2-bifonazol(IS) (2 $\mu\text{g/mL}$)	90
Şekil 4.21. Bifonazol içeren Mycospor® %1 kremde gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız krem numune kromatogramı, 1-bifonazol (3 $\mu\text{g/mL}$); 2-oksikonazol(IS) (1 $\mu\text{g/mL}$). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-bifonazol (6 $\mu\text{g/mL}$); 2-oksikonazol(IS) (1 $\mu\text{g/mL}$)	90
Şekil 4.22. Oksikonazol içeren Oceral® %1 kremde gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız krem numune kromatogramı, 1-bifonazol(IS) (2 $\mu\text{g/mL}$); 2-oksikonazol (5 $\mu\text{g/mL}$). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-bifonazol(IS) (2 $\mu\text{g/mL}$); 2-oksikonazol (10 $\mu\text{g/mL}$).....	91

Şekil 4.23. Sertakonazol içeren Zalain® %2 kremde gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız krem numune kromatogramı, 1-oksikonazol(IS) (1 µg/mL); 2-sertakonazol (4 µg/mL). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-oksikonazol(IS) (1 µg/mL); 2-sertakonazol (8 µg/mL).....	91
Şekil 4.24. Bileşiklerin herhangi bir bozunmaya maruz bırakılmamış çözeltilerine ait kromatogramlar. A) klimbazol, B) lanokonazol, C) bifonazol, D) butokonazol, E) oksikonazol, F) sertakonazol	92
Şekil 4.25. Asidik ortama maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları.....	93
Şekil 4.26. Asidik ortama maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları.....	93
Şekil 4.27. Asidik ortama maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları.....	94
Şekil 4.28. Asidik ortama maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları.....	94
Şekil 4.29. Asidik ortama maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları.....	95
Şekil 4.30. Asidik ortama maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları.....	95
Şekil 4.31. Bazik ortama maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları.....	96
Şekil 4.32. Bazik ortama maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları.....	96
Şekil 4.33. Bazik ortama maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları.....	97
Şekil 4.34. Bazik ortama maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları.....	97
Şekil 4.35. Bazik ortama maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları.....	98
Şekil 4.36. Bazik ortama maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları.....	98
Şekil 4.37. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları.....	99
Şekil 4.38. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları.....	99
Şekil 4.39. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları.....	100
Şekil 4.40. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları.....	100
Şekil 4.41. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları.....	101
Şekil 4.42. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları.....	101
Şekil 4.43. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramı	102

Şekil 4.44. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramı	102
Şekil 4.45. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramı	102
Şekil 4.46. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramı	103
Şekil 4.47. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramı	103
Şekil 4.48. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramı	103
Şekil 4.49. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları	104
Şekil 4.50. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları	105
Şekil 4.51. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları	105
Şekil 4.52. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları	106
Şekil 4.53. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları	106
Şekil 4.54. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları	107

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Günümüzde kullanılan başlıca imidazol ve triazoller.....	2
Çizelge 1.2. Farklı HPLC türlerinde kullanılan sabit ve mobil fazlar	11
Çizelge 1.3. RPLC’de yaygın olarak kullanılan tamponlar.....	23
Çizelge 1.4. Asetonitril ve su içeren karışımlara ait mol kesri değerleri	29
Çizelge 1.5. RPLC’de kullanılan çözücülere ait Kamlet-Taft parametreleri	30
Çizelge 1.6. Metot geliştirmede başlıca ayırma hedefleri.....	31
Çizelge 1.7. Polaritelerine göre organik çözücüler	32
Çizelge 1.8. Polaritelerine göre fonksiyonel gruplar	32
Çizelge 1.9. Kolonlar ve özellikleri	33
Çizelge 2.1. Bifonazolün farklı oranlardaki MDM-su karışımlarından elde edilen pK_a değerleri	43
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar ve ticari preparatlar	52
Çizelge 3.2. Tez çalışması boyunca kullanılan cihazlar	53
Çizelge 4.1. Bileşiklerin Chemicalize programı ile hesaplanmış fizikokimyasal parametreleri	61
Çizelge 4.2. Klimbazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri	62
Çizelge 4.3. Lanokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri	63
Çizelge 4.4. Bifonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri	64
Çizelge 4.5. Butokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri	65
Çizelge 4.6. Oksikonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri	66
Çizelge 4.7. Sertakonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri	67
Çizelge 4.8. Belirlenen asetonitril-su ortamlarındaki Kamlet-Taft parametre değerleri	83
Çizelge 4.9. Bileşiklerin Kamlet-Taft- pK_a ilişkisi kullanılarak sudaki pK_a değerlerinin belirlenmesi	84
Çizelge 4.10. Belirlenen optimum koşula ait değerler	84
Çizelge 4.11. Sistem uygunluk değerlendirme çalışmaları.....	86
Çizelge 4.12. Bileşiklere ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları ...	88
Çizelge 4.12. Bileşiklere ait kalibrasyon fonksiyonları, doğrusal aralıklar, LOD ve LOQ verileri	87
Çizelge 4.13. Lanokonazol ve butokonazol için idrarda gerçekleştirilen geri kazanım sonuçları	89
Çizelge 4.14. Şampuan ve krem formülasyonlarının içerdikleri etken madde yüzdesi ve geri kazanım sonuçları.....	89
Çizelge 4.15. Tez çalışmasında uygulanan stres koşulları	92
Çizelge 5.1. Bileşiklerin termodinamik pK_a değerleri	109
Çizelge 5.2. Farklı yaklaşımlarla hesaplanmış su ortamındaki pK_a değerleri ..	110
Çizelge 5.3. Bileşikler için alıkonmanın istatistiki değerlendirmesi.....	111
Çizelge 5.4. Çeşitli stres koşulları altında bileşiklerin bozunma yüzdeleri	113

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asetonitril
BİF	Bifonazol
BUT	Butokonazol
D	Çözünenin iyonlaşma derecesi
DAD	Diode Array Dedektör
DMSO	Dimetil sülfoksit
E_T^N	Solvatokromik parametre
FDA	Gıda ve ilaç dairesi
H	Tabaka yüksekliği
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ICH	Uluslararası uyumlaştırma konferansı
IPA	İzopropil alkol
k	Alıkonma (kapasite) faktörü
KBZ	Klimbazol
logP	Lipofilisite
logD	Dağılma katsayısı
logS	Çözünürlük katsayısı
L	Kolon uzunluğu
LAN	Lanokonazol
LOD	Dedeksiyon limiti
LOQ	Tayin alt limiti
MS	Kütle spektrofotometresi
N	Teorik tabaka sayısı
NaOH	Sodyum hidroksit
NPLC	Normal faz sıvı kromatografi
OKSİ	Oksikonazol
pK _a	Protonasyon sabiti
RPLC	Ters faz sıvı kromatografi
R _s	Ayırma gücü
RSD	Bağıl standart sapma
SER	Sertakonazol
t _R	Alıkonma zamanı
t ₀	Ölü zaman
THF	Tetrahidrofuran
T _f	Kuyruklanma faktörü
USP	Amerikan farmakopesi
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya sağlık örgütü
α	Seçicilik katsayısı

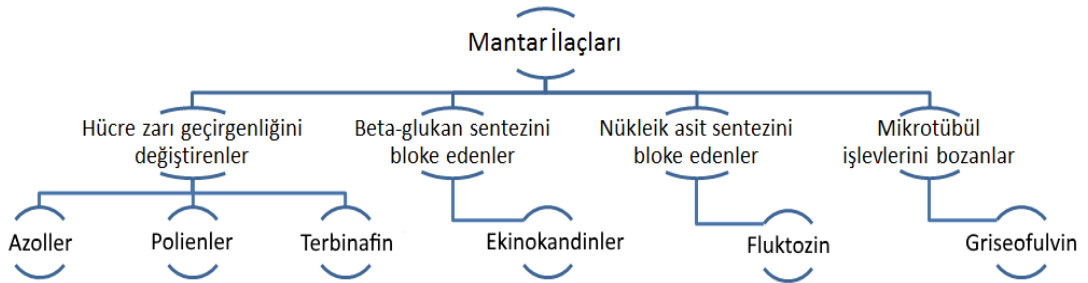
1. GİRİŞ

1.1. Antifungal İlaçlar ile İlgili Temel Bilgiler

Son yıllarda çeşitli sebeplere ve tedavilere bağlı olarak bağışıklı bozulmuş veya baskılanmış hasta sayısındaki artışa paralel olarak mantar enfeksiyonlarında da ciddi bir artış meydana geldiği bilinmektedir. Mantar enfeksiyonlarının tedavi edilmesi için mutlaka doğru ilaç ile antifungal terapi gerekmektedir. Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlar mantar hücrelerine etkilerine göre,

- Hücre zarı geçirgenliğini değiştirenler
- Beta-glukan sentezini bloke edenler
- Nükleik asit sentezini bloke edenler
- Mikrotübül işlevlerini bozanlar

şeklinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.1). Tüm bu gruplar içerisinde en yaygın olarak kullanılan antifungal ajanların başında azoller gelmektedir (Yüksel, 2002; Trevor, 2015).



Şekil 1.1. Etki şekillerine göre mantar ilaçlarının sınıflandırılması

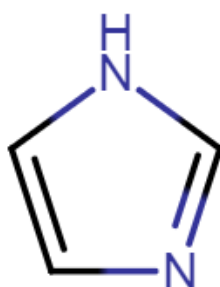
1960' larda bulunan azoller tamamen sentetik ajanlardır. Yan etkileri diğer antifungal ajanlara göre daha az olan azoller, günümüzde antifungal ilaç gelişiminde ve klinik kullanımda üstün hale gelmiştir. Azol grubu ilaçlar, aynı antifungal spektrum ve etki mekanizmasını paylaşan imidazoller ve triazoller olmak üzere iki ana sınıf içerir (Warnock, 2010). Bu bileşikler azol halkasındaki azotun sayısına göre sınıflandırılmışlardır. İki azot içerenler imidazol, üç azot içerenler ise triazol olarak adlandırılmıştır. Dünyada bilinen ve kullanımda olan başlıca imidazol ve triazol grubu içeren ilaçlar Çizelge 1.1' de verilmektedir.

Çizelge 1.1. Günümüzde kullanılan başlıca imidazol ve triazoller

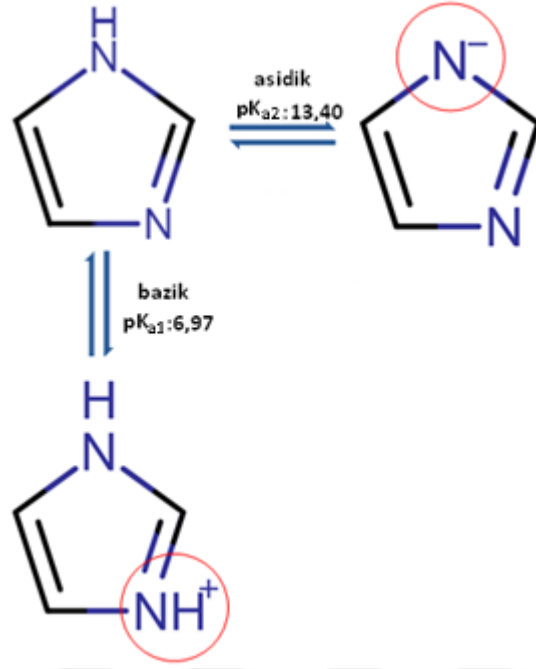
İmidazoller		Triazoller
Bifonazol	Lanokonazol	Albakonazol
Butokonazol	Lulikonazol	Efinakonazol
Ekonazol	Mikonazol	Flukonazol
Fentikonazol	Omokonazol	İzavukonazol
İzokonazol	Oksikonazol	İtrakonazol
Ketokonazol	Sertakonazol	Posakonazol
Klimbazol	Tiyokonazol	Ravukonazol
Klotrimazol	Terkonazol	Vorikonazol

1.2. İmidazol Halkasını Bulunduran Bileşikler

İmidazol (1,3-diaza-2,4-siklopentadien) $C_3H_4N_2$ formülüne sahip beş üyeli bir heterosiklik aromatik amindir (Şekil 1.2). İmidazol amfoterik bir bileşiktir ve yapısında iki adet azot bulunmaktadır. Yapısında bulunan bu iki N atomunun biri katyon oluşturmak üzere proton alırken, diğeri ise başka bir bileşiğe H vermesine olanak sağlar (Scheiner ve Yi, 1996). Hem asidik hem de bazik özellik gösteren bu yapıya ait iki adet iyonlaşma/protonasyon sabiti (pK_a) değeri bulunmaktadır. Tahmini hesap yapan programlarla asidik azota ait pK_a değeri 13,40; bazik azota ait pK_a değeri ise 6,97 olarak hesaplanmıştır (Şekil 1.3) (Chemicalize, 2018).

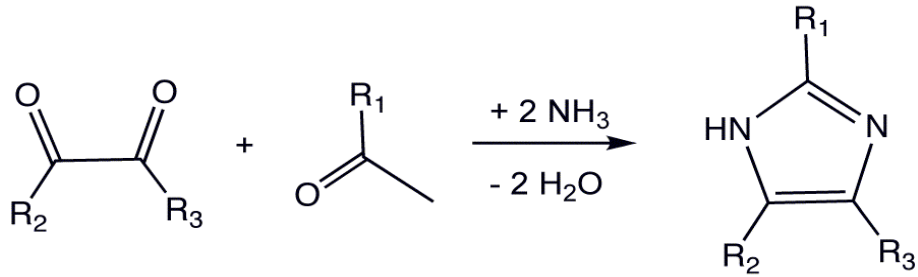


Şekil 1.2. İmidazolün kimyasal yapısı



Şekil 1.3. İmidazolün asidik ve bazik grubuna ait iyonlaşması dengesi

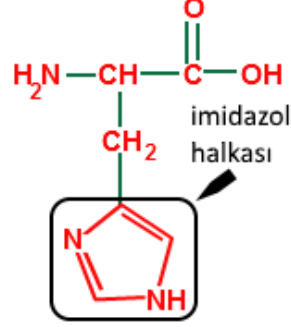
İmidazol suda çözünen bir katıdır ve aprotik çözücü maddelerde çözünmez. İmidazolün birçok sentez yöntemi bulunmaktadır ve ilk olarak 1858 yılında Heinrich Debus tarafından glioksal ve formaldehit kullanılarak sentezlenmiştir (Şekil 1.4) (Chawla vd., 2012).



Şekil 1.4. Glioksal ve formaldehit kullanılarak gerçekleştirilen imidazol sentezi

İmidazol halkası doğal olarak birçok bileşiğin yapısında bulunan ve sentetik yollarla da elde edilebilen biyoaktif bir bileşiktir. Metallere ligand olarak bağlanma özelliği ve proteinler ile hidrojen bağı yapabilme yeteneği sayesinde biyoajan olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Yapısında bu halkayı bulunduran en bilinen bileşik bir amino asit olan histidindir (Şekil 1.5.). Histidin birçok proteinin ve enzimin yapısında bulunur ve hemoglobinin bağlanma işlevlerinde oldukça önemli bir rol

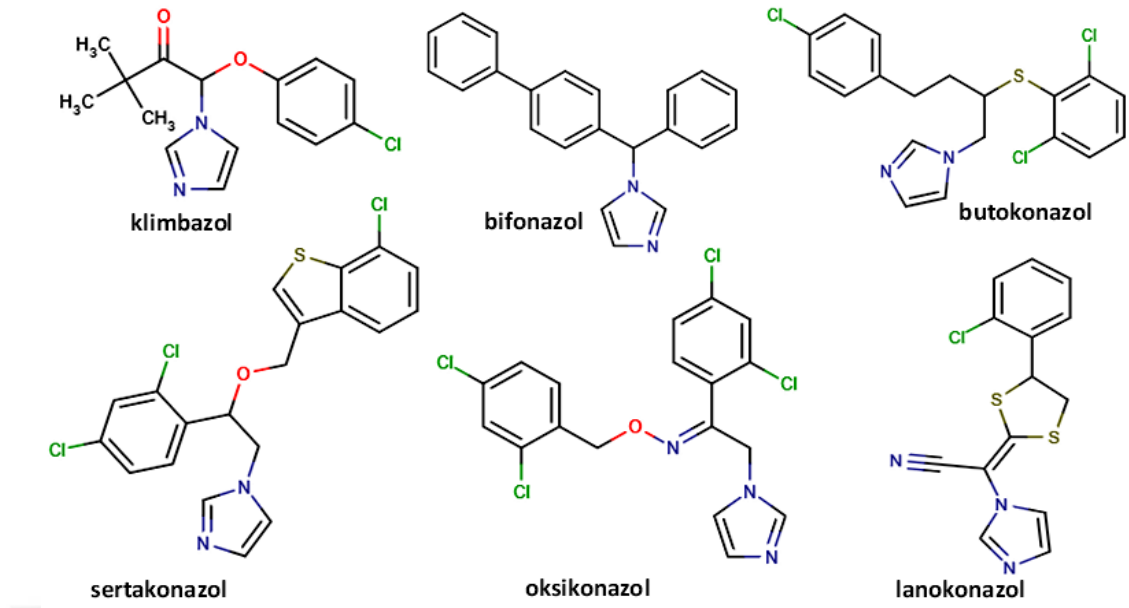
oynamaktadır. Bu grubu bulunduran diğer doğal bileşikler; biyotin, esansiyel amino asitler, histamin ve pilokarpin alkaloidleri iken, imidazol içeren sentetik bileşiklerin bazıları ise simetidin, losartan, fungusitler, herbisitler, bitki büyüme düzenleyicileri ve terapötik ajanlar olarak örneklendirilebilir (Molina vd., 2012).



Şekil 1.5. Histidinin kimyasal yapısı

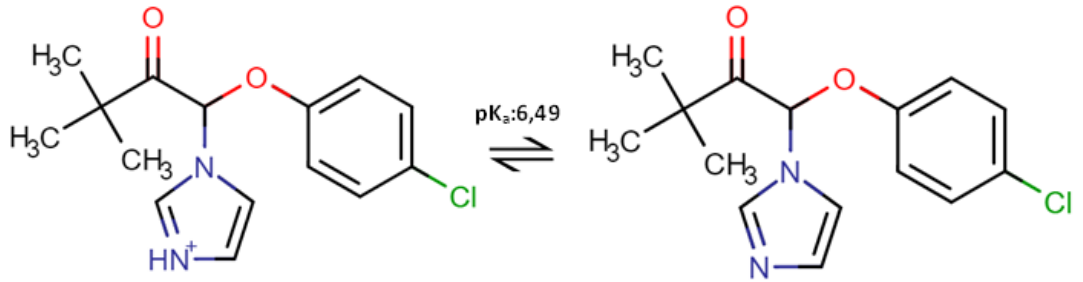
İmidazoller; antifungal, antikanser, antiviral, antibakteriyel, antitüberküloz, antiparazitik, antihistaminik, antiinflamatuvar, antinöropatik, antiobezite ve antihipertansif özellik gösteren oldukça geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Günümüzde bilim insanları arasında imidazollerin antikanser kemoterapisinde güvenli bir alternatif olarak geliştirilmesi bu grubu içeren ilaçlara ilgiyi daha da artırmıştır. Bu ilgiden yola çıkılarak imidazollerin farmakolojik özellikleri aktif olarak incelenmiş ve piyasada mevcut olan imidazollerin antikanser ilaçlara kıyasla eşit ve hatta daha iyi terapötik etkilere sahip olduğu görülmüştür (Ali vd., 2017; Richardson, 2005).

Tez çalışmasında kullanılan imidazol halkasını içeren bileşikler; klimbazol, bifonazol, butokonazol, lanokonazol, oksikonazol ve sertakonazol olarak seçilmiştir. Bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Tezde çalışılan bileşiklerin kimyasal yapıları

Klimbazol; formülü $C_{15}H_{17}ClN_2O_2$, molekül ağırlığı ise 292,76 g/mol olan bir imidazol grubu antifungal bileşiktir. Beyaz toz halde bulunan bu bileşiğin erime noktası $98^{\circ}C$, kaynama noktası ise $447,5^{\circ}C$ 'dir. Bu bileşiğin logP değeri 4,34; bazik azota ait pK_a değeri ise 6,49 olarak hesaplanmıştır (Chemicalize, 2018). Bileşiğin iyonlaşma dengesi Şekil 1.7'de verilmiştir.

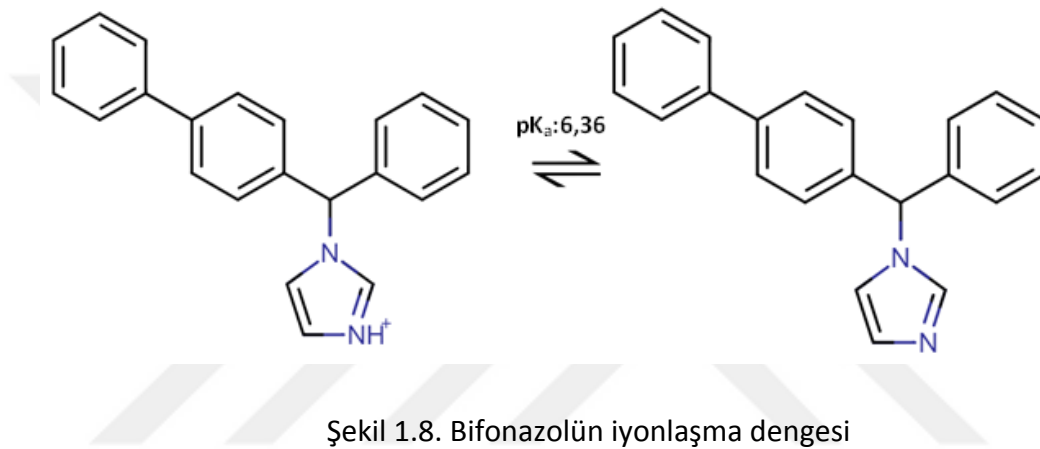


Şekil 1.7. Klimbazolün iyonlaşma dengesi

Klimbazol, şampuanlarda kepek önleyici, temizlik maddelerinde antibakteriyel olarak kullanılmaktadır. Bilinen en etkili mantar öldürücülerden biri olan bu bileşik, Avrupa ülkelerinde birkaç yıldır kullanılmakta iken son yıllarda Türkiye'de üretilen şampuanlarda da kullanılmaktadır. Piyasada bulunan ve klimbazol içeren

şampuanlardan bazılarına Climdan®, Relieve®, Seboderm®, Oliprox® ve Heger® örnek olarak verilebilir.

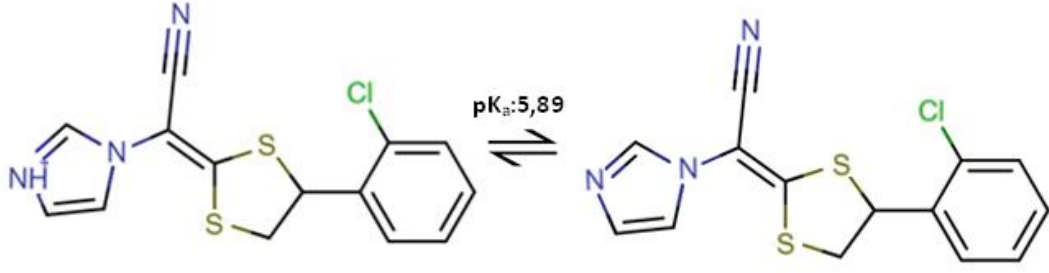
Bifonazol; formülü $C_{22}H_{18}N_2$, molekül ağırlığı ise 310,4 g/mol olan bir imidazol grubu antifungal bileşiktir. Bifonazol; etanol, dimetil sülfoksit ve dimetil formamit gibi organik çözücülerde çözünabilmektedir. Yapılan stabilite çalışmaları sonucunda bifonazolün $-20^{\circ}C$ 'de 2 yıl bozunmadan kaldığı belirlenmiştir. Bu bileşiğin logP değeri 5,23; pK_a değeri ise 6,36 olarak hesaplanmıştır (Chemicalize, 2018). Bileşiğin iyonlaşma dengesi Şekil 1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.8. Bifonazolün iyonlaşma dengesi

Bifonazol, dermatofitler, mayalar, küfler ve *Malassezia furfur* gibi diğer mantarları kapsayan geniş bir antimikotik etki spektrumuna sahip bir imidazol türevidir. Ayrıca *Corynebacterium minutissimum*'a da etkilidir. Bifonazol, dermatofitlere, özellikle de *Trichophyton* türlerine karşı belirgin fungusit etki gösterir. Bifonazol, direnç gelişiminin az olması açısından olumlu bir profile sahiptir. Bifonazol, ergosterol biyosentezini iki farklı düzeyde inhibe ederek, hem diğer azol türevlerinden hem de sadece tek bir düzeyde etki gösteren diğer antifungallerden ayrılır. Bazı krem, losyon ve pudra gibi birçok farklı formülasyonlar da bifonazol grubunu içermektedir.

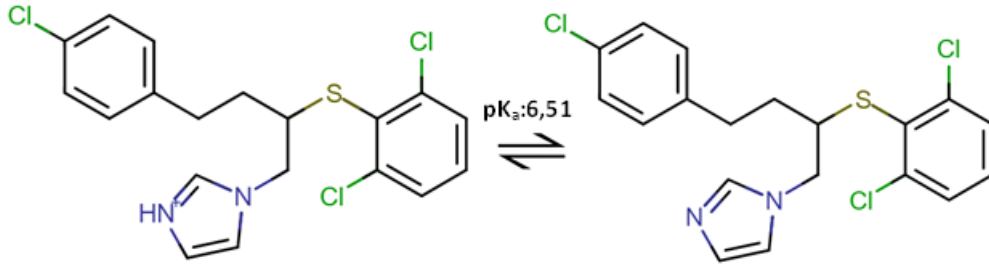
Lanokonazol; formülü $C_{14}H_{10}ClN_3S_2$, molekül ağırlığı ise 319,83 g/mol olan imidazol grubu antimikotik bir bileşiktir. Açık sarı kristaller halinde bulunan bu bileşiğin erime noktası $129^{\circ}C$, kaynama noktası ise $477,6^{\circ}C$ 'dir. Bileşiğin logP değeri 3,47; pK_a değeri ise 5,89 olarak hesaplanmıştır (Chemicalize, 2018). Bileşiğin iyonlaşma dengesi Şekil 1.9'da verilmiştir.



Şekil 1.9. Lanokonazolün iyonlaşma dengesi

Lanokonazol, kloroform ve metanol gibi organik çözücülerde çözünürken sudaki çözünürlüğü yok denebilecek kadar azdır. Bu bileşik *tinea pedis*, *tinea corporis* ve *kutanöz kandidiazit* tedavisinde etkili bir antimikotiktir. Lanokonazol 1994 yılından beri Japonya’da aktif olarak kullanılmaktadır. Piyasada bilinen iki adet topikal formülasyonu mevcuttur: Astat® %1, Iwaki® %1.

Butokonazol; formülü $C_{19}H_{17}Cl_3N_2S$, molekül ağırlığı ise 411,78 g/mol olan antifungal bir bileşiktir. Bileşiğin logP değeri 6,55; pK_a değeri ise 6,51 olarak hesaplanmıştır (Chemicalize, 2018). Bileşiğin iyonlaşma dengesi Şekil 1.10’da verilmiştir. Yaklaşık 159°C’de eriyen butokonazol; metanol, kloroform, metilen klorür, aseton ve etanolde az miktarda çözünürken, suda ve etil asetatda neredeyse hiç çözünmez.

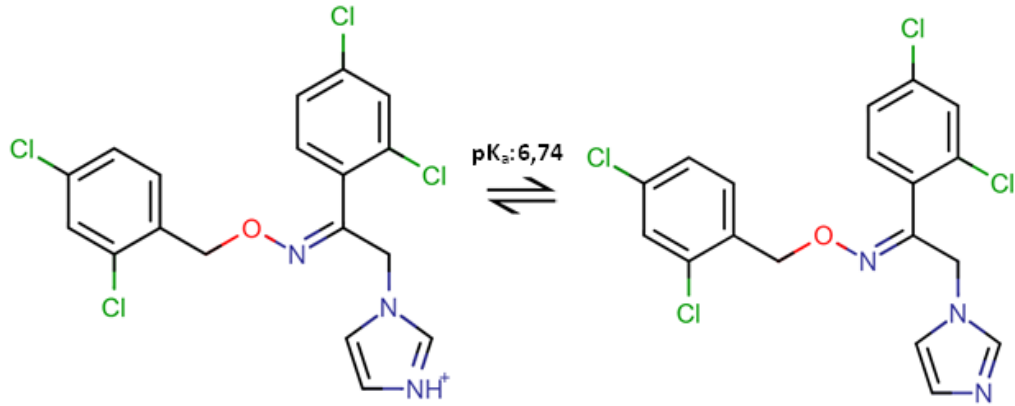


Şekil 1.10. Butokonazolün iyonlaşma dengesi

Butokonazol özellikle jinekolojide vajinal enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Enfeksiyona neden olan maya ve mantarların büyümesini durduran bu bileşik, yanma, kaşıntı ve bu durumlarda oluşabilecek rahatsızlıkları azaltmaktadır.

Oksikonazol; formülü $C_{18}H_{13}Cl_4N_3O$, molekül ağırlığı ise 429,12 g/mol olan imidazol türevi bir antifungal bileşiktir. LogP değeri 5,84; pK_a değeri ise 6,74 olarak

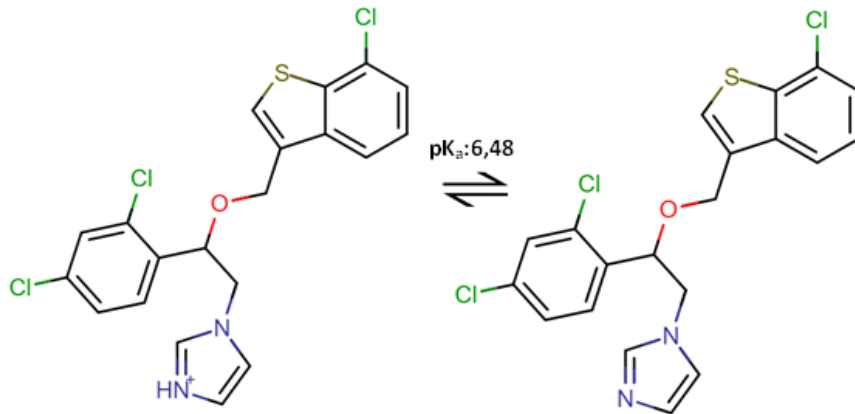
hesaplanmıştır (Chemicalize, 2018). Bileşiğin iyonlaşma dengesi Şekil 1.11’de verilmektedir.



Şekil 1.11. Oksikonazolün iyonlaşma dengesi

Oksikonazol, antifungal aktivitesi ergosterol biyosentezinin inhibisyonuna dayanan geniş spektrumlu bir antifungal bileşiktir. Dermatofitler ve mayalar dahil olmak üzere çeşitli patojenik mantarlara karşı antifungal aktiviteye sahiptir. Oksikonazolün piyasada krem ve spreyl olmak üzere iki formu bulunmakta olup bu ilacı içeren ürünlerin bazıları; Oceral®, Oxazole® ve Oxistat® olarak örneklendirilebilir.

Sertakonazol; formülü C₂₀H₁₅Cl₃N₂OS, molekül ağırlığı ise 437,77 g/mol olan ve başta vajinal enfeksiyonlar olmak üzere birçok mantar enfeksiyonunda kullanılan imidazol grubu bir antifungal ajandır. Bileşiğin logP değeri 6,23; pK_a değeri ise 6,48 olarak hesaplanmıştır (Chemicalize, 2018). Bileşiğin iyonlaşma dengesi Şekil 1.12’de verilmiştir. Beyaz kristalize halde bulunan sertakonazol, etanol ve kloroformda kolayca çözünürken, aseton ve n-oktanolde kısmi olarak çözünmektedir bunun yanı sıra sudaki çözünürlüğü ise oldukça azdır.



Şekil 1.12. Sertakonazolün iyonlaşma dengesi

Sertakonazol, mantarların cilt üzerinde büyümelerini ve çoğalmalarını engelleyen geniş spektrumlu bir antifungal bileşiktir. El ve ayak parmak aralarında meydana gelen mantar hastalıklarında, kasıklarda ve koltuk altlarında görülen mantar hastalıklarında, derinin kıvrımlı yerlerinde görülen mantar enfeksiyonlarında ve özellikle vajinal mantar enfeksiyonlarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Piyasada ise krem, solüsyon ve fitil olmak üzere üç çeşit formülasyonu bulunmaktadır.

1.3. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin farklı göç hızlarından yararlanarak birbirinden ayrılmasını sağlayan 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. Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı sürelerde olur. Böylece bileşenler, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terkederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin zamana karşı dedektör cevapları işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir.

Kromatografik yöntemler; uygulama biçimine, ayrılma mekanizmasına ve faz tiplerine göre sınıflandırılmaktadır.

Uygulama biçimine göre;

- Düzlem kromatografisi
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi
- Kolon kromatografisi
 - Gaz kromatografisi
 - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
 - Süper kritik akışkan kromatografisi

Ayrılma mekanizmalarına göre;

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma kromatografisi
- İyon değişim kromatografisi
- Jel filtrasyon kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

Faz tiplerine göre;

- Sıvı kromatografisi
 - Sıvı-katı kromatografisi
 - Sıvı-sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
 - Gaz-katı kromatografisi
 - Gaz-sıvı kromatografisi

olarak sınıflandırılırlar (Gündüz, 2002; Ünlü, 2018).

1.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), karışımdaki bileşiklerin kalitatif ve kantitatif ayrımı için analitik kimyada kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte mobil fazın ilerlemesi yüksek basınçla sağlandığı için yüksek basınçlı sıvı kromatografi olarak da adlandırılmaktadır. HPLC tekniği 1970'lerden bu yana laboratuvarlarda ayırma, analiz ve saflaştırma amacıyla kullanılmaktadır (Scientific 2014).

Mobil faz ve sabit fazın türüne göre geliştirilen HPLC teknikleri kısaca özetlenmiştir.

Normal Faz HPLC: Bu metotta analitler polaritelerine bağlı olarak ayrılmaktadır. NPLC'de sabit faz polar, mobil faz ise apolardır. Bu teknikte sabit faz olarak genellikle silika kullanılmaktadır. Mobil faz olarak da sıklıkla hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunlardan oluşan karışımlar tercih edilmektedir. Genellikle polar bileşiklerin ayrımında kullanılır.

Ters Faz HPLC: Bu kromatografi türünde sabit faz apolar, mobil faz ise polardır. Mobil faz olarak çoğunlukla organik çözücü (asetonitril, metanol ve tetrahidrofuran) ve su içeren karışımlar tercih edilmektedir. Bu yöntemde polar bileşikler sabit faz ile daha az etkileşim gösterdikleri için kolondan daha önce elüe olmaktadır. Benzer şekilde polar olmayan bileşikler de sabit faz ile daha fazla etkileştikleri için daha fazla kolonda tutunmaktadırlar.

İyon Değişim HPLC: Bu metot yalnızca yüklü moleküllerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Bu kromatografi türünde durgun faz anyon ve katyon değiştiricileri içermektedir. Ayırma, bu iyonik grupların örnekteki moleküller ile etkileşime girmesi temeline dayanmaktadır. Mobil faz olarak, elüsyon süresinin kontrolü amacıyla sulu tampon çözeltiler kullanılmaktadır.

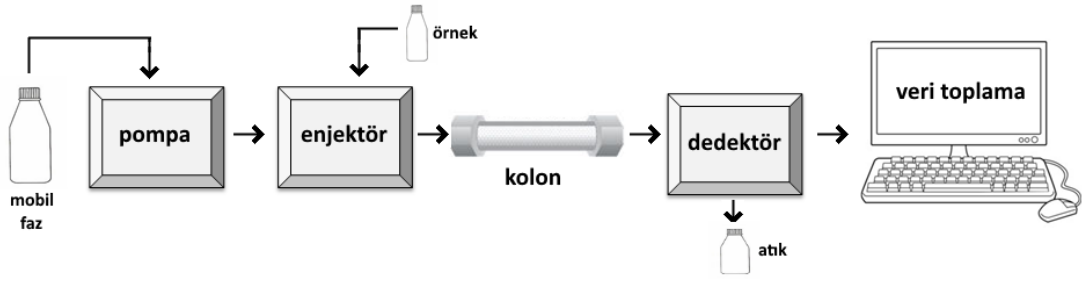
Size exclusion HPLC: Bu teknikte ayırma moleküler ağırlıklara dayanılarak gerçekleştirilir. En büyük molekül ilk önce elüe olurken, en küçük molekül en son elüe olur (Kumar vd., 2013).

Çizelge 1.2’de bileşiklerin HPLC ile analizinde hangi HPLC türünün seçileceği ve bu türlerde kullanılan sabit ve mobil fazlarla ilgili bilgiler özetlenmektedir.

Çizelge 1.2. Farklı HPLC türlerinde kullanılan sabit ve mobil fazlar

Bileşik Türü	HPLC	Durgun Faz	Mobil Faz
Zayıf asitler ve bazlar, nötral, amfiprotik ve zwitteriyonik bileşikler	Ters Faz	C18, C8, C4, siyano, amino	Su-organik modifiyer
Yağda çözünen vitaminler, izomerler, kiral bileşikler	Normal Faz	Silika, amino, siyano, diol	Organik çözücüler
Peptitler ve proteinler	İyon değişimi	Anyon veya katyon değişim reçinesi	Sulu tampon iyonu
Yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler ve polimerler	Size exclusion	Polistiren, silika	Jel filtrasyon, sulu jel filtrasyon

HPLC sistemi temel olarak çözücü haznesi, pompa, enjektör, kolon fırını, dedektör ve veri toplama şeklinde şematize edilebilir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. HPLC sisteminin şematik gösterimi

Klasik HPLC sisteminde yer alan parçalar aşağıda kısaca özetlenmektedir.

- **Çözücü haznesi:** HPLC’de kullanılan mobil faz veya çözücüler cam bir haznede muhafaza edilmektedir. Mobil faz, derişimleri önceden belirlenmiş polar ya da apolar çözücülerden oluşmaktadır ve çalışma boyunca Şekil 1.12’de belirtildiği şekilde pompaya yakın olacak şekilde bulundurulmaktadır.
- **Pompa:** Sistemin önemli parçalarından biri olan pompa, çözücü rezervuarından mobil fazın kolona ve dedektöre ulaşmasını sağlamaktadır. Sabit fazın partikül boyutu, mobil fazın akış hızı ve mobil fazın bileşimi gibi bir dizi faktöre bağlı olarak pompanın basıncı değişkenlik göstermektedir.
- **Enjektör:** Enjektör, tek başına veya enjeksiyon sistemi şeklinde olabilmektedir. HPLC sisteminde enjektör, yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek basınç altında, 0,1-100 mL hacim aralığında sıvı numunenin enjeksiyonunu sağlamaktadır.
- **Kolon:** Kolonlar genellikle paslanmaz çelikten imal edilmiş olup, uzunluğu 50-300 mm arasında, iç çapı ise 2 ila 5 mm arasında olabilmektedir. Kolonlar genellikle 2-10 μ m’lik parçacık boyutuna sahip sabit bir faz ile doldurulmaktadır. Analiz boyunca mobil fazın ve kolonun sıcaklığının sabit tutulması ile analizdeki alıkonma zamanının değişiminin kontrol altına alınmasını sağlamaktadır.

- **Dedektör:** Sistemde kolonun sonunda bulunan dedektör, analitlerin kolondan elüe olmalarına göre tespit etmekte ve sonuçları veri toplama cihazına iletmektedir. Sıvı kromatografide sabit ve değişken dalga boylu UV dedektörler, floresans, kütle-spektrometri refraktif indeks ve elektrokimyasal dedektörler olarak örneklendirilmektedir.
- **Veri toplama:** Dedektörden gelen sinyaller, grafik kaydedici veya elektronik entegratörlerde toplanmaktadır. Bilgisayar aracılığıyla elde edilen sinyaller her bir bileşen için okunması ve yorumlanması kolay bir kromatogram ile verilmektedir.

Karışımların HPLC metoduyla analiz edilmesinin birçok avantajı bulunmaktadır. Kolay ve hızlı bir biçimde uygulanabilmesi, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, çok düşük miktarlarda çalışabilmesi ve ayırma süresinin oldukça kısa olması başlıca avantajları arasında gösterilmektedir. HPLC yöntemi kullanılarak ayrılan bileşiklerin kantitasyonunda yüksek doğruluk, kesinlik ve duyarlılık sağlanması bu yöntemin tercih edilmesindeki başlıca sebepler olarak kabul edilmektedir. Tüm bu özellikler sayesinde HPLC, validasyon ve kalite kontrol çalışmalarında oldukça önemli bir analitik tekniktir. İlaç araştırmaları, klinik analizler, adli kimya, çevre kimyası, kozmetik analizleri, farmasötik uygulamalar ve bunlar gibi birçok kalitatif ve kantitatif analiz HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmektedir (Kumar vd., 2013, Scientific 2014).

1.3.2. HPLC’de kullanılan parametreler

HPLC’de kullanılan parametreler ve bu parametrelere etki eden faktörler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Alıkonma zamanı (t_R): Alıkonma zamanı, bir bileşiğin enjekte edildikten sonra kolonda geçirdiği süre olarak tanımlanmaktadır. Bu süre, enjeksiyon yapıldığı andan itibaren numune pikinin maksimum yüksekliğe sahip olduğu yere kadar geçen zamanın ölçülmesi ile belirlenmektedir. Alıkonma zamanları genellikle dakika cinsinden verilmekte ve t_R olarak gösterilmektedir. Kolon sıcaklığı, basınç, akış hızı ve kolon boyutu gibi faktörler alıkonma zamanını etkileyeceğinden, yapılan çalışma

esnasında bu kromatografik koşulların dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir (Anonim, 2018).

Alıkonma (kapasite) faktörü (k): Alıkonma (veya kapasite) faktörü (k), bir analitin kolon ile etkileşimini belirleyen bir parametredir. Alıkonma faktörü hesaplanırken analitin alıkonma zamanı ve kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanının (t_0) bilinmesi gerekmektedir (Eşitlik 1.1).

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.1)$$

İyonlaşmayan türlerin analizinde t_0 olarak mobil fazdaki organik çözücünün kolondaki alıkonma zamanı kullanılırken, iyonlaşan bileşiklerin analizlerinde urasil, potasyum bromür, sodyum nitrat gibi bileşiklerin alıkonma zamanları kullanılmaktadır.

Hesaplanan k değerinin 1'den büyük olması, analitin alıkonmasının yani sabit faz ile etkileşiminin fazla olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, k değerinin 1'den küçük olması ise analitin kolonda çok fazla tutunmadığını göstermektedir.

Alıkonma faktörü, yapılan analizlerde çoğunlukla elde edilen piklerin karşılaştırılmasında kullanılan bir parametredir. Alıkonma faktörünün değiştirilmesindeki en etkili yol, mobil fazın çözücü gücünün değiştirilmesidir. Bu işlemde genellikle mobil fazdaki organik çözücü miktarının değiştirilmesi ile mümkün olmaktadır. Mobil fazın polaritesinin artırılması ile analit sabit faz ile daha az etkileşmekte ve bunun sonucunda analit kolonda daha kısa süre tutunmaktadır. HPLC'de mobil faz bileşiminin değiştirilmesi, ayırmanın optimizasyonu için oldukça belirleyici ve kullanışlı bir araçtır. Mobil fazın organik modifiyerindeki %10'luk bir artış, her bir bileşen için alıkonma faktöründe 2-3 kat oranında bir azalma meydana getirmektedir. Benzer şekilde organik bileşiminin %10 oranında azaltılması alıkonma faktöründe 2-3 katlık bir artışa neden olmaktadır. Alıkonma faktörünün çok yüksek veya çok düşük olması sıvı kromatografik ayırmada istenmeyen bir durumdur. Özellikle apolar bileşiklerin analizinde alıkonma faktörünün 1'den düşük ya da 10'dan büyük olmaması için ayırmada bazı kromatografik koşulların uygun hale getirilmesi gerekmektedir (Scientific, 2014).

Seçicilik (ayırma) faktörü (α): Kromatografide seçicilik faktörü, numune bileşenlerinin birbirinden ayrılmasını gösteren bir parametredir. Bu parametre iki bileşiğin kapasite faktörü değerlerinin oranı alınarak hesaplanmaktadır (k_2/k_1). α değerinin 1,15 ve daha büyük olması, ayırma gücünün iyi olduğunu ve pikler arasında iyi bir ayırım olduğunu göstermektedir. Teorik olarak seçicilik faktörünün her zaman 1'den büyük olması beklenmektedir. Çünkü α değerinin 1'e eşit olması alıkonma faktörlerinin eşit olması ve bu da alıkonmaların aynı olduğunu, analizi yapılan bileşiklerin ayrılmadıklarını göstermektedir.

HPLC'de ayırmanın seçiciliği; analitin, mobil fazın ve sabit fazın kimyasına bağlı olduğundan bu faktörlerin hepsi ayırmanın optimizasyonu için değiştirilebilmektedir.

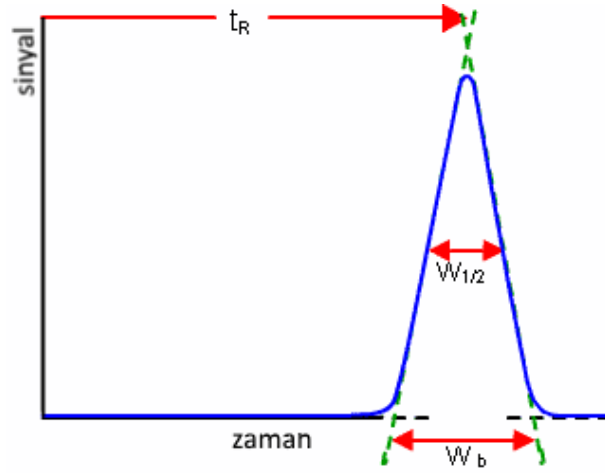
HPLC'de seçiciliğe etki eden birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar;

- Organik çözücü türü
- Mobil faz pH'ı
- Mobil faz bileşimi
- Sabit faz
- Kolon sıcaklığı

gibi faktörlerdir. Seçicilik faktörünün değişmesi kromatografik ayırmayı ciddi anlamda değiştirmektedir. İstenilen ayırma elde edilemediği takdirde yukarıda belirtilen faktörler değiştirilerek seçiciliğin uygun değerlere gelmesi mümkün olmaktadır (Scientific, 2014).

Kolon etkinliği: Bir kolonun etkinliği temel olarak iki faktörle açıklanabilmektedir. Bunlar teorik tabaka sayısı (N) ve tabaka yüksekliği (H) olarak ifade edilmektedir. Tabaka sayısının teorik olarak hesaplanmasında kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir (Eşitlik 1.2). Eşitlikte verilen parametrelerin kromatogram üzerinde gösterimi ise Şekil 1.14'te verilmiştir.

$$N=16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (1.2)$$

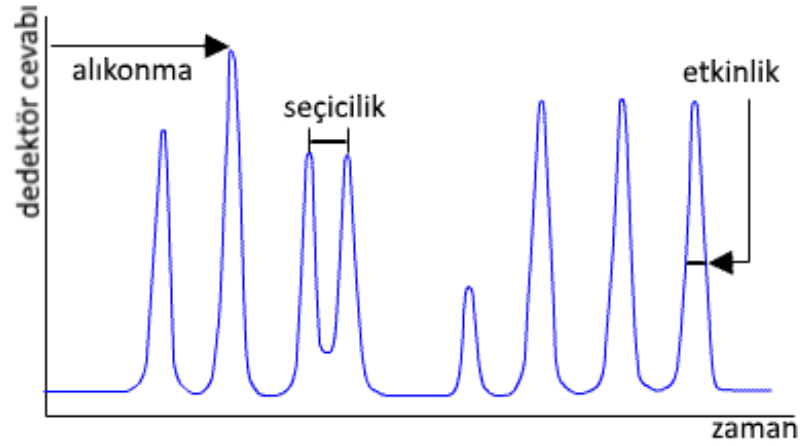


Şekil 1.14. Etkinliğin kromatogram üzerinde gösterimi

Tabaka sayısı (N) ne kadar yüksek olursa her bir tabaka arasındaki mesafe (H) de o derece azalmaktadır. Yüksek etkinlikli bir ayırmanın elde edilebilmesi için tabaka sayısının yüksek, tabaka yüksekliğinin ise düşük olması gerekmektedir. Bu iki terimin birbirleriyle olan ilişkisi, kolonun uzunluğunun (L) bilinmesi ile hesaplanabilmektedir ($H=L/N$). Kolon etkinliği, enjeksiyon hacmi ve akış hızı gibi faktörlerin değişmesi ile değişebilmektedir. Diğer parametrelerde olduğu gibi etkinliğin artması da ayırma gücünü artırmaktadır (Scientific, 2014).

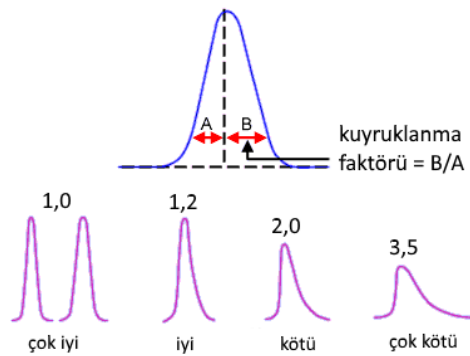
Ayırma gücü (R_s): HPLC’de minimum zamanda optimum ayırma koşulunun belirlenmesi ve bunun neticesinde de ayırma gücü değerinin hesaplanması gerekmektedir. Hesaplanan ayırma gücü değerinin 1,5 ve daha büyük olması, art arda iki pikin alanının veya yüksekliğinin kesin olarak ölçülebilmesini sağlamaktadır. Sıvı kromatografide ayırma gücünün hesaplanabilmesi için birçok formül geliştirilmiştir. Bunlar içerisinde literatürde en yaygın kullanılan eşitlik Purnell eşitliğidir (Snyder, 1997) (Eşitlik 1.3). Eşitlikte de görüldüğü gibi alıkonma, seçicilik ve etkinlik gibi üç önemli parametreden etkilenmektedir (Şekil 1.15).

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{etkinlik}} \times \underbrace{\frac{\alpha-1}{\alpha}}_{\text{seçicilik}} \times \underbrace{\frac{k_2}{1+k_2}}_{\text{alıkonma}} \quad (1.3)$$



Şekil 1.15. Ayırma gücünü etkileyen parametrelerin kromatogram üzerinde gösterimi

Pik kuyruklanması: Sıvı kromatografik ayırmanın kalitesini belirleyen ve doğru kolonun seçilip seçilmediğini gösteren önemli bir parametredir. Bu parametre sıklıkla pik asimetri faktörü (A_s) ile belirlenmektedir. A_s , pik yüksekliğinin %10'undaki pik genişliği olarak hesaplanır. İlaç analizleri dışında çalışan bütün analizciler çoğunlukla asimetri faktörünü kullanırlar. Birleşik devlet farmakopesini (USP) kullanan ilaç analizcileri pik asimetrisini kuyruklanma faktörü (T_f) olarak hesaplarlar. T_f , pik yüksekliğinin %5'indeki pik genişliği olarak hesaplanır. Kromatografide ideal bir pikin simetrik olması gerekmektedir. Tam anlamıyla simetrik bir pikin kuyruklanma faktörü ise 1 kabul edilmektedir (Şekil 1.16). Sabit fazın adsorpsiyon etkileri, kolon dolgusunun kalitesi ve cihaz kaynaklı bazı sebeplerden ötürü pikler, kuyruklanma eğilimi göstererek simetrileri bozulabilmektedir. Ayrıca, numune derişimi çok yüksekse kuyruklanma pikin ön tarafında meydana gelmektedir (Scientific, 2014).

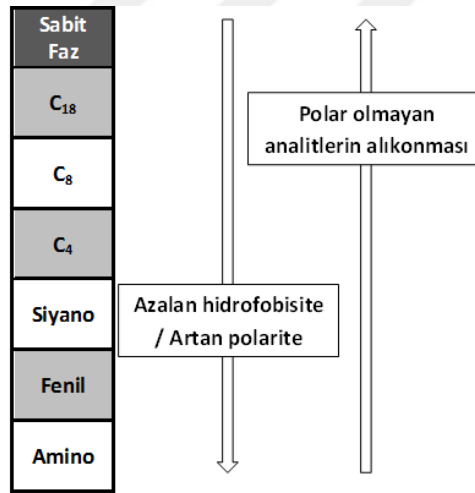


Şekil 1.16. Kuyruklanma faktörlerine göre pik şekilleri

Kromatogramdaki simetrik olmayan (asimetrik) pikler ayırmada ve piklerin kantitasyonunda bazı problemler meydana getirmektedir. Asimetrik piklerin ayrılması daha zordur ve bu piklerin kantitasyonlarında tekrarlanabilir ölçümler alabilmek için integrasyon yapılması hata oranını azaltmaktadır.

1.3.3. Ters faz sıvı kromatografi (RPLC)

Ters faz sıvı kromatografide (RPLC), mobil faz sabit fazdan daha polardır. RPLC yaygın olarak kullanılan sıvı kromatografi çeşididir ve bu yöntemde bileşiklerin hidrofobisitesine göre ayırım yapılabilir. RPLC’de kullanılan sabit fazlar hidrofobik, mobil fazlar ise hidrofilik özelliğe sahiptir. RPLC’de sıklıkla kullanılan sabit fazlar Şekil 1.17’de gösterilmektedir.



Şekil 1.17. RPLC’de kullanılan sabit fazlar

1.3.3.1. RPLC’de analitlerin alıkonması

Bir analitin hidrofobisitesi, RPLC’de alıkonmanın belirlenebilmesi için en önemli gösterge olarak kabul edilmektedir. Hidrofobisite, analitin standart koşullar altında karışmayan iki çözücüdeki (genellikle oktanol ve su) dağılımının bir ölçüsüdür ve log P ile ifade edilmektedir (Eşitlik 1.4).

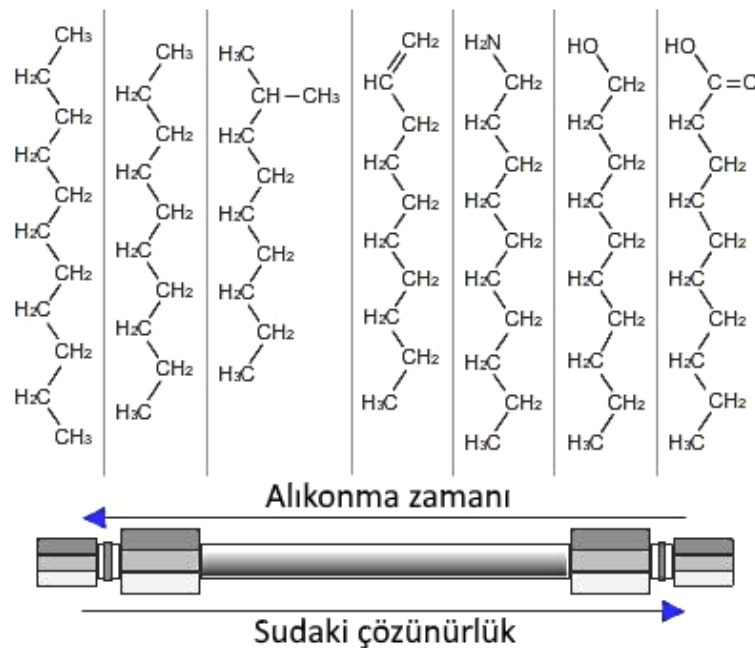
$$\log P_{\text{okt/su}} = \log \left(\frac{[\text{çözünen}_{\text{oktanol}}]}{[\text{çözünen}_{\text{su}}]} \right) \quad (1.4)$$

LogP değeri ne kadar yüksek ise molekül o kadar hidrofobiktir. Hidrofobik bileşikler ters faz koşullarında oldukça yüksek bir tutunma gösterdikleri için RPLC ile tayinleri çok daha uygun olmaktadır. Benzer şekilde hidrofilik bileşikler de uygun kolon seçimiyle ters faz sıvı kromatografi ile tayin edilebilmektedir.

Hidrofobisitenin yanı sıra, kromatografik analizi yapılacak olan numunedeki moleküllerin yapısı da elüsyon sırasına ilişkin ipuçları vermektedir. Elüsyon sırası, molekülün sudaki çözünürlüğü ile yakından ilgilidir ve molekülün karbon içeriği de bu sırayı etkilemektedir. Kimyasal yapı ile alıkonma arasındaki ilişkiyi gösteren bazı durumlar aşağıda özetlenmektedir:

- Bir analit suda ne kadar az çözünüyorsa alıkonması o kadar yüksek olmaktadır.
- Moleküldeki karbon atomlarının sayısı arttıkça alıkonma artmaktadır.
- Dallanmış zincirli bileşikler, normal izomerlerden daha hızlı elüe edilmektedir.
- Moleküldeki doymamışlık alıkonmayı düşürmektedir.
- Elüsyon zamanı en kısa olan nötr bileşiklerdir ve bu sırayı önce asidik daha sonra ise bazik bileşikler takip etmektedir (Scientific, 2014).

Şekil 1.18’de kimyasal yapısı verilen bazı bileşiklerin alıkonma sürelerinin ve sudaki çözünürlüklerinin yapıya göre değişmesi gösterilmektedir.



Şekil 1.18. Kimyasal yapının alıkonma zamanı ve sudaki çözünürlüğe etkisi

1.3.3.2. RPLC’de kullanılan mobil fazlar

RPLC’de mobil faz olarak genellikle su ve organik çözücülerden oluşan karışımlar tercih edilmektedir. Bunların yanı sıra iyonlaşan bileşiklerin analizinde ise alıkonmanın ve pik şeklinin kontrolünü sağlamak amacıyla mobil faza çeşitli tampon çözeltiler veya katkı maddeleri ilave edilebilmektedir.

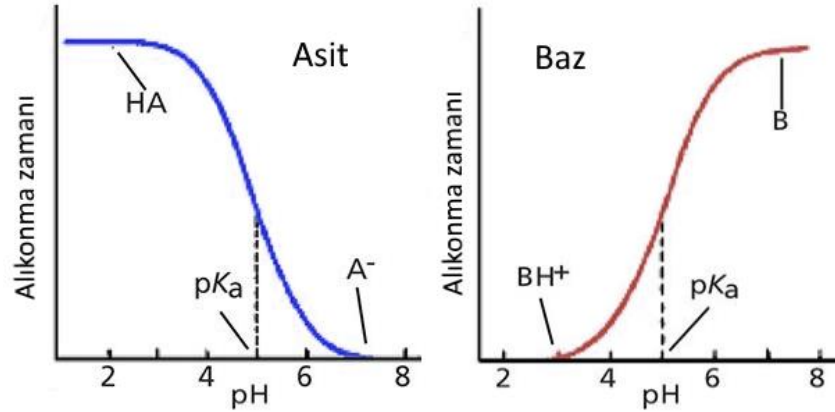
Kromatografik olarak RPLC’de en zayıf çözücünün su olduğu bilinmektedir. Bu yüzden suyun yanına organik modifiyer ilave edilerek analitin sabit faz ile daha az etkileşmesi sağlanarak analitin daha erken elüe olması mümkün olmaktadır. Mobil faza eklenen organik çözücü miktarı ne kadar artarsa, analitlerin alıkonma süreleri de o kadar azalmaktadır (Rafferty vd., 2011).

Asetonitril, metanol, etanol, THF, DMSO, hekzan, kloroform, dioksan, IPA ve aseton RPLC’de sıklıkla tercih edilen organik çözücülerdir. Mobil fazda kullanılan organik modifiyerler, ayırmanın seçiciliğini ve alıkonma özelliklerini değiştireceğinden organik modifiyer seçimi büyük önem arz etmektedir.

Ters faz sıvı kromatografide mobil fazlarda sıklıkla kullanılan organik çözücülerden biri asetonitrildir. Suda çözünürlüğü oldukça yüksek olan asetonitrilin diğer organik çözücülere kıyasla birçok avantajı bulunmaktadır. RPLC’de kullanılan başlıca organik çözeltiler içerisinde en düşük absorbansa sahip olan çözücü asetonitrildir (ACN: 190 nm; MeOH: 205 nm; THF: 215 nm; su: 200 nm). 25°C’deki dielektrik sabiti (ϵ) 35,88 olan asetonitrilin yoğunluğu 0,786 g/cm³’tür. Asetonitril yüksek bir dipol momente sahiptir ve asitliği (hidrojen bağ donörü) oldukça baskındır. Asetonitril düşük UV absorbansa, düşük viskoziteye (0,352 cP) ve yüksek kaynama noktasına (81,60°C) sahip olduğundan sıklıkla kullanılmaktadır (Jones, 2009).

RPLC’de ayırmanın optimizasyonu için mobil faz pH’sının kontrolü oldukça önemlidir. Alıkonma zamanı, analitlerin hidrofobisite ve polarite özelliklerine dayanmaktadır. Analizi yapılan tüm bileşiklerin nötr olması durumunda mobil faz pH’sı göz ardı edilebilir. İyonlaşabilen analitlerin analizi söz konusu olduğunda ise mobil faz pH’sı değiştiğinde alıkonma zamanlarında değişme meydana gelmektedir. Asidik ve bazik gruba sahip bileşikler için alıkonma zamanları mobil faz pH’sına karşı

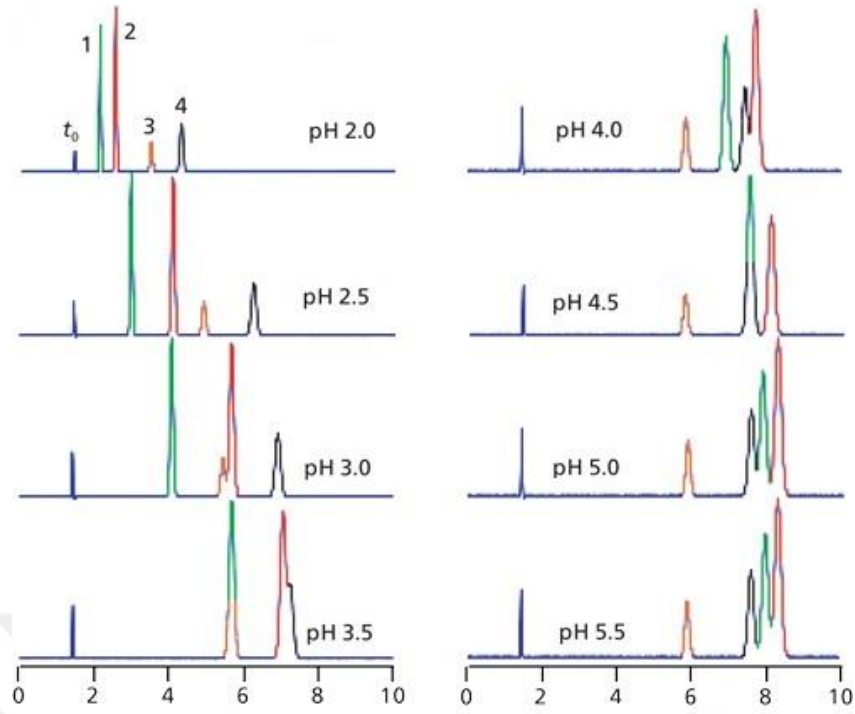
grafiğe geçirildiğinde sigmoidal gözlemlenmektedir (Şekil 1.19). Sigmoidalin orta noktasındaki pH, bileşiğin pK_a değerine eşittir. Ters faz sıvı kromatografide pK_a değerlerini bu yaklaşımla hesaplayan paket programları mevcuttur (Sherrod, 2008; Originlab, 2016). Bu grafikler asidik ve bazik bileşiklerin genel alıkonma davranışlarını göstermektedir. Bu davranışlar birbirlerinin ayna görüntüsü olarak nitelendirilmektedir.



Şekil 1.19. Asidik ve bazik bileşikler için mobil faz pH'sına karşı alıkonma değişiminin gösterimi

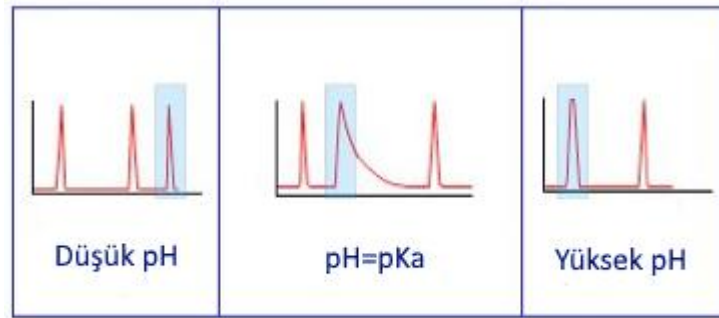
Asidik bileşiklerin nötral formu (HA) iyonlaşmış formundan (A^-) daha çok kolonda tutunur. Bazlarda ise bunun tam tersi söz konusudur. İyonlaşan kısım (BH^+) kolonda daha az tutunurken, nötral formu (B) kolonda daha çok tutunmaktadır. Bu prensip göz önünde tutulduğunda ise hem asidik hem de bazik özellikteki bileşiklerin aynı anda ayrımı söz konusudur (Dolan, 2017).

Mobil faz pH'sı alıkonmayı etkilediği gibi seçiciliği de etkilemektedir. Mobil faz pH'sında yapılan değişim alıkonmalarda önemli derecede değişikliğe yol açar (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Mobil faz pH'sı ve seçicilik arasındaki ilişki (Dolan, 2017)

Mobil faz pH'sındaki küçük bir değişim pik şekillerini de etkileyebilmektedir. Ayırmada mobil faz pH'sı analizi yapılan bileşiğin pK_a değerinin $\pm 1,5$ aralığında olması gerekmektedir. pH değeri bileşiğin pK_a değerine yakın olduğunda pik şekli önden veya arkadan kuyruklanma yapabilmektedir (Şekil 1.21).



Şekil 1.21. Mobil faz pH'sının pik şekline etkisi

1.3.3.3. RPLC'de kullanılan tamponlar

Uygun tampon pH'sının seçimi RPLC'de iyonlaşan bileşiklerin ayırımında tekrarlanabilirliğin sağlanması için gereklidir. İyonlaşan bileşikler için uygun olmayan pH'nın seçimi sıklıkla pik asimetrisini etkilemektedir. Keskin ve simetrik pikler, düşük

dedeksiyon limiti, enjeksiyonlar arasında düşük bağıl standart sapma (RSD) ve alıkonma zamanlarının tekrarlanabilirliği kantitatif analiz için gereklidir.

Ters faz sıvı kromatografide mobil faz pH değerleri genellikle 2,0 ile 7,5 arasındadır. Numune çözeltisi, bu pH aralığı dışındaysa veya ters faz koşullarında analit iyonlaşıyorsa mobil fazda mutlaka tamponların kullanılması gerekmektedir. Tampon pH'sı seçilmeden önce analitin pK_a değerinin bilinmesi gereklidir. Analitin pK_a değerinin 2 birimin altında veya üstünde tampon pH'sının seçilmesi iyi bir pik şekli için tercih edilmelidir.

Mobil faz pH seçimi bir örnek ile açıklayabiliriz. Benzoik asitin pK_a değeri 4,2'dir. pH 2,2'de bileşik nötral formdadır. pH 6,2'de ise anyonik formdadır. Ters faz sıvı kromatografide bu bileşiğin kolonda tutunması için nötral formda olması gerekir (yapısında bulunan karboksilik asitten dolayı). Bu yüzden pH'sı 2,2 civarında olan asidik bir tampon seçilmelidir. Çizelge 1.3'te RPLC'de yaygın kullanılan tamponlar ve tamponlama aralıkları verilmiştir. Çizelge 1.3'e göre benzoik asit için Çizelge 1.3'te pH 2,2'de fosfat ve sitrat tamponların kullanılabileceği görülmektedir (Bosch vd., 1996)

Çizelge 1.3. RPLC'de yaygın olarak kullanılan tamponlar

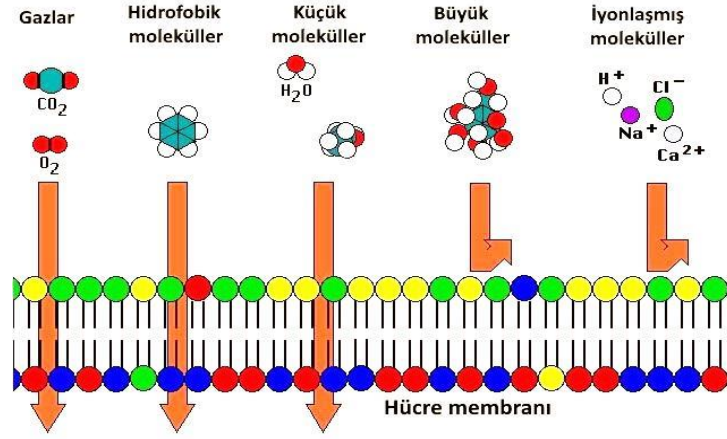
Tampon	pK_a	pH aralığı	UV (nm)
Fosfat	2,1	1,1-3,1	< 200
	7,2	6,2-8,2	
	12,3	11,3-13,3	
Asetat	4,8	3,8-5,8	210
Sitrat	3,1	2,1-4,1	230
	4,7	3,7-5,7	
	5,4	4,4-6,4	
Karbonat	6,1	5,1-7,1	< 200
	10,3	9,3-11,0	
Format	3,8	2,8-4,8	210
Amonyum bikarbonat	7,6	6,6-8,6	230
Borat	9,3	8,3-10,3	-

1.4. İlaçların İyonlaşması ve Protonasyon Sabiti

Bir bileşiğin fizikokimyasal profilinin (çözünürlük, iyonlaşma, lipofilisite, geçirgenlik) bilinmesi, farmakokinetik parametrelerinin ve biyolojik etkilerinin tahminine olanak sağlamaktadır. Özellikle ilaçların iyonlaşma davranışlarının bilinmesi; membran geçirgenliği, plazma proteinlerine bağlanma, doku penetrasyonu ve hücre-ilâç etkileşimleriyle ilişkili olan birçok parametreyi daha anlaşılabilir kılmaktadır. İlaç moleküllerinin asit-baz özellikleri, ilaçların geliştirilmesinde anahtar parametredir çünkü bu özelliklerin bilinmesi ile ilaçların absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon ve toksikolojik özellikleri hakkında net bilgilere ulaşılmaktadır.

Protonasyon sabiti (pK_a) ise, bazik bileşiklerin iyonlaşmasını gösteren fizikokimyasal bir parametredir. Bu parametre ile ilaçların ADMET özellikleri ve yapısal karakterizasyonu belirlenmektedir. Aynı zamanda pK_a değeri, ilaçların organizma içerisindeki davranışlarını tahmin etmeye olanak sağlar bu da ilacın biyoyararlanımı ile yakından ilgilidir (Ishihama vd., 2001, Wiczling, 2004, Babic, 2007).

Canlı organizmalarda vücudun farklı bölgeleri farklı pH özelliklerine sahiptir. Örneğin; ağız pH'ı 6,7 civarında iken, kalın bağırsağın pH'ı 7,3 civarındadır. Bir ilâç geliştirilirken, ilacın organizma içerisinde daha efektif davranabilmesi için, ilacın farklı pH değerlerindeki davranışının bilinmesi gerekmektedir. İlaçların membranlardan geçişinde de pH'ın etkisi farmakolojik açıdan oldukça önem teşkil etmektedir. Ayrıca bir ilacın membrandan geçip geçemeyeceği, membranın her iki tarafının pH'ına ve ilacın pK_a değerine bağlıdır. Bununla birlikte bileşiklerin membranlardan geçebilmesi için mutlaka iyonlaşmamış formda bulunması gerekmektedir (Şekil 1.22). İyonize form suda daha fazla çözünürken, nötr form daha lipofiliktir ve daha yüksek zar geçirgenliğine sahiptir (Goldstein, 1974; Gibaldi, 1984; Stoelting, 1999; Dolin, 2000).



Şekil 1.22. Hücre membranından molekül geçişleri

Sürekli olarak yeni ilaçların keşfedilmesi, pK_a tayini için de birçok yöntem geliştirilmesine neden olmaktadır. pK_a tayini günümüzde birçok yöntemle gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler potansiyometrik, spektrofotometrik, sıvı kromatografik ve elektroforetik yöntemlerdir.

Potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemler doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından oldukça güvenilir yöntemlerdir. Fakat potansiyometrik yöntemlerde çok küçük miktarlarda çalışılabilmek mümkün olmadığından ve yeni metotların geliştirilmesinden dolayı pK_a tayinindeki kullanımı günümüzde daha az tercih edilir hale gelmiştir. Spektrofotometrik yöntemlerde ise bileşikler çok düşük çözünürlük ve derişimlere sahip olsalar dahi pK_a tayinleri mümkün olmaktadır. Bu yöntemin öncelikli avantajı yüksek duyarlılığa sahip olmasıdır ki bu nedenle molar absorpsiyon katsayısı çok düşük olan bileşikler bile bu yöntemle rahatlıkla tayin edilebilmektedir (Babíc vd., 2007) .

Son yıllarda ayırmaya dayalı alternatif teknikler olarak sıvı kromatografi ve kapiler elektroforez yöntemleri geliştirilmiştir. Bileşiklerin bu yöntemler ile su-organik çözücü ortamlarındaki asit-baz davranışları hakkında yeterli düzeyde bilgiler elde edilebilmektedir. Kapiler elektroforez yöntemi ile iyonlaşmış bileşiğin pK_a değerinin tayini, sabit iyonik şiddette ve çeşitli pH 'lardaki su/su-organik çözücü ikili karışımlarındaki elektroforetik hareketliliğin belirlenmesine dayanmaktadır. Sıvı kromatografi tekniği ise analitin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış türlerinin farklı alıkonma davranışlarının tayinine bağlı olarak uygulanmaktadır. Ters faz sıvı

kromatografi yöntemi pK_a tayin yöntemleri içerisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun nedenleri;

- Çalışmada çok düşük miktarlarda bileşikler kullanılması
 - Çalışılan örneğin ve çözünen maddenin saf olmasının gerekmemesi
 - Düşük çözünürlüğün herhangi bir sorun teşkil etmemesi
 - Çözünen madde konsantrasyonunun ölçümünün gerekmemesi
- olarak sıralanabilir (Ishihama vd., 2002; Ravichandiran vd., 2011).

Sıvı kromatografide alıkonmanın (t_R) mobil faz pH'sı ile ilişkisi teorik olarak ilk kez 1977 yılında Horvath ve Melander tarafından önerilmiştir (Horvath ve Melander, 1980). Monoprotik bazlar için alıkonmanın değişimi Eşitlik 1.5'te verilmektedir.

$$t_R = \frac{t_{R_B} + t_{R_{BH^+}} \frac{\alpha_{H_m^+} V_{BH_m^+}}{K_a}}{1 + \frac{\alpha_{H_m^+} V_{BH_m^+}}{K_a}} \quad (1.5)$$

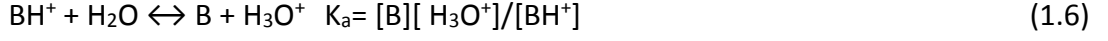
Eşitlikte, K_a ; zayıf bazın protonasyon sabiti, $V_{BH_m^+}$; Debye-Hückel eşitliği ile hesaplanan mobil fazdaki iyonlaşan bazın aktivite katsayısı, t_{R_B} ; iyonlaşmamış zayıf bazın alıkonması, $t_{R_{BH^+}}$; iyonlaşmış zayıf bazın alıkonması ve $\alpha_{H_m^+}$; mobil fazdaki hidrojen iyonu derişimidir. Bağintıdan da görüldüğü gibi iyonlaşan bileşiğin alıkonma zamanını etkileyen üç etken vardır. Bunlar, moleküler ve iyonik türün alıkonma zamanı ve bileşiğin iyonlaşma sabitidir. Bu üç deneysel değer de organik modifiyerin derişimine bağlı değerlerdir. Bu bağintı, herhangi bir iyonlaşan bileşikte organik modifiyerin belli derişimi için protonasyon sabiti değeri ve su-organik çözücü ikili karışımının hidronyum derişimi biliniyorsa, bize teorik alıkonma zamanı değerlerini hesaplama imkanı sağlar.

1.4.1. İyonlaşma derecesi parametresini kullanarak alıkonmanın tahmini

RPLC yönteminde çözünenin alıkonmasının belirlenmesi birçok faktöre (sabit faz, organik modifiyerin tipi, mobil faz bileşimi ve pH'sı, kolon sıcaklığı) bağımlı bir işlemdir. RPLC'de analitin alıkonmasının tahmin edilmesi için iyonlaşma derecesini temel alan $\log[1-D(1-f)]$ parametresi kullanılmaktadır (Rosés vd., 1998). Bu

parametre ile nötral, asidik, bazik ve amfiprotik bileşiklerin alıkonma zamanı hesaplanabilmektedir.

Zayıf bir baz için iyonlaşma aşağıdaki gibi gösterilir (Eşitlik 1.6):



D , mobil faz pH'sı, aktiflik katsayısı (γ) ve pK_a değerine bağımlı olarak hesaplanabilir (Eşitlik 1.7 ve Eşitlik 1.8).

$$D = [BH^+]/[B] + [BH^+] = [H_3O^+]/[H_3O^+] + K_a \quad (1.7)$$

$$D = 10^{(pK_a - pH \cdot \gamma)} / (1 + 10^{(pK_a - pH \cdot \gamma)}) \quad (1.8)$$

Zayıf baz için deneysel olarak tayin edilen alıkonma zamanı (t_R) nötral (t_{RB}) ve iyonik (t_{RBH^+}) türlerin alıkonma zamanı ve her bir tür için hesaplanmış mobil faz pH'ına bağımlı D ile hesaplanabilir (Eşitlik 1.9).

$$t_R = (1-D)t_{RB} + Dt_{RBH^+} \quad (1.9)$$

Eşitlik 1.9, zayıf bazın mobil faz pH'ına bağımlı olarak belirlenen alıkonma zamanının (t_R) sigmoidal ilişkisini tanımlamaktadır. Sıvı kromatografik kolonda zayıf bazın iyonik formu, nötral formundan daha az tutunur ($t_{RBH^+} < t_{RB}$). Bu durum göz önüne alınarak eşitlik sadeleştirildiğinde aşağıdaki eşitliğe dönüştürülür (Eşitlik 1.10).

$$\log t_R = \log t_{RB} + \log(1-D) \quad (1.10)$$

t_{RBH^+} değerinin t_{RB} ya oranlanması ile f parametresi tanımlanabilir (Eşitlik 1.11).

$$f = t_{RBH^+}/t_{RB} \quad (1.11)$$

f değerine bağımlı olarak yukarıdaki eşitlik tekrar aşağıdaki şekilde yazılabilir (Eşitlik 1.12).

$$\log t_R = \log t_{RB} + \log[1-D(1-f)] \quad (1.12)$$

$\log[1-D(1-f)]$ bileşiğin iyonlaşmasını açıklamak için çözünen parametresi olarak kullanılmaktadır. D kullanılarak hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$

grafiğe geçirildiğinde bir doğrusallığın olması beklenir. Bunun yanı sıra eğim değerinin 1 ve kesim değerinin 0 veya sifıra yakın olması gerekmektedir (Roses vd., 1998).

Sıvı kromatografik yöntemle pK_a tayininde bileşiğin $pK_a \pm 2$ değerleri dikkate alınarak mobil fazın pH değerleri belirlenir ve pH'sı belli mobil fazlar kullanılarak alıkonma zamanları belirlenir. Alıkonma zamanının pH ile değişimi grafiğe geçirildiğinde sigmoidal davranış gözlenir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki pK_a değerini verir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde sıvı kromatografik yöntemle hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir (Sherrod, 2008). Benzer şekilde Solver (Çözücü), Microsoft Excel'de elektronik tablo optimizasyon modelleme sistemi olarak kullanılan bir eklentidir. Çeşitli doğrusal ve doğrusal olmayan eşitlikleri çözmek için kullanılmaktadır. Bir dizi deneysel veriyle bağımlı değişken üzerinde ilk parametreler seti kullanılarak tahmin edilmek istenen veri çözümlendirilerek belirlenir. Bu eklenti ile de bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanabilmektedir.

1.4.2. Ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile bileşiklerin su ortamındaki pK_a tayini

İlaçların çoğunun kimyasal yapısı zayıf asit veya zayıf bazdan oluşmaktadır. Bu yüzden birçok ilacın sudaki çözünürlükleri oldukça azdır. Bu durumda ilaçlarla ilgili çalışma yapılırken tam anlamıyla çözünmenin sağlanabilmesi için mobil faza organik modifiyer ilave edilmesi gerekmektedir. Mobil fazdaki organik modifiyerin varlığı bileşiklerin pK_a 'sını direkt olarak etkiler. Bir bileşiğin su ortamında çözünmemesi bileşiğin su ortamındaki pK_a değerinin hesaplanması için engel teşkil etmemektedir. Bileşiğin su-organik çözücü karışımında elde edilen pK_a verileri kullanılarak farklı metotlarla bileşiğin sudaki değerini hesaplamak mümkündür. Su ortamındaki pK_a değerlerinin hesaplanması için birçok metot olduğundan, tez kapsamında kullanılan organik modifiyer derişiminin molkesri değerlerinin kullanıldığı mol kesri- pK_a yaklaşımı, solvatokromik çözücü parametresi (E_T^N) kullanılarak yapılan hesaplama ve Kamlet-taft parametreleri kullanılarak yapılan hesaplama yöntemleri anlatılacaktır (Kamlet vd., 1983; Takacs-Novak vd., 1997; Avdeef vd., 1999; Babić, 2007).

2.4.2.1. Mol kesri - pK_a yöntemi

Bu yöntemde mutlaka mobil fazda kullanılan organik çözücünün hacimce kesrine karşılık mol kesri değerlerinin bilinmesi gereklidir. Tez çalışmasında organik modifiyer olarak asetonitril belirlenmiştir ve asetonitrile ait mol kesri değerleri (X_{ACN}) Çizelge 1.4'te gösterilmektedir (Gagliardi vd., 2007). Mobil fazdaki organik çözücünün mol kesrine karşı, mobil fazda belirlenen pK_a değerleri grafiğe geçirildiğinde bir doğru elde edilir. Bu doğrudan elde edilen fonksiyonun kesim noktası analitin sudaki pK_a değerini verir.

Çizelge 1.4. Asetonitril ve su içeren karışımlara ait mol kesri değerleri

%(v/v)	X_{ACN}	%(v/v)	X_{ACN}
10	0,037	15	0,057
20	0,079	25	0,102
30	0,127	35	0,155
40	0,184	45	0,216
50	0,252	55	0,291
60	0,334	65	0,382
70	0,436	75	0,498
80	0,568	85	0,649
90	0,745	95	0,860

1.4.2.2. Solvatokromik çözücü parametresi yöntemi

Bu yöntem kullanılarak bileşiğin mobil fazdaki organik modifiyerin hacimce yüzdelerinde hesaplanmış olan solvatokromik çözücü parametresine (E_T^N) karşı pK_a değerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıda solvatokromik çözücü parametresi (E_T^N) yerine su ortamındaki solvatokromik çözücü parametresinin sabit değeri 0,46 konularak bileşiğin su ortamındaki protonasyon sabiti değeri belirlenir (Reichardt ve Welton, 2011).

1.4.2.3. Kamlet-Taft yöntemi

Çözücü davranışını anlamak ve tahmin etmek için en kapsamlı ve yaygın kullanılan parametrelerden biri de Kamlet-Taft parametreleridir. Çözünen-çözücü etkileşim gücü genel olarak açıklanacak olursa polarite tek bir parametre ile tanımlanamaz. Bu

durumu açıklayabilmek için polarite Kamlet ve Taft tarafından üç parametreye ayrılmıştır. Bunlar;

- Dipolarite/polarize edilebilirlik (π^*)
- Hidrojen bağı asitliği (α)
- Hidrojen bağı bazlığı (β)'dır.

İyonlaşma derecesi parametresi yaklaşımı bu parametrelerle ilişkilendirildiğinde ise RPLC'de alıkonmanın tahmini Eşitlik 1.13 ile mümkün olmaktadır.

$$\log k = (\log k)_0 + s\pi_m^* + \alpha\beta_m + \beta\alpha_m \quad (1.13)$$

Verilen eşitlikteki katsayılar; çözünen, sabit faz ve mobil faz ile ilişkilidir (Lagalante vd., 1998, Demiralay vd., 2009). Çizelge 1.5'te verilen değerler eşitlikte yerine konulduğunda bileşiklerin alıkonmalarına bağlı olarak pK_a değerleri elde edilebilmektedir.

Çizelge 1.5. RPLC'de sıklıkla kullanılan çözücülere ait Kamlet-Taft parametreleri

Çözücü	π^*	α	β
Asetonitril	0,19	0,40	0,75
Metanol	0,98	0,66	0,60
THF	0,00	0,55	0,58
Su	1,17	0,47	1,09

1.5. İlaç Analizlerinde Analitik Metodun Geliştirilmesi

Metot geliştirme birçok faktöre dayanmaktadır. Metot geliştirmeye başlamadan önce çalışılacak bileşiğin, ilacın veya numunenin tüm fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bilinmesi ve metodun amaç tanımlaması yapılarak bu amaca uygun koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Bir analitik metot geliştirilirken, analizi yapılacak ilaçların daha önce aynı kromatografik yöntemlerle tayin edilip edilmediğinin araştırılması, bunun için de literatürde tarama yapılması gerekmektedir. Yapılmış olan benzer çalışmalar, yeni metotların geliştirilmesinde deneysel olarak çalışmacılara yol göstermektedir.

Metot geliştirilirken dikkat edilmesi gerekenler;

- Yeterli örnek bilgisi ve ayırma hedefinin belirlenmesi
- Örnek ön hazırlığı ve prosedürünün oluşturulması
- Dedektör seçimi
- Kromatografi türünün seçilmesi ve ayırmanın sağlanacağı koşulların belirlenmesi
- Ayırma koşullarının optimizasyonu
- Metot validasyonu'dur.

Metot geliştirmede kromatografik ayırım esnasında zaman, pompa basıncı, çözücü tüketimi ve kantitasyon ile ilgili hedeflenen belli ölçütler bulunmaktadır. Bu ölçütler Çizelge 1.6'da kısaca özetlenmiştir (Clark, 2016).

Çizelge 1.6. Metot geliştirmede başlıca ayırma hedefleri

Parametre	Hedef
Ayırma gücü	Hassas ve doğru bir kantitatif analiz için ayırma gücü değerinin 1,5'tan büyük olması gerekmektedir.
Ayırma zamanı	Her bir analit için olması beklenen zaman 5-10 dakika arasındadır.
Kantitasyon	Kantitatif analizlerde bağıl standart sapmanın %2'den küçük olması hedeflenmektedir.
Pompa basıncı	Pompa basıncının 150 bar'dan düşük olması beklenmektedir fakat 200 bar'a kadar kabul edilebilir.
Çözücü tüketimi	Mobil faz kullanımının her çalışmada minimum düzeyde olmasına dikkat edilmelidir.

Metot geliştirmede seçilen dedektör ile tüm bileşenlerin algılanacağından emin olmak gerekmektedir. Normal şartlarda kromatografide en çok tercih edilen dedektörler çoklu dalga boyuna sahip UV dedektörlerdir. Numune için dedektör cevabının yetersiz olduğu durumlarda ise diğer dedektörler tercih edilebilmektedir.

Metot geliştirilirken tercih edilen kolon ve mobil faz seçimi, pik şeklinin ve ayırma koşullarının optimizasyonunda oldukça önemli rol oynamaktadır. Kolonun uzunluğu ve parçacık boyutu analiz hızını ve çözücü tüketimini etkilemektedir. Genellikle kolon seçilirken sabit fazın polaritesi ile numunedeki analitlerin polaritesinin birbirine uyumlu olması gerekmektedir. Seçilen mobil fazda analitlerin tamamen

çözünmüş olması ve mobil fazın polaritesinin ise belirtildiği gibi yöntemine uygun olması gerekmektedir. Çizelge 1.7’de mobil fazda kullanılan organik çözücüler polarite sıralarına göre yer almaktadır.

Çizelge 1.7. Polaritelerine göre organik çözücüler

1	Floroalkanlar (en az polar)	10	Aseton
2	Hekzan	11	Etil asetat
3	İzooktan	12	Dioksan
4	Karbon tetraklorit	13	İzopropanol
5	Toluen	14	Etanol
6	Dietil eter	15	Asetik asit
7	Kloroform	16	Asetonitril
8	Metilen klorür	17	Metanol
9	Tetrahidrofuran	18	Su (en polar)

Mobil faz olarak su ve su-organik çözücü ikili karışımları kullanılırken, analiz süresinin uzun olduğu veya ayırmanın zayıf olduğu durumlarda, 2 veya 3 farklı çözücü aynı anda mobil fazda kullanılabilir. Fakat bu tip üçlü karışımlarda mobil faz pH standardizasyonu mümkün değildir. Bunun için mobil fazda üç veya daha fazla çözücünün bulunduğu koşullar tercih edilmemelidir. Alıkonma zamanı, mobil faz bileşimi ile yakından etkilidir ve alıkonma mobil faz polaritesinin değişimi ile kolaylıkla değişebilmektedir. Ters faz sıvı kromatografide en çok kullanılan ve en iyi sonuç veren organik çözücüler; tetrahidrofuran, asetonitril ve metanoldür. Bunun yanı sıra analitin yapısında bulunan fonksiyonel grupların polaritelerine göre kullanılacak çözücüler de değişiklik göstermektedir. Çizelge 1.8’de polaritelerine göre fonksiyonel gruplar gösterilmektedir.

Çizelge 1.8. Polaritelerine göre fonksiyonel gruplar

1	Hidrokarbonlar (apolar)
2	Eterler
3	Esterler
4	Ketonlar
5	Aldehitler
6	Amitler
7	Aminler
8	Alkoller
9	Su (polar)

Metot geliştirmenin en önemli aşamalarından birisi kolondaki sabit faz seçimidir. Sabit fazın seçimi birçok faktör göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Çizelge 1.9’da kullanılan kolonlar ve özellikleri genel olarak belirtilmiştir.

Çizelge 1.9. Kolonlar ve özellikleri

Kolon	Özellik
C ₁₈ (oktadesil, ODS)	En dayanıklı ve tutma kapasitesi en yüksek olan kolon türü olduğu için en çok tercih edilen kolondur.
C ₈ (oktil)	C ₁₈ ’e benzer özelliklere sahiptir fakat tutma kapasitesi C ₁₈ ’e göre biraz daha düşüktür.
C ₃ ve C ₄	Az tutma kapasiteli ve az kararlılığa sahip kolonlardır. Özellikle hidrofobisitesi yüksek olan bileşiklerin analizlerinde tercih edilmektedir. Az tutma kapasitesine ve daha az kararlılığa sahip kolonlardır.
C ₁ (trimetilsilil)	En az tutma kapasitesine ve en düşük kararlılığa sahip olan kolon türüdür.
Fenil	Orta dereceli tutma kapasitesine sahip kolonlardır fakat seçicilikleri değişkendir.
CN (siyano)	Orta dereceli tutma kapasitesine sahip olup hem normal faz hem de ters faz kromatografide kullanılmaktadır.
NH ₂ (amino)	Zayıf tutma kapasiteli ve az kararlılığa sahip kolonlardır ayrıca normal fazda daha çok kullanılmaktadırlar.
Polistiren	pH 1-13 arasında oldukça kararlıdır, pik şekilleri düzgün olmasına karşın etkinliği düşük bir kolon türüdür.

Farklı kolon üreticileri tarafından üretilen ve benzer özelliklere sahip olan kolonlar arasında genellikle seçicilik farkı bulunmaktadır. Silika temelli kolonlar, polimerik eşdeğerliklerinden ve tekrarlanabilir olma eğilimlerinden dolayı en sık tercih edilen kolon türleridir. Bileşiklerin yapılarında bulunan fonksiyonel gruplar ve bileşiklere ait fizikokimyasal parametreler hakkında yeterli bilgi sahibi olunması durumunda kolon seçimi kolaylıkla yapılabilir. Numune hakkında yeterli çalışma ve ön bilgi bulunmadığı takdirde uygun kolonu belirlemek için literatürde tayini yapılacak analite yapısal benzerliği olan çalışmalar incelenmelidir. Deneme yanılma yöntemi asla tercih edilmemelidir.

1.6. Metot Validasyonu

Kalite kontrol çalışmaları birkaç aşamadan meydana gelmektedir. Bu aşamalar, cihazın yeterliliği, metot validasyonu ve sistem uygunluk testleri olarak tanımlanmaktadır. Herhangi bir yöntem geliştirilmeden önce cihazla ilgili tüm bakım ve performans çalışmalarının sağlanması ve metodun kalitesi açısından büyük önem teşkil etmektedir. Metot validasyonu ise, WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından bir metodun, prosedürün, cihazın veya sistemin beklendiği gibi çalıştığını ve istenen sonuçları verdiğini kanıtlama işi olarak tanımlanmaktadır (Kopp, 2016). Geliştirilen metodun belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanması ve metodun performansının belirlenmesi için yapılan tüm test ve ölçme işlemleri metot validasyonunun temelini oluşturmaktadır. Metot validasyonu, analitik metodun kullanım amacına dayanan ve farklı ihtiyaçlar için farklı yaklaşımlar içeren birçok validasyon parametresini içeren geniş bir alandır. Analitik metot validasyonunun birçok avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlar aşağıda kısaca özetlenmektedir.

- Validasyonu gerçekleştirilmiş bir metot, yalnızca çalışmacı için değil ayrıca bu metottan yararlanacak tüm kullanıcılar için güven teşkil etmektedir.
- Validasyon işlemleri oldukça zahmetli gibi görünse de bu işlemler ile hem deneylerdeki gereksiz tekrarlamalar ortadan kalkmaktadır hem de çalışma boyunca oldukça iyi bir zaman yönetimi sağlamaktadır.
- Reaktiflerin tedarikçisinin değiştirilmesi gibi faktörlerin meydana gelmesi gibi durumlarda sonuçlarda değişiklik olması kaçınılmaz olsa da metot validasyonu ile bu faktörler kolaylıkla elimine edilebilmektedir.

Uluslararası komiteler tarafından (ICH, FDA, WHO) önerilen ortak validasyon parametreleri aşağıda verilmektedir.

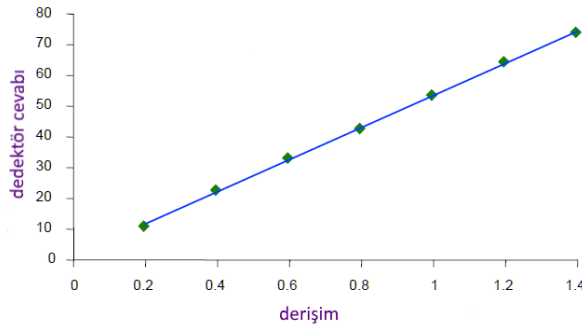
- **Sistem uygunluk testleri**

Sistem uygunluk testleri, geliştirilen metot ve kullanılan sistemin birbiri ile uyumunu ölçmek ve analizlerin beklendiği gibi gerçekleştiğini göstermeyi sağlayan testlerdir. Bu testler, genelde düzenlemelere tabi olan kimyasal ve biyoanalitik analizler için

yaygın olarak kullanılmakta olup kalite kontrol çalışmalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu testler, analizi yapılan bileşiklerin ayrımının ve metodun tekrarlanabilirliğinin sistemle uyumlu olduğunu doğrulamak için kullanılmaktadır. Sistem uygunluk testlerinde öncelikli olarak kolon verimliliği, pik simetrisi ve ayırma gücü kontrol edilmektedir. Bu testlerin gerçekleştirilmesi ve önerilen referans değerlere uygunluğunun kontrol edilmesi, metodun güvenilirliği ve kalitesi konusunda oldukça önemlidir (Mcpoln, 2009).

- **Doğrusallık**

Bir analitik prosedürün doğrusallığı, numunedeki analit konsantrasyonu ile kullanılan dedektör cevabının belli bir aralıkta orantılı olarak elde edilmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Doğrusallığın belirlenebilmesi için ICH'a göre en az beş noktali olacak şekilde kalibrasyon grafiği oluşturulmalıdır. Geliştirilen yöntemin doğrusallığının belirlenebilmesi için oluşturulan kalibrasyon grafiklerinde korelasyon katsayısı (r) oldukça yüksek olan bir doğru elde edilmesi gerekmektedir (Şekil 1.23). Kalibrasyon yöntemi, analitik yöntemin sonunda nicel sonuçların elde edilmesi için kullanılmaktadır (Green, 1996).



Şekil 1.23. Doğrusal kalibrasyon grafiği

- **Kesinlik**

Analitik prosedürlerde kesinlik, aynı numunenin bir dizi ölçüm sonucunda elde edilen çoklu verilerinin birbirlerine yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Bir metodun kesinliği; genellikle varyans, standart sapma veya varyasyon katsayısı olarak ifade edilmektedir. Kesinlik parametresinin tayini, gün içi ve günler arası çalışmaların

yapılmasıyla da belirlenmektedir. Gün içi ve günler arası çalışmalar gerçekleştirilirken en az üç tekrarın yapılması gerekmektedir (Kalra, 2011).

- **Doğruluk**

Analitik bir prosedürün doğruluğu, gerçek değer ile deneysel olarak bulunan değer arasındaki yakınlığını ifade etmektedir. Doğruluk, sistematik hata (analitik metodun hatası) ve analit geri kazanımı (%geri kazanma) ile yakından ilişkilidir. Doğruluk ölçülürken referans değer mevcut ise deneysel sonuç referans değerle karşılaştırılmakta, referans değer olmaması durumunda ise doğruluk ölçümü geri kazanım deneyleri ile gerçekleştirilmektedir. Bir matriks ortamına derişimi bilinen numune ile farklı derişimlerde katkılandırma yapılarak elde edilen sonuçlardan geri kazanım hesaplanabilmektedir. Geri kazanım deneylerinin hassasiyeti numune hazırlamaya bağlı olduğundan bu hazırlık aşamasında oldukça özenli çalışılması gerekmektedir. Geri kazanım deneylerinin düzgün bir biçimde gerçekleştirilmesi durumunda elde edilen kantitatif sonuçlar geri kazanım faktörüyle düzeltilebilmektedir (Kalra, 2011).

- **LOD ve LOQ**

Tayin alt limiti (LOD), numunede tespit edilebilen fakat nicel olarak hesaplanamayan en düşük analit miktarı olarak tanımlanmaktadır. Kantitatif yorum sınırı (LOQ), numunede doğruluk ve kesinliğe uygun olarak hesaplanabilen en düşük analit miktarıdır. LOD ve LOQ, kalibrasyon fonksiyonundan elde edilen eğim (m) ve kalibrasyonun standart sapması (SD) kullanılarak, Eşitlik 1.13 ve Eşitlik 1.14'te hesaplanmaktadır.

$$LOD = 3,3 \times SD/m \quad (1.13)$$

$$LOQ = 10 \times SD/m \quad (1.14)$$

- **Seçicilik**

Seçicilik, bir numunede bozunma ürünleri, matriks ve safsızlıkların yanı sıra ana bileşenin tayin edilebilme yeteneğidir. Seçiciliğin belirlenmesinde pikin saflığı için DAD ya da MS dedektörlerinin tercih edilmesi daha uygun olmaktadır.

- **Kararlılık**

Kararlılık çalışmaları, bir ilaç etken maddesinin veya farmasötik ürünün kalitesinin değişik çevre koşullarının etkisi ve zamana bağlı olarak uğradığı değişiklikleri ortaya koyan çalışmalar olarak tanımlanmaktadır. Kararlılık çalışmalarının amacı etken madde veya farmasötik ürün için saklama koşulları ve raf ömrünün belirlenmesinde kullanılabilecek verileri elde etmektir.

Metot validasyonunun bir parçası olan kararlılık çalışmaları gerçekleştirilirken, numunelerin bozunmaya uğramadan önerilen saklama koşullarında ne kadar süreyle saklanabileceğini belirlemek gerekmektedir. Daha sonra numuneler, gerekli koşullar ile belirli aralıklarla periyodik olarak test edilmektedir. Bu etkilerin ilaç geliştirme aşamasında tayin edilmesi oldukça önem teşkil etmektedir. Kararlılık çalışmalarında uzun vadede bozunma etkilerinin test edilmesi zaman açısından sorun oluşturmaktadır. Kararlılık çalışmaları çoğunlukla uzun süreli (12 ay) ve hızlandırılmış (6 ay) olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Bu işlem çok uzun sürdüğü için çoğunlukla birkaç haftadan daha kısa sürede sonuçlanan zorlanmış bozunma çalışmaları tercih edilmektedir (Blessy vd., 2014). Bu tip analizlerde analizi yapılan ilaçların, bileşiklerin veya farmasötik ürünün geliştirilmesinde bu kimyasalların karakteristik kararlılığının belirlenmesi için yapay koşulların oluşturulması gerekmektedir. FDA özellikle faz 3 aşamasında bu testlerin mutlaka yapılması gerektiğini açıklamıştır. Zorlanmış bozunma deneyleri, abartılmış saklama koşulları uygulamak suretiyle kimyasal bozunma ve fiziksel değişim hızını artırmaya yönelik çalışmalardır. Özellikle etken maddenin kendine özgü kararlılığını ortaya çıkarmak üzere, bir seri hızlandırılmış bozunma testlerine stres testleri denmektedir. Stres çalışmaları, pH'sı farklı çözeltilerde, oksijen ve ışık varlığında, farklı sıcaklıklarda ve nem seviyelerinde gerçekleştirilmektedir. İlaç bileşiklerinin bozunması kromatografik işlemlerin validasyonunda %5 ve %20 arasında olması yeterlidir (Ngwa, 2010).

İlaçlardaki safsızlıklar: Bir ilaç ürünündeki ilaç etken maddesi dışındaki diğer tüm istenmeyen bileşenler safsızlık olarak tanımlanmaktadır. Bir ilaç ürününün kalitesi ve güvenilirliği, sadece ilaç aktif maddenin kendi toksikolojik özelliklerine değil aynı

zamanda içindeki safsızlıklara da bağlıdır. Farmasötik ürünlerdeki safsızlıkların tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi, kalite ve güvenlik prosesleri için önem teşkil etmektedir. Bu istenmeyen safsızlıkların az miktarda bile bulunması farmasötik ürünlerin etkinliğini ve güvenilirliğini etkilemektedir.

İlaçlardaki safsızlıklar ve hem kısa hem de uzun vadede oluşabilecek bozunma ürünlerinin prosedürlerde yer alabilmesi için mutlaka belirlenmesi gerekmektedir. Bu safsızlık ve bozunma ürünlerinin belirlenmesi için ilaçlara kararlılık testleri uygulanmaktadır.

Zorlanmış bozunma testleri (Stres testleri): Zorlanmış bozunma çalışmaları ile ilaçlara ait olası bozunma ürünleri tanımlanmakta ve ilaçların karakteristik kararlılıkları belirlenmektedir. Ayrıca analitik metot validasyonunda ilaç analizlerinde bu aşamanın mutlaka gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Zorlanmış bozunma deneylerinde uygulanacak koşullar, geliştirilen metoda ve bileşiğin davranışına göre değişebilmektedir. Zorlanmış bozunmaların gerçekleştirilebilmesi için stres testleri uygulanmaktadır. Stres testleri, belirlenen ılıman veya sert koşuldaki bozunma ürünlerinin karakterizasyonu ve yapının aydınlatılmasını temel almaktadır.

Zorlanmış bozunma çalışmaları öncelikle literatür taraması ile tayini yapılacak olan bileşiklerin muhtemel bozunma ürünlerinin tahmin edilmesi ile başlamaktadır. Daha sonra uygun bozunma protokolü oluşturularak stres deneyleri yürütülmektedir. Geliştirilen kromatografik yöntem ile bozunma ürünleri belirlendikten sonra bileşiklerin bozunma profilleri farklı dedektör sistemleriyle belirlenmektedir. Bu işlemin arkasından bozunma ürünlerinin yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir (Ngwa, 2010).

Stres testleri, ilaç etken maddesi ve ilaç formülasyonlarında uygulanabilmektedir. Bu testler, ICH'a göre hidrolitik (asit-baz-nötral), oksidatif, termal ve fotolitik koşullar altında yürütülmektedir. Uygulanan ılıman veya sert koşullar, ilacın fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Stres testleri uygulanmaya başlamadan önce ilaçların mutlaka stres testi uygulanmayan formlarının özellikleri belirlenmeli ve karşılaştırma bu referans değerlere göre yapılmalıdır. Bileşikler stres testleri altında fazla miktarda bozunma gösterebildikleri gibi çok az bozundukları

veya neredeyse hiç bozunmadıkları durumlar da görülmektedir. Böyle durumlarda bileşiğin davranışına ve çalışmacıya bağlı olarak stres testlerindeki koşullar ılıman veya sert şekilde belirlenebilmektedir (ICH, 1995).

- **Hidrolitik bozunma:** Bileşiklerin asidik, bazik ve nötral ortamdaki bozunmalarının belirlenebilmesi için bileşikler çoğunlukla hem asidik hem de bazik koşullara maruz bırakılmaktadır. Bileşiğin bilinen derişimde çözeltisi hazırlanarak, asit bozunması için 0,1-1 M aralığında bir hidroklorik asit veya sülfirik asit ile, baz bozunması için 0,1-1 M aralığında bir sodyum hidroksit çözeltisi ile muamelesi sağlanmaktadır. Asit veya baz çözeltisinin ilave edilmesi ile herhangi bir çözünmeme ya da çökme olması durumunda yardımcı çözücüler eklenebilmektedir. Bileşiklerin bozunma miktarını hızlandırmak için ısıtma işlemi uygulanabilmektedir.
- **Oksidatif bozunma:** Oksidatif bozunmanın uygulanabilmesi için oksijen varlığının fazla olduğu bir ortam ya da peroksit kullanılmaktadır. Kullanılan peroksit, bozunma miktarına bağlı olarak %3 (v/v) ve üzerinde olacak şekilde tercih edilmektedir. Hidrolitik bozunmada da olduğu gibi bozunma miktarını artırabilmek için ortamın ısısı artırılabilir.
- **Fotolitik bozunma:** Fotolitik bozunmalarda, ICH tarafından önerilen koşullar kullanılmaktadır. Yapay bir UV ışık altında veya direkt güneş ışığına maruz bırakılarak ilaçların bozunmaları belirlenmektedir.
- **Termal bozunma:** İlaçların nakliyesinde veya saklanmasıyla oluşabilecek yüksek sıcaklık durumlarında ilaçlarda oluşabilecek muhtemel bozunmaların belirlenebilmesi için termal stres testleri de seçilecek belirli sıcaklık değerlerinde ve belirli sürelerde gerçekleştirilmektedir (Anonim, 2018).

1.7. Tezin Amacı

İlaç geliştirme, oldukça zahmetli ve uzun bir süreçtir. Bir ilacın bulunuşundan tedavide kullanılmasına kadar geçen süre yaklaşık 10-12 yıl sürmektedir. Bu süre boyunca ilacın tüm klinik, kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi ve raporlanması gerekmektedir. İlaçların kısa ve uzun vadede kullanımları sonucunda oluşabilecek muhtemel bozunma ürünlerinin ve bu ürünlerin insan sağlığına

etkilerinin belirlenmesi de bu safhada oldukça önem teşkil etmektedir. Bu yüzden ilaçların her türlü safsızlık ve bozunma ürünlerinin tayinine yönelik çalışmalar da yeni ilaçların üretilmesi ve geliştirilmesiyle birlikte önem kazanmaya devam etmektedir.

Ters faz sıvı kromatografi (RPLC) özellikle ilaç sektöründe; farmasötik formülasyonlar içindeki ilaç etken maddelerin analizi, ilaç içerisindeki safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin belirlenmesinde yaygın bir kullanım alanına sahiptir.

İmidazol grubunu içeren antifungal ilaçlar, başta mantar enfeksiyonları olmak üzere birçok patolojik hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar. Tezde ilk olarak bu grubu içeren bazı antifungal ilaçların ADMET karakterizasyonu için gereken önemli fizikokimyasal parametrelerden pK_a değerinin, RPLC yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonrasında metot optimizasyonu çalışmasıyla ilaç etken maddelerinin ticari preparatlarda kromatografik analizlerinin yapılması ve stres koşulları altında bozunma profillerinin RPLC yöntemiyle tayini amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasında imidazol halkası içeren antifungal bileşiklerden klimbazol, lanokonazol, bifonazol, butokonazol, oksikonazol ve sertakonazolün protonasyon sabitleri ve kromatografik davranışları asetronitril-su ikili karışımlarında RPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Literatürde çalışılan bileşiklerden sadece bifonazole ait protonasyon sabitinin farklı yöntemlerle tayin edildiği iki adet çalışma bulunmaktadır. Bunun dışında diğer bileşiklere ait herhangi bir analitik yöntemle protonasyon sabiti tayinine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu grup bileşikler imidazol halkasını içerdikleri için öncelikle imidazolün pK_a değerine yönelik literatür taraması gerçekleştirilmiştir. İmidazolün yapısında bulunan asidik veya bazik azot atomuna ait iyonlaşma/protonasyon sabitinin farklı analitik yöntemlerle tayini yapılmıştır.

Histidin aminoasitinin yapısında imidazol halkası bulunduğundan bu aminoasitin asit-baz kimyasının belirlemek adına mikroskopik ve makroskopik pK_a çalışmaları literatürde mevcuttur. Çalışmalar özellikle ^1H -NMR tekniğiyle gerçekleştirilmiştir (Hauer vd., 1981; Tanokura 1983; Boschov vd., 1983). Bunun yanı sıra imidazol grubu içeren hidroksamik asitin Fe (III) ile koordinasyonu gerçekleştirilerek imidazol halkasındaki asit/baz iyonlaşma sabitleri de tayin edilmiştir (Farkas vd., 2007).

Yagıl (1967), NH grubu içeren heterosiklik yapıdaki bazı bileşiklerin su ortamındaki asit iyonlaşma sabiti değerlerini UV spektroskopik yöntemle tayin etmiştir. 235 nm'de maksimum absorbanı veren imidazol grubu bileşiklerin pK_a değeri $14,17 \pm 0,02$ olarak tayin edilmiştir ve su ortamında bu bileşiklerin zayıf asit davranışı gösterdikleri belirlenmiştir.

Ayrıca, Daniele vd. (1989) tarafından yapılan çalışmada farklı iyonik şiddette, imidazol halkasındaki azotun protonasyon sabiti potansiyometrik yöntemle belirlenmiştir. Çalışma boyunca sıcaklık $25^\circ C$ 'de, iyonik şiddet 0,07-0,95 M arasında sabit tutulmuştur. Bu aralıkta tutulan farklı tuz çözeltilerinde (LiCl, NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ vb.) imidazolün protonasyon sabiti ortalama 6,9-7 olarak hesaplanmıştır.

Öğretir vd. (2001), çalışmalarında UV spektroskopik yöntemle sekiz imidazol türevinin asit iyonlaşma sabiti değerlerini tayin etmişlerdir. Bu bileşikler farklı pH değerlerindeki tampon çözeltiler içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Ortamın iyonik şiddeti 0,1 M NaCl ile ayarlanmıştır. Bileşiklerin pK_a değerlerinin tayininde CO_2 içermeyen suda çözülerek hazırlanmış KOH çözeltisi kullanılmıştır. İmidazol, 2-fenil imidazol, 4-fenil imidazol ve 2,5-difenil imidazol moleküllerinin asit iyonlaşma sabitleri sırasıyla 14,20; 13,40; 13,50 ve 12,60 olarak tayin edilmiştir. Veriler literatür değerleriyle karşılaştırılmış ve uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu sekiz bileşiğin kimyasal yapılarına göre asitlik ve bazlık sabitlerinin artışı/azalışı da tayin edilmiştir.

Foulon vd. (2004), N-imidazol türevini içeren aromataz inhibitörlerinin protonasyon sabitlerini kapiler elektroforez yöntemiyle etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar farklı yöntemlerden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmışlardır. Fosfat tamponu ortamında hazırlanan bileşikler farklı pH değerlerine trietilamin ilavesiyle getirilmiştir. Tamponların iyonik şiddetleri 0,023-0,074 arasında sabit tutulmuştur. pK_a hesaplamaları, farklı pH değerlerindeki elektroforetik mobilite değerleri kullanılarak yapılmıştır. Metil ve fenil fonksiyonel grubunu içeren N imidazol bileşiklerinin pK_a değerleri 5,80-6,23 arasında doğrusal olmayan regresyon programıyla hesaplanmıştır.

Tay vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada imidazol ve tiyazol halkalarını içeren asetamid bileşiklerinin 25°C'de UV spektroskopik yöntemle asitlik/bazlık sabitleri belirlenmiştir. Bu dokuz bileşik için 2-merkapt imidazol halkasındaki azota ait bazlık sabiti değerlerini 6,01-8,22 değerleri arasında tayin etmişlerdir. Spektrofotometrik titrasyon pH 1-14 arasında yapılmıştır. Bileşiklerin dalga boyu taraması 220-400 nm arasında yapılmıştır.

Çalışmada iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin hesaplanmasında aktiflik katsayısı kullanıldığı için veriler termodinamik sabitler olarak verilmiştir. Bileşiklerdeki imidazol gruplarındaki azot atomuna bağlı aromatik fenil halkası imidazolün bazik atomunun protonasyon sabiti değerini artırdığı belirtilmiştir.

Bifonazol'un protonasyon sabiti tayinine ait literatür özetleri aşağıda verilmiştir.

Box vd. (2007), su ortamında az çözünen bileşiklerin pK_a değerlerinin tayini için birden fazla organik çözücü-su ikili karışımları kullanmışlardır. Yapmış oldukları çalışmada çoklu çözücü sistemlerinin bileşiklerin çözünürlüğünü önemli ölçüde artırdığını göstermişlerdir. Kullanmış oldukları çoklu çözücü karışımı eşit miktarlarda metanol, dioksan ve asetonitril içermektedir ve bu karışımı MDM olarak adlandırmışlardır. MDM-su ortamında MDM yüzdesi arttıkça asidik bileşiklerin pK_a değerlerinin artması, bazik bileşiklerin pK_a değerlerinin de azalması beklenmiştir. Bazik bir bileşik olan bifonazolün de MDM yüzdesi arttıkça pK_a değerinin beklendiği gibi azaldığı görülmüştür. Bifonazol için MDM oranına (%w/w) bağımlı olarak belirlenen pK_a değerleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu deneysel değerler kullanılarak Yasuda Shedlovsky yöntemiyle bifonazolün sudaki pK_a değeri $5,92 \pm 0,04$; Sirius programıyla ise 6,06 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 2.1. Bifonazolün farklı oranlardaki MDM-su karışımlarından elde edilen pK_a değerleri

% (w/w) MDM	pK_a
%48,7	5,47
%43,1	5,56
%35,9	5,59
%25,3	5,73
%17,5	5,88

Shalaeva vd. (2008), yapmış oldukları çalışmada az çözünen asidik, bazik ve multiprotik bileşiklerin pK_a değerlerinin tayini için kapiler elektroforez yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada çoğunluğu ilaç olan 105 farklı bileşik kullanılmış ve sonuçlar literatür değerleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada bileşiklerin su ortamındaki ve metanol-su ikili karışımlarındaki (%30, %40, %50, %60, v/v) pK_a ' ları tayin edilmiştir. Su ortamındaki pK_a ' ların tayini için pH'ı 1,75 ve 11,20 arasında değişen 24 adet tampon kullanmışlardır. Tayini yapılacak bileşiklerin konsantrasyonları 50-100 $\mu\text{g/mL}$ arasında ayarlanmış, çalışma 214 nm'de yürütülmüştür. Bileşiklere ait pK_a değerleri ise pK_a Estimator™ programı ile hesaplanmıştır. Tez kapsamında seçilen bileşiklerden bifonazolün sudaki ortalama pK_a değeri 6,29 olarak hesaplanmıştır. Bifonazolün metanol-su karışımındaki

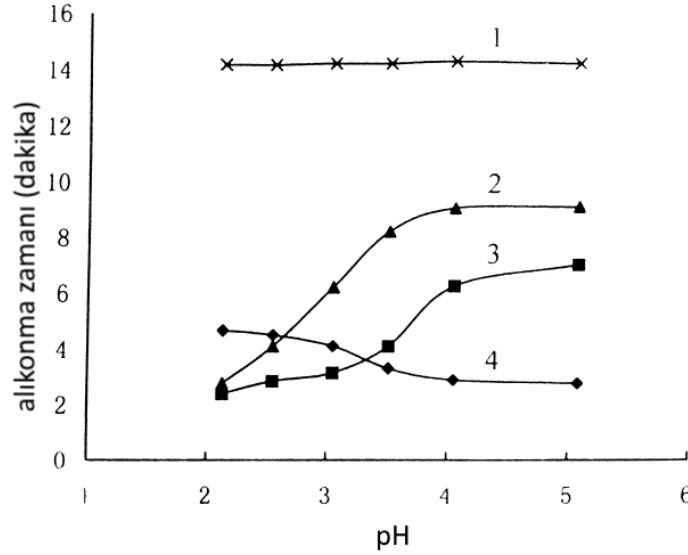
pK_adeğerleri organik modifiyerin artışıyla azalmıştır. Bu değerler kullanılarak Yasuda-Shedlovsky yaklaşımıyla su ortamındaki pK_a değeri 6,11 olarak hesaplanmıştır.

Tez kapsamında çalışılan antifungal bileşiklerin sıvı kromatografik yöntemlerle gerçekleştirilen kantitatif tayinleri ve bu bileşiklerle yapılan validasyon çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

Couteau vd. (2000), yapmış oldukları çalışmada klimbazolün suda hazırlanmış çözeltisinin (15,8 µg/mL) UV ışığı altındaki fotolitik bozunmasına pH'ın etkisini incelemek için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada LiChrosorb RP-18 kolon kullanılmış ve mobil faz olarak pH'sı perklorik asit ile 3,0'e ayarlanmış asetonitril ve 0,05 M sodyum perklorat karışımı (40:60, h/h) tercih edilmiştir. 20°C'de yürütülen çalışmada akış hızı 2 mL/dakika olarak belirlenmiştir. Klimbazol için maksimum spektrum 220 nm'de görülmüş ve alıkonma zamanı 7 dakika olarak ölçülmüştür. Çalışmanın doğrusal aralığı 5-25 µg/L olarak tayin edilmiştir. Klimbazolün bozunma hız sabiti zamana karşı pik alanının grafiğe geçirilmesiyle oluşan doğrunun eğiminden elde edilmiştir. 1. derece kinetiğe bağımlı çalışmada, pH'nın klimbazolün ışığa bağımlı bozunmada etkisi olduğu belirlenmiştir.

Chao (2001), çalışmasında dört kepek önleyici şampuandaki salisilik asit, ketokonazol, klimbazol ve oktopiroks bileşiklerinin eş zamanlı kantitatif tayini için ters faz sıvı kromatografi yöntemini geliştirmiştir. Kromatografik çalışma, Waters symmetry C18 kolon (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) kullanılarak 35°C'de gerçekleştirilmiştir. Optimum koşulun tayini için mobil faz pH'sının kromatografik davranış üzerindeki etkisi gözönüne alınmıştır (Şekil 2.1). Bu işlem esnasında diğer bütün kromatografik parametreler sabit tutulmuştur. Sonuçta mobil faz pH'sına bağımlı olarak alıkonma zamanı değerleri ketokonazol için grafiğe geçirildiğinden pH artışına bağımlı olarak alıkonma zamanında artış gözlemlenmiştir. Akış hızının 0,8 mL/dakika olarak ayarlandığı çalışmada mobil faz olarak pH'ı 4'e ortofosforik asitle ayarlanmış asetonitril:su karışımı (60:40, h/h) kullanılmıştır. Klimbazol için alıkonma zamanı 8,9 dakika olarak bulunmuştur. UV dedektör kullanılarak yürütülen çalışmada 224-305 nm arasında ölçüm yapılmıştır. Şampuan örneği hazırlanırken, 1 gr şampuan tartılıp üzerine 10 mL mobil faz eklenerek 10 dk boyunca 15000 rpm'de

santrifüjlenmiştir. Daha sonra çözelti 0,45 µm Millipore filtreden geçirilerek sisteme enjekte edilmiştir. Çalışma sonucunda %98,0-104,1 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Hızlı ve tekrarlanabilir olarak uygulanabilen metodun bağıl standart sapma (RSD) değerleri numuneler için %0,11-0,90 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2.1. Kepek önleyici maddelerin alıkonma süreleri ile mobil faz pH arasındaki ilişki. (1) Oktopiroks (2) Klimbazol (3) Ketokonazol (4) Salisilik asit

Milano vd. (2002), oksikonazolün losyon ve krem formülasyonlarında kantitatif tayini için ters faz sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım LiChrocart C8 kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızının 1 mL/dakika olarak ayarlandığı çalışma 254 nm'de UV dedektör kullanılarak yürütülmüştür. Metanolde çözülerek hazırlanmış bileşiğin doğrusal çalışma aralığı 40-140 µg/mL olarak belirlenmiştir. Metodun RSD değeri, losyonda %1,57, kremde %0,71 olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası RSD değerleri losyonda ve kremde sırasıyla %0,57 ve %1,34 olarak bulunmuştur. Losyonda geri kazanım değerleri %98,84-102,2 arasında, kremde ise %100,54-101,59 aralığında elde edilmiştir. Metot validasyonunda kullanılan lineerlik, kesinlik, doğruluk, spesifiklik, dayanıklılık, LOD ve LOQ gibi parametrelerde yeterli ve istenen sonuçların elde edildiği görülmüştür. Zorlanmış degradasyon yöntemi kullanılarak çeşitli koşullarda kararlılık deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda sadece kalitatif olarak belirlenmiş iki tane degradasyon ürünlerinin oksikonazolden ayrıldığı belirtilmiştir. Çalışmacılar

oksikonazol için metot sağlamlığı çalışmaları da yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre oksikonazol için geliştirilen metot kolon değişikliğinden etkilenmemesine rağmen mobil faz değişikliklerinden önemli derecede etkilendiği belirlenmiştir.

Čudina vd. (2005), yapmış oldukları çalışmada bifonazol ve benzil alkolün farmasötik formülasyonlardan eş zamanlı kantitatif tayini için ters faz sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada kolon olarak Zorbax Eclipse XDB-C18 kolon tercih edilmiş ve mobil fazın akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Metanol ve amonyum asetat tamponundan oluşan mobil fazın kullanıldığı çalışma 220 ve 252 nm arasında yürütülmüştür. Optimum ayırma koşulunun belirlenmesi için mobil faz bileşiminin etkisi incelenmiştir. Bu işlemde mobil fazda bulunan metanol ve amonyum asetat tamponunun oranları değiştirilerek yapılmıştır. Metanol oranı arttıkça bifonazolün kapasite faktörü değeri ve pik genişliği azalmıştır. pH etkisi çalışması ise pH 3,5-7,5 aralığında gerçekleştirilmiştir. Bifonazolün pH<5’de protonlanmış formda olduğu belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı etkisi 20-40°C arasındayapılmış ve her iki bileşiminde sıcaklık değişiminden etkilenmediği görülmüştür. Bifonazole ait krem çözeltisi hazırlanırken 10 mg/g bifonazol içeren yaklaşık 0,4 gr krem 20 mL metanol eklenerek ekstrakte edilmiş ve ultrasonik banyoda 40°C’de 5 dakika bekletilmiş sonrasında ise 0,2 µm whatman filtresinden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen 1 mL çözelti, mobil faz ile 10 mL’ye seyreltilerek sisteme enjekte edilmiştir. Geliştirilen metodun validasyonunda; doğrusalılık, seçicilik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, LOD ve LOQ parametreleri kullanılmıştır. Çalışmada doğrusal çalışma aralığı bifonazol için 4-24 µg/mL, benzil alkol için 8-48 µg/mL olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri, bifonazol ve benzil alkol için sırasıyla 1-4 µg/mL ve 2-8 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bifonazol içeren farmasötik kremden (Mycospor %1) yapılan geri kazanım sonucu ise %98,4 olarak hesaplanmıştır.

Wang vd. (2009), yapmış oldukları çalışmada sıvı kromatografisi elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi yöntemiyle sertakonazolün insan plazmasında kantitatif tayinini gerçekleştirmişlerdir. Analiz, pozitif iyon çoklu reaksiyon izleme modu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve iç standart olarak loratadin kullanılmıştır.

Sertakonazol ve iç standart ayrımı HYPERSIL GOLD C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) kullanılarak yapılmış, mobil faz olarak metanol ve %0,2 formik asit içeren sulu çözelti karışımı (70:30, h/h) kullanılmış ve akış hızı 0,2 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Bileşiklere ait m/z oranları sertakonazol ve iç standart için sırasıyla 439 [M+H]⁺ → 181 ve 383 [M+H]⁺ → 337 olarak ölçülmüştür. Kalibrasyonun doğrusal çalışma aralığı 0,1-10 ng/mL olarak belirlenmiş ve korelasyon katsayısı 0,999 olarak hesaplanmıştır. Numune hazırlama, eter:diklorometan (80:20, h/h) karışımı kullanılarak, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Sertakonazol için üç farklı derişimdeki (0,25 ng/mL, 1,0 ng/mL ve 5,0 ng/mL) elde edilen yüzde geri kazanım değerleri sırasıyla, %66,4±7,6, %60,3±3,3, %70,3±6,1 olarak bulunmuştur. İnsan plazmasından geri kazanım çalışmaları yapılmış ve 10 sağlıklı gönüllüye sertakonazol içeren vajinal formülasyondan uygulanarak alınan sonuçlar doğrultusunda yöntemin geçerliliği ve güvenilirliği kanıtlanmıştır.

Kumar vd. (2009), lanokonazolün z-izomerinin ayrımı ve kantitasyonu için normal faz HPLC metodunu kullanmışlardır. Ayırma Thermo Hypersil Silica kolon (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En iyi ayırmayı elde edebilmek için mobil faz olarak 2-propanol, n-hekzan ve trietilamin karışımını (50:50:0,05, h/h/h) kullanmışlardır. İzokratik çalışma UV dedektör kullanılarak 296 nm'de gerçekleştirilmiştir. Lanokonazole ve z-izomerine ait alıkonmalar sırasıyla 5,25 dakika ve 4,44 dakika olarak bulunmuştur. z-izomerine ait geri kazanım değeri %97-99 aralığında hesaplanmıştır. Çalışmacılar spesifiklik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, dayanıklılık, LOD ve LOQ parametreleri kullanılarak önerilen metodu valide etmişlerdir. LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla 0,005 µg/mL ve 0,017 µg/mL'dir. Geliştirilen metodun rutin izomer analizlerinde güvenle uygulanabileceği görülmüştür.

Zaid vd. (2012), yapmış oldukları çalışmada bifonazolün analizi için HPLC metodu geliştirmişler ve ICH'a göre metot validasyonu geliştirmişlerdir. Geliştirilen gradient metotta iki çözücü bileşimi kullanılmış (A: pH'sı 5,6'ya buzlu asetik asit ile ayarlanmış 0,2 M amonyum asetat, B: asetonitril) ve akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlenmiştir. Geliştirilen metot, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sistem uygunluk ve

dayanıklılık parametreleri kullanılarak valide edilmiştir. Metodun doğrusal çalışma aralığı 0,024-0,056 mg/mL olarak belirlenmiş ve R^2 değeri 0,9998 olarak bulunmuştur. Bifonazolün toz formülasyondaki (%1, w/w) geri kazanım değeri %99,62 ve %RSD değeri ise kritik değerin altında hesaplanmıştır. Çalışmada bifonazol, termal, oksidatif ve hidrolitik stres koşullarına maruz bırakılmış ve bozunmaya uğramış numuneler analiz edilmiştir. Zorlanmış bozunma 1 hafta boyunca uygulanmıştır. 1 hafta sonucunda 0,5 N NaOH ile muamele sonucu bifonazol tamamen bozunmuştur. 60°C H₂O'da %48; %3 H₂O₂ ortamında %10; 1 N HCl ortamında %200 oranında bozunma gözlemlenmiştir. Bifonazol, geliştirilen kromatografik yöntemle bozunma ürünlerinden tamamen ayrılmıştır.

Wahab ve Zaheer (2013), yapmış oldukları çalışmada bifonazolün farmasötik formlarında tayini için ters faz sıvı kromatografi metodunu geliştirmişlerdir. Çalışma Eurosphere C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolonda gerçekleştirilmiş ve mobil faz olarak pH'ı 3 olan metanol-sodyum asetat karışımı (70:30 h/h) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlenmiş ve bifonazole ait alıkonma zamanı 6,54 dakika olarak tayin edilmiştir. Bileşik 252 nm'de UV dedektörle belirlenmiştir. Geliştirilen metoda çeşitli sistem uygunluk testleri uygulanmış ve ICH tarafından belirlenen doğrusallık, doğruluk, kesinlik, LOD ve LOQ parametreleri ile valide edilmiştir. Metot 1-20 mg/mL arasında doğrusal olup, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,33 ve 1,11 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda geri kazanım %99,96 olarak hesaplanmıştır. Önerilen metodun %RSD değerinin, literatürde krem formülasyonlarından elde edilen %RSD değerinin altında olduğu belirtilmiştir.

Chen vd. (2013), çalışmalarında suni deride ve saçlı deride, saç bakım ürünlerinin kullanımından sonra kalan klmbazol miktarının tayini için ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometrisi (UHPLC-MS/MS) yöntemini kullanmışlardır. Bileşiklerin ayrımı Waters Acquity UPLC BEH C18 kolon (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0,2 mL/dakika olarak belirlenmiş olup, enjeksiyon hacmi 5 µm'dir. Kolon ve numune haznesinin sıcaklıkları sırasıyla 30°C ve 4°C olarak ayarlanmıştır. Çalışmada iç standart olarak

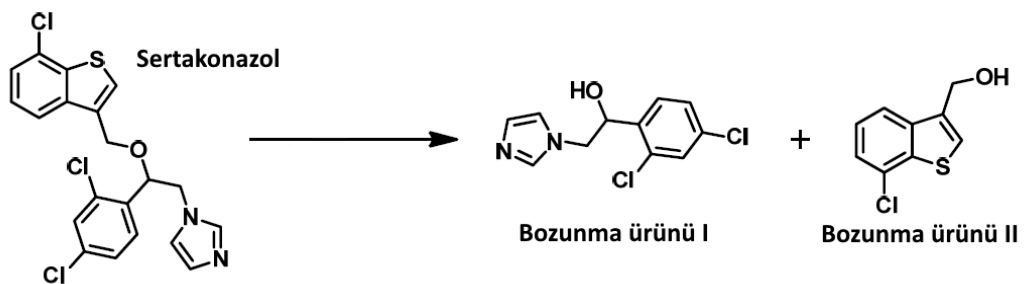
döteryumlanmış klmbazol kullanılmıştır. Çoklu reaksiyon izleme yönteminin kullanıldığı deneyde m/z değerleri klmbazol için 293,0→69,0, iç standart için 296,0→225,1 olduğu görülmüştür. Deneyde doğrusal aralık 4-2000 ng/mL olarak ölçülmüştür. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1 ng/mL ve 4 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen metot ile hücre içi ve hücre dışı ortamlarda klmbazol kalıntıları başarılı şekilde tayin edilmiştir.

Rizk vd. (2014), yapmış oldukları çalışmada sertakonazol (SER) ve terkonazolün (TEZ) dozaj formlarında ve katkılandırılmış insan plazmasında tayini için miseller sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmacılar SER ve TEZ'in kromatografik performansını etkileyen farklı parametreleri sistematik olarak deneyerek ayırma için optimum koşulu belirlemişlerdir. Çalışma Inertsil Cyano kolon kullanılarak 225 nm'de yürütülmüştür. Mobil faz olarak 0,1 M sodyum dodesil sülfat, %20 1-propanol, %0,3 (v/v) trietilamin ve 0,02 M o-fosforik asit karışımını tercih etmişlerdir. Geliştirilen metot, sertakonazol için 8-40 µg/mL, terkonazol için 16-80 µg/mL derişim aralığında valide edilmiştir. LOD değerleri SER ve TEZ için sırasıyla 1,24 ve 1,67 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Yapılan gün içi ve günler arası çalışma sonucunda elde edilen %RSD değerleri SER ve TEZ için sırasıyla %0,9 ve %1,55 olarak bulunmuştur. Çalışmada SER ve TEZ farklı stres koşullarına maruz bırakılarak %bozunmaları hesaplanmıştır. Alkali hidrolizde ilaç dozaj formunda SER %68-100 oranında bozunmaya uğramıştır. Asidik bozunmada SER, 1N HCl'ye 24 saat maruz bırakılmış ve %50 bozunma olduğu gözlemlenmiştir. %30 H₂O₂'ye 24 saat maruz bırakılan SER tamamen bozunmuştur. Güneş ışığına maruziyet sonucunda ise SER'in %50 bozunma gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma, referans HPLC teknikleri ile karşılaştırılmış ve yeterli olduğu gözlemlenmiştir.

Jia vd. (2014), geliştirmiş oldukları sıvı kromatografisi ardışık kütle spektrometresi yönteminde butokonazolün insan plazmasından tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bileşikler, izokratik olarak Inertsil ODS-SP kolon (100 mm x 2,1 mm, 3 µm) kullanılarak ayrılmış ve çoklu reaksiyon izleme yöntemi ile analiz edilmiştir. Mobil faz olarak asetronitril ve %0,1 formik asit içeren amonyum asetat (78:22, h/h) karışımı kullanılan çalışmada akış hızı 0,3 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Kromatografik çalışmada metot validasyonu için iç standart yöntemi kullanılmış, butokonazol ve

repaglinid (iç standart) için alıkonma zamanları sırasıyla 2,47 dakika ve 2,15 dakika olarak belirlenmiştir. Analitlerin miktar tayinleri $[M+H]^+$ iyonlarına göre yapılmış ve bileşiklere ait m/z değerleri butokonazol ve iç standart için sırasıyla 412,8→165,1 ve 453,4→230,3 olarak bulunmuştur. Metot 20-8000 pg/mL aralığında doğrusal olduğu verilmiştir. Butokonazolün insan plazmasından geri kazanım çalışmaları 60, 600 ve 6400 pg/mL olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiş ve geri kazanım yüzdeleri sırasıyla $(87,4 \pm 7,2)$, $(88,4 \pm 7,6)$ ve $(86,7 \pm 4,3)$ olarak bulunmuştur. Plazma ortamında butakonazolün oda sıcaklığında 8 saat, 4°C'de 6 saat, -70°C'de 28 gün kararlı olduğu bulunmuştur. Önerilen metodun doğruluk ve kesinlik verilerine bakarak güvenilir olduğu gözlemlenmiştir. Geliştirilen yöntemin butokonazolün bütün farmakokinetik çalışmalarında rahatlıkla uygulanabileceği belirtilmiştir.

Alamein (2015), çalışmasında sertakonazolün farmasötik formülasyonlardan tayini ve safsızlık profilinin belirlenmesi için spektrofotometrik ve kromatografik yaklaşımları kullanmıştır. Geliştirmiş olduğu kromatografik yöntemde, sertakonazolün tayinini RP-ZORBAX C18 kolon (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) ile sağlayan çalışmacı, deneyi 260 nm'de yürütmüştür. Mobil faz olarak metanol ve %0,2 formik asit içeren sulu çözelti karışımı (pH 3,5, 75:25, v/v) kullanılan çalışmada akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Sertakonazol için doğrusal çalışma aralığı 0,8-40 µg/mL olarak belirlenirken, farmasötik dozaj formda ortalama geri kazanım yüzdesi $99,65 \pm 0,630$ olarak hesaplanmıştır. Sertakonazol 1M HCl ile 2 saat boyunca hidroliz edilmiş ve yapısındaki eter bağları ayrılmıştır. Sonuçta iki bozunma ürünü (N-(2-(2,4- diklorofenil)-2-hidroksi (I), 7-kloro-3-hidroksi metil benzotiyofen (II)) meydana gelmiştir (Şekil 2.2). Bu verilerin kütle spektrometresi ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2.2. Sertakonazolün bozunması sonucunda meydana gelen bozunma ürünleri

Sonuçta geliştirilen yöntemin sertakonazolün farmasötik formülasyonlarda tayini için uygulanabilir olduğu elde edilen validasyon verileri ile açıklanmıştır.

Castro vd. (2016), çalışmalarında atık sulardaki flukonazol ve klimbazolün UV ve UV/H₂O₂ bozunmalarını incelemişler ve bunun için sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (LC-QTOF-MS) yöntemini kullanılmışlardır. Bozunma deneyleri ultra saf su ile katkılanırılmış ve atık su numunelerinde gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografik ayırım Zorbax Eclipse XDB C18 kolon (100 mm x 2 mm, 3,5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. Akış hızının 0,2 mL/dakika olarak belirlendiği deneyde mobil faz olarak su ve metanol karışımı tercih edilmiştir. Deneyler sonucunda her iki bileşik için 1. derece kinetik model tercih edilerek yarılanma ömürleri ($t_{1/2}$) tayin edilmiş ve flukonazol için bozunma olmazken, klimbazol için bozunma ürünleri bu yöntemle belirlenmiştir.

Nouman vd. (2017), geliştirmiş oldukları metotta, butokonazolün insan plazmasından tayini için LC-MS/MS yöntemini kullanmışlar ve metodu valide etmişlerdir. Kromatografik ayırım için X Terra C18 kolon (3,0 mm x 50 mm, 3 µm) kullanılmış ve akış hızı dakikada 0,5 mL olacak şekilde belirlenmiştir. Gradient çalışmada mobil faz olarak %0,1 formik asit içeren su ve asetronitril:metanol karışımı (30:70, h/h) kullanılmıştır. Çoklu reaksiyon izleme yönteminin kullanıldığı çalışmada analiz süresi 5,5 dakika olup, doğrusal çalışma aralığı 0,10-30,00 ng/mL olarak belirlenmiştir. Butokonazol ve atorvastatib (iç standart) için m/z değerleri sırasıyla 413,4 → 164,9 ve 559,3 → 440,3 olarak belirlenmiştir. İnsan plazmasından elde edilen ortalama geri kazanım %80'den fazla, doğruluk %93,51-106,85 arasında ve %RSD ise %10'un altında bulunmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında; (i) imidazol grubu içeren bileşiklerin sıvı kromatografik ve bozunma davranışlarının belirlenmesi amacıyla RPLC yöntemi geliştirilmiş, (ii) geliştirilen RPLC metodu valide edilmiş, (iii) bileşiklere ait bozunma yüzdeleri RPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde geliştirilen metotlarda kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve cihazlar hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Kimyasal Maddeler ve Farmasötik Ürünler

Tez çalışması boyunca kullanılan kimyasallar ve ticari prepatlar için üretici firma bilgileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar ve ticari preparatlar

Kimyasal / Ticari Preparat	Üretici Firma
Klimbazol PESTANAL®	Sigma Aldrich
Lanokonazol VETRANAL®	Sigma Aldrich
Bifonazol	Sigma Aldrich
Butokonazol VETRANAL®	Sigma Aldrich
Oksikonazol nitrat	United States Pharmacopeia
Sertakonazol nitrat	European Pharmacopeia
Urasil	Sigma Aldrich
Asetonitril	Sigma Aldrich
Potasyum Hidrojen Ftalat	Merck
Orto-fosforik Asit	Sigma Aldrich
Sodyum Hidroksit	Sigma Aldrich
Hidroklorik Asit	Sigma Aldrich
Hidrojen Peroksit	Merck
Seboderin Şampuan %1	Hair Pharma
Mycospor Topikal Krem %1	BAYER
Oceral Topikal Krem %1	SABA
Zalain Topikal Krem %2	ADEKA

3.2. Cihazlar

Tez sürecince çalışılan imidazol bileşiklerinin sıvı kromatografik davranışlarının belirlenmesi, pK_a değerlerinin tayini, bileşiklerin bozunma davranışları ve muhtemel

bozunma ürünlerinin belirlenmesinde yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı (HPLC) kullanılmıştır. Bu tezde kullanılan tüm cihazlar Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışması boyunca kullanılan cihazlar

Cihaz /Bileşen	Firma
HPLC Pompa LC-20AD	Shimadzu
HPLC Kolon Fırını CTO-10AS	Shimadzu
HPLC Degazer Ünitesi DGU-20A ₃	Shimadzu
HPLC UV-Vis Dedektör SPD-20A	Shimadzu
HPLC Diode Array Dedektör SPD-M20A	Shimadzu
pH Metre MA 235	Mettler Toledo
pH Elektrot Inlab Expert Pro	Mettler Toledo
WiseMix Vortex VM-10	NetLab
Pinnacle DB Cyano Kolon	Restek
Hassas Terazi HR250AZ	A&D Company
Ultra Saf Su Cihazı	Direct Q-3 UV

3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon

3.3.1. Kolon seçimi

HPLC’de kolon seçimi, ilaç analizlerinde yöntemin tekrarlanabilirliğinin ve sağlamlığının geliştirilmesi için temel parametrelerden biridir. Analitik kolonun seçimi analitin; çözünürlük, moleküler ağırlık, bileşiğin iyonlaşma durumu gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu tezde çalışılan ilaçlar zayıf bazik bileşiklerdir. Bazik bileşiklerin analizi için uygun bir kolon olan Pinnacle DB Siyano tez çalışması için seçilmiştir. Literatürde yapılan çalışmaların çoğu C18 ve C8 kolonlarla yapılmıştır. Bu tip bir kolonla yapılan çalışması teze özgünlük katmaktadır. Boyutları 4,6 mm x 250 mm, partikül boyutu ise 5 µm olan kolon bazik bileşikler için ideal performans özelliklerine sahip bir kolondur. Siyano (CN) fazlı kolonlar kategorisine giren bu kolonda ligand türü olarak siyanopropilsilen tercih edilmiştir. 2,5-8 pH ölçüm aralığına sahip bu kolonda başta bazik bileşikler olmak üzere birçok farmasötik bileşik, oldukça iyi bir pik simetrisine sahip olarak ve mobil faza herhangi bir modifiyer eklemeye gerek kalmadan kolaylıkla elüe edilebilmektedir.

3.3.2. Dalga boyu seçimi

Kromatografik çalışmalara başlamadan önce su-asetonitril ortamında hazırlanan bileşiklerin 190-400 nm arasındaki spektral davranışları incelenmiş ve bileşiklerin maksimum absorptans verdikleri dalga boyları 202 nm olarak belirlenmiştir.

3.3.3. Kromatografik koşullar

Deneylerde organik modifiyer olarak asetonitril tercih edilmiş ve mobil faz olarak asetonitril oranı %35, %40, %45, %50 ve %55 (v/v) olan asetonitril-su ikili karışımları tercih edilmiştir. Mobil fazlar, pH değerleri 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5 ve 7 olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüm kromatografik çalışmalar boyunca kolon sıcaklığı 25°C'de sabit tutulmuş ve mobil fazın akış hızı 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Mobil faz pH'sının ayarlanmasında tampon olarak fosfat tamponu tercih edilmiş ve mobil fazlar içerisinde kullanılan o-fosforik asit derişimi 25 mM'da sabit tutulmuştur. Her bir enjeksiyon 20 µL olacak şekilde sabit hacimde gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Çalışma boyunca analizi yapılan bileşiklerin her biri günlük olarak hazırlanmıştır. Analitik saflıkta temin edilen bileşiklerin 100 µg/mL'lik çözeltileri çalışılan asetonitril-su ikili karışımlarında hazırlanmış ve +4°C' de muhafaza edilmişlerdir. Bileşiklerin protonasyon sabitlerinin tayini için mobil faz olarak, asetonitril oranı %35, %40, %45, %50 ve %55 (v/v) olan ve pH değeri 3-7 aralığında değışen ikili karışımlar kullanılmıştır. Hacimce yüzdeleri farklı olan mobil fazların her birinin hazırlanma aşamaları aşağıda verilmiştir.

- **%35 (v/v) asetonitril içeren mobil faz:** 100 mL mobil faz hazırlamak için 65 mL saf su alınmış ve üzerine 35 mL asetonitril ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde orto-fosforik asit (% 85, w/w) ilave edilmiştir. Bu ortama suda hazırlanmış 1M NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (3;3,5;4;4,5;5;5,5;6;6,5;7) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

- **%40 (v/v) asetonitril içeren mobil faz:** 100 mL mobil faz hazırlamak için 60 mL saf su alınmış ve üzerine 40 mL asetonitril ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde orto-fosforik asit (% 85, w/w) ilave edilmiştir. Bu ortama suda hazırlanmış 1M NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (3;3,5;4;4,5;5;5,5;6;6,5;7) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.
- **%45 (v/v) asetonitril içeren mobil faz:** 100 mL mobil faz hazırlamak için 55 mL saf su alınmış ve üzerine 45 mL asetonitril ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde orto-fosforik asit (% 85, w/w) ilave edilmiştir. Bu ortama suda hazırlanmış 1M NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (3;3,5;4;4,5;5;5,5;6;6,5;7) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.
- **%50 (v/v) asetonitril içeren mobil faz:** 100 mL mobil faz hazırlamak için 50 mL saf su alınmış ve üzerine 50 mL asetonitril ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde orto-fosforik asit (% 85, w/w) ilave edilmiştir. Bu ortama suda hazırlanmış 1M NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (3;3,5;4;4,5;5;5,5;6;6,5;7) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.
- **%55 (v/v) asetonitril içeren mobil faz:** 100 mL mobil faz hazırlamak için 45 mL saf su alınmış ve üzerine 55 mL asetonitril ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde orto-fosforik asit (% 85, w/w) ilave edilmiştir. Bu ortama suda hazırlanmış 1M NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (3;3,5;4;4,5;5;5,5;6;6,5;7) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

- **Urasil çözeltisi:** Çalışmada bileşiklerin kapasite faktörlerinin belirlenmesi amacıyla kolonda tutunmayan tür olarak (t_0) urasil seçilmiştir. Urasil çözeltisi günlük olarak 100 µg/mL derişimde hazırlanarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir.
- **Potasyum hidrojen ftalat çözeltisi:** Potasyum hidrojen ftalat ($C_8H_5KO_4$), primer standart pH referans çözeltisi olarak 0,05 molal derişimde kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlanmadan önce katı bileşik 2 saat 110°C’de kurutulmuştur.
- **Krem ve şampuan numune çözeltileri:** Çalışmada klimbazol, bifonazol, oksikonazol ve sertakonazolün şampuan ve krem formülasyonlarından miktar tayinlerinin yapılabilmesi amacıyla krem ve şampuan numuneleri analize hazırlanmıştır. Bunun için 1 g klimbazol içeren Seboderm® şampundan 2,5 mL alınarak 100 mL mobil fazda çözülmüştür. Derişimi bu 100 µg/mL olan bu şampuan çözeltisi, içerisindeki etken maddenin belirlenebilmesi için hazırlanan kalibrasyon derişim aralığına girecek şekilde seyreltilmiştir. Bifonazol içeren Mycospor®, oksikonazol içeren Oceral® ve sertakonazol içeren Zalain® krem numunelerinden ise 1 g tartılarak 100 mL mobil fazda çözülmüştür. Derişimleri sırasıyla 100 µg/mL, 100 µg/mL ve 200 µg/mL olan bu krem numuneleri, içerisindeki etken maddelerin belirlenebilmesi için hazırlanan kalibrasyonların derişim aralıklarına girecek şekilde seyreltilmiştir. Elde edilen çözeltiler beyaz bant süzgeç kağıdı (640 m, Ø125 mm) kullanılarak süzölmüş ve sisteme enjekte edilmeden önce 0,45 µm Millipore filtreden geçirilmiştir.
- **İdrar numune çözeltisi:** Sağlıklı bir insandan alınan ve içerisinde herhangi bir ilaç bulunmayan idrar numunesi 1:10 oranında seyreltilmiştir. 1mL idrar numunesinin üzerine 9 mL mobil faz eklenerek numune içerisindeki proteinler çöktürölmüş böylece proteinlerin bozucu etki oluşturması önlenmiştir. Mobil fazla seyreltilmiş idrar numunesinin üzerine her bir ilaçtan üç farklı derişimde, seçilen iç standarttan sabit derişimde olacak şekilde katkı yapılmıştır. Mobil faz ile 10 mL’ye tamamlanan farklı oranlarda katkılandırılmış çözeltiler 0,45 µm Millipore filtreden geçirilerek sisteme enjekte edilmiştir.

- **Asit bozunma çözeltisi:** Bileşiklerin asidik ortamdaki bozunma davranışları, 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. %38'lik (v/v) derişik HCl'den (M_A : 36,46 g/mol) 4 mL alınarak üzerine 46 mL mobil faz ilave edilmiş böylece 50 mL 0,1 M HCl çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan HCl çözeltileri deney boyunca +4°C'de muhafaza edilmiştir. Bileşiklerin asit ortamında bozunmalarının belirlenebilmesi amacıyla bileşiklerin 25 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 2 mL alınarak üzerlerine 1 mL 0,1 M HCl ilave edilerek 2, 12, 24 ve 48 saat süreyle karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Asit bozunmasına maruz bırakılan çözeltileri daha nötral koşula getirmek amacıyla 0,1 M NaOH'ten 0,3 mL ilave edilmiş ve kalibrasyonda belirlenen derişim aralığına girecek şekilde mobil faz ile seyreltme işlemi yapılmıştır.
- **Baz bozunma çözeltisi:** Bileşiklerin bazik ortamdaki bozunma davranışları 0,1 M NaOH çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 2 g NaOH (M_A : 39,997 g/mol) 50 mL mobil fazda çözülerek 0,1 M NaOH çözeltisi hazırlanmış ve deney boyunca +4°C'de muhafaza edilmiştir. Bileşiklerin baz ortamında bozunmalarının belirlenebilmesi amacıyla bileşiklerin 25 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 2 mL alınarak üzerlerine 1 mL 0,1 M NaOH ilave edilerek 2, 12, 24 ve 48 saat süreyle karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Baz bozunmasına maruz bırakılan çözeltileri daha nötral koşula getirmek amacıyla 0,1 M HCl'ten 0,3 mL ilave edilmiş ve kalibrasyonda belirlenen derişim aralığına girecek şekilde mobil faz ile seyreltme işlemi yapılmıştır.
- **Peroksit bozunma çözeltisi:** Bileşiklerin oksidatif bozunmalarının gözlenebilmesi için bileşikler hidrojen peroksit (H_2O_2) ortamına maruz bırakılmıştır. Bunun için %35'lik (v/v) H_2O_2 'den 4,28 mL alınarak üzerine 45,72 mL mobil faz ilave edilmiştir. Böylece 50 mL %3'lük (v/v) H_2O_2 çözeltisi hazırlanmıştır. Bileşiklerin peroksit ortamında bozunmalarının belirlenebilmesi amacıyla bileşiklerin 25 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 2 mL alınarak üzerlerine %3'lük (v/v) H_2O_2 'ten 1 mL ilave edilmiştir. Bu stok çözeltilerden 2 mL alınarak üzerlerine 1 mL %3'lük (v/v) H_2O_2 ilave edilerek oda sıcaklığında 3, 12, 24 ve 48 saat süreyle karanlık ortamda bekletilmiştir. Daha sonra

kalibrasyondabelirlenen derişim aralığına girecek şekilde mobil faz ile seyreltme işlemi yapılmıştır.

- **UV bozunması:** Analitik saflıkta temin edilen bileşiklerin UV ortamda bozunmalarının belirlenebilmesi amacıyla bileşikler dikkatlice tartılmış ve 365 nm UV ışık altında oda sıcaklığında 3 saat süreyle bozunmaya maruz bırakılmıştır. Bozunmaya maruz kalan toz halindeki bileşikler uygun hacimdeki mobil fazlarda çözümlere istenen derişime getirilmiştir.
- **Termal bozunma:** Bileşiklerin sıcaklık ile bozunmalarının belirlenebilmesi için bileşikler iki farklı sıcaklığa (60°C - 80°C) 2 saat süreyle maruz bırakılmışlardır. Temin edilen bileşikler dikkatlice tartılarak cam beherlerde etüve yerleştirilmiş ve belirlenen sıcaklıklarda 2 saat boyunca tutulmuştur. Isıya maruz bırakılan bileşikler uygun hacimdeki mobil fazlarda çözümlere istenen derişime getirilmiştir.
- **Kalibrasyon çözeltileri:** Çalışmada doğrusal aralığın belirlenebilmesi amacıyla kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafikleri oluşturulurken iç standart yöntemi kullanılmıştır. Başlangıçta her bir bileşiğin 50 µg/mL stok çözeltileri çalışılan su-asetonitril karışımlarında hazırlanmış ve kalibrasyon çalışmaları için yine aynı ortamda seyreltilmiştir. Kalibrasyonda; bifonazol için 1-8 µg/mL, lanokonazol ve sertakonazol için 2-10 µg/mL arasında değişen yedi farklı çözelti hazırlanmıştır. Bu üç bileşik için iç standart oksikonazol olarak belirlenmiş ve derişimi 1 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Klimbazol için 8-22 µg/mL, butokonazol ve oksikonazol için ise 3-12 µg/mL arasında yedi farklı derişimde su-asetonitril karışımında çözeltiler hazırlanmıştır. Bu üç bileşik için de iç standart bifonazol olarak belirlenmiş ve derişimi 2 µg/mL olacak şekilde sabit hazırlanmıştır.
- **Sistem uygunluk çalışma çözeltileri:** Kromatografik çalışmada belirlenen referans değerlere uygunluğunun belirlenmesi amacıyla sistem uygunluk testleri gerçekteştirilmiştir. Sistem uygunluk testleri metodun optimum koşulunda, %45 (v/v) oranında asetonitril içeren ve pH'sı 7 olacak şekilde ayarlanmış asetonitril-

su ikili karışımında gerçekleştirilmiştir. Belirlenen bu koşulda, klimbazol için 16 µg/mL, bifonazol için 4 µg/mL, lanokonazol ve sertakonazol için 5 µg/mL, oksikonazol ve butokonazol için 8 µg/mL derişimde hazırlanan bu standartlar üçer tekrarlı olarak enjekte edilmiştir.

- **Gün içi ve günler arası çalışma çözeltileri:** Çalışmada metodun kesinliğinin belirlenebilmesi amacıyla gün içi ve günler arası çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Klimbazol için 10-20 µg/mL, oksikonazol ve butokonazol için 5-10 µg/mL, lanokonazol ve sertakonazol için 3-8 µg/mL, bifonazol içinise 2-6 µg/mL derişimlerinde hazırlanan bu bileşiklerin gün içi ve günler arası çalışmalar için en az üç tekrarlı olacak şekilde enjeksiyonları yapılmıştır.

3.3.5. Bileşikler için optimum ayırma koşulunun belirlenmesi

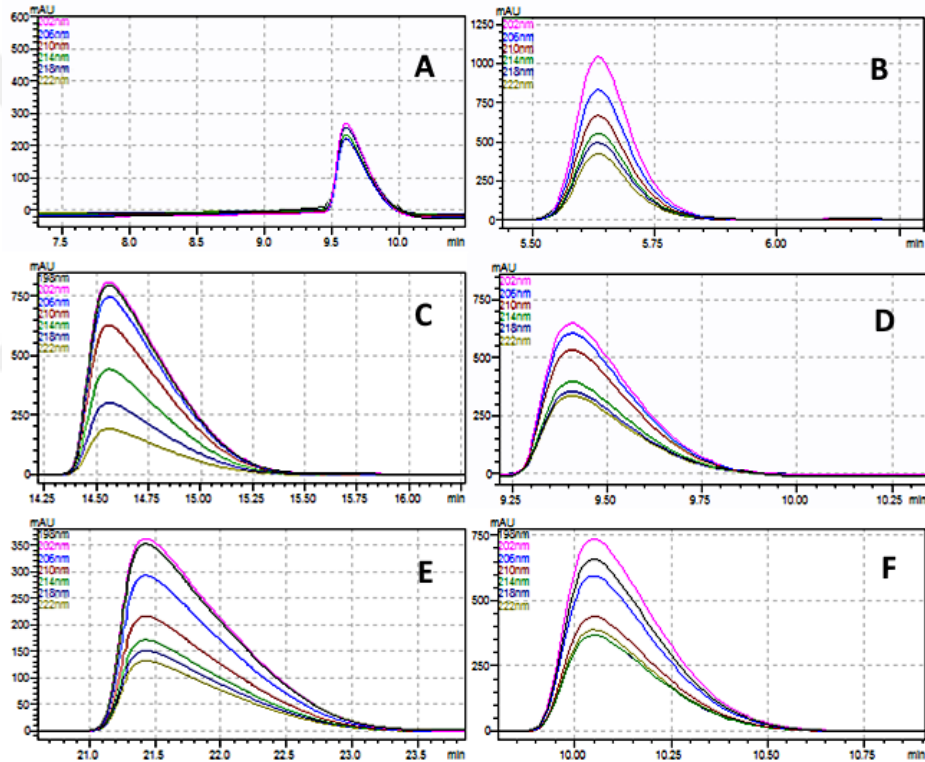
Beş farklı asetonitril-su ikili karışımında gerçekleştirilen protonasyon sabiti tayinleri sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek bileşikler için ayırma ve metot validasyonunun gerçekleştirilebilmesi amacıyla en uygun koşul belirlenmiştir. Bu koşul belirlenirken bileşik çiftleri için her bir mobil fazdaki kapasite faktörleri, seçicilik katsayıları ve ayırma gücü değerleri göz önünde bulundurulmuştur. Çalışılan bütün koşullar incelendiğinde bu altı bileşiğin aynı anda ayırımı gerçekleştirilememiştir. Bu yüzden bileşiklerin üçerli iki grup halinde ayırımı sağlanmıştır. Gruplar; (i) lanokonazol, bifonazol ve sertakonazol; bu grubun iç standardı oksikonazol (ii) butokonazol, oksikonazol ve klimbazol; bu grubun iç standardı bifonazol olacak şekilde belirlenmiştir. Tüm parametreler incelendiğinde bu iki gruptaki bileşiklerin optimum ayırma koşulu pH'sı 7 olan %45 (v/v) oranında asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımı olarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu bölümde RPLC yöntemiyle gerçekleştirilen deneylere ilişkin tüm veriler ve hesaplamalar verilmiştir.

4.1. Bileşiklerin Optimum Dalga Boylarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan bileşiklerin en yüksek absorbans yaptıkları dalga boyları DAD dedektör kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen spektral tarama grafikleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Yapılan spektrum taraması sonucunda bütün bileşikler için $\lambda_{\max}$ değerinin 202 nm olduğuna karar verilmiş ve çalışmalar bu dalga boyunda yürütülmüştür.

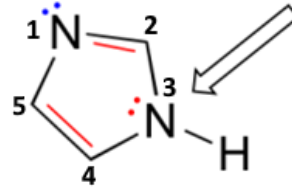


Şekil 4.1. Bileşiklerin DAD dedektör kullanılarak belirlenmiş $\lambda_{\max}$ değerleri. A. Klimbazol, B. Lanokonazol, C. Bifonazol, D. Butokonazol, E. Oksikonazol, F. Sertakonazol

4.2. Bileşiklerin Chemicalize Programıyla Hesaplanan Fizikokimyasal Parametreleri

Seçilen bileşikler yapılarında bir adet imidazol halkası bulundurmaktadır. Bu halkanın 3 numaralı azotuna ait pK_a değerleri Chemicalize programı ile

hesaplanmıştır (Şekil 4.2). Ayrıca bileşiklere ait pK_a , $\log P$, $\log D$ ve $\log S$ değerleri de bu program aracılığıyla hesaplanarak tüm parametreler Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.2. 1,3-imidazolün yapısı

Çizelge 4.1. Bileşiklere ait fizikokimyasal parametreler

Bileşik	pK_a	$\log P$	$\log D$	$\log S$
Klimbazol	6,49	4,34	4,14	-3,80
Bifonazol	6,36	5,23	5,044	-5,59
Lanokonazol	5,89	3,47	3,268	-5,08
Butokonazol	6,51	6,55	6,35	-6,98
Oksikonazol	6,74	5,84	5,626	-6,51
Sertakonazol	6,48	6,23	5,939	-6,67

4.3. Bileşiklerin Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarındaki pK_a Değerlerinin Tayini

Mevcut çalışmada bileşiklerin protonasyon sabitlerinin tayini, asetonitril oranı %35, %40, %45, %50 ve %55 (v/v) olan asetonitril-su ikili karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir asetonitril-su karışımında pH'sı 3-7 arasında değişen mobil fazlar kullanılmıştır. Bu pH değerlerinde bileşiklerin deneysel alıkonma zamanları kullanılarak tahmini alıkonma zamanları çözünen parametresi ile hesaplanmıştır. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun eğim değerinin 1 ve kesim değerinin 0 veya sıfıra yakın olduğu belirlenmiştir. Daha sonra deneysel ve hesaplanan değerler arasındaki farkların toplamı kullanılarak Excel eklentisi Solver (Çözücü) programı ile bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanmıştır.

4.3.1. Tezde çalışılan bileşiklerin iyonlaşma derecesi parametresi ile alıkonmalarının hesaplanması

Bileşiklerin çalışılan tüm asetonitril-su ortamlarında elde edilen t_R değerleri ve aktiflik katsayıları (γ), klimbazol için Çizelge 4.2’de, lanokonazol için Çizelge 4.3’te, bifonazol için Çizelge 4.4’te, butokonazol için Çizelge 4.5’te, oksikonazol için Çizelge 4.6’da ve sertakonazol için Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Klimbazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri

%ACN	pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hes. log t_R	Den. log t_R	$\Delta(\text{Den} - \text{Hes})^2$
%35	3,50	8,066	0,843	0,915	0,907	0,00007575
	4,00	9,378	0,835	0,965	0,972	0,00005736
	4,50	11,127	0,832	1,035	1,046	0,00013522
	5,00	12,067	0,830	1,091	1,082	0,00009223
	5,50	12,932	0,830	1,119	1,112	0,00005422
	6,00	13,300	0,829	1,129	1,124	0,00003178
	6,50	13,967	0,826	1,133	1,145	0,00014655
Toplam						0,00059310
%40	3,50	6,985	0,839	0,839	0,844	0,00002932
	4,00	7,200	0,828	0,875	0,857	0,00031262
	4,50	8,777	0,825	0,927	0,943	0,00027727
	5,00	9,415	0,823	0,968	0,974	0,00003384
	5,50	9,657	0,823	0,988	0,985	0,00001153
	6,00	9,737	0,822	0,996	0,988	0,00005447
	6,50	9,975	0,819	0,998	0,999	0,00000033
Toplam						0,00071939
%45	3,50	5,603	0,834	0,742	0,748	0,00004013
	4,00	5,807	0,822	0,772	0,764	0,00005835
	4,50	6,493	0,817	0,811	0,812	0,00000095
	5,00	6,878	0,815	0,841	0,837	0,00001619
	5,50	7,102	0,815	0,856	0,851	0,00001783
	6,00	7,215	0,814	0,861	0,858	0,00000652
	6,50	7,475	0,812	0,862	0,874	0,00012382
Toplam						0,00026379
%50	3,50	4,942	0,840	0,692	0,694	0,00000277
	4,00	4,998	0,819	0,700	0,699	0,00000127
	4,50	5,155	0,810	0,716	0,712	0,00001174
	5,00	5,486	0,807	0,735	0,739	0,00001620
	5,50	5,630	0,805	0,749	0,751	0,00000287
	6,00	5,666	0,805	0,755	0,753	0,00000263
	6,50	5,700	0,800	0,757	0,756	0,00000146
Toplam						0,00003895
%55	3,50	4,573	0,841	0,659	0,660	0,00000058
	4,00	4,571	0,815	0,661	0,660	0,00000085
	4,50	4,614	0,802	0,665	0,664	0,00000149
	5,00	4,758	0,798	0,676	0,677	0,00000334
	5,50	4,925	0,796	0,692	0,692	0,00000000
	6,00	5,100	0,795	0,708	0,708	0,00000017
	6,50	5,267	0,794	0,716	0,722	0,00002687
Toplam						0,00030243

Çizelge 4.3. Lanokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri

%ACN	pH	Deneyisel t_r	γ aktiflik	Hes. log t_r	Den. log t_r	$\Delta(\text{Den} - \text{Hes})^2$
%35	3,00	7,888	0,862	0,893	0,897	0,00001444
	3,50	8,191	0,843	0,920	0,913	0,00003885
	4,00	9,487	0,835	0,975	0,977	0,00000370
	4,50	11,238	0,832	1,048	1,051	0,00000641
	5,00	12,621	0,830	1,102	1,101	0,00000065
	5,50	13,133	0,830	1,127	1,118	0,00007293
	6,00	13,912	0,829	1,136	1,143	0,00005364
Toplam						0,00019064
%40	3,00	6,212	0,861	0,785	0,793	0,00006147
	3,50	6,309	0,839	0,811	0,800	0,00011145
	4,00	7,154	0,828	0,857	0,855	0,00000655
	4,50	8,221	0,825	0,907	0,915	0,00006043
	5,00	8,777	0,823	0,938	0,943	0,00003042
	5,50	8,827	0,823	0,951	0,946	0,00002306
	6,00	8,951	0,822	0,955	0,952	0,00001031
Toplam						0,00030369
%45	3,00	5,613	0,861	0,751	0,749	0,00000281
	3,50	5,963	0,834	0,773	0,775	0,00000776
	4,00	6,377	0,822	0,804	0,805	0,00000072
	4,50	6,674	0,817	0,828	0,824	0,00001514
	5,00	6,874	0,815	0,840	0,837	0,00000863
	5,50	7,055	0,815	0,845	0,848	0,00001531
	6,00	7,031	0,814	0,846	0,847	0,00000092
Toplam						0,00005129
%50	3,00	4,550	0,860	0,659	0,658	0,00000106
	3,50	4,914	0,830	0,689	0,691	0,00000687
	4,00	5,239	0,815	0,720	0,719	0,00000096
	4,50	5,438	0,809	0,739	0,735	0,00001203
	5,00	5,588	0,807	0,747	0,747	0,00000048
	5,50	5,596	0,806	0,749	0,748	0,00000179
	6,00	5,670	0,806	0,750	0,754	0,00001227
Toplam						0,00003546
%55	3,00	4,250	0,860	0,629	0,628	0,00000010
	3,50	4,459	0,826	0,648	0,649	0,00000090
	4,00	4,628	0,808	0,666	0,665	0,00000021
	4,50	4,724	0,800	0,675	0,674	0,00000053
	5,00	4,748	0,798	0,679	0,677	0,00000417
	5,50	4,775	0,797	0,680	0,679	0,00000059
Toplam						0,00001788

Çizelge 4.4. Bifonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri

%ACN	pH	DeneySEL t_R	γ aktiflik	Hes. log t_R	Den. log t_R	$\Delta(\text{Den} - \text{Hes})^2$
%35	3,50	11,224	0,843	1,051	1,050	0,00000057
	4,00	11,470	0,835	1,064	1,060	0,00002005
	4,50	12,685	0,832	1,099	1,103	0,00001523
	5,00	14,999	0,830	1,173	1,176	0,00001113
	5,50	18,979	0,830	1,268	1,278	0,00011148
	6,00	20,201	0,829	1,338	1,305	0,00104141
	6,50	23,941	0,826	1,370	1,379	0,00007658
	7,00	24,738	0,818	1,382	1,393	0,00012001
Toplam						0,00139646
%40	3,00	8,892	0,861	0,947	0,949	0,00000572
	3,50	8,899	0,839	0,950	0,949	0,00000037
	4,00	9,199	0,828	0,960	0,964	0,00001373
	4,50	9,413	0,825	0,987	0,974	0,00018099
	5,00	11,384	0,823	1,044	1,056	0,00016013
	5,50	12,979	0,823	1,117	1,113	0,00001095
	6,00	14,54	0,822	1,170	1,163	0,00005031
	6,50	15,848	0,819	1,194	1,200	0,00003263
Toplam						0,00045482
%45	3,50	6,116	0,834	0,788	0,786	0,00000407
	4,00	6,200	0,822	0,798	0,792	0,00002867
	4,50	6,805	0,817	0,823	0,833	0,00009990
	5,00	7,502	0,815	0,875	0,875	0,00000002
	5,50	8,711	0,815	0,942	0,940	0,00000421
	6,00	9,618	0,814	0,991	0,983	0,00005684
	6,50	10,466	0,812	1,013	1,020	0,00004667
Toplam						0,00024038
%50	3,50	5,138	0,830	0,711	0,711	0,00000016
	4,00	5,189	0,815	0,716	0,715	0,00000127
	4,50	5,404	0,809	0,730	0,733	0,00000867
	5,00	5,700	0,807	0,758	0,756	0,00000425
	5,50	6,242	0,806	0,794	0,795	0,00000145
	6,00	6,589	0,806	0,820	0,819	0,00000149
	6,50	6,801	0,804	0,832	0,833	0,00000044
Toplam						0,00001774
%55	3,50	4,475	0,826	0,652	0,651	0,00000101
	4,00	4,499	0,808	0,656	0,653	0,00000932
	4,50	4,709	0,800	0,668	0,673	0,00002501
	5,00	4,913	0,798	0,692	0,691	0,00000035
	5,50	5,271	0,797	0,722	0,722	0,00000001
	6,00	5,550	0,796	0,743	0,744	0,00000160
	6,50	5,636	0,795	0,752	0,751	0,00000224
Toplam						0,00003956

Çizelge 4.5. Butokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri

%ACN	pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hes. log t_R	Den. log t_R	$\Delta(\text{Den} - \text{Hes})^2$
%35	3,50	18,891	0,862	1,281	1,276	0,00002070
	4,00	19,192	0,843	1,288	1,283	0,00002611
	4,50	20,912	0,835	1,310	1,320	0,00011548
	5,00	23,228	0,832	1,362	1,366	0,00002024
	5,50	27,489	0,830	1,449	1,439	0,00008730
	6,00	34,309	0,830	1,533	1,535	0,00000748
	6,50	38,445	0,829	1,581	1,585	0,00001882
	7,00	39,486	0,826	1,600	1,596	0,00001098
Toplam						0,00030711
%40	3,50	11,712	0,861	1,076	1,069	0,00005260
	4,00	12,020	0,839	1,081	1,080	0,00000065
	4,50	12,626	0,828	1,095	1,101	0,00004309
	5,00	13,710	0,825	1,129	1,137	0,00006318
	5,50	15,131	0,823	1,188	1,180	0,00006985
	6,00	17,607	0,823	1,247	1,246	0,00000116
	6,50	19,301	0,822	1,280	1,286	0,00002623
	7,00	19,586	0,819	1,294	1,292	0,00000458
Toplam						0,00026135
%45	3,50	9,027	0,834	0,960	0,956	0,00002386
	4,00	9,277	0,822	0,965	0,967	0,00000618
	4,50	9,470	0,817	0,978	0,976	0,00000250
	5,00	10,194	0,815	1,010	1,008	0,00000206
	5,50	11,802	0,815	1,064	1,072	0,00006415
	6,00	13,235	0,814	1,117	1,122	0,00002124
	6,50	14,116	0,812	1,147	1,150	0,00000546
	7,00	14,130	0,787	1,160	1,150	0,00009101
Toplam						0,00021646
%50	3,00	6,895	0,860	0,840	0,839	0,00000271
	3,50	7,002	0,830	0,841	0,845	0,00001730
	4,00	7,007	0,815	0,844	0,846	0,00000298
	4,50	7,035	0,809	0,852	0,847	0,00002023
	5,00	7,382	0,807	0,871	0,868	0,00001008
	5,50	8,168	0,806	0,905	0,912	0,00005041
	6,00	8,573	0,806	0,938	0,933	0,00002612
	6,50	9,057	0,804	0,957	0,957	0,00000006
	7,00	9,262	0,77	0,965	0,967	0,00000287
Toplam						0,00013276
%55	3,50	5,445	0,826	0,738	0,736	0,00000255
	4,00	5,476	0,808	0,740	0,738	0,00000138
	4,50	5,586	0,800	0,745	0,747	0,00000268
	5,00	5,786	0,798	0,760	0,762	0,00000663
	5,50	6,095	0,797	0,784	0,785	0,00000025
	6,00	6,360	0,796	0,809	0,803	0,00002856
	6,50	6,700	0,795	0,823	0,826	0,00001160
Toplam						0,00005364

Çizelge 4.6. Oksikonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri

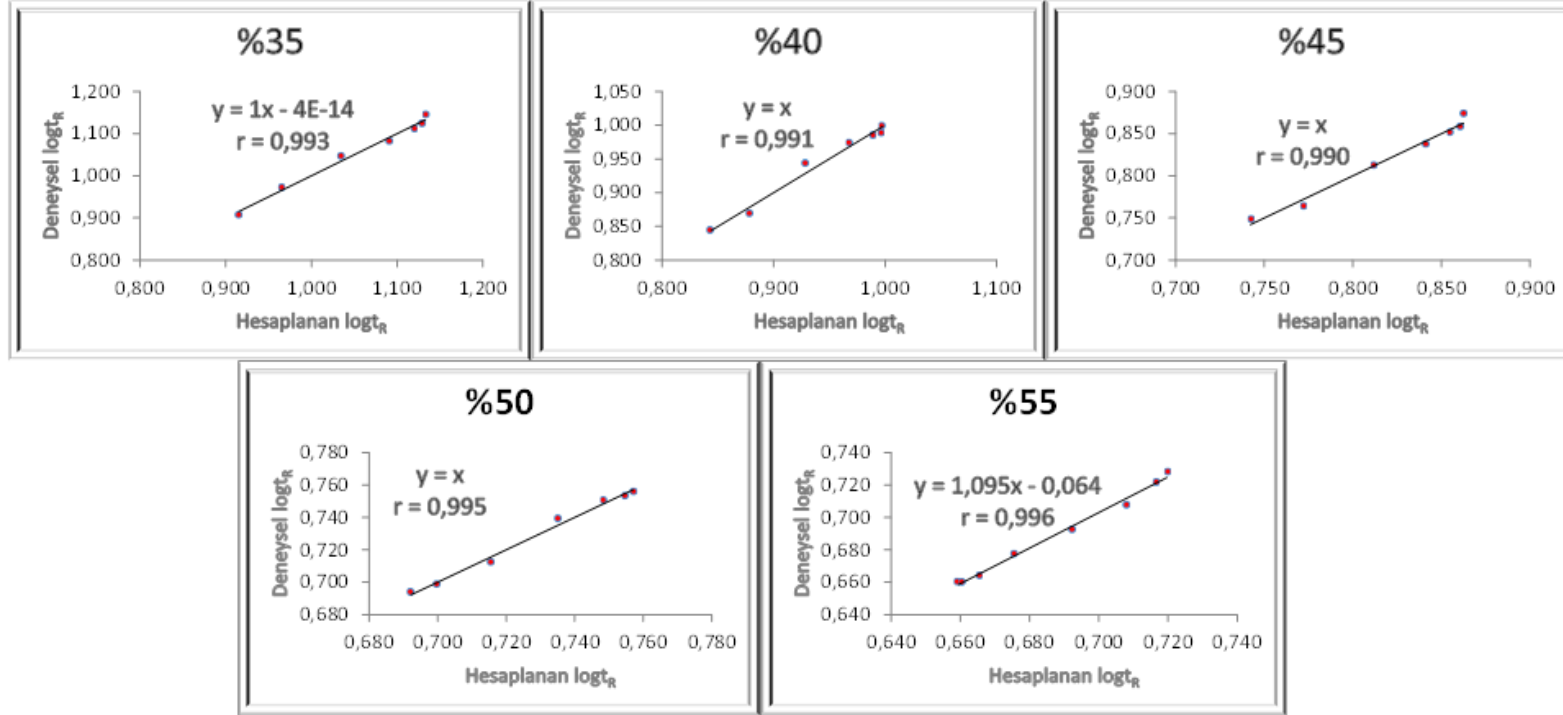
%ACN	pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hes. log t_R	Den. log t_R	$\Delta(\text{Den} - \text{Hes})^2$
%35	3,50	18,791	0,843	1,275	1,274	0,00000035
	4,00	20,175	0,835	1,308	1,305	0,00000906
	4,50	24,248	0,832	1,374	1,385	0,00011102
	5,00	27,573	0,830	1,455	1,440	0,00020661
	5,50	33,298	0,830	1,510	1,522	0,00014815
	6,00	33,851	0,829	1,535	1,530	0,00003012
	6,50	35,054	0,826	1,544	1,545	0,00000057
Toplam						0,00050589
%40	3,50	13,363	0,839	1,125	1,126	0,00000166
	4,00	13,799	0,828	1,133	1,140	0,00004659
	4,50	14,022	0,825	1,155	1,147	0,00007285
	5,00	15,584	0,823	1,200	1,193	0,00005865
	5,50	18,543	0,823	1,255	1,268	0,00016206
	6,00	19,698	0,822	1,293	1,294	0,00000093
	6,50	20,176	0,819	1,310	1,305	0,00003151
Toplam						0,00037426
%45	3,50	8,946	0,834	0,957	0,952	0,00002780
	4,00	9,350	0,822	0,963	0,971	0,00005833
	4,50	9,527	0,817	0,980	0,979	0,00000075
	5,00	10,204	0,815	1,013	1,009	0,00001843
	5,50	11,437	0,815	1,053	1,058	0,00002498
	6,00	11,972	0,814	1,081	1,078	0,00000632
	6,50	12,391	0,812	1,093	1,093	0,00000010
Toplam						0,00013671
%50	3,50	6,626	0,830	0,818	0,821	0,00001160
	4,00	6,654	0,815	0,822	0,823	0,00000049
	4,50	6,758	0,809	0,834	0,830	0,00002112
	5,00	7,168	0,807	0,858	0,855	0,00000863
	5,50	7,808	0,806	0,887	0,893	0,00002972
	6,00	8,038	0,806	0,906	0,905	0,00000162
	6,50	8,207	0,804	0,915	0,914	0,00000056
Toplam						0,00007374
%55	4,00	5,379	0,808	0,733	0,731	0,00000432
	4,50	5,534	0,800	0,741	0,743	0,00000285
	5,00	5,759	0,798	0,758	0,760	0,00000528
	5,50	5,950	0,797	0,778	0,775	0,00000932
	6,00	6,192	0,796	0,790	0,792	0,00000213
	6,50	6,246	0,795	0,796	0,796	0,00000010
Toplam						0,00002399

Çizelge 4.7. Sertakonazolün asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilen ve hesaplanan t_R değerleri

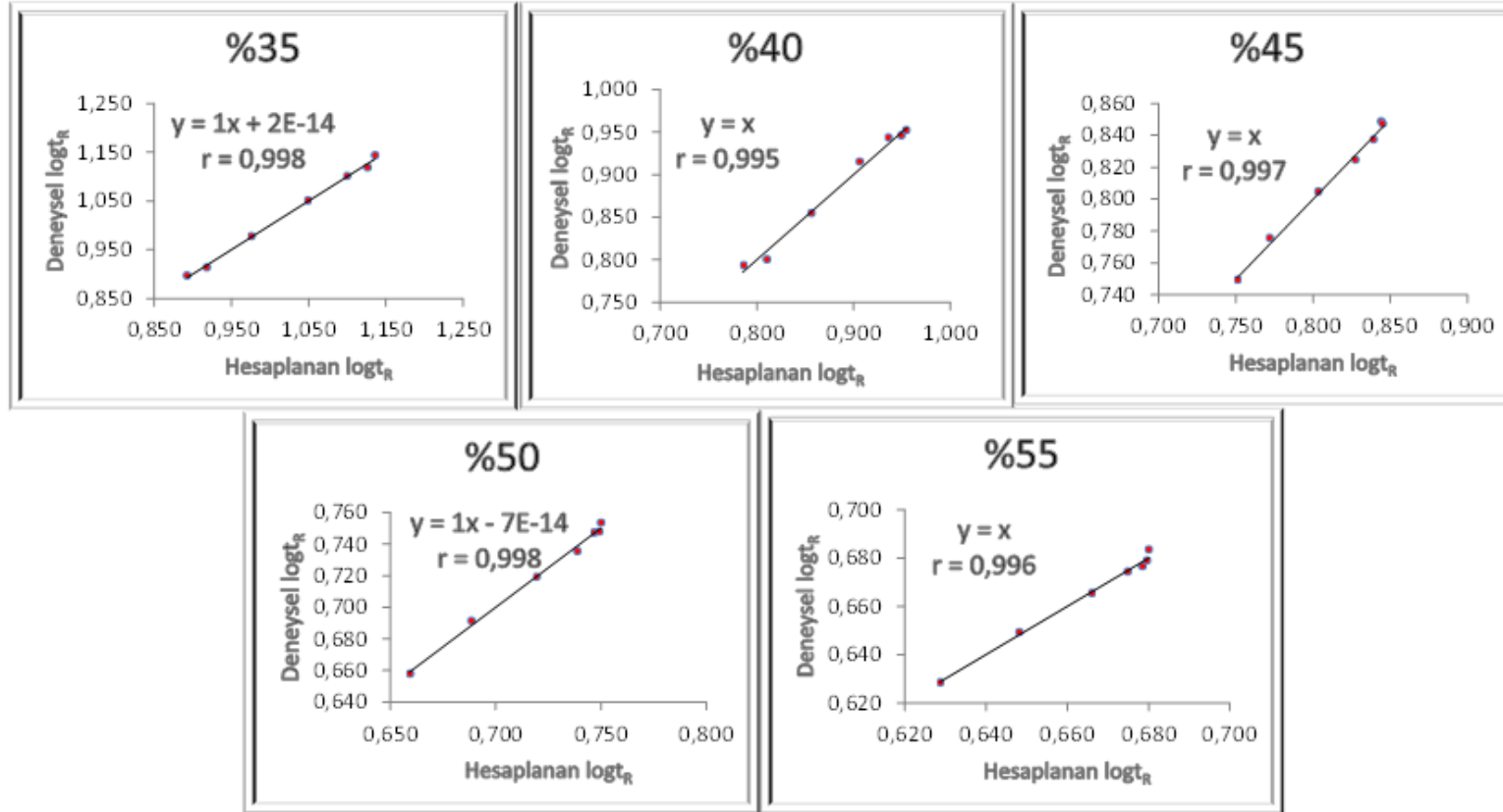
%ACN	pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hes. log t_R	Den. log t_R	$\Delta(\text{Den} - \text{Hes})^2$
%35	3,50	22,938	0,843	1,340	1,361	0,00041583
	4,00	21,537	0,835	1,347	1,333	0,00018332
	4,50	23,001	0,832	1,366	1,362	0,00001493
	5,00	25,378	0,830	1,411	1,404	0,00004892
	5,50	30,405	0,830	1,488	1,483	0,00002849
	6,00	38,65	0,829	1,563	1,587	0,00059289
	6,50	38,75	0,826	1,605	1,588	0,00028130
	7,00	42,051	0,818	1,622	1,624	0,00000312
Toplam						0,00156880
%40	3,50	12,097	0,839	1,093	1,083	0,00010995
	4,00	12,359	0,828	1,098	1,092	0,00003997
	4,50	13,367	0,825	1,113	1,126	0,00016573
	5,00	14,5035	0,823	1,150	1,161	0,00013955
	5,50	16,031	0,823	1,212	1,205	0,00004967
	6,00	18,574	0,822	1,273	1,269	0,00002093
	6,50	20,649	0,819	1,309	1,315	0,00003986
	7,00	20,899	0,813	1,323	1,320	0,00000660
Toplam						0,00057227
%45	3,50	9,933	0,834	0,994	0,997	0,00000865
	4,00	9,935	0,822	0,998	0,997	0,00000149
	4,50	10,241	0,817	1,011	1,010	0,00000012
	5,00	10,914	0,815	1,041	1,038	0,00000790
	5,50	12,412	0,815	1,092	1,094	0,00000372
	6,00	13,782	0,814	1,142	1,139	0,00000622
	6,50	14,949	0,812	1,170	1,175	0,00002127
	7,00	15,094	0,787	1,181	1,179	0,00000682
Toplam						0,00005618
%50	3,50	7,393	0,830	0,868	0,869	0,00000019
	4,00	7,439	0,815	0,871	0,872	0,00000032
	4,50	7,486	0,809	0,878	0,874	0,00001678
	5,00	7,942	0,807	0,896	0,900	0,00001319
	5,50	8,501	0,806	0,926	0,929	0,00000991
	6,00	8,871	0,806	0,955	0,948	0,00004862
	6,50	9,347	0,804	0,971	0,971	0,00000004
	7,00	9,567	0,769	0,977	0,981	0,00001211
Toplam						0,00010116
%55	4,00	5,680	0,808	0,758	0,754	0,00001464
	4,50	5,849	0,800	0,764	0,767	0,00000925
	5,00	6,041	0,798	0,778	0,781	0,00000905
	5,50	6,300	0,797	0,801	0,799	0,00000314
	6,00	6,602	0,796	0,822	0,820	0,00000789
	6,50	6,862	0,795	0,834	0,836	0,00000556
Toplam						0,00004953

Çizelgeler incelendiğinde deneysel ve hesaplanan logaritmik t_R değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Her bir ortam için hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel $\log t_R$ değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri, klmbazol için Şekil 4.3'te, lanokonazol için Şekil 4.4'te, bifonazol için Şekil 4.5'te, butokonazol için Şekil 4.6'da, oksikonazol için Şekil 4.7'de ve sertakonazol için Şekil 4.8'de verilmiştir.

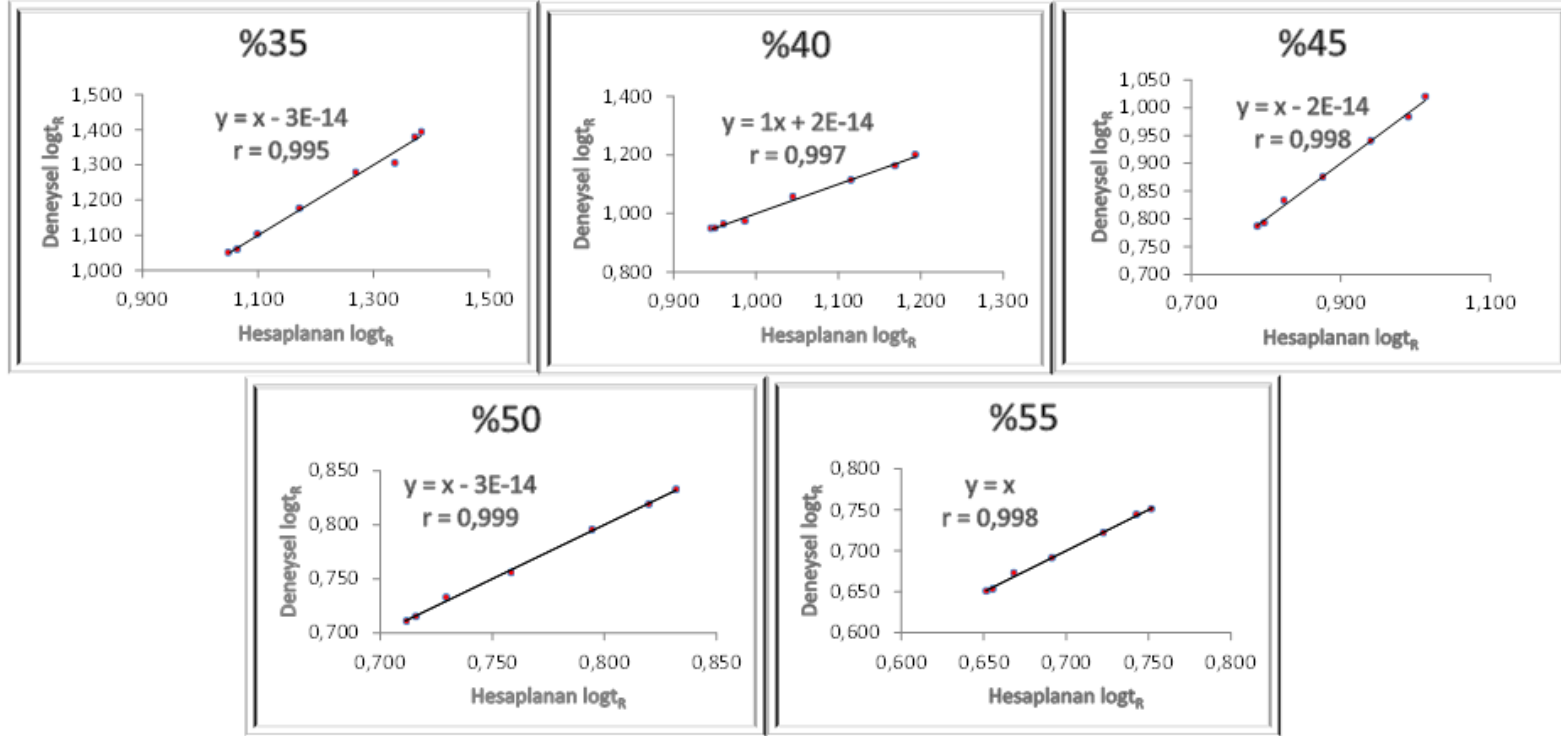




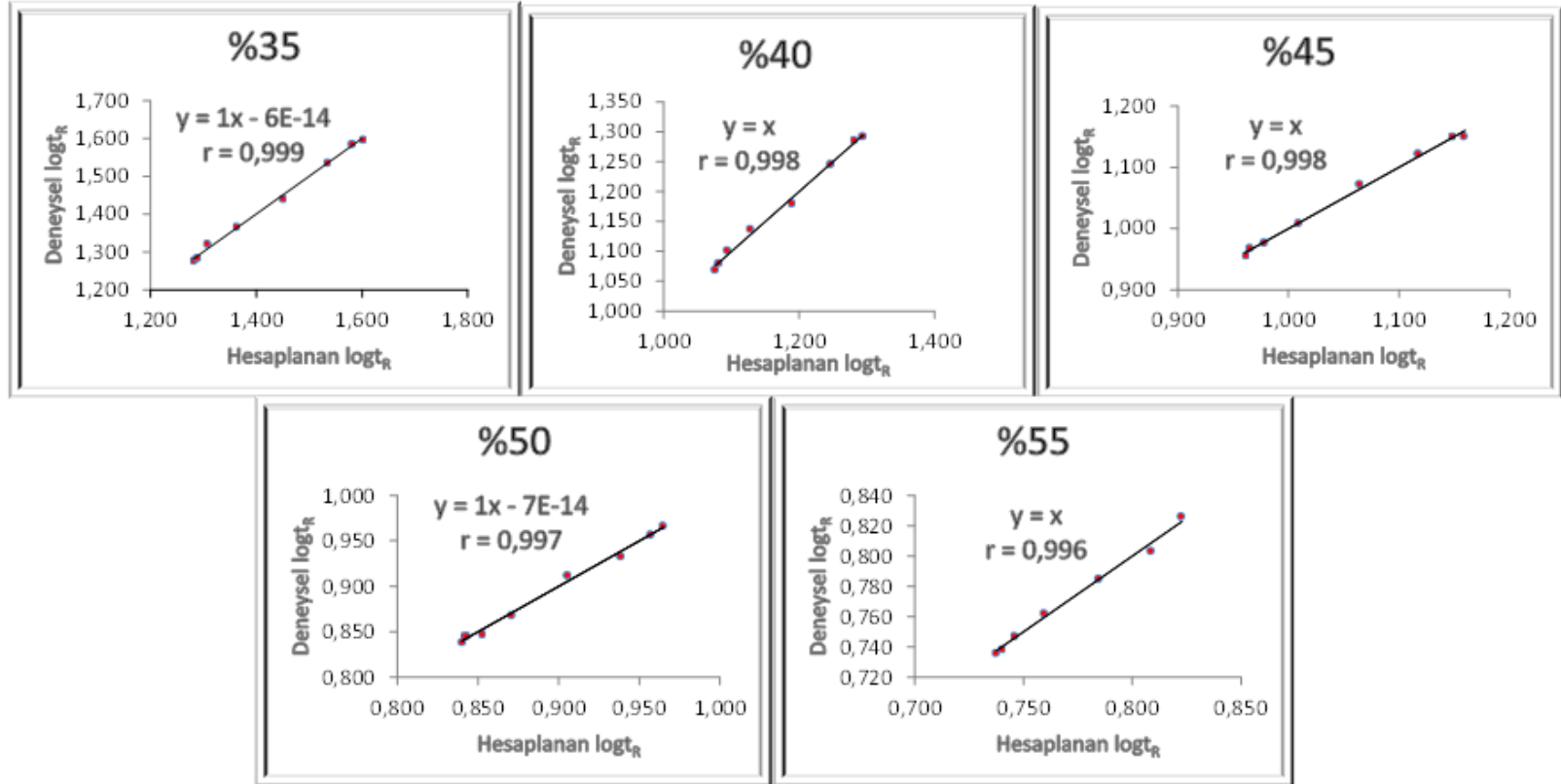
Şekil 4.3. Klimbazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler



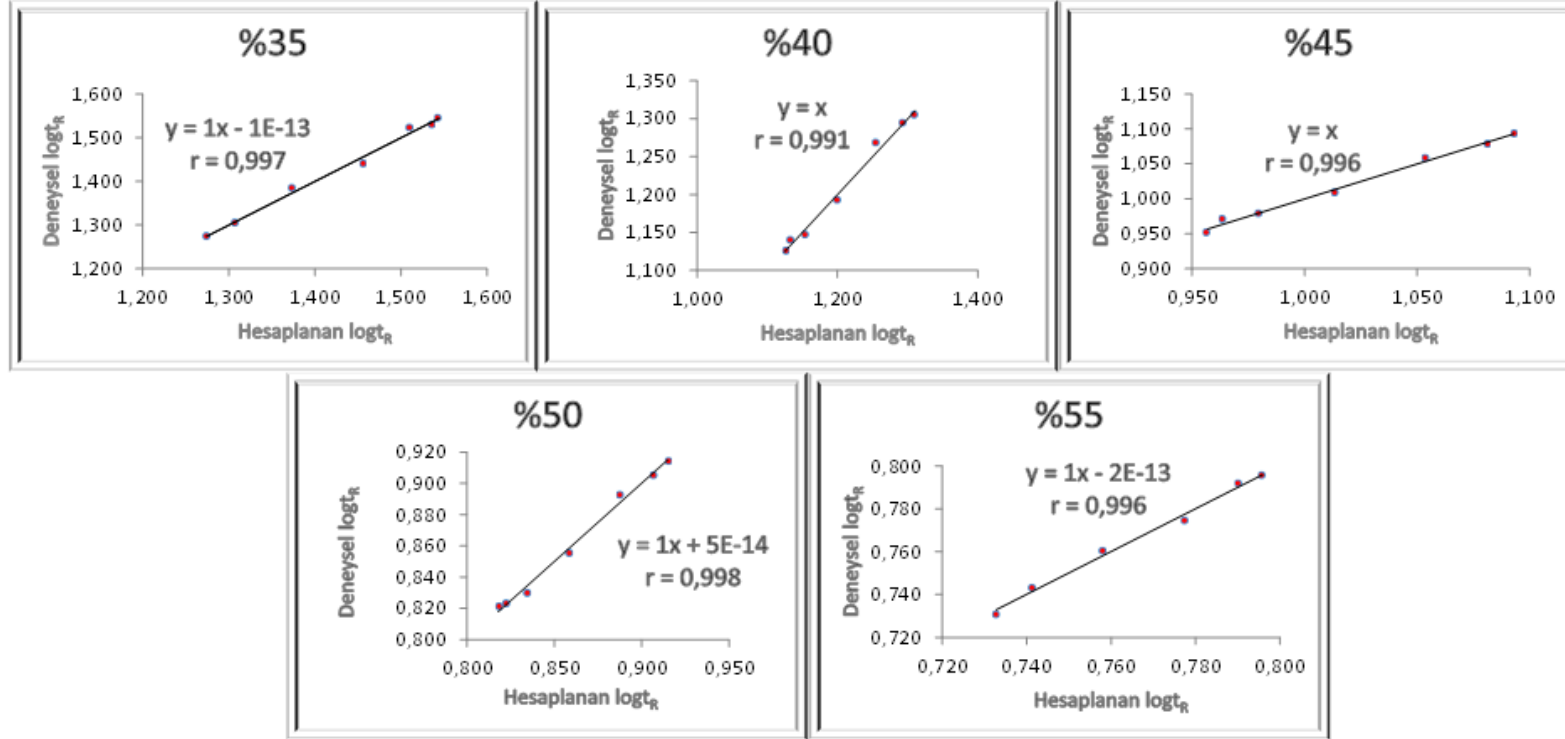
Şekil 4.4. Lanokonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler



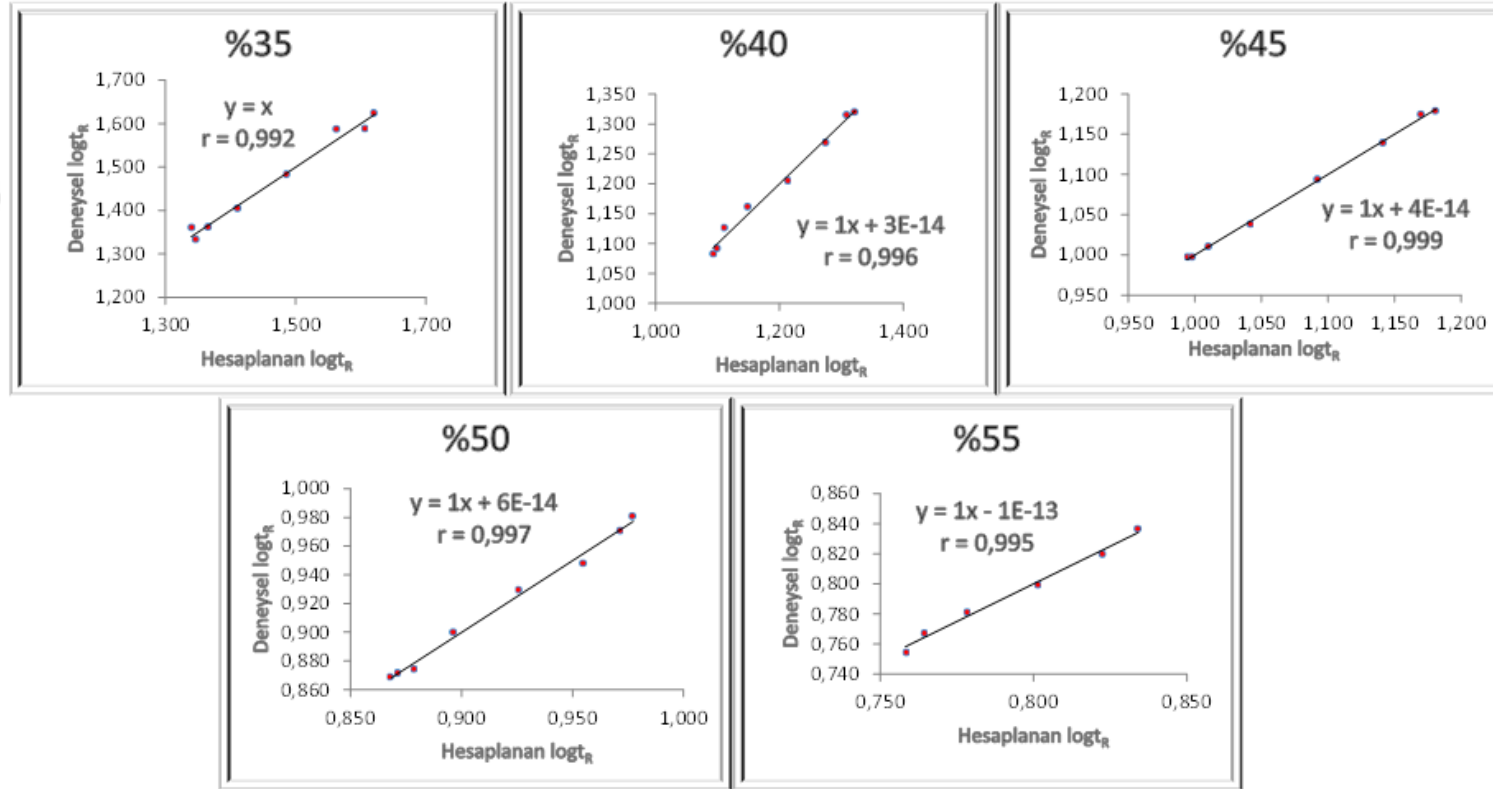
Şekil 4.5. Bifonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler



Şekil 4.6. Butokonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler



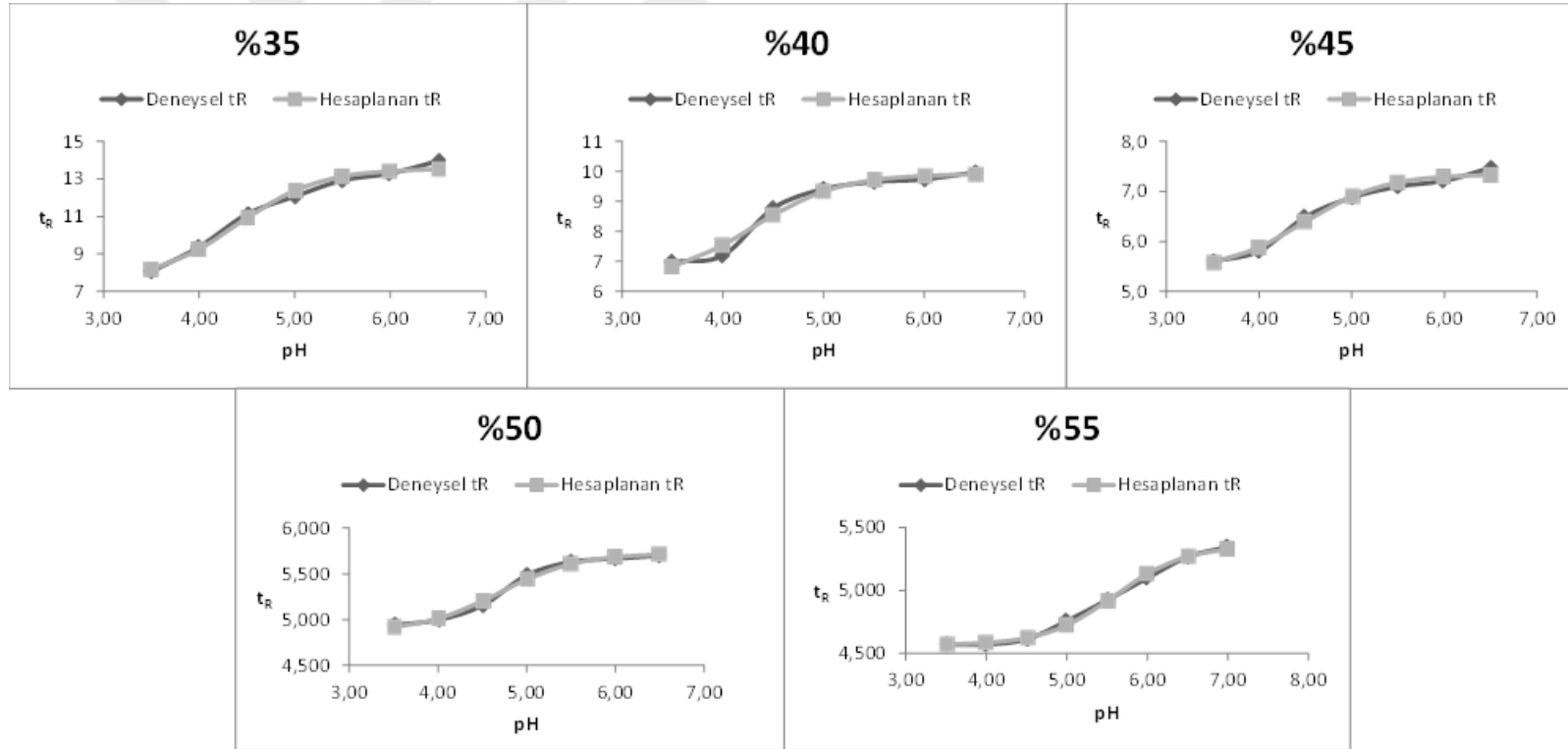
Şekil 4.7. Oksikonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler



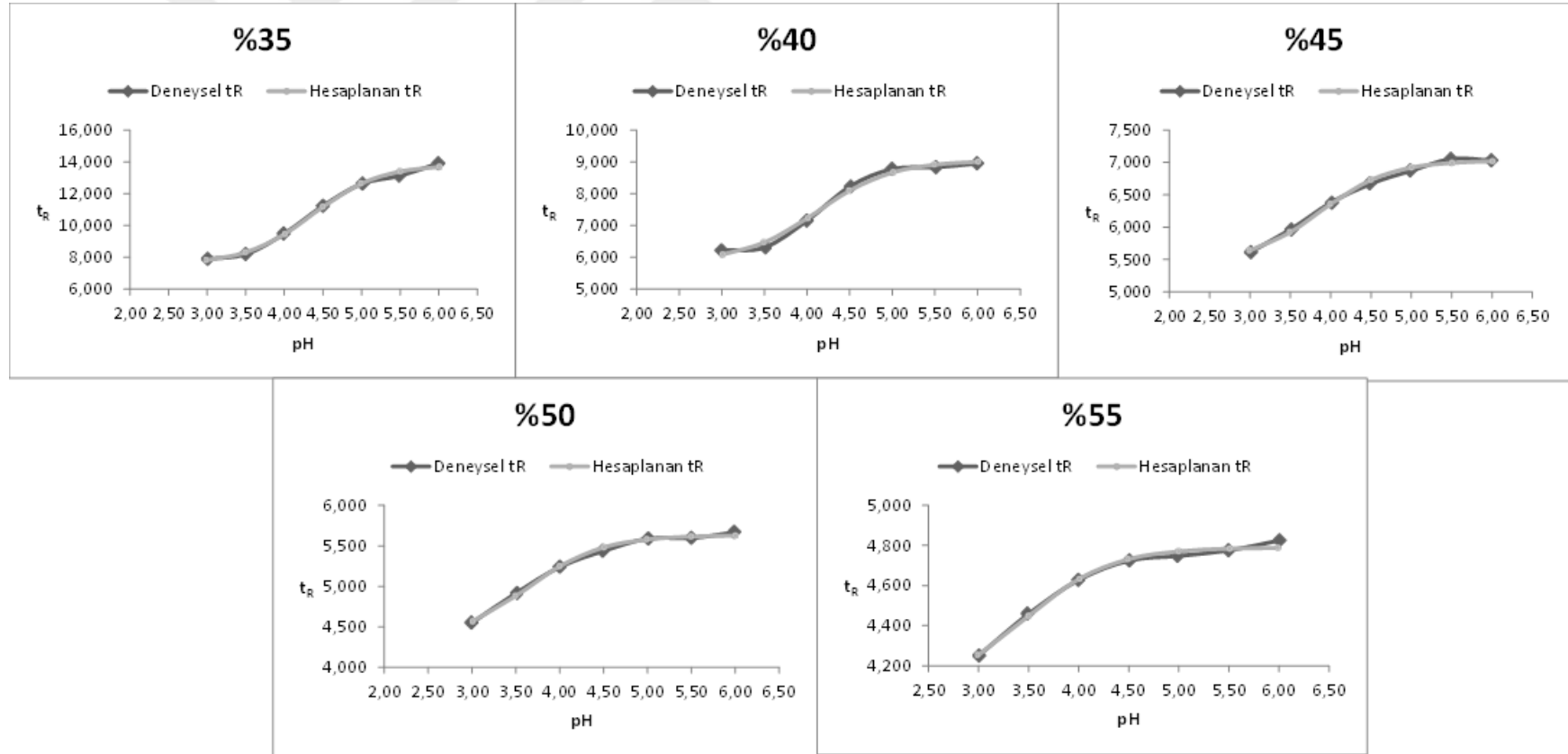
Şekil 4.8. Sertakonazol için tüm asetonitril-su ikili karışımlarındaki deneysel ve hesaplanan $\log R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafikler

Hesaplanan $\log t_R$ ve deneysel $\log t_R$ değerleri grafiğe geçirildiğinde eğim değerinin 1, kesim değerinin 0'a yakın olduğu ve r değerlerinin (korelasyon katsayısı) 0,99 ve üzeri hesaplandığı görülmektedir.

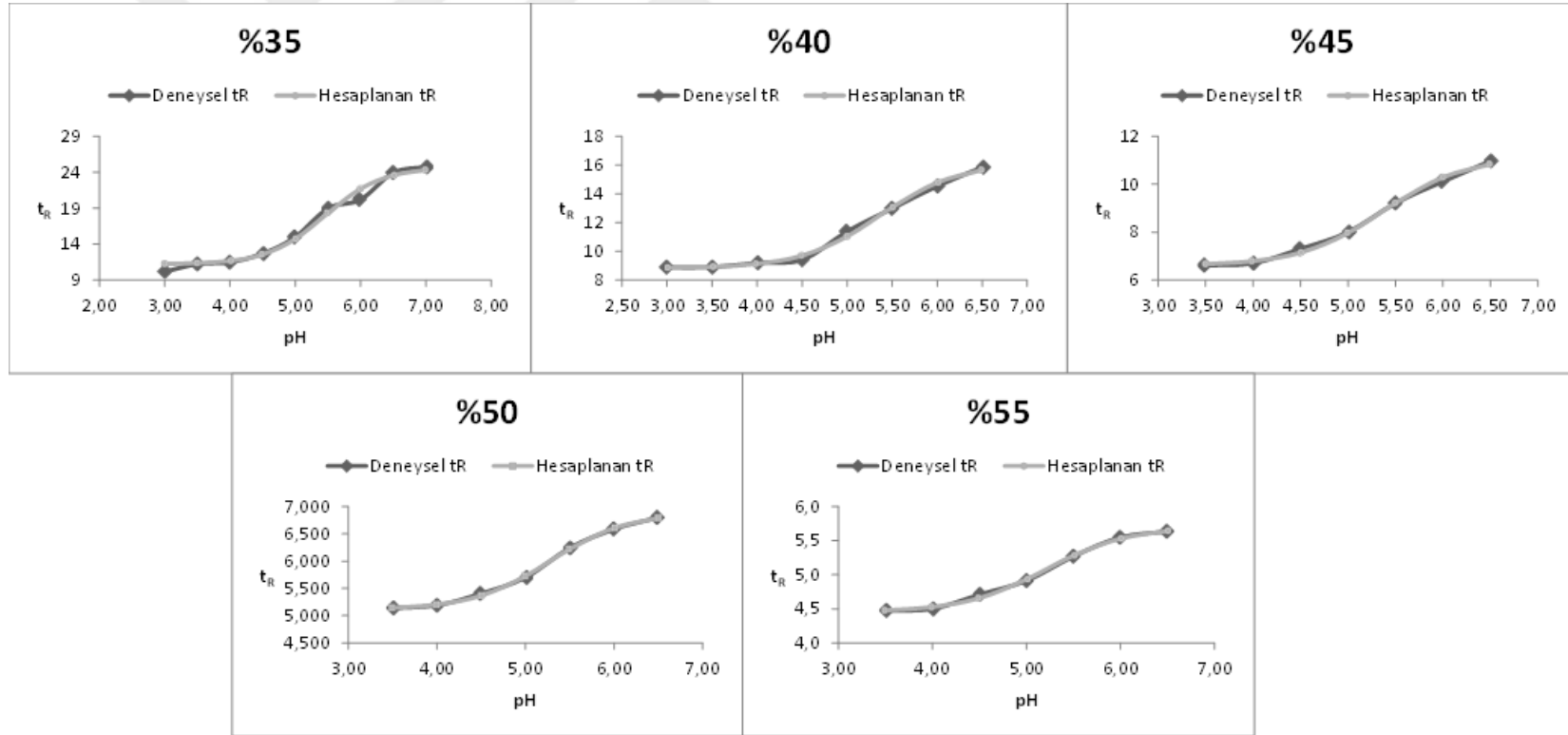
Ayrıca mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve pK_a değerleri kullanılarak Horvath-Melander yaklaşımla da bazik bileşiklerin alıkonma değerleri hesaplanmıştır. Bu yaklaşıma ek olarak bazik bileşiklerin alıkonma değerlerini hesaplamaya yönelik Horvath-Melander tarafından geliştirilmiş bağıntıda deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değerleri kullanılarak alıkonma değerleri teorik olarak hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı teorik ve deneysel alıkonma değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen sigmoidaller, klmbazol için şekil 4.9'da, lanokonazol için şekil 4.10'da, bifonazol için şekil 4.11'de, butokonazol için şekil 4.12'de, oksikonazol için şekil 4.13'te ve sertakonazol için şekil 4.14'te verilmiştir.



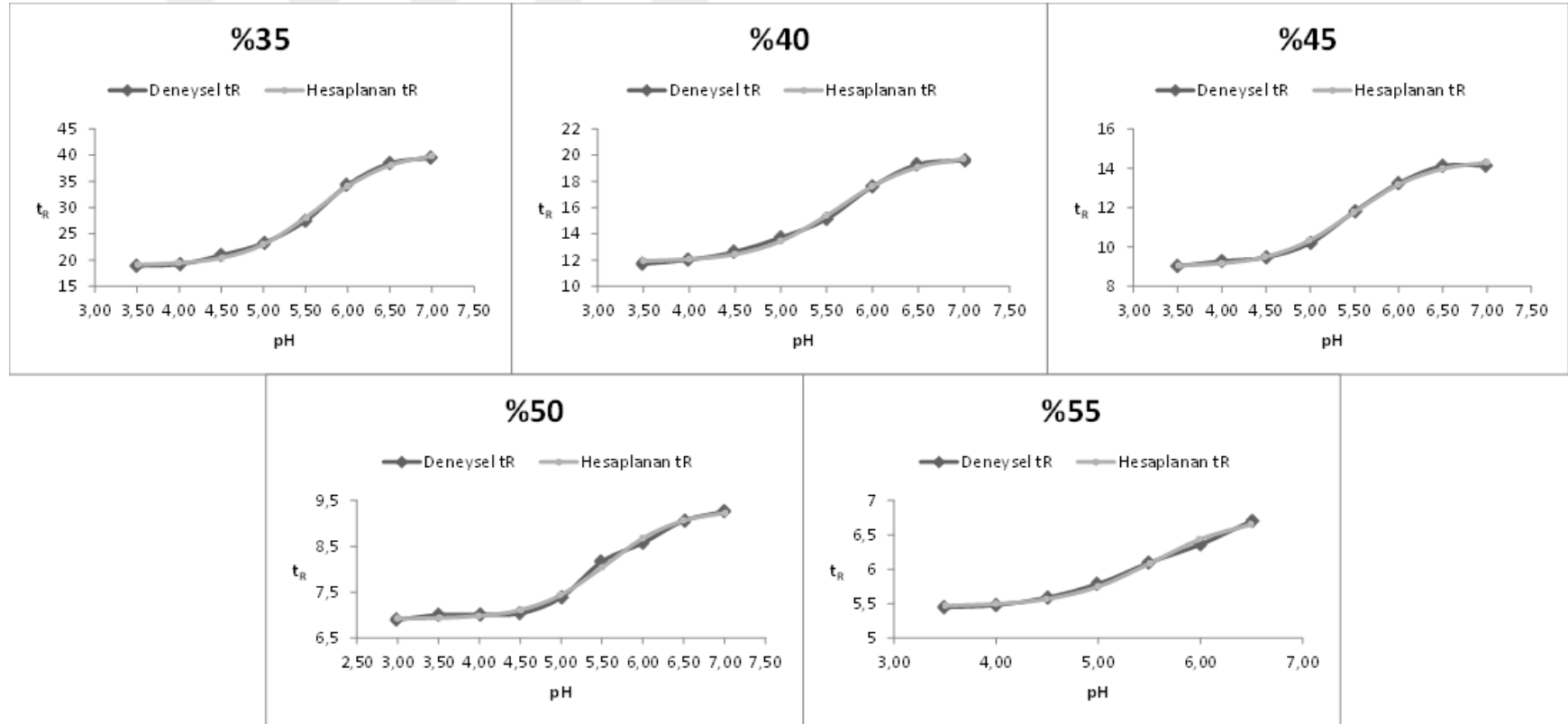
Şekil 4.9. Klímazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkönma zamanı ilişkisi



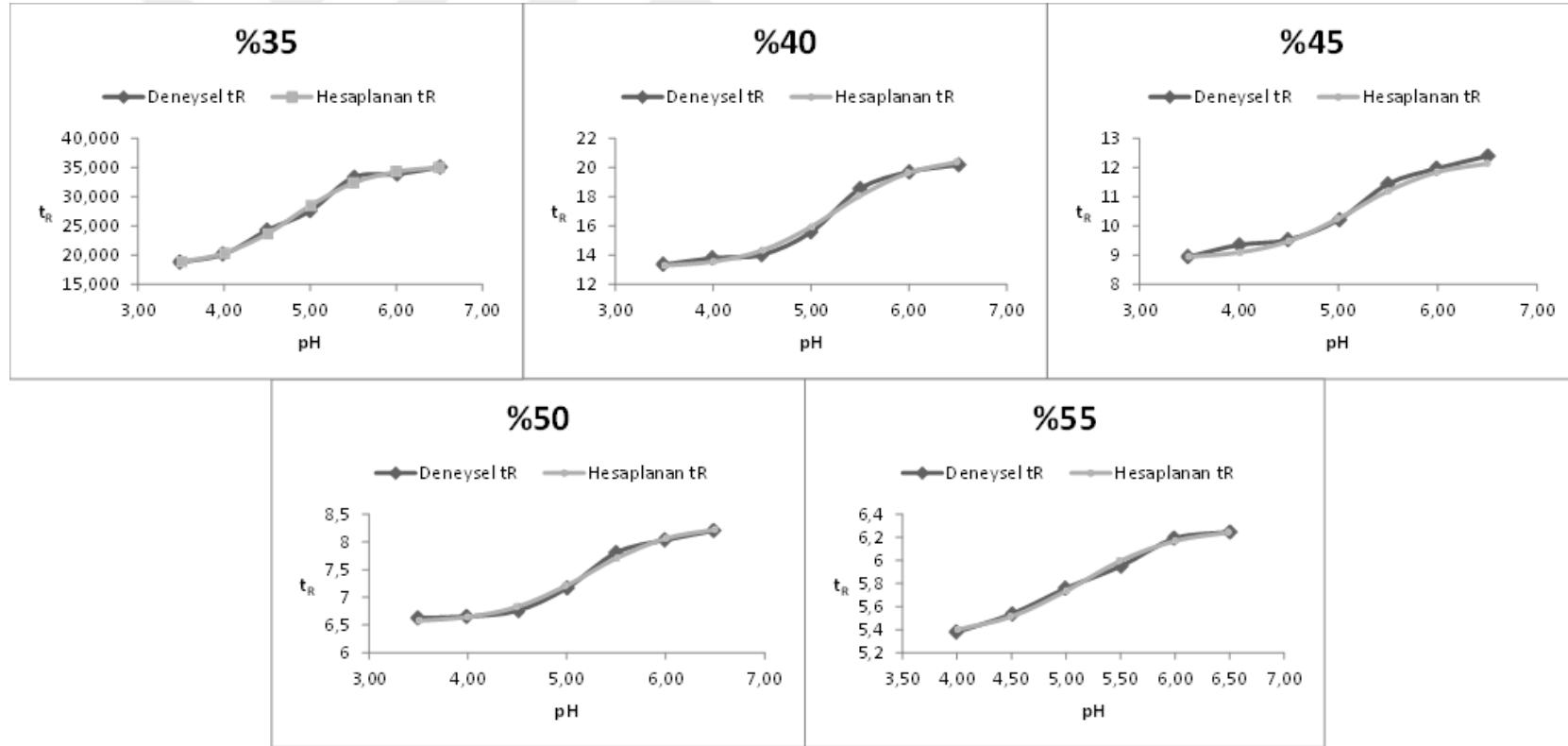
Şekil 4.10. Lanokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkönme zamanı ilişkisi



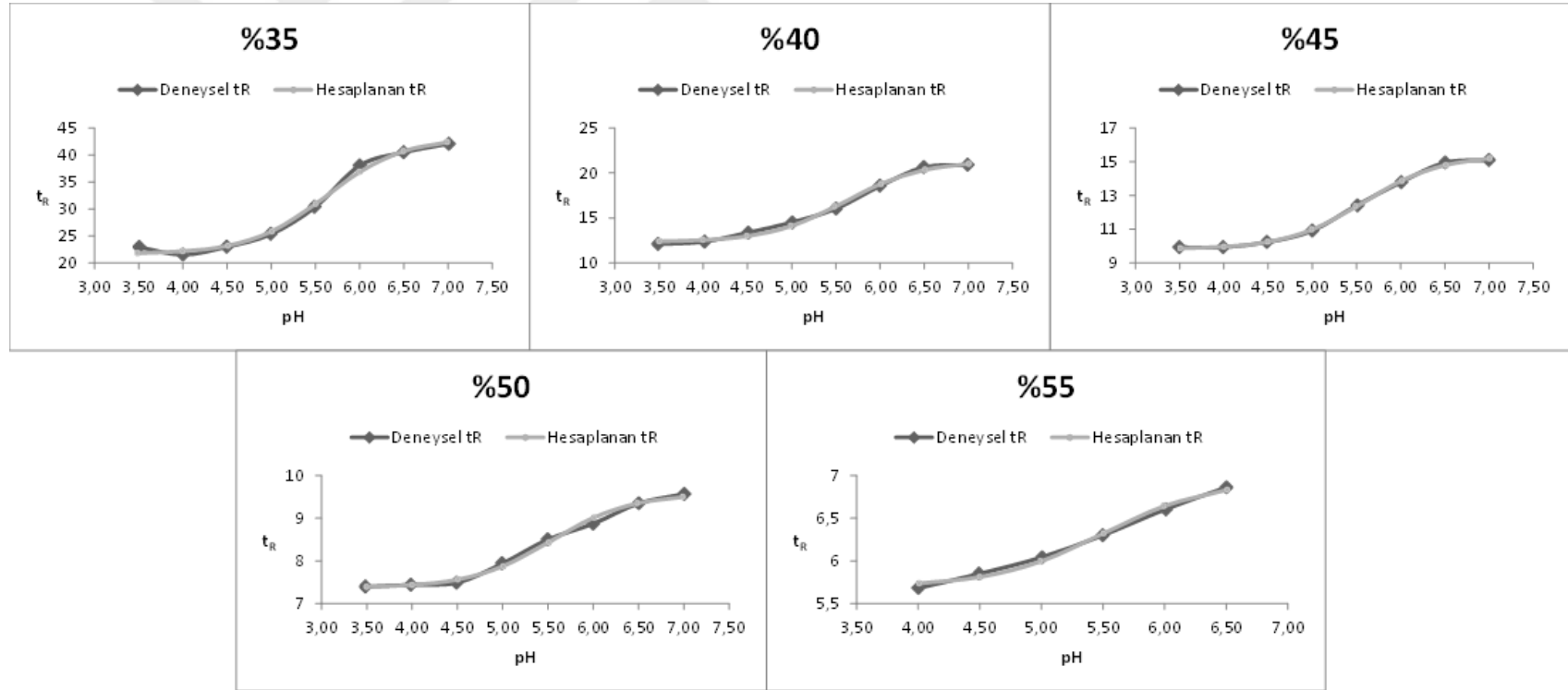
Şekil 4.11. Bifonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi



Şekil 4.12. Butokonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkönme zamanı ilişkisi



Şekil 4.13. Oksikonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkonma zamanı ilişkisi



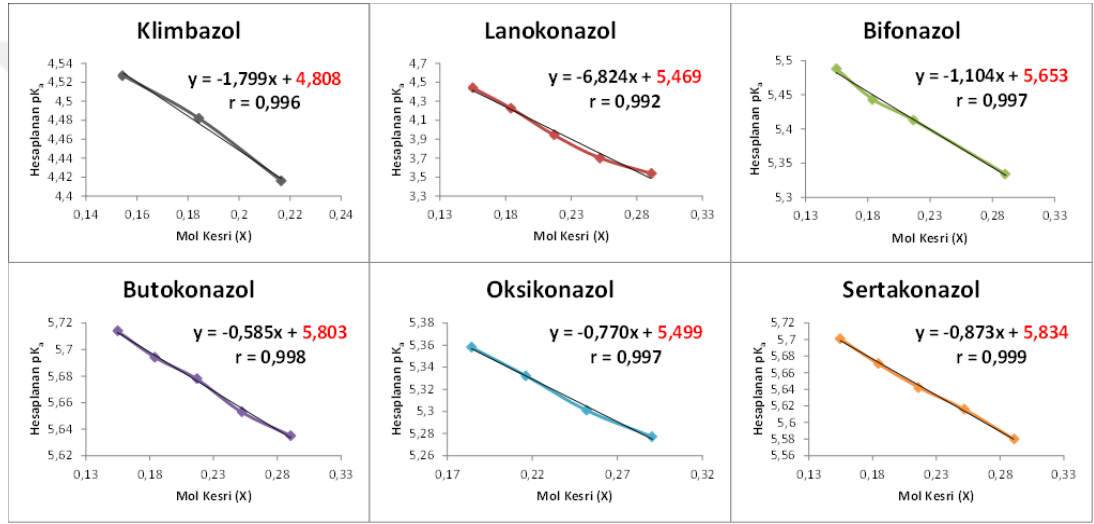
Şekil 4.14. Sertakonazolün asetonitril-su ikili karışımlarındaki pH-alıkönme zamanı ilişkisi

4.4. Bileşiklerin Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Tayini

Bileşiklerin su ortamındaki pK_a değerlerinin tayini için üç farklı yaklaşım kullanılmıştır.

4.4.1. Mol kesri - pK_a yöntemi

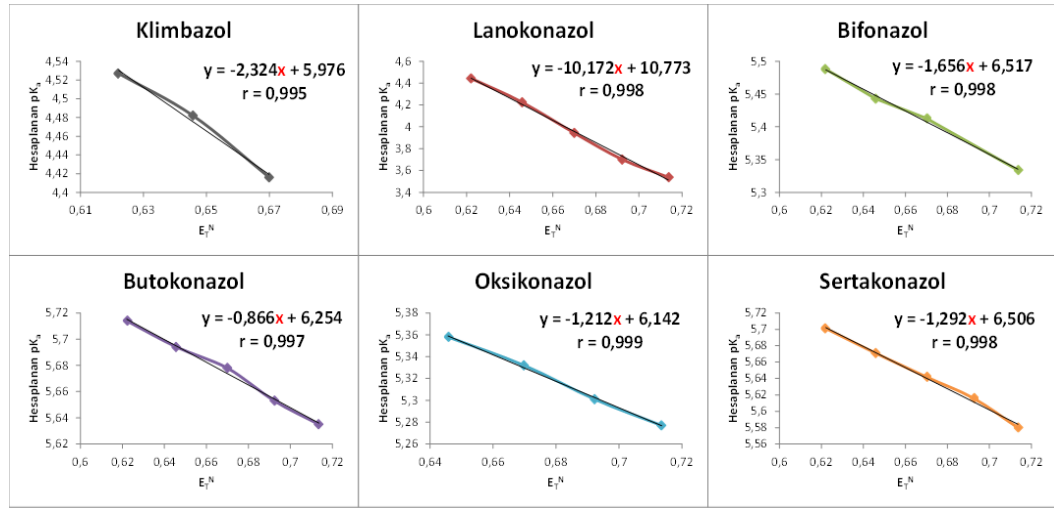
Bu yöntem ile bileşiklerin asetonitril-su ikili karışımlarında, asetonitrilin mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlarda hesaplanmış pK_a değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pK_a değerleri belirlenmiştir. Bileşikler için elde edilen grafikler Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. Bileşiklerin mol kesri-pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerlerinin belirlenmesine ait grafikler

4.4.2. Mobil faz solvatokromik parametresi (E_T^N) yöntemi

Bu yöntemde, bileşiklerin her bir asetonitril-su ikili karışımındaki solvatokromik çözücü parametresine (E_T^N) karşı, bu ortamlarda elde edilen pK_a değerleri grafiğe geçirilmiştir. Grafiklerden elde edilen bağıntılarda, solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değeri (0,46) konularak her bir bileşiğin su ortamındaki pK_a değeri hesaplanmıştır. Her bir bileşik için elde edilen grafikler Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. Bileşiklerin E_T^N - pK_a ilişkisi kullanılarak sudaki pK_a değerlerinin belirlenmesine ilişkin grafikler

4.4.3. Kamlet-Taft yöntemi

Çözünen tanımlayıcısı metodolojisi kullanılarak su-asetonitril ortamında hesaplanan pK_a değerleri ile bu ortamdaki Kamlet-Taft parametreleri (Çizelge 4.8) kullanılarak çoklu regresyonla aralarındaki ilişki belirlenmiştir. Kamlet-Taft solvatokromik parametreleriyle asetonitril-su karışımındaki pK_a değerleri arasındaki ilişkinin sadece asetonitril hidrojen bağı asitliği (α) değerine bağlı olduğu bulunmuştur. Çizelge 4.9'da verilen Kamlet-Taft eşitliklerindeki α 'nın yerine su ortamındaki sabit değerler konulduğunda suda çözünürlüğü az olan bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanabilmektedir.

Çizelge 4.8. Belirlenen asetonitril-su ortamlarındaki Kamlet-Taft parametre değerleri

%ACN (v/v)	α	β	π^*
%35	1,024	0,460	1,039
%40	0,997	0,458	1,030
%45	0,969	0,456	1,020
%50	0,939	0,453	1,009
%55	0,906	0,451	0,998

Çizelge 4.9. Bileşiklerin Kamlet-Taft- pK_a ilişkisi kullanılarak sudaki pK_a değerlerinin belirlenmesi

Bileşik	Eşitlik	pK_a
Klimbazol	-	-
Lanokonazol	$y=7,886\alpha-3,654$	5,572
Bifonazol	$y=1,277\alpha+4,176$	5,670
Butokonazol	$y=0,675\alpha+5,022$	5,812
Oksikonazol	$y=0,899\alpha+4,459$	5,513
Sertakonazol	$y=1,008\alpha+4,668$	5,847

4.5. Metot Optimizasyonu

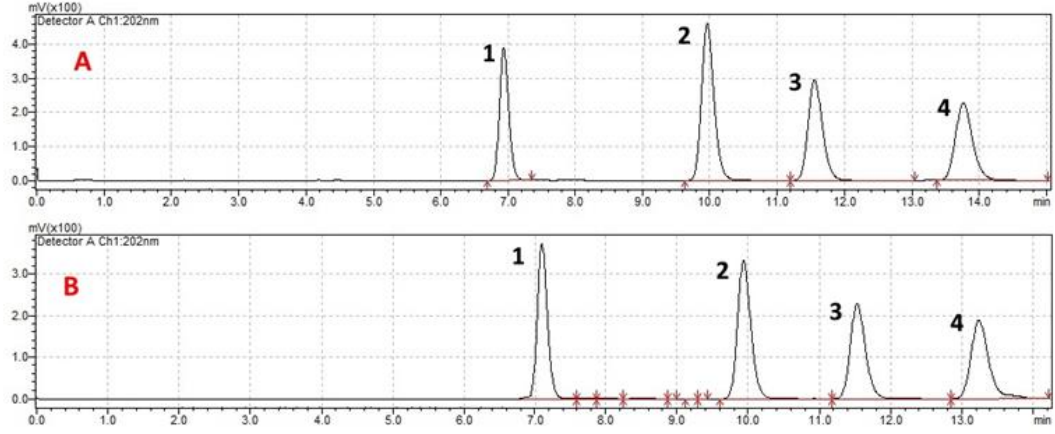
Bu tez çalışmasında geliştirilen kromatografik metotta bileşiklerin mümkün olan en kısa sürede analizi ve simetrik piklerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için bu özelliklerin sağlandığı optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Çalışılan bileşiklere ait optimum ayırma koşullarının belirlenmesinde bazı önemli kriterler dikkate alınmıştır. Bunlar; kapasite faktörü (k) değerlerinin 1'den büyük olması, seçicilik faktörünün (α) 1,15'ten büyük olması ve ayırma gücü (R_s) değerlerinin 1,5'tan büyük olmasıdır (%98). Çalışılan tüm asetonitril-su ikili karışımları içerisinde bu koşulları sağlayan koşul, mobil fazda asetonitril oranı %45 (v/v) ve pH'sı 7 olan asetonitril-su ikili karışımı olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı 25°C'de sabit tutulmuş ve akış hızı da dakikada 1 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirlenen bu optimum koşulda seçilen altı bileşiğin eş zamanlı tayini mümkün olmadığı için bileşikler iki gruba ayrılmıştır. Metot optimizasyonunda ve bileşiklerin kantitatif tayinlerinde iç standart yöntemi kullanılmıştır. Üçerli olarak oluşturulan iki grubun iç standartları yine çalışılan bileşikler arasından seçilmiştir. İki grup için belirlenen optimum koşula ait hesaplanan k , α ve R_s değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Her iki gruba da ait optimum ayırma koşulunu gösteren kromatogramlar ise Şekil 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Belirlenen optimum koşula ait değerler

1. Grup						
Bileşik	k	α	$(\alpha-1)/\alpha$	$k_2/(k_2+1)$	$1/4\sqrt{N}$	R_s
Klimbazol	1,331	-	-	-	-	-
Bifonazol (IS)	2,142	1,609	0,379	0,682	27,715	7,154
Oksikonazol	2,765	1,291	0,225	0,734	29,625	4,903
Butokonazol	3,236	1,170	0,146	0,764	29,814	3,316

Çizelge 4.10. Belirlenen optimum koşula ait değerler (Devam)

2. Grup						
Bileşik	k	α	$(\alpha-1)/\alpha$	$k_2/(k_2+1)$	$1/4\sqrt{N}$	R_s
Lanokonazol	1,268	-	-	-	-	-
Bifonazol	2,142	1,689	0,408	0,682	27,715	7,709
Oksikonazol (IS)	2,765	1,291	0,225	0,734	29,625	4,903
Sertakonazol	3,401	1,230	0,187	0,773	30,102	4,352



Şekil 4.17. Optimum ayırma koşulunda elde edilen kromatogramlar. A) 1-lanokonazol; 2-bifonazol; 3-oksikonazol(IS); 4-sertakonazol, B) 1-klimbazol; 2-bifonazol(IS); 3-oksikonazol; 4-butokonazol

4.6. Metot Validasyonu

Bu tez çalışmasında geliştirilen RPLC metodunun geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla metot validasyonu gerçekleştirilmiş ve ICH tarafından önerilen parametreler test edilerek metodun performansı ve güvenilirliği değerlendirilmiştir. Geliştirilen metot; doğrusalılık, duyarlılık, seçicilik, doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve kararlılık parametreleri kullanılarak valide edilmiştir. Tüm bu parametrelere ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.6.1. Sistem uygunluk verileri

Sistem uygunluk testleri (SST), gaz ve sıvı kromatografik yöntemlerin ayrılmaz bir parçasıdır. Bazı kromatografik parametreler için belirlenen SST limitleri yapılan çalışmanın sağlık test sonuçlarının da temelini oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında da belirlenen optimum koşulda yapılan sistem uygunluk testleri Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Sistem uygunluk değerlendirme çalışmaları

Parametre	KBZ	IS	OKSİ	BUT	Önerilen değerler
t_R	7,224	10,18	11,796	13,578	-
Kuyruklanma Faktörü	1,208	1,218	1,211	1,236	≤ 2
k	1,419	2,405	2,955	3,554	≥ 1
R_s	-	8,301	4,113	3,905	≥ 2
Etkin tabaka sayısı	11624	13140	13990	14102	> 2000
α	-	1,695	1,229	1,203	> 1
%RSD (t_R)	0,275	0,097	0,134	0,085	≤ 1
%RSD (alan)	0,651	0,871	0,448	0,889	≤ 1
Parametre	LAN	BİF	IS	SER	Önerilen değerler
t_R	7,192	10,544	12,273	14,693	-
Kuyruklanma Faktörü	1,247	1,224	1,321	1,224	≤ 2
k	1,399	2,516	3,094	3,9	≥ 1
R_s	-	9,249	4,073	4,945	≥ 2
Etkin tabaka sayısı	11533	13556	13339	14424	> 2000
α	-	1,799	1,229	1,261	> 1
%RSD (t_R)	0,061	0,066	0,045	0,041	≤ 1
%RSD (alan)	0,803	0,771	0,728	0,763	≤ 1

4.6.2. Kalibrasyon ve duyarlılık

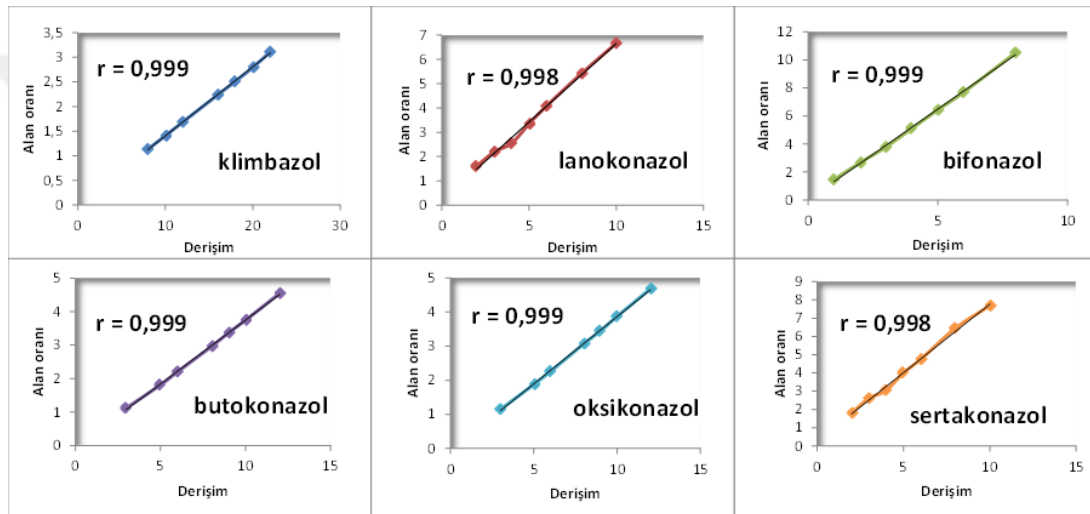
Bileşiklerin doğrusal oldukları derişim aralığının saptanması amacıyla her bir bileşik için 50 µg/mL'lik stok çözeltiler hazırlanmıştır. Sonrasında bu stok çözeltiler kullanılarak yedi farklı derişimde çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusunun oluşturulmasında iki grup için de belirlenen iç standartlar kullanılmış ve iç standart yöntemine göre değerlendirme yapılmıştır. Bunun için kalibrasyon doğrusu, bileşiklerin her bir derişim değerine karşı elde edilen pik alanının iç standardın pik alanına oranına karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Ayrıca yöntemin seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla her bir bileşik için dedeksiyon limiti (LOD) ve kantitatif yorum sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.12'de kalibrasyon fonksiyonları, bileşiklerin doğrusal olduğu aralıklar, LOD ve LOQ değerleri verilmiştir. Bileşiklere ait kalibrasyon grafikleri ise Şekil 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Bileşiklere ait kalibrasyon fonksiyonları, doğrusal aralıklar, LOD ve LOQ verileri

Bileşik	Kalibrasyon Fonksiyonu	Doğrusal Aralık (µg/mL)	SD	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
KBZ	$y = 0,140 (0,001)^a x + 0,003 (0,003)^b$	8-22	0,015	0,343	1,038
LAN	$y = 0,646 (0,018)x + 0,193 (0,110)$	2-10	0,127	0,647	1,961
BİF	$y = 1,291 (0,021)x + 0,039 (0,097)$	1-8	0,122	0,312	0,945
BUT	$y = 0,382 (0,004)x - 0,072 (0,032)$	3-12	0,030	0,259	0,786
OKSİ	$y = 0,394 (0,004)x - 0,075 (0,031)$	3-12	0,029	0,248	0,752
SER	$y = 0,751 (0,020)x + 0,262 (0,121)$	2-10	0,139	0,609	1,847

a: eğimin standart sapması

b: kesimin standart sapması



Şekil 4.18. Bileşiklere ait kalibrasyon grafikleri

4.6.3. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları

Gerçekleştirilen validasyon çalışmasında metodun kesinliğinin belirlenebilmesi amacıyla gün içi ve günler arası çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Gün içi (Gi) ve günler arası (GA) çalışmalar her bileşik için iki farklı derişimde gerçekleştirilmiştir. Gün içi çalışmalar aynı gün içinde, günler arası çalışmalar üçüncü günün sonunda standart çözeltilerin bekletilmesiyle yapılmıştır.

Çizelge 4.12. Bileşiklere ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları

Bileşik	Derişim (µg/mL)	Gi derişim ortalaması (µg/mL)	%RSD	GA derişim ortalaması (µg/mL)	%RSD
KBZ	10	9,964	0,122	9,972	0,408
	20	19,966	0,423	19,861	0,574
LAN	3	3,151	0,683	3,307	0,838
	8	8,162	0,747	9,123	0,945
BiF	2	2,051	0,527	2,139	0,839
	6	5,824	0,778	6,231	0,948
BUT	5	4,931	0,485	4,974	0,977
	10	9,989	0,220	9,833	0,329
OKSi	5	4,984	0,374	5,117	0,555
	10	10,024	0,254	9,974	0,284
SER	3	3,117	0,616	3,314	0,795
	8	8,371	0,631	8,270	0,722

4.6.4. Geri kazanım çalışmaları

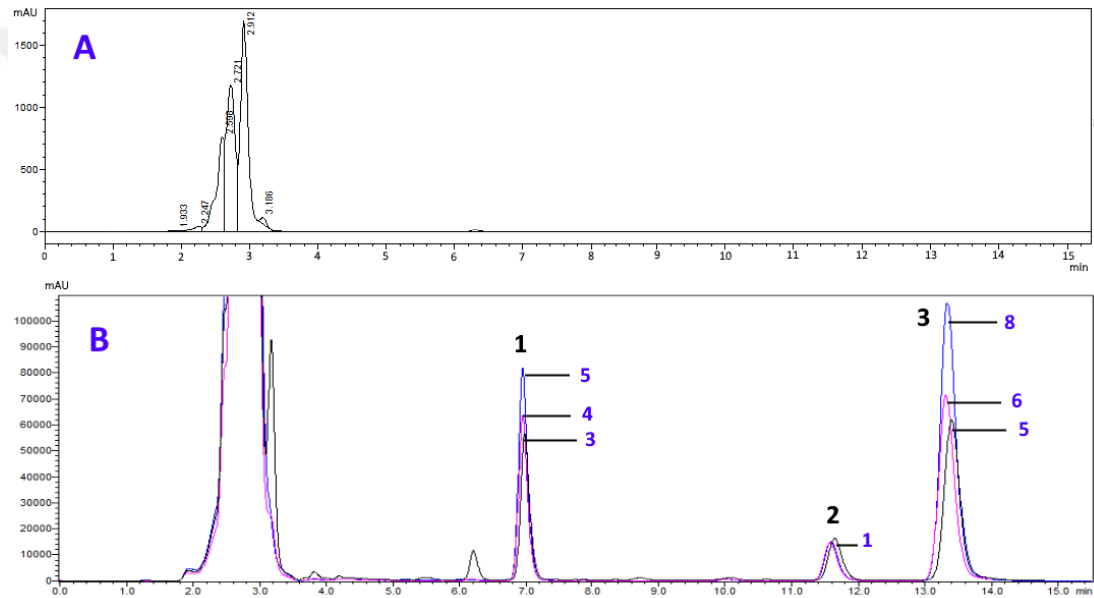
Yapılan çalışmada geliştirilen metodun doğruluğunu belirtmek için geri kazanım çalışması yapılmaktadır. Bileşikler için geri kazanım deneyleri piyasadaki formülasyonlarda ve insan idrarına katkılandırmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Lanokonazol ve butokonazolün ilaç formülasyonları ülkemizde temin edilemediğinden bu iki ilacın geri kazanım çalışmaları insan idrarında gerçekleştirilmiştir. Diğer dört bileşik için geri kazanım deneyleri krem ve şampuan formülasyonlarında gerçekleştirilmiş ve preparatların içerdiği etken madde yüzdeleri ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. İnsan idrarında lanokonazol ve butokonazolün analizi için bu bileşiklerin üç farklı derişimde (µg/mL) hazırlanmış çözeltileri idrar numunelerine katkılandırılmıştır. Numune ortamından (idrar) bu bileşiklerin geri kazanım değerleri Çizelge 4.13'te verilmiştir. Analizi yapılan bileşikleri içermeyen ve bileşiklerin farklı derişimlerde katkılandırılmasıyla elde edilen idrar kromatogramları, Şekil 4.19'da verilmiştir. İdrar gibi bozucu etkilerin çok fazla bulunduğu krem ve şampuan formülasyonlarının içerdiği etken madde yüzdeleri ve geri kazanım değerleri Çizelge 4.14'te verilmiştir. Çeşitli numunelerde yapılan geri kazanım çalışmalarına ait katkılandırılmamış ve belirli derişimlerde

katkılandırılmış kromatogramlar ise klmbazol için Şekil 4.20’da, bifonazol için Şekil 4.21’de, oksikonazol için Şekil 4.22’de, sertakonazol için Şekil 4.23’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Lanokonazol ve butokonazol için idrarda gerçekleştirilen geri kazanım sonuçları

	Lanokonazol			Butokonazol		
		%Geri kazanım $\pm$ G.S*	%RSD		%Geri kazanım $\pm$ G.S*	%RSD
Katkılandırılmış Derişim(μ g/mL)	3	99,317 $\pm$ 0,836	0,677	5	99,161 $\pm$ 0,859	0,697
	4	98,702 $\pm$ 0,343	0,380	6	100,253 $\pm$ 1,010	0,810
	5	99,129 $\pm$ 0,357	0,390	8	98,864 $\pm$ 0,940	0,765

*Güven sınırı

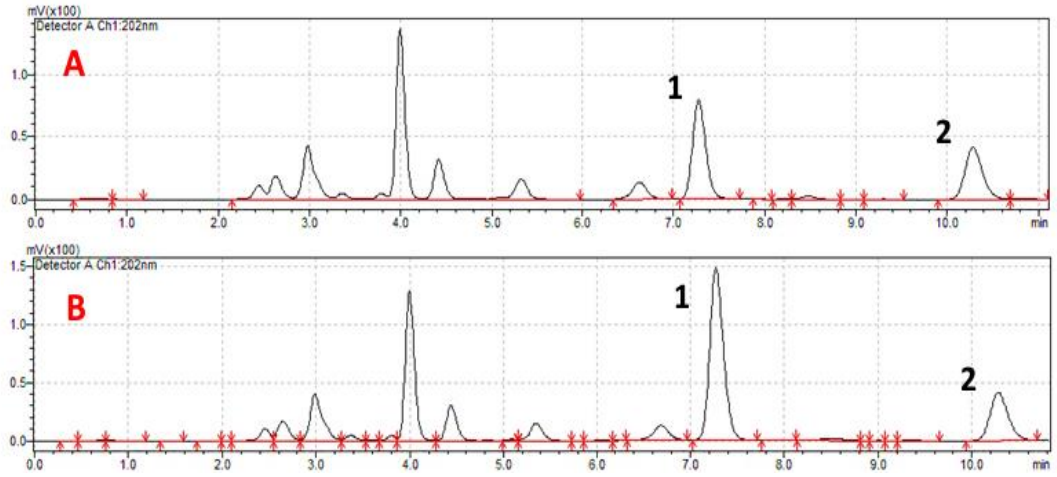


Şekil 4.19. A) Katkılandırılmamış idrar numunesi kromatogramı. B) Bileşiklerin üç farklı derişimde (μ g/mL) katkılandırılmasıyla elde edilmiş numune kromatogram, 1-lanokonazol; 2-oksikonazol(IS); 3-butokonazol

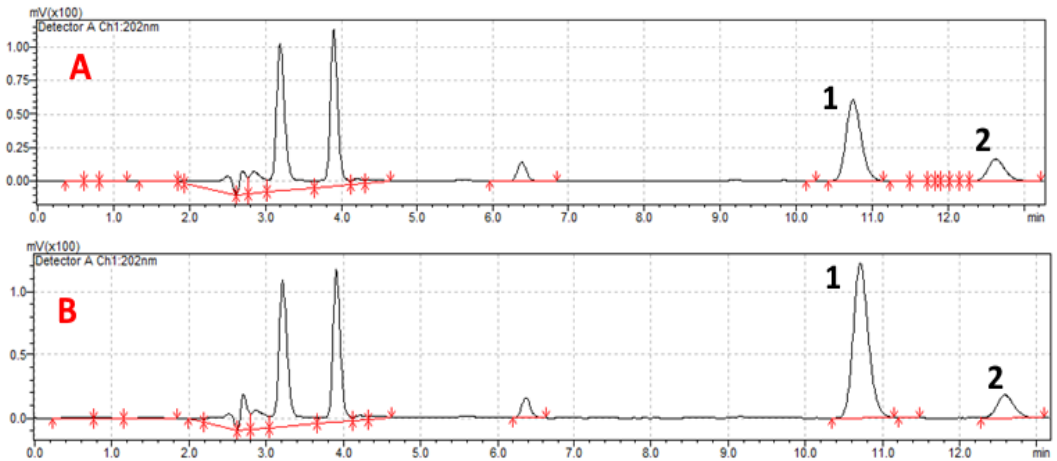
Çizelge 4.14. Şampuan ve krem formülasyonlarının içerdikleri etken madde yüzdesi ve geri kazanım sonuçları

Bileşik	Ürün	Bulunan etken madde yüzdesi	%Geri Kazanım $\pm$ G.S*	%RSD	%Hata
OKSİ	Oceral® %1	%0,971	%97,621 $\pm$ 0,875	0,855	2,854
SER	Zalain® %2	%2,050	%102,936 $\pm$ 1,872	1,463	-2,514
BİF	Mycospor® %1	%0,967	%97,762 $\pm$ 2,102	1,729	3,334
KBZ	Seboder® %1	%0,969	%97,543 $\pm$ 1,635	1,348	3,088

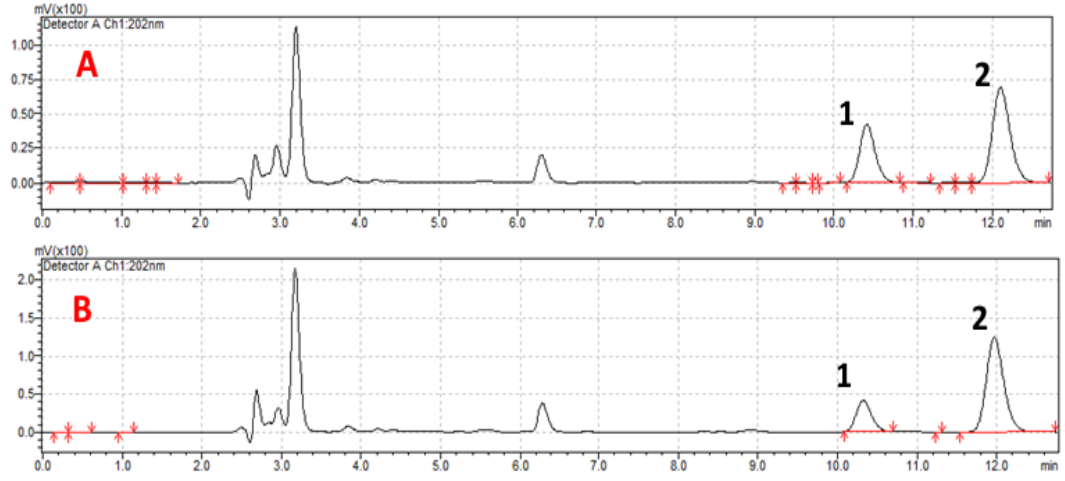
*Güven sınırı



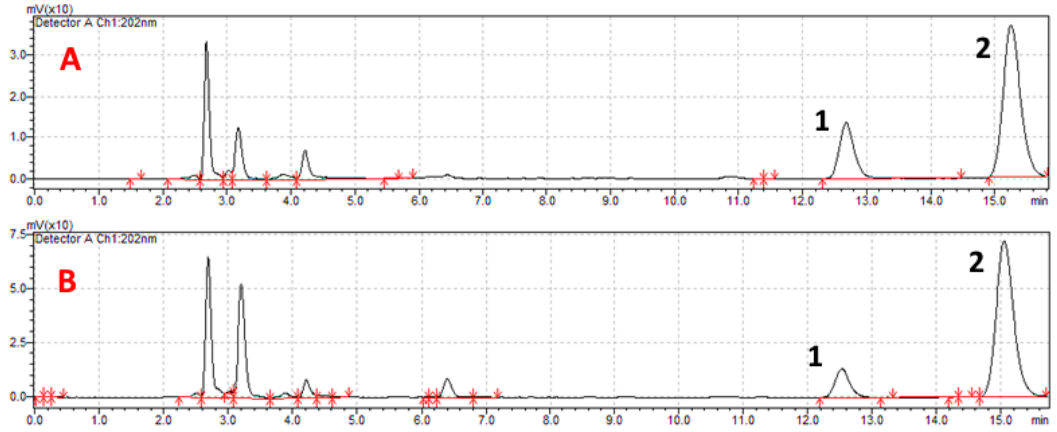
Şekil 4.20. Klimbazol içeren Seboderm® %1 şampuanda gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız şampuan numune kromatogramı, 1-klimbazol (10 µg/mL); 2-bifonazol(IS) (2 µg/mL). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-klimbazol (20 µg/mL); 2-bifonazol(IS) (2 µg/mL)



Şekil 4.21. Bifonazol içeren Mycospor® %1 kremde gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız krem numune kromatogramı, 1-bifonazol (3 µg/mL); 2-oksikonazol(IS) (1 µg/mL). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-bifonazol (6 µg/mL); 2-oksikonazol(IS) (1 µg/mL)



Şekil 4.22. Oksikonazol içeren Oceral® %1 kremde gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız krem numune kromatogramı, 1-bifonazol(IS) (2 µg/mL); 2-oksikonazol (5 µg/mL). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-bifonazol(IS) (2 µg/mL); 2-oksikonazol (10 µg/mL)



Şekil 4.23. Sertakonazol içeren Zalain® %2 kremde gerçekleştirilen analize ait kromatogramlar. A) Katkısız krem numune kromatogramı, 1-oksikonazol(IS) (1 µg/mL); 2-sertakonazol (4 µg/mL). B) Katkılandırılmış numune kromatogramı, 1-oksikonazol(IS) (1 µg/mL); 2-sertakonazol (8 µg/mL)

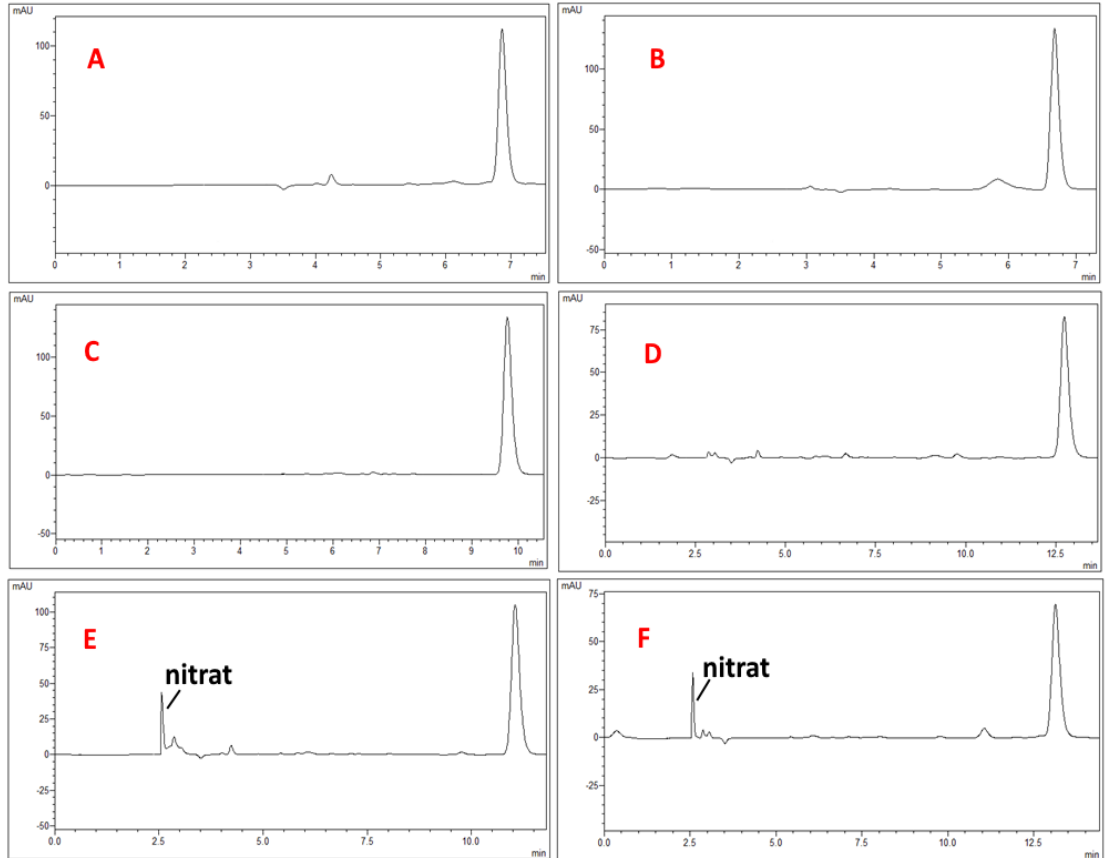
4.6.5. Bozunma ürünlerinin belirlenmesi

Bileşiklerin bozunma ürünlerinin belirlenebilmesi için bileşiklere stres testleri (zorlanmış bozunma) uygulanmıştır. Stres testlerinde ICH tarafından önerilen ılıman koşullar uygulanmış ve bu koşullar Çizelge 4.15'te verilmiştir. Metodun spesifikliği DAD dedektör kullanılarak tayin edilen pik saflıkları ile belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. Tez çalışmasında uygulanan stres koşulları

Bozunma Türü	Deneysel Koşullar	Sıcaklık	Süre
Hidroliz	0,1 M HCl	Oda sıcaklığı	2, 12, 24, 48 saat
	0,1 M NaOH	Oda sıcaklığı	2, 12, 24, 48 saat
Oksidasyon	%3 (v/v) H ₂ O ₂	Oda sıcaklığı	3, 12, 24, 48 saat
Fotolitik	UV ışık 365 nm	Oda sıcaklığı	3 saat
Termal	Etüv	60°C	2 saat
	Etüv	80°C	2 saat

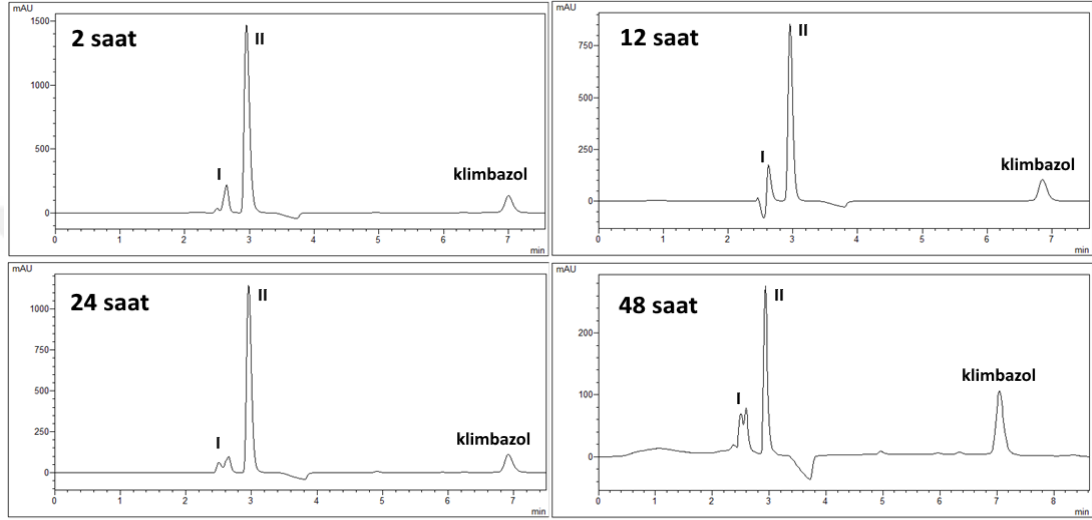
Bileşiklere stres testleri uygulanmadan önce bileşikler daha önce kalibrasyonda belirlenen derişimlere seyreltilmiş ve bütün bozunma süreci boyunca derişimleri sabit tutulmuştur. Bu derişimler; bifonazol için 6 µg/mL, klmbazol için 12 µg/mL, lanokonazol, butokonazol, oksikonazol ve sertakonazol için ise 8 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin başlangıçta herhangi bir bozunmaya maruz bırakılmamış çözeltilerine ait kromatogramlar Şekil 4.23'te verilmiştir.



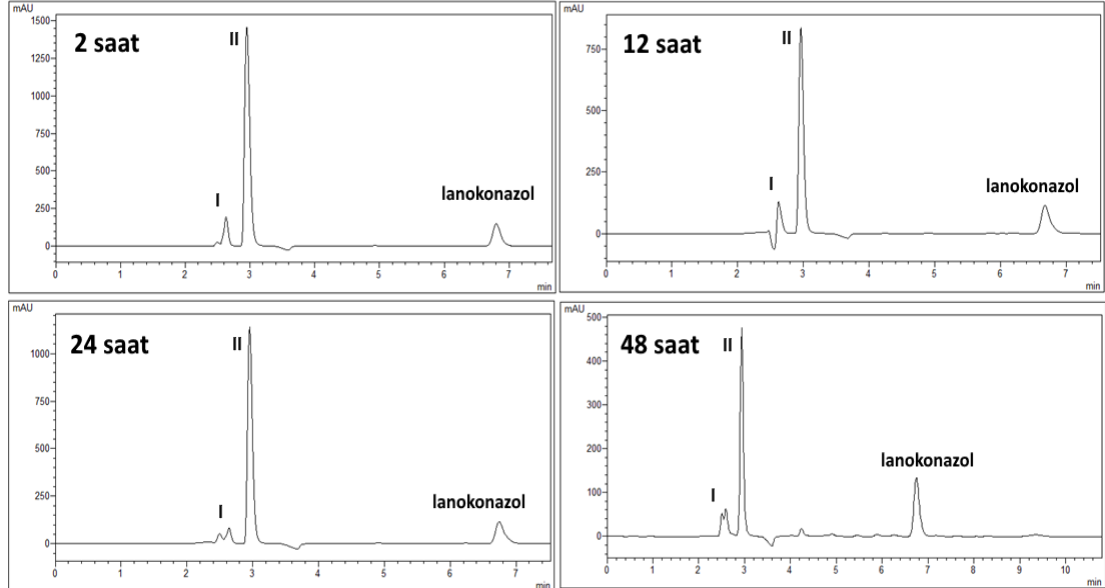
Şekil 4.24. Bileşiklerin herhangi bir bozunmaya maruz bırakılmamış çözeltilerine ait kromatogramlar. A) klmbazol, B) lanokonazol, C) bifonazol, D) butokonazol, E) oksikonazol, F) sertakonazol

4.6.5.1. Asit hidrolizi

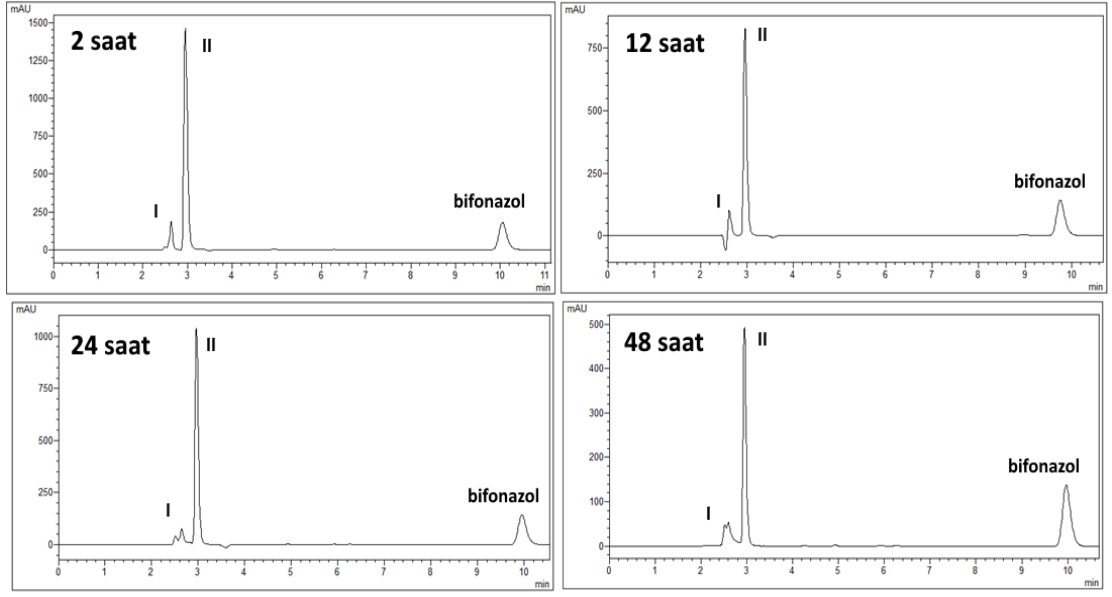
Çalışılan bileşikler 2, 12, 24 ve 48 saat boyunca oda sıcaklığında 0,1 M HCl'ye maruz bırakılmıştır. Her bir bileşik ve karakterize edilemeyen bozunma ürünlerine ait kromatogramlar, klimbazol için Şekil 4.25'te, lanokonazol için Şekil 4.26'da, bifonazol için 4.27'de, butokonazol için 4.28'de, oksikonazol için 4.29'de ve sertakonazol için 4.30'da verilmiştir.



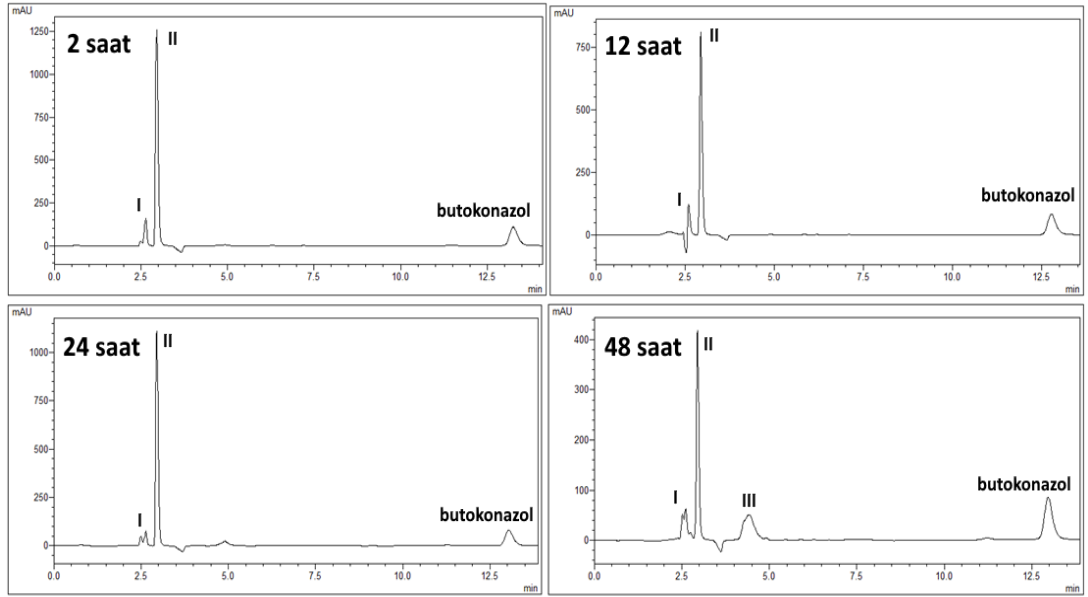
Şekil 4.25. Asidik ortama maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları



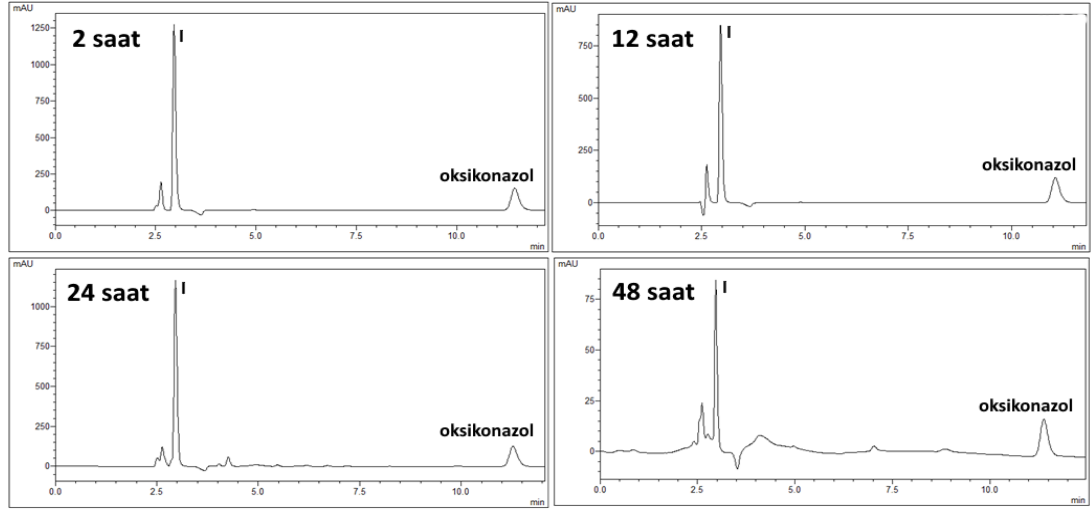
Şekil 4.26. Asidik ortama maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları



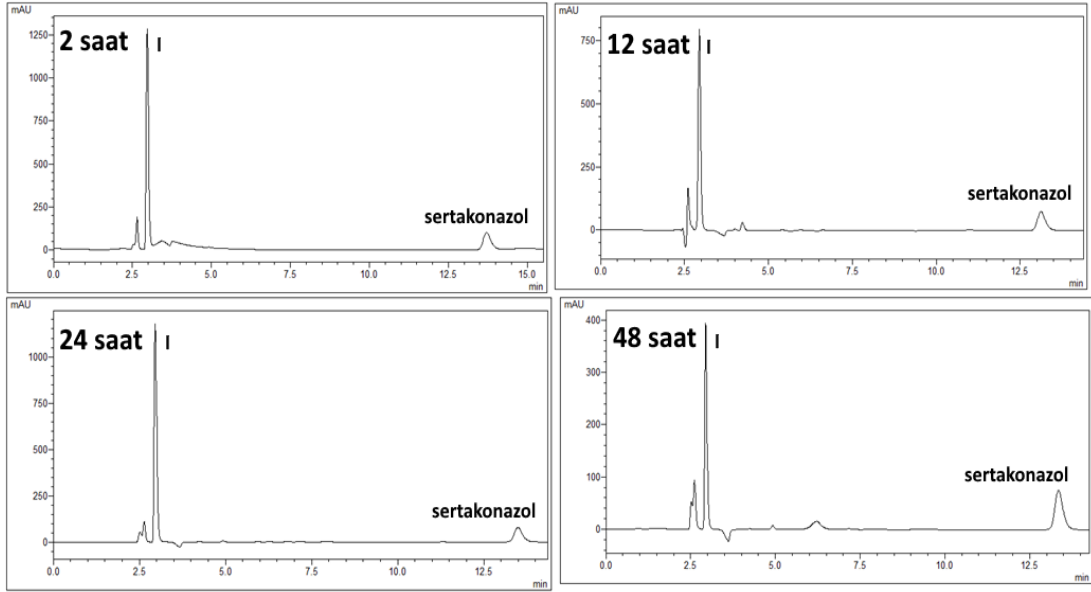
Şekil 4.27. Asidik ortama maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.28. Asidik ortama maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.29. Asidik ortama maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları

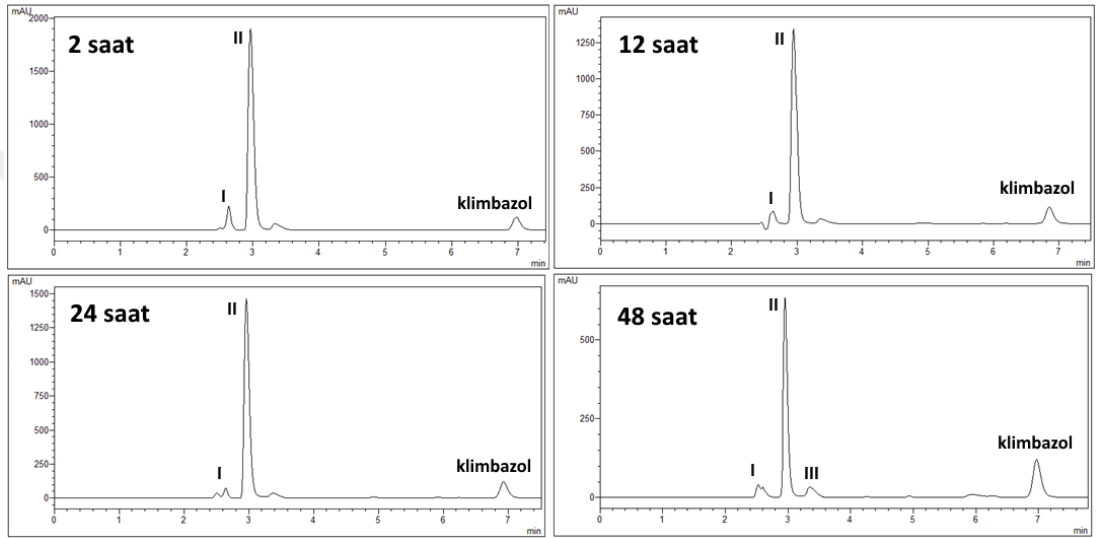


Şekil 4.30. Asidik ortama maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları

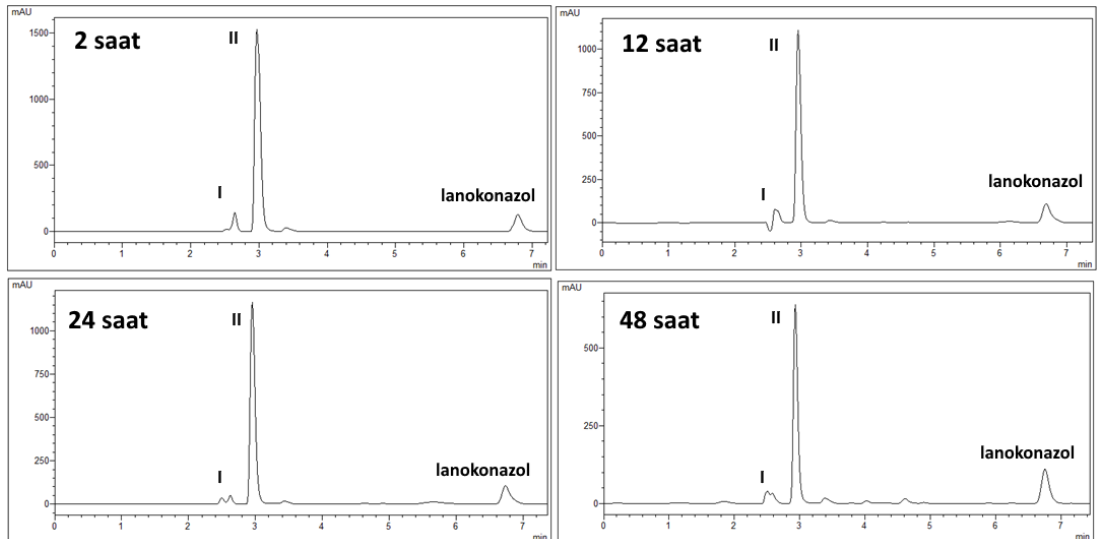
Oluşan bozunma ürünleri çalışılan bileşiklere göre daha polar oldukları için doğru kolon seçimiyle çalışılan bileşiklerden ayrılmışlardır. II numaralı pik bu koşulda çalışılan bütün bileşiklerin ana bozunma ürünüdür.

4.6.5.2. Baz hidrolizi

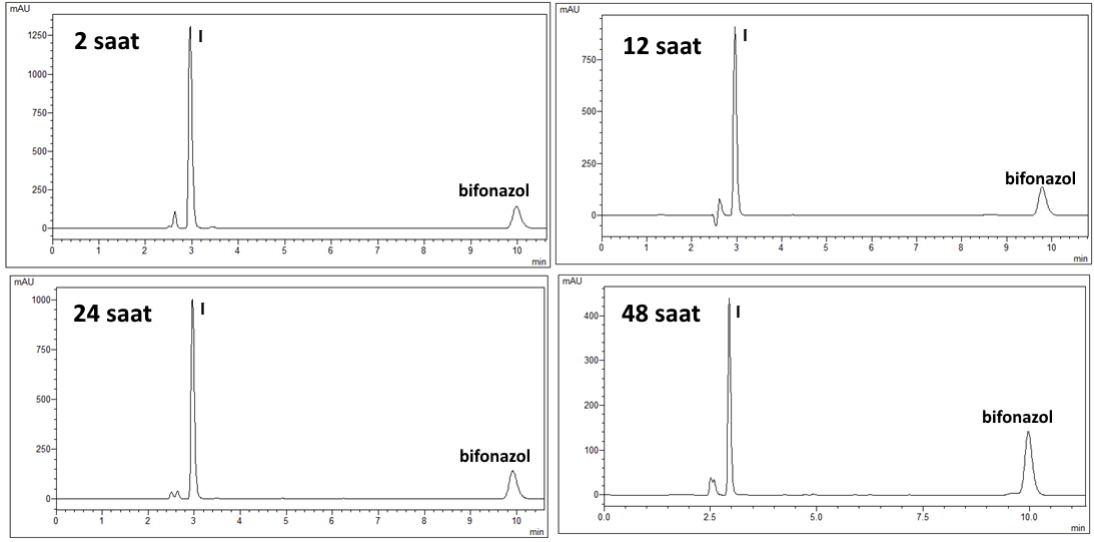
Bileşikler 2, 12, 24 ve 48 saat boyunca oda sıcaklığında 0,1 M NaOH'e maruz bırakılmıştır. Sonuçta her koşulda bileşikler ve bozunma ürünleri elde edilmiştir. Klimbazole ait kromatogramlar Şekil 4.31'de, lanokonazole ait kromatogramlar Şekil 4.32'de, bifonazole ait kromatogramlar Şekil 4.33'te, butokonazole ait kromatogramlar Şekil 4.34'te, oksikonazole ait kromatogramlar Şekil 4.35'te ve sertakonazole ait kromatogramlar Şekil 4.36'da verilmiştir.



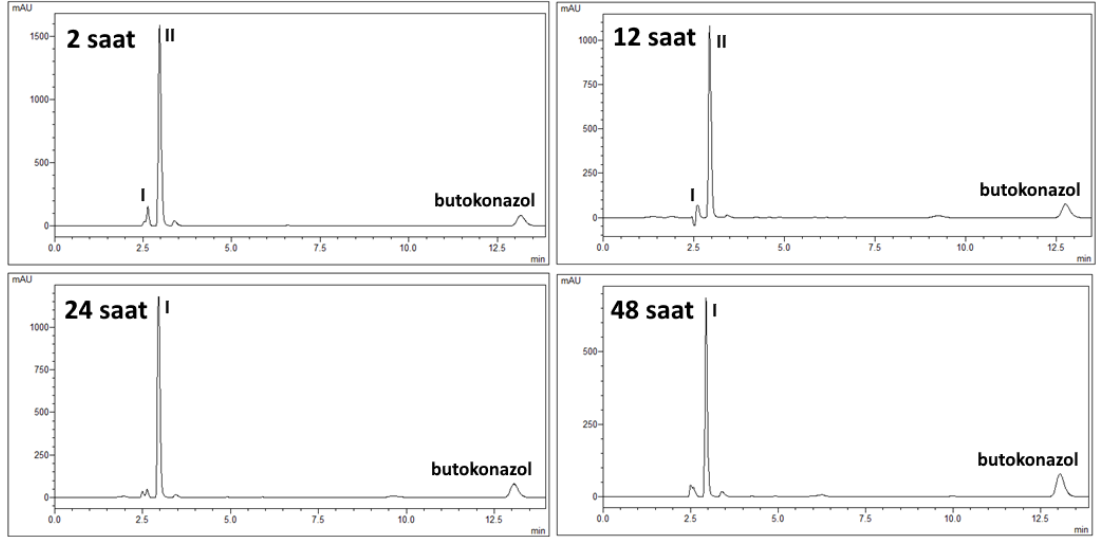
Şekil 4.31. Bazik ortama maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları



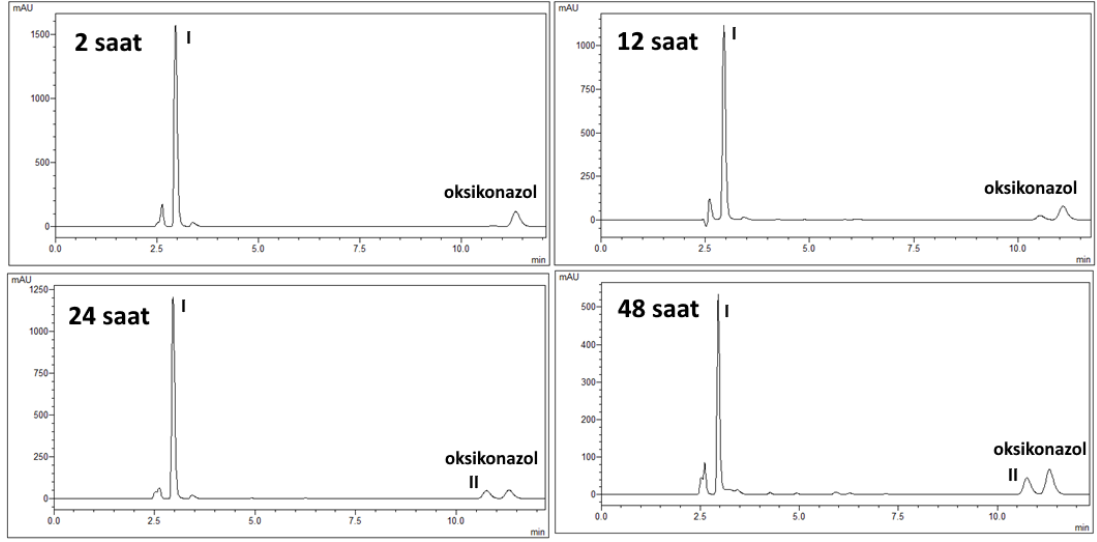
Şekil 4.32. Bazik ortama maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları



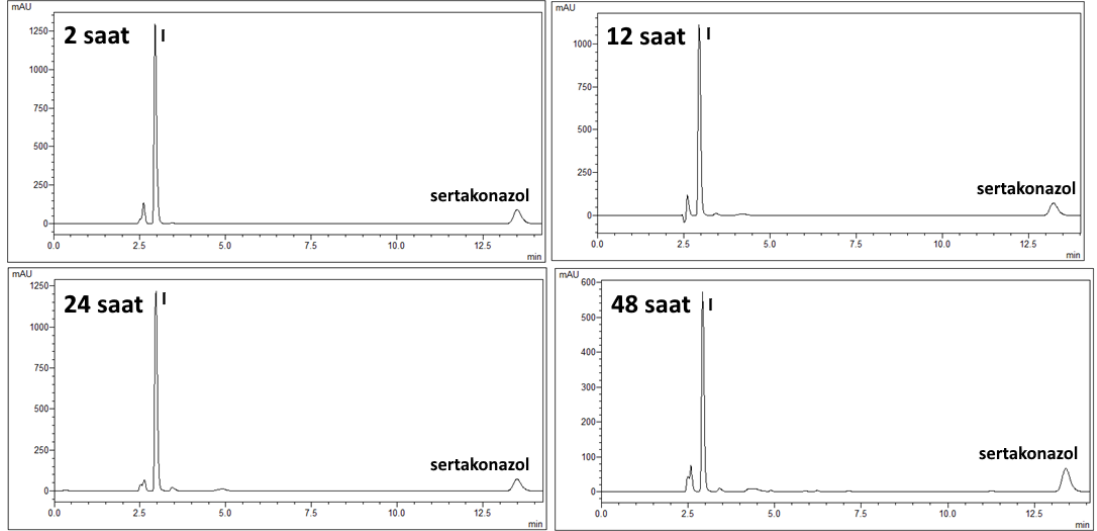
Şekil 4.33. Bazik ortama maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.34. Bazik ortama maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.35. Bazik ortama maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları

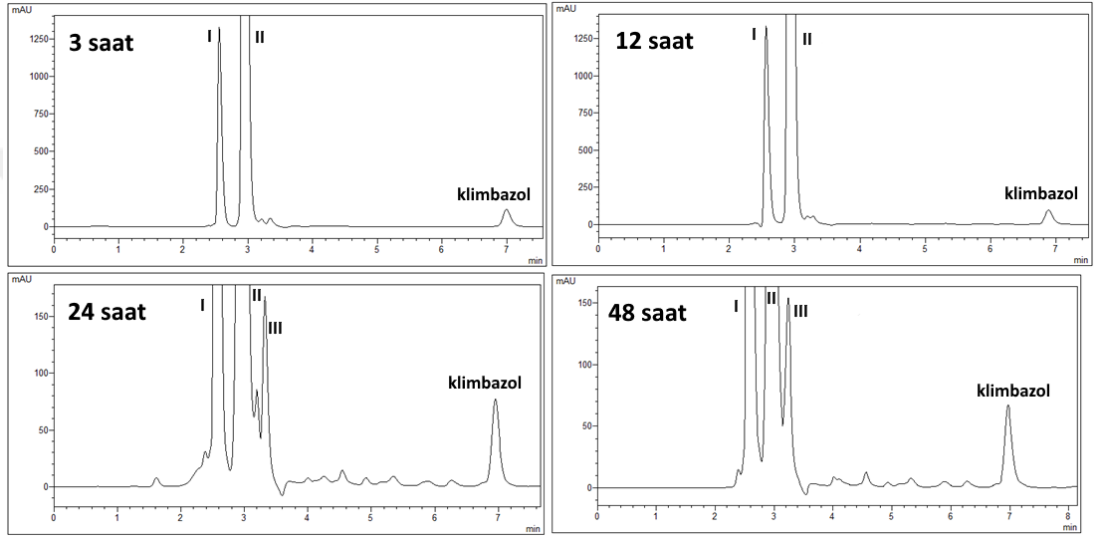


Şekil 4.36. Bazik ortama maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları

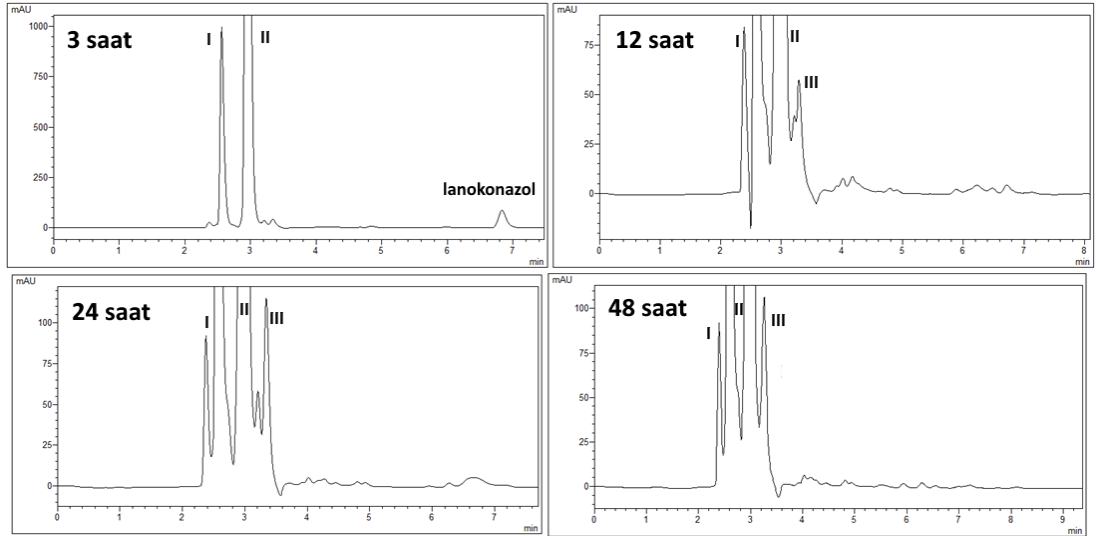
Kromatogramlarda görüldüğü üzere, bileşikler stres koşulları altında oluşan bozunma ürünlerinden ayrılmıştır fakat karakterize edilememiştir. Bu koşulda oluşan II numaralı pik ana bozunma ürünüdür. Ayrıca yöntemin spesifikliğı için pik saflıkları DAD dedektör yardımıyla belirlenmiştir.

4.6.5.3. Oksidatif bozunma

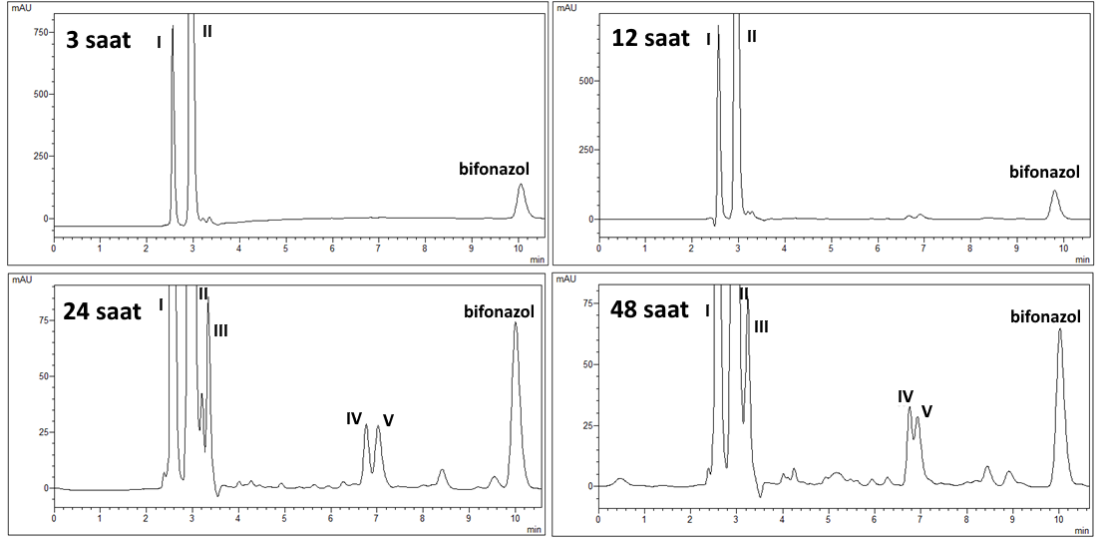
Çalışılan ilaç bileşiklerinde en fazla bozunma oksidatif koşullarda elde edilmiştir. Bu çalışma ilaçların 3, 12, 24 ve 48 saatte, oda sıcaklığında %3 (v/v)'lük H₂O₂'ye maruz bırakılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu koşulda elde edilmiş bozunma kromatogramları, klimbazol için Şekil 4.37'de, lanokonazol için 4.38'de, bifonazol için 4.39'da, butokonazol için 4.40'da, oksikonazol için 4.41'de ve sertakonazol için 4.42'de verilmiştir.



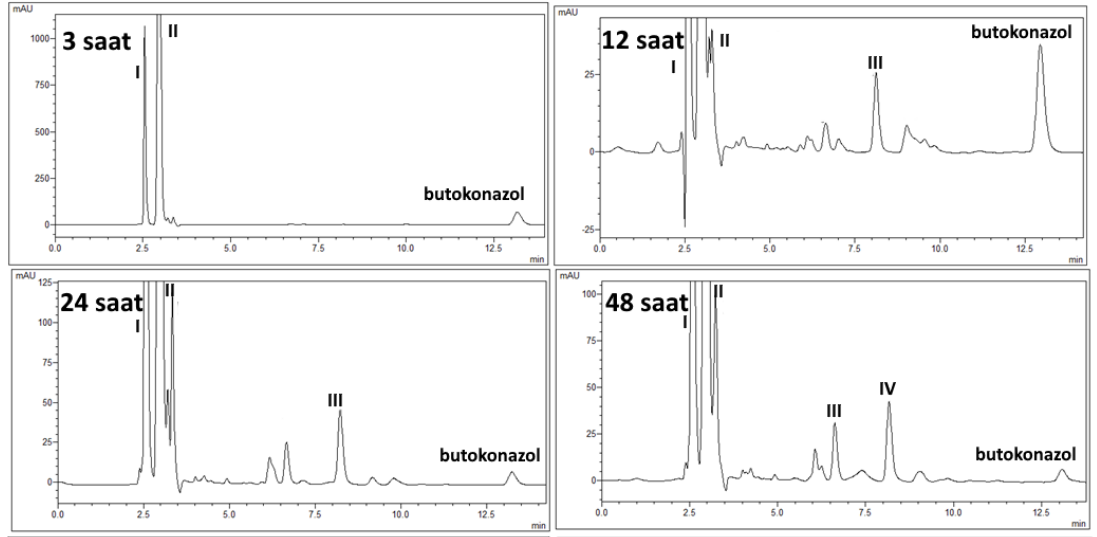
Şekil 4.37. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları



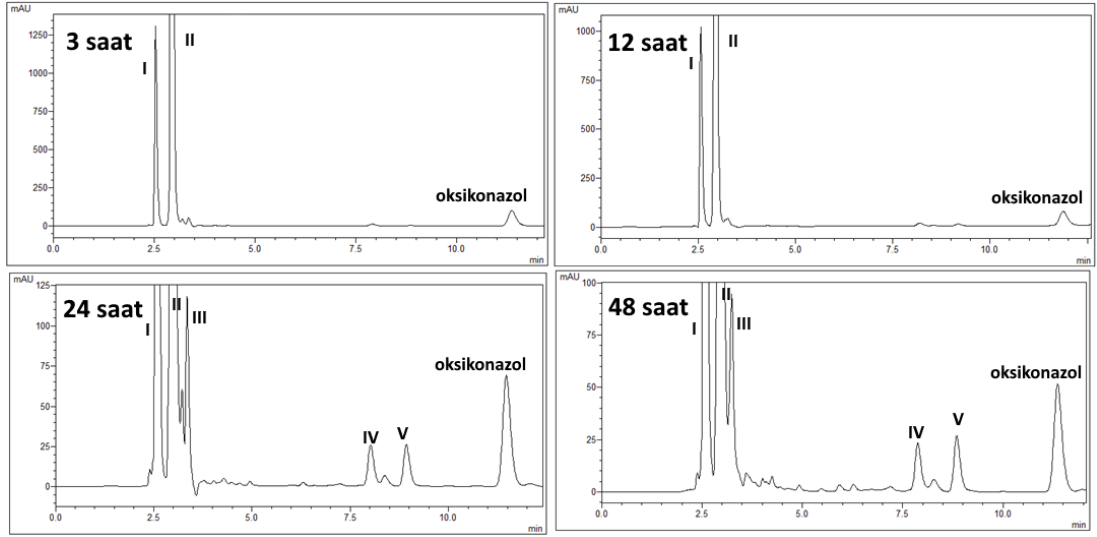
Şekil 4.38. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları



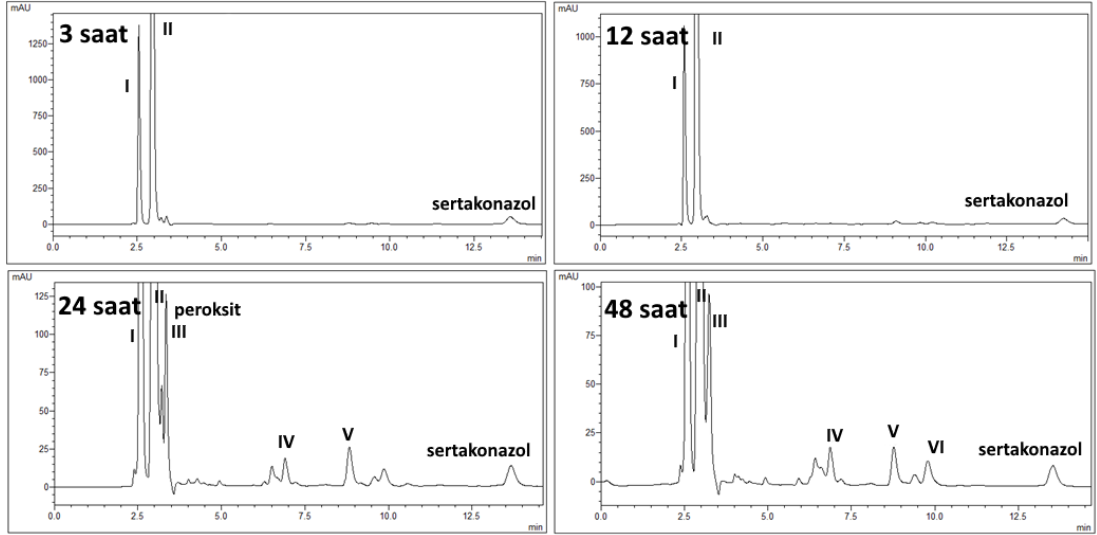
Şekil 4.39. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.40. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.41. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları

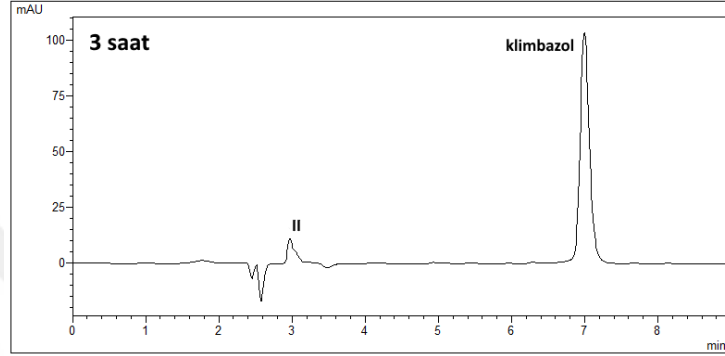


Şekil 4.42. %3 (v/v)'lük peroksit ortamında maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları

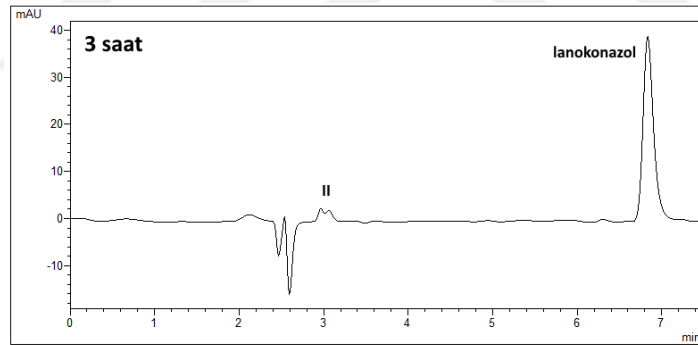
Çalışılan bileşikler, farklı sürelerde elde edilen kromatogramlardan görüldüğü üzere bozunma ürünlerinden ayrılmışlardır. Bu koşulda oluşan II numaralı pik ana bozunma ürünüdür. Bileşikler ve bozunma ürünlerinin pik saflıkları ise DAD dedektör yardımıyla belirlenmiştir.

4.6.5.4. Fotolitik bozunma

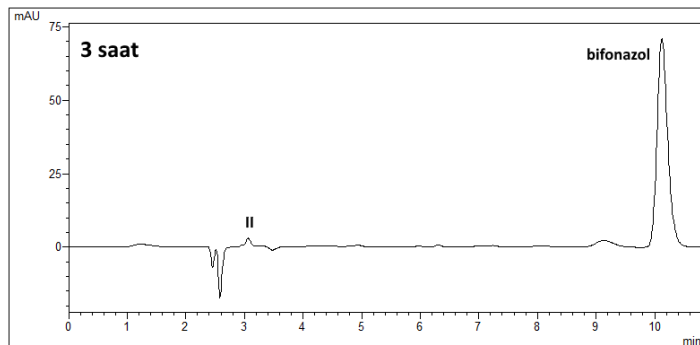
Bileşiklerin saf katısı oda sıcaklığında 3 saat boyunca 365 nm UV ışığa maruz bırakılmıştır. Bu koşulda elde edilen bozunma kromatogramları, klimbazol için Şekil 4.43'te, lanokonazol için Şekil 4.44'te, bifonazol için Şekil 4.45'te, butokonazol için Şekil 4.46'da, oksikonazol için Şekil 4.47'de ve sertakonazol için Şekil 4.48'de verilmiştir.



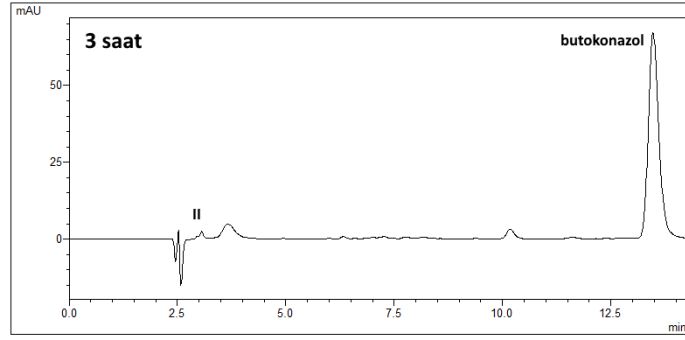
Şekil 4.43. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramı



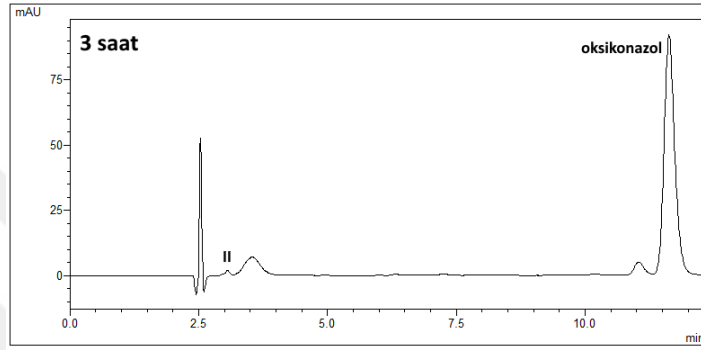
Şekil 4.44. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramı



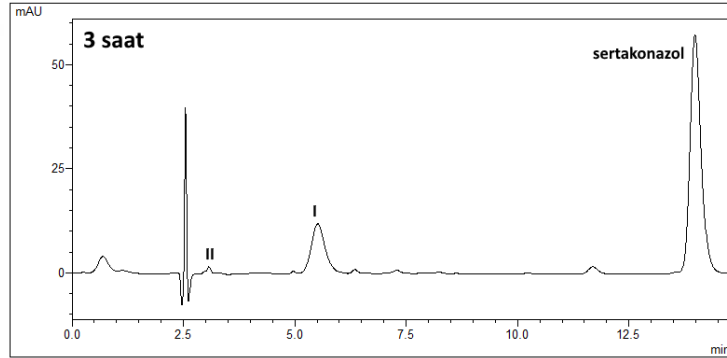
Şekil 4.45. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramı



Şekil 4.46. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramı



Şekil 4.47. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramı

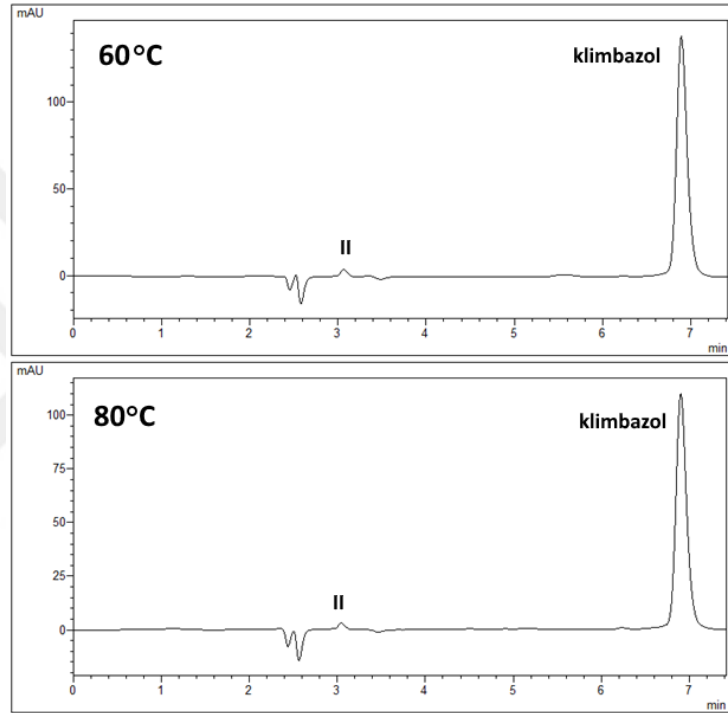


Şekil 4.48. Fotolitik bozunmaya maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramı

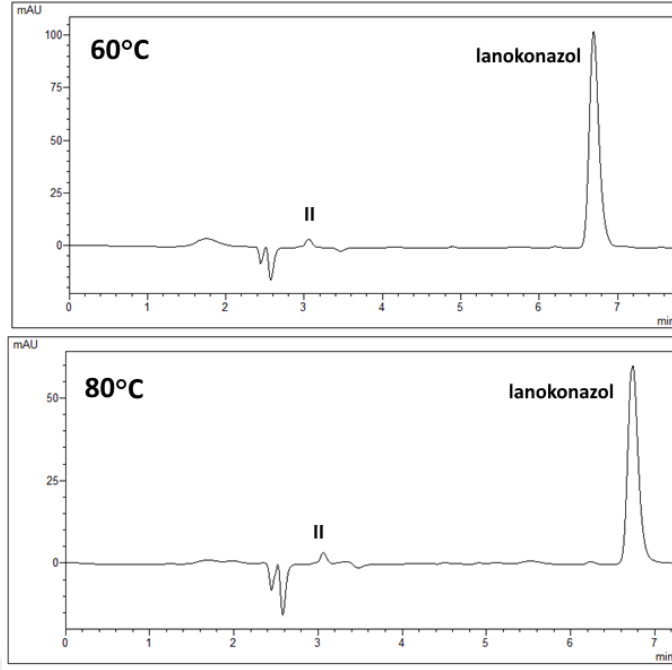
Bu bozunma koşulunda gözleendiği üzere II numaralı ana bozunma pikinin alanı küçüktür. Bu koşulda bütün bileşikler için önemli derecede bir bozunma gözlemlenmemiştir. Bileşiklerin ve bozunma ürünlerinin pik saflıkları DAD dedektör yardımıyla belirlenmiştir.

4.6.5.5. Termal bozunma

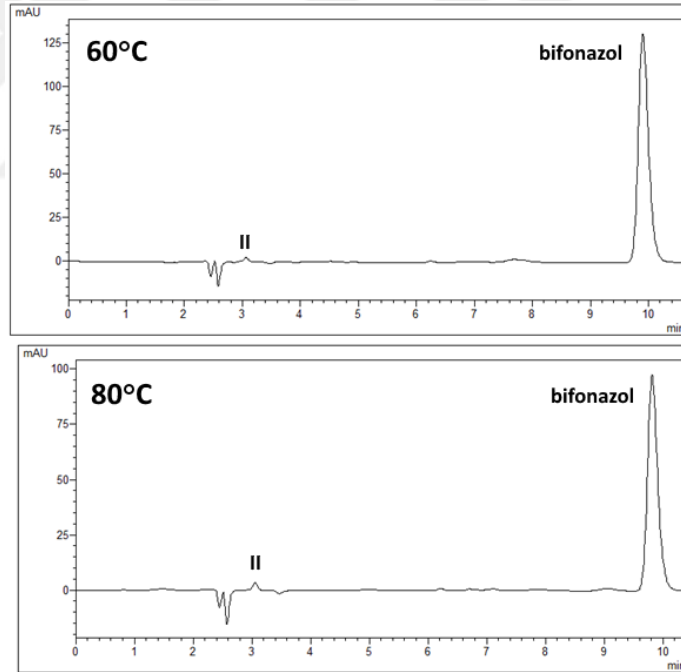
Saf katı bileşikler 2 saat boyunca etüvde 60°C ve 80°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Bu koşullarda bütün bileşikler için önemli bir bozunma gözlemlenmemiştir. II numaralı degradasyon ürününün alanı çok küçüktür. Bu koşulda elde edilen bozunma kromatogramları klimbazol için Şekil 4.49'da, lanokonazol için Şekil 4.50'de, bifonazol için Şekil 4.51'de, butokonazol için Şekil 4.52'de, oksikonazol için Şekil 4.53'te ve sertakonazol için Şekil 4.54'te verilmiştir.



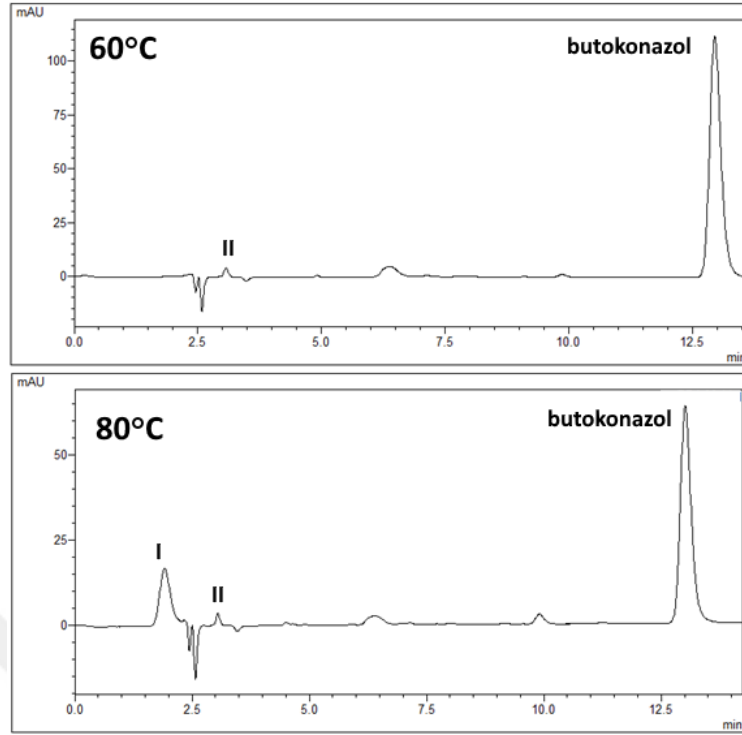
Şekil 4.49. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış klimbazole ait bozunma kromatogramları



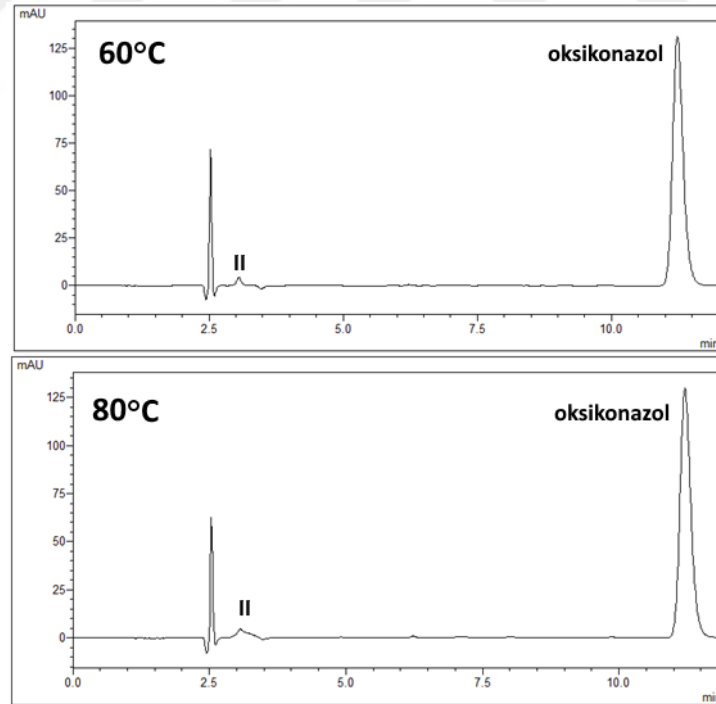
Şekil 4.50. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış lanokonazole ait bozunma kromatogramları



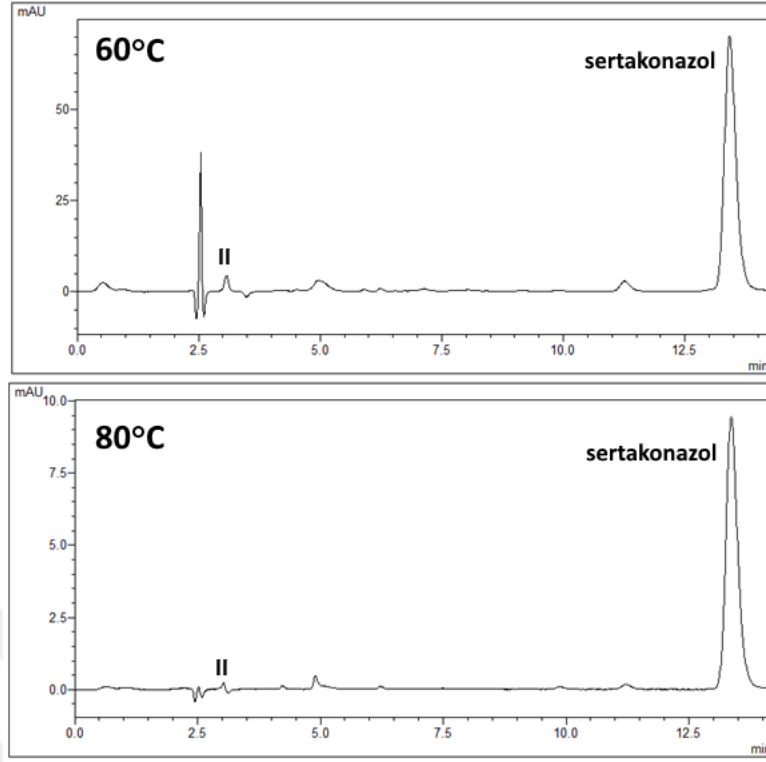
Şekil 4.51. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış bifonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.52. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış butokonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.53. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış oksikonazole ait bozunma kromatogramları



Şekil 4.54. İki farklı sıcaklığa maruz bırakılmış sertakonazole ait bozunma kromatogramları

Bu bozunma koşulunda gözleendiği üzere II numaralı ana bozunma pikinin alanı küçüktür. Bu koşulda bütün bileşikler için önemli derecede bir bozunma gözlemlenmemiştir. Bileşiklerin ve bozunma ürünlerinin pik saflıkları DAD dedektör yardımıyla belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İmidazol grubunu içeren ilaçlar, başta antifungal olmak üzere, antikanser, antibakteriyel, antiparazitik, antihistaminik ve antiinflamatuvar özellik gösteren oldukça geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu grubu içeren bileşiklerin fizikokimyasal özelliği olan pK_a değeri ve geliştirilen yöntemle birlikte spesifikliğinin aydınlatılmasına yönelik her analiz, ilaç geliştirme sürecinde ve klinik çalışmalarda çalışmacılara oldukça önemli katkı sağlamaktadır. Bu doktora tezi de imidazol grubunu içeren bazı antifungal ilaçların termodinamik pK_a değerlerinin RPLC yöntemiyle tayini ile birlikte bu bileşiklerin bozunma ürünlerinin belirlenmesi ve bozunma mekanizmalarının aydınlatılmasına dayanmaktadır. Bu çalışma sadece kimya alanında çalışan araştırmacıların değil aynı zamanda tıp ve eczacılık alanında çalışmalar yapan araştırmacıların da ilgisini çekecektir.

Üç aşamadan meydana gelen bu tez çalışmasında ilk aşamada RPLC yöntemi kullanılarak imidazol grubu ilaç etken maddelerinin termodinamik pK_a değerleri belirlenmiştir. Daha sonra ikinci aşamada yine aynı yöntemle bileşiklerin ticari preparatlarında ve insan idrarında kantitatif tayinleri yapılmış ve metot validasyonu gerçekleştirilmiştir. Son aşama olarak bileşiklerin geliştirilen metotla spesifikliğinin belirlenmesi ve bozunma davranışlarının aydınlatılması amacıyla RPLC tekniği uygulanmıştır.

5.1. Bileşiklerin Termodinamik pK_a Değerlerinin Tayini

İlaçların su ortamındaki pK_a değerleri, rutin ilaç analizleri için gerekli parametrelerdir. Bileşikler suda yeterli miktarda çözünmeseler bile, su-organik çözücü karışımında elde edilen pK_a verileri kullanılarak farklı yaklaşımlarla bileşiklerin sudaki pK_a değerleri hesaplanabilmektedir. Bu tez çalışmasında da suda çözünürlüğü az olan klimbazol, lanokonazol, bifonazol, butokonazol, oksikonazol ve sertakonazolün pK_a değerlerinin tayini %35, %40, %45, %50 ve %55 (v/v) oranında asetronitril içeren asetronitril-su ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalarda çözünen parametresi yaklaşımı kullanılarak alıkonma değerleri tahmin edilmiştir. Sonra bu tahmini değerler excel eklentisi Solver programına çözdürülerek pK_a değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan her

bir su-asetonitril ortamında hesaplanan aktiflik katsayıları da çözünen parametresi kullanılarak yapılan hesaplama dahil edildiğinden bileşiklerin beş ortamdaki termodinamik pK_a verileri hesaplanmıştır. (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Bileşiklerin termodinamik pK_a değerleri

%ACN (v/v)	pK_a					
	KBZ	LAN	BİF	BUT	OKSİ	SER
%35	4,527	4,443	5,488	5,714	4,896	5,701
%40	4,482	4,225	5,443	5,694	5,358	5,671
%45	4,416	3,945	5,413	5,678	5,332	5,642
%50	4,800	3,701	5,564	5,653	5,301	5,616
%55	5,551	3,539	5,334	5,635	5,277	5,580

Bazı bileşiklere ait pK_a değeri, su-organik çözücü ikili karışımlarında organik çözücü yüzdesinin artmasıyla azalmaktadır. Sonuçlardan görüldüğü üzere çalışılan mobil fazlardaki asetonitril yüzdesinin artmasıyla imidazol halkasındaki 3 numaralı azota ait pK_a değerleri genel olarak azalmıştır. KBZ, BİF ve OKSİ’de çalışılan bazı ortamlarda bu azalma davranışı gözlemlenememiştir. Bunun sebebi çalışılan pH aralığında elde edilen alıkonma değerleri ile teorik olarak hesaplanan alıkonma değerleri arasında çok büyük farklar gözlemlenmesidir.

Deneyssel olarak bulunan bu termodinamik pK_a değerleri kullanılarak üç farklı yaklaşımla su ortamındaki termodinamik pK_a değerleri hesaplanmıştır. Birinci yaklaşım, mol kesri- pK_a yaklaşımıdır. Bu ekstrapolasyon yöntemi kullanılarak, elde edilen doğrusal eşitliklerin kesim noktalarından su ortamındaki termodinamik pK_a değerleri hesaplanmıştır. İkinci yaklaşımda, bileşiklerin asetonitril-su ikili karışımlarında hesaplanan solvatokromik çözücü parametresine (E_T^N) karşı pK_a değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrusal eşitliklerden elde edilmiştir. Üçüncü yaklaşımda ise Kamlet-Taft parametreleri kullanılarak çoklu regresyon yaklaşımı kullanılarak elde edilen eşitliklerden yine su ortamındaki termodinamik pK_a değerleri hesaplanmıştır. Bu üç yaklaşımla elde edilen pK_a değerleri Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Farklı yaklaşımlarla hesaplanmış su ortamındaki pK_a değerleri

Bileşik Yaklaşım	Mol kesri yaklaşımı	Solvatokromik çözücü parametresi yaklaşımı	Kamlet Taft yaklaşımı
Klimbazol	4,808	4,907	-
Lanokonazol	5,469	6,094	5,572
Bifonazol	5,653	5,755	5,670
Butokonazol	5,803	5,856	5,812
Oksikonazol	5,499	5,584	5,513
Sertakonazol	5,834	5,912	5,847

Hem su-asetonitril hem de su ortamında hesaplanan bu verilerin birbirleriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Literatürde olmayan bu veriler özellikle metot optimizasyonu aşamasında çalışmacılar tarafından mutlaka kullanılacaktır. Ayrıca bu parametre bileşiklerin ADMET özelliklerinin belirlenmesinde büyük önem taşıdığı için tıp ve ilaç alanında araştırmalar yapan çalışmacıların da ilgisini çekecektir.

Bir sıvı kromatografik çalışmada alıkonma zamanının mobil fazın polaritesi ile değişimi $\log t_R$ ile E_T^N parametresi arasındaki ilişki ile verilir. Çalışılan su-asetonitril ortamlarında hesaplanmış E_T^N değerleri kullanılarak moleküler (B) ve iyonlaşmış (BH^+) türe ait eşitlikler türetilmiş ve bu bağıntılardan da moleküler ve iyonlaşmış türlerin kesim (C_{BH^+} , C_B) ve eğim (e_{BH^+} , e_B) değerleri hesaplanmıştır. Bu parametreler ve hareketli fazın her bir asetonitril yüzdesindeki E_T^N değerleri ve bileşiklerin termodinamik pK_a değerleri kullanılarak, çalışılan mobil fazlarda seçilen her bir pH aralığına karşılık gelen teorik alıkonma zamanları hesaplanmıştır. Elde edilen deneysel değerlerle bu teorik alıkonma değerleri karşılaştırılarak geliştirilen sıvı kromatografik yöntemle pK_a tayininin kesinliği RRMSD parametresi ile belirlenmiştir. Elde edilen istatistiki değerler, Çizelge 5.3' te verilmiştir.

Çizelge 5.3. Bileşikler için alıkonmanın istatistiki değerlendirmesi

Bileşik	KBZ	LAN	BİF	BUT	OKSİ	SER
C_{BH}⁺	3,469	3,096	3,327	4,824	4,748	5,165
e_{BH}⁺	-4,127	-3,559	-3,955	-5,757	-5,665	-6,213
C_B	4,684	4,431	5,458	6,684	6,155	6,757
e_B	-5,715	-5,344	-6,619	-8,238	-7,534	-8,328
RRMSD^a	2,649	6,154	10,067	9,801	5,527	10,842
N	21	34	30	41	27	38

$$^a \text{RRMSD} = 100 \sqrt{(t_{R_{\text{den}}} - t_{R_{\text{tah}}})^2 / \sum (t_{R_{\text{den}}})^2}, N=\text{veri sayısı}$$

RRMSD, deneysel olarak elde edilen t_R değerleri ile teorik olarak elde edilen t_R değerlerinin farkı, kısaca standart sapma olarak tanımlanabilir. Bu değer kesinliğin bir ölçüsüdür ve %14'ten küçük olması tercih edilir. Çizelge 5.3' te hesaplanan RRMSD değerleri ters faz sıvı kromatografi yönteminin bileşiklerin pK_a tayini için uygun olduğunu göstermektedir.

5.2. Geliştirilen Metodun Validasyonu

Tezin ikinci aşamasında ise deneysel çalışmalar sonucunda çalışılan bütün su-asetonitril oranlarında elde edilen alıkonma faktörü-pH ilişkisi incelenerek bileşiklerin kantitatif tayini için optimum koşul belirlenmiş ve metot validasyonu çalışması yapılmıştır. Optimum koşulun belirlenmesinde; bileşiklerin kapasite faktörü (k) değerlerinin 1'den büyük olması, bileşiklerin ayrılmasında seçicilik faktörünün (α) 1,15'ten büyük olması ve ayırma gücü (R_s) değerlerinin 2'den büyük olması gibi gerekli olan şartlar sağlanmış ve uygun koşul belirlenmiştir.

Kantitatif çalışmada validasyon işlemi için iç standart yöntemi kullanılmıştır. Validasyon işleminde öncelikle sistem uygunluk testleri yapılarak bütün analitler için uygun pik simetri faktörü, teorik tabaka sayısı, ayırma gücü, kapasite ve seçicilik faktörlerinin sağlandığı belirlenmiştir. Elde edilen parametrelerin referans değerlerle uygunluğu görülmüştür.

Doğrusallık çalışmasında her bir bileşik için elde edilen doğrusal fonksiyonun korelasyon katsayılarının (r) 0,998 değerinden büyük olduğu belirlenmiştir.

Dedeksiyon limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri doğrusallık verileri içerisinde değerlendirilmiş ve literatürde sınırlı veri bulunan bu değerlerin uygun olduğu görülmüştür.

Kesinlik çalışmalarında gün içi ve günler arası tekrarlı analizler gerçekleştirilmiş ve hesaplanan bağıl standart sapma değerlerinin yorumlanmasıyla yöntemin kesinliği belirlenmiştir.

Doğruluk (geri kazanım) çalışmalarında ise her bir bileşik için yöntemin doğrusal çalışma aralığını kapsayan derişim aralığında geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Hesaplanan bu geri kazanım yüzdelerinin %100'e yakın olduğu belirlenmiştir. Hesaplanan bu geri kazanım yüzdeleri tayini yapılan bileşiklerin geliştirilen uygun numune hazırlama teknikleri ile bozucu etkilerle girişim yapmadığını göstermektedir.

DeneySEL ve istatistikSEL veriler değerlendirildiğinde, geliştirilen metotların krem, şampuan ve insan idrarı dışındaki diğer biyolojik sıvılara da uygulanabileceği görülmüştür.

5.3. Bileşiklerin Bozunma Davranışları

Tezin son aşamasında, belirlenen optimum ayırma koşulunda bozunma bileşiklerin bozunma ürünlerinin belirlenmesi amacıyla ICH tarafından belirlenen zaman (2-3, 12, 24 ve 48 saat) ve stres koşulları (asidik, bazik, oksidatif, fotolitik ve termal) belirlenen derişimlerdeki çözeltileri ve katı numunelerine uygulanmıştır. RPLC yöntemi ile yapılan bu çalışmalar sonucunda bileşiklerin bozunma ürünleri kalitatif olarak belirlenmiş ve bileşiklerin çalışılan ortamlardaki yüzde bozunma değerleri hesaplanmıştır.

Stres testlerine maruz bırakılan bileşiklerin bozunma öncesi ve sonrası pik alanları ölçülerek bileşiklerin ne kadar bozundukları Eşitlik 5.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm bileşiklere ait bozunma yüzdeleri Çizelge 5.4'te verilmiştir.

$$\%Bozunma = \frac{(Bozunmamış\ pik\ alanı - Bozunmuş\ pik\ alanı)}{(Bozunmamış\ pik\ alanı)} \times 100 \quad (5.1)$$

Çizelge 5.4. Çeşitli stres koşulları altında bileşiklerin bozunma yüzdeleri

Bozunma Türü	Süre	%Bozunma					
		KBZ	LAN	BİF	BUT	OKSİ	SER
Asit hidrolizi	2 saat	9,009	0,935	0,964	2,111	3,187	3,786
	12 saat	21,241	8,118	2,956	2,470	7,800	5,386
	24 saat	24,630	10,275	5,939	3,305	9,114	6,507
	48 saat	25,271	11,601	6,226	4,057	10,175	8,139
Baz hidrolizi	2 saat	13,275	9,508	3,850	8,038	1,790	7,815
	12 saat	22,485	17,448	7,499	9,909	26,525	8,947
	24 saat	22,795	18,069	9,049	10,316	46,525	11,277
	48 saat	23,312	18,336	11,187	11,474	47,798	14,422
Oksidatif	3 saat	21,430	38,570	5,323	17,245	6,727	32,257
	12 saat	39,729	100,000	31,914	57,333	24,290	53,662
	24 saat	44,287	100,000	49,552	89,697	33,082	80,519
	48 saat	50,226	100,000	56,212	90,963	50,274	84,410
Fotolitik	3 saat	26,240	70,969	50,795	15,438	14,783	17,547
Termal 60°C	2 saat	9,592	26,953	11,301	6,945	11,111	6,924
Termal 80°C	2 saat	19,303	57,029	35,048	22,690	15,234	11,722

Gerçekleştirilen bu çalışma sonrasında bileşiklerin en çok asidik ortamda kararlı davrandıkları ve en fazla bozunmanın ise peroksit ortamında olduğu saptanmıştır. DAD dedektör kullanılarak her bir bileşik için pik saflıkları ölçülmüş ve sonuçlar 0,999'dan büyük olarak tayin edilmiştir. Tüm bu bozunma sonuçları değerlendirildiğinde ise asidik en çok klmbazolün, bazik hidrolizde ise oksikonazolün bozunduğu, oksidatif, fotolitik ve termal bozunma koşullarından ise lanokonazolün etkilendiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Al Alamein, A.M.A., 2015. Purity Assessment And Determination Of Sertaconazole in Bulk And Pharmaceutical Formulations Based On Spectrophotometric And Chromatographic Approaches. *European Journal of Chemistry*, 6(4), 381-386.
- Ali, I., Lone, M.N., Aboul-Enein, H.Y., 2017. Imidazoles As Potential Anticancer Agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 42(4), 234-241.
- Anonim, 2018. https://www.shodganga.inflibnet.ac.in/bitstream/08_chapter2
Erişim tarihi: 16.01.2018
- Babić, S., Horvat, A.J.M., Pavlović, D.M., Kaštelan-Macan, M., 2007. Determination of pKa Values of Active Pharmaceutical Ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043-1061.
- Blessy, M.R.D.P., Patel, R.D., Prajapati, P.N., Agrawal, Y.K., 2014. Development of Forced Degradation And Stability Indicating Studies Of Drugs-A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), 159-165.
- Bosch, E., Bou, P., Allemann, H., Rosés, M., 1996. Retention of Ionizable Compounds on HPLC. pH Scale in Methanol-Water and the pK_a and pH Values of Buffers. *Analytical Chemistry*, 68(20), 3651-3657.
- Boschcov, P., Seidel, W., Muradian, J., Tominaga, M., Paiva, A.C., Juliano, L., 1983. Ionization Constants and Thermodynamic Parameters of Histidine and Derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 12(1), 34-44.
- Box, K. J., Völgyi, G., Ruiz, R., Comer, J.E., Takács-Novák, K., Bosch, E., Rosés, M., 2007. Physicochemical Properties of A New Multicomponent Cosolvent System For The pK_a Determination Of Poorly Soluble Pharmaceutical Compounds. *Helvetica Chimica Acta*, 90(8), 1538-1553.
- Castro, G., Casado, J., Rodríguez, I., Ramil, M., Ferradás, A., Cela, R., 2016. Time-of-Flight Mass Spectrometry Assessment of Fluconazole and Climbazole UV and UV/H₂O₂ Degradability: Kinetics Study And Transformation Products Elucidation. *Water research*, 88, 681-690.
- Chao, L., 2001. Simultaneous Determination of Four Anti-Dandruff Agents Including Octopirox in Shampoo Products by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*, 23, 183-188.
- Chawla, A., Sharma, A., Kumar Sharma, A., 2012. A Convenient Approach For The Synthesis Of Imidazole Derivatives Using Microwaves. *Synthesis*, 5(6), 7.
- Chemicalize, 2018. <http://www.chemicalize.com>, Erişim tarihi: 04.04.2018

- Chen, G., Hoptroff, M., Fei, X., Su, Y., Janssen, H., 2013. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Measurement of Climbazole Deposition From Hair Care Products Onto Artificial Skin and Human Scalp. *Journal of Chromatography A*, 1317, 155-158.
- Couteau, C., Jadaud, M., Peigne, F., 2000. Influence of pH on the Photodegradation Kinetics Under UV light of Climbazole Solutions. *Analisis*, 28(6), 557-560.
- Cudina, O.A., Comor, M.I., Jankovic, I.A., 2005. Simultaneous Determination of Bifonazole and Benzyl Alcohol in Pharmaceutical Formulations by Reverse-Phase HPLC. *Chromatographia*, 61, 415-418.
- Dalgıç, N., İnce, E., 2005. Sistemik Etkili Antifungal İlaçlar, *Klinik Pediatri*, 4(3), 90-98.
- Daniele, P.G., De Robertis, A., De Stefano, C., Sammartano, S., 1989. Salt Effects On The Protonation Of İmidazole İn Aqueous Solution At Different İonic Strengths: A Tentative Explanation By A Complex Formation Model. *Journal Of Solution Chemistry*, 18(1), 23-36.
- Demiralay, E.Ç., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2009. Determination of pK_a Values of Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Oxicams by RP-HPLC And Their Analysis in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of separation science*, 32(17), 2928-2936.
- Dolan, J.W., 2017. Back to Basics: The Role of pH in Retention and Selectivity. *LCGC North America*, 35(1), 22-28.
- Dolin, S.J., 2000. "Drugs and pharmacology" in *Total Intravenous Anesthesia*, pp. 13-35 (Nicholas L. Padfield, ed), Butterworth Heinemann, Oxford.
- Farkas, E., Bátka, D., Csóka, H., Nagy, N.V., 2007. Interaction Of İmidazole Containing Hydroxamic Acids With Fe (III): Hydroxamate Versus İmidazole Coordination Of The Ligands. *Bioinorganic Chemistry And Applications*, Febiger, Philadelphia.
- Foulon, C., Danel, C., Vaccher, C., Yous, S., Bonte, J. P., Goossens, J.F., 2004. Determination of Ionization Constants of N-İmidazole Derivatives, Aromatase Inhibitors, Using Capillary Electrophoresis and Influence of Substituents on pK_a Shifts. *Journal of Chromatography A*, 1035(1), 131-136.
- Gagliardi, L.G., Castells, C.B., Rafols, C., Rosés, M., Bosch, E., 2007. Static Dielectric Constants of Acetonitrile/Water Mixtures at Different Temperatures and Debye–Hückel A and a 0 B Parameters for Activity Coefficients. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 52(3), 1103-1107.

- Gibaldi, M., 1984. Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. 3rd Edition.
- Goldstein, A., Aronow, L., Kalman, S.M., 1974. The Time Course of Drug Action. Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology, 312.
- Green, J.M., 1996. Peer Reviewed: A Practical Guide To Analytical Method Validation. Analytical Chemistry, 68(9), 305A-309A.
- Gündüz, T., 2002. İnrümental analiz. Kromatografi Metotları. Gazi Büro Kitabevi. Ankara.
- Hauer, J., Müller, K., Lüdemann, H.D., Jaenicke, R., 1981. The Pressure Dependence of the Histidine Ring Protonation Constant Studied by ^1H HR-NMR. FEBS Letters, 135(1), 135-138.
- Horvath, C., Melander, W., 1980. Reversed-phase Chromatography, High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives, Academic Press, 113-303, New York.
- Ishihama, Y., Nakamuro, M., Miwa, T., Kajima, T., Asakawa, N., 2002. A Rapid Method for pKa Determination of Drugs Using Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis with Photodiode Array Detection in Drug Discovery. Journal of Pharmaceutical Sciences, 91(4), 933-942.
- Clark, J., 2016. High Performance Liquid Chromatography-HPLC, Chemguide. <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html> Erişim tarihi: 28.03.2018
- Jia, M.M., Zhou, Y., He, X.M., Wu, Y.L., Li, H.Q., Chen, H., Li, W.Y., 2014. Development of A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method For Determination of Butoconazole Nitrate In Human Plasma And Its Application to A Pharmacokinetic Study. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences], 34(3), 431-436.
- Jones, S., 2009. HPLC in a World Without Acetonitrile. Int. Labmate, 34, 8-10.
- Kalra, K., 2011. Method Development and Validation of Analytical Procedures. In Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. InTech.
- Kamlet, M. J., Abboud, J. L.M., Abraham, M.H., Taft, R.W., 1983. Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. The Journal of Organic Chemistry, 48(17), 2877-2887.
- Kazakevich, Y.V., Lobrutto, R., 2007. HPLC For Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons.

- Kumar, A., Ashok, H., Jawla, B., Suril S., Yadav, G., 2013. Recent Analytical Method Developed by RP-HPLC. *Global Journal of Pharmacology*, 7(3): 232-240.
- Kumar, A.P., Ganesh, V.R.L., Rao, D.V.S., Anil, C., Hariharakrishan, V.S., 2009. Separation and Quantitation of Z-isomer in Lanoconazole by Normal Phase HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50, 535-537.
- Lagalante, A.F., Hall, R.L., Bruno, T.J., 1998. Kamlet-Taft Solvatochromic Parameters of The Sub-And Supercritical Fluorinated Ethane Solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(34), 6601-6604.
- Mcpolin, O., 2009. *Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*, 141s, United Kingdom.
- Milano, J., Morsch, L.M., Cardoso, S.G., 2002. LC Method for the Analysis of Oxiconazole In Pharmaceutical Formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 175-180.
- Ngwa, G., 2010. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Delivery Technology*, 10(5), 56-59.
- Nouman, E.G., Al-Ghobashy, M.A., Lotfy, H.M., 2017. Development and Validation of LC-MS/MS Assay for the Determination of Butoconazole in Human Plasma: Evaluation of Systemic Absorption Following Topical Application in Healthy Volunteers. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55(2), 303-310.
- OriginLab, O., 2016. *Data Analysis and Graphing Software*. OriginLab Corp., Northampton Google Scholar.
- Öğretir, C., Berber, H., Asutay, O., 2001. Spectroscopic Determination of Acid Dissociation Constants of Some Imidazole Derivatives. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 46(6), 1540-1543.
- Pharmacology. Chapters 2 and 3. John Wiley & Sons, New York 1974.
- Rafferty, J.L., Siepmann, J.I., Schure, M.R., 2011. Mobile Phase Effects in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Comparison of Acetonitrile/Water and Methanol/Water Solvents as Studied by Molecular Simulation. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2203-2213.
- Ravichandiran, V., Devarajan, V., Masilamani, K., 2011. Determination of Ionization Constant (pK_a) for Poorly Soluble Drugs of Using Surfactants : a Novel Approach. *Scholar Research Library*, 3(4), 183-192.
- Reichardt, C., ve Welton, T., 2011. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. John Wiley & Sons.

- Richardson, M.D., 2005. Changing Patterns and Trends in Systemic Fungal Infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, i5-i11.
- Rizk, M., Toubar, S.S., El-Alamin, M.M.A., Azab, M.M.M., 2014. Micellar Liquid Chromatographic Determination of Sertaconazole and Terconazole in Bulk, Pharmaceutical Dosage Forms and Spiked Human Plasma. *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, 52, 155-164.
- Rosés, M., Bosch, E., 2002. Influence of Mobile Phase Acid–Base Equilibria on The Chromatographic Behaviour of Protolytic Compounds. *Journal of Chromatography A*, 982, 1–30.
- Rosés, M., Bolliet, D., Poole, C.F., 1998. Comparison of Solute Descriptors for Predicting Retention of Ionic Compounds (Phenols) in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using the Solvation Parameter Model. *Journal of Chromatography A*, 829(1-2), 29-40.
- Scientific, C., 2014. The Theory of HPLC. Chromatographic Parameters. E-Learning for the Analytical Chemistry Community, LC/GC, Chromacademy, 1-21.
- Scientific, C., 2014. The Theory of HPLC Introduction. E-Learning for the analytical Chemistry Community, Chromacademy, 1-16.
- Scientific, C., 2014. Reversed Phase Chromatography. E-Learning for the Analytical Chemistry Community, Chromacademy, 1-91.
- Scientific, C., 2014. Quantitative & Qualitative HPLC. E-Learning for the analytical Chemistry Community, Chromacademy, 1-31.
- Shalaeva, M., Kenseth, J., Lombardo, F., Bastin, A., 2008. Measurement of Dissociation Constants (pK_a Values) of Organic Compounds by Multiplexed Capillary Electrophoresis Using Aqueous and Cosolvent Buffers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(7), 2581-2606.
- Sherrod, P.H., 2008. NLREG version 6.5. Brentwood, TN, USA <http://www.nlreg.com>
Erişim tarihi: 14.03.2018
- Snyder, L.R., 1997. Modern Practice of Liquid Chromatography: Before and After 1971. *Journal of chemical education*, 74(1), 37.
- Snyder, L.R., 2000. Peer Reviewed: HPLC: Past and Present. 412-A.
- Stoelting, R.K., 1999. "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Injected and Inhaled Drugs", in *Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*, Lippincott-Raven Publishers, 1-17.

- Takács-Novák, K., Box, K.S., Avdeef, A., 1997. Potentiometric pK_a Determination of Water-Insoluble Compounds. Validation Study in Methanol/Water Mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235-248.
- Tanokura, M., 1983. ¹H-NMR Study on the Tautomerism of the Imidazole Ring of Histidine Residues: I. Microscopic Pk Values And Molar Ratios of Tautomers in Histidine-Containing Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 742(3), 576-585.
- Tay, F., Duran, M., İspir, C., Demirayak, Ş., 2016. Determination And Evaluation of Acidity Constants of Some Imidazole And Thiazole Linked Acetamide Compounds. *Anadolu University Journal of Science And Technology–A Applied Sciences and Engineering*, 17(2), 263-272.
- Trevor, A. J., 2015. *Katzung & Trevor's Pharmacology: Examination & Board Review*, 11e. McGraw-Hill.
- Ünlü, A., 2018. <https://bys.trakya.edu.tr/file/open/20607229> Erişim tarihi: 04.04.2018
- Wahab, S.I., Zaheer, Z., 2013. An RP-HPLC Method Developed for Determination of Bifonazole in Pharmaceutical Formulation. *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences*, 1(1), 12-15.
- Wang, Y., Pang, L., Wu, M., Ou, N., 2009. A validated LC–MS/MS method for determination of sertaconazole nitrate in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 877(31), 4047-4050.
- Warnock, D.W., 2010. *Antibiotic and Chemotherapy (Ninth Edition)*, 366-382.
- Yagil, G., 1967. The Proton Dissociation Constant of Pyrrole, Indole And Related Compounds. *Tetrahedron*, 23(6), 2855-2861.
- Zaid, A.N., Qaddomi, A., Khammash, S., 2012. Formulation of Bifonazole Powder And Development of A New Stability Indicating HPLC Method For its Analysis. *Journal of Pharmacy Research*, 5(4), 1857-1861.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zehra ÜSTÜN

Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul, 1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : zehra_ustun@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lisans

Süleyman Demirel Üniversitesi - Fen Edebiyat Fakültesi - Kimya Bölümü 2010

Yüksek Lisans

Süleyman Demirel Üniversitesi - Fen Edebiyat Fakültesi - Kimya Bölümü 2014

Yayınlar

Uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler

Ebru Çubuk Demiralay, Zehra Üstün, Doğan Daldal, Estimation of Thermodynamic Acidity Constants of Some Penicillinase-Resistant Penicillins, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 91, (2014), 7-11.

Aybike Talay, Ebru Çubuk Demiralay, Y. Doğan Daldal, Zehra Üstün, Investigation of thermodynamic acidity constants of some statins with RPLC method, Journal of Molecular Liquids 208 (2015) 286–290.

Hülya Yılmaz, Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, RPLC determination of acid dissociation constants and quantitative estimation for sulfasalazine, Journal of Iranian Chemical Society, 13, (2015), 103-110.

Zehra Üstün, Aybike Talay, Ebru Çubuk Demiralay, Optimization of RPLC Conditions for Quantitative Analysis of Atorvastatin and Rosuvastatin in Pharmaceutical Dosage Form, SDU Journal of Science, 11(1), (2016), 72-81.

Büşra Gündoğan, Ebru Çubuk Demiralay, Yaşar Doğan Daldal, Zehra Üstün, Determination of optimum separation condition for some carbapenem antibiotics using RPLC with the aid of central composite design and desirability function, Current Pharmaceutical Analysis, 13, (2016), 100-109.

Zehra Üstün, Yaşar Doğan Daldal, Aybike Talay, Ebru Çubuk Demiralay, An Improved Optimization Study for Determination of Pravastatin in Pharmaceutical Form by Using Reversed Phase Liquid Chromatography Method, Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 7(2), (2017), 602-607.

Vesile Canseven, Ebru Çubuk Demiralay, Zehra Üstün, Yaşar Doğan Daldal, Sibel Ayşıl Özkan, Güleren Alsancak, Measurements of Thermodynamic Acid Dissociation Constants for Three HMG-CoA Reductase Inhibitors by using RPLC and Study of Validation in Pharmaceutical Tablets, Current Pharmaceutical Analysis,13(1), (2017), 48-55.

Ramazan Uysal, Y. Doğan Daldal, Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Optimization of RPLC Method for Separation of Some Acetylcholinesterase Inhibitors by using Central Composite Design, Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 12(1), (2017), 23-43.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, İkbâl Demet Nane, Identification of Penicillinase-Resistant Penicillins in Human Urine by RPLC Method, Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 12(1), (2017), 3-13.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Simultaneous Quantitative Determination of Imidazole Antimycotics in Human Urine by using RPLC Technique, Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 12(6), (2017), 953-962.

Uluslararası toplantılarda sunulacak özet metin olarak yayınlanan bildiriler

Zehra Üstün, Erdem Kuzucanlı, Ebru Çubuk Demiralay, İkbâl Demet Nane, Temperature-dependent Determination of Dissociation Constants of Three ACE Inhibitors with Reversed Phase Liquid Chromatography, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, Çanakkale, 2016.

Ebru Çubuk Demiralay, Y. Doğan Daldal, Fatma Ürer, Zehra Üstün, Hülya Yılmaz, Experimental Determination for Thermodynamic Protonation Constant of Three Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, Çanakkale, 2016.

İkbâl Demet NANE, Zehra ÜSTÜN, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY, Identification of Chromatographic Behaviour in Acetonitrile-Water Binary Mixture for Method Optimization of Cinnarizine, International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development September 21-24, 2017 Isparta/TURKEY.

Zehra ÜSTÜN, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY, Optimization and Validation of RP-HPLC-UV Method for Determination of Sertaconazole in Dermatological Formulation, International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development September 21-24, 2017 Isparta/TURKEY.

Zehra ÜSTÜN, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY, Reversed Liquid Chromatographic Determination of Lanconazole in Human Urine, International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development September 21-24, 2017 Isparta/TURKEY.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Quantitative Determination and Validation of Oxiconazole in Topical Cream Formulation by using Reversed Phase Liquid Chromatography, I. International Scientific and Vocational Studies Congress, 5-8 October 2017, Ürgüp/Nevşehir.

Zehra Üstün, Güleren Alsancak, Ebru Çubuk Demiralay, Reversed Phase Liquid Chromatographic Determination of Climbazole in Antimycotic Shampoo Product, I. International Scientific and Vocational Studies Congress, 5-8 October 2017, Ürgüp/Nevşehir.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Forced Degradation Study On Climbazole By Rplc, 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018), 2-5 May 2018, Burdur/TURKEY.

Erdem Kuzucanlı, Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Reversed Phase Liquid Chromatographic Method Development And Stress Degradation Studies For Quinapril, 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018), 2-5 May 2018, Burdur/TURKEY.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Quantification And Validation Of Bifonazole In Dermatological Formulation With Reversed Phase Liquid Chromatography, 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018), 2-5 May 2018, Burdur/TURKEY.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, A Specific Rplc Method For Validation Of Butoconazole In Human Urine, 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018), 2-5 May 2018, Burdur/TURKEY.

İlkay Konçe, Zehra Üstün, Hale Seçilmiş Canbay, Ebru Çubuk Demiralay, Analysis Of Tetracycline Antibiotics In Wastewater Sample Using Solid Phase Extraction With Reversed Phase Liquid Chromatography Method, 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018), 2-5 May 2018, Burdur/TURKEY.

Abdullah Cengiz, İkbâl Demet Nane, Zehra Üstün, İlkay Konçe, Ebru Çubuk Demiralay, Liquid Chromatographic Behaviour and Determination of Phenytoin, 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018), 2-5 May 2018, Burdur/TURKEY.

Ulusal toplantılarda sunularak özet metin olarak yayınlanan bildiriler

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Yaşar Doğan Daldal, Güleren Alsancak, Metisilin ve Nafsilinin Kromatografik İyonlaşma Sabiti Değerlerinin Tayini, 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Kahramanmaraş, 2014.

Büşra Keskin, Ebru Çubuk Demiralay, Y.Doğan Daldal, Zehra Üstün, Güleren Alsancak, Merkezi Kompozit Dizayn Yaklaşımı ile Bazı Karbapenemlerin İdrarda Kantitatif Tayini için RPLC Yönteminin Geliştirilmesi, 15. Ulusal Kromatografi Kongresi, Uşak, 2015.

Hülya Yılmaz, Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, RPLC Yöntemiyle Azatiyopürin ve Metotreksatin Farklı Su- Organik Çözücü İkili Karışımlarında Kromatografik Davranışlarının Belirlenmesi, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Fatma Ürer, Ebru Çubuk Demiralay, Zehra Üstün, Bazı Seçici Serotonin Gerilim İnhibitörlerinin Protonasyon Sabitlerinin Su-Asetonitril İkili Karışımlarındaki Tayini, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi/Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Aybike Talay Aydoğan, Yaşar Doğan Daldal, Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Sibel Aysıl Özkan, RPLC Yöntemiyle Atorvastatin ve Rosuvastatinin Eş Zamanlı Ayrımında Metot Optimizasyonu ve Validasyonu, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi/Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Aybike Talay Aydoğan, Yaşar Doğan Daldal, Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Dislipidemi Tedavisinde Kullanılan Statin Grubu İlaçların Termodinamik Asitlik Sabitlerinin RPLC Yöntemiyle Tayini, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Penisilinaza Dirençli Penisilinlerin İnsan İdrarında Tayini İçin Ters Faz Sıvı Kromatografi Metodunun Geliştirilmesi, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Vesile Canseven, Zehra Üstün, Yaşar Doğan Daldal, Ebru Çubuk Demiralay, Güleren Alsancak, HMG-KoA Redüktaz İnhibitörlerinin RPLC Yöntemi ile Termodinamik İyonlaşma Sabitlerinin Tayini, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Vesile Canseven, Zehra Üstün, Yaşar Doğan Daldal, Ebru Çubuk Demiralay, Hülya Yılmaz, HMG-KoA Redüktaz İnhibitörlerinin Tablet Formunda Validasyonu için RPLC Metodunun Geliştirilmesi, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, İkbal Demet Nane, RPLC Yöntemiyle Oksasilin, Kloksasilin ve Dikloksasilinin İyonlaşma Sabitlerinin Tayini, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi/Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

Ramazan Uysal, Yaşar Doğan Daldal, Zehra Üstün, Ebru Çubuk Demiralay, Faktöriyel Dizayn Yöntemi Kullanılarak Bazı Geri Dönüşümlü Asetilkolinesteraz İnhibitörlerinin Ayrımı için RPLC Metodunun Optimizasyonu, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi / Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016.

