

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**FARMASÖTİK KREMLERDE UV TÜREV SPEKTRİYOMETRİSİ VE YÜKSEK
BASINÇLI SIVI KROMATOGRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE İZOKONAZOL NİTRAT
VE DİFLUKORTOLON VALERAT MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gürkan ÖZEN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

ANKARA
(OCAK 2009)

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**FARMASÖTİK KREMLERDE UV TÜREV SPEKTROFOTOMETRİSİ VE YÜKSEK
BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE İZOKONAZOL NİTRAT
VE DİFLUKORTOLON VALERAT MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gürkan ÖZEN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

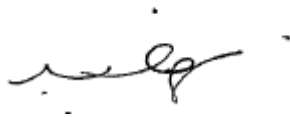
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2008-02 no. lu proje ile desteklenmiştir

ANKARA
16. 01. 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

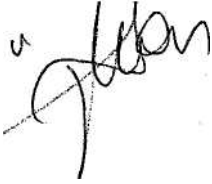
Tez Savunma Tarihi: 16/01/2009



İmza
Prof.Dr. Nilgün GÜNDEN GÖGER
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof.Dr. Sibel ÖZKAN
Ankara Üniversitesi



İmza

Doç.Dr. Nusret ERTAŞ
Gazi Üniversitesi

TEŐEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına yön veren, tezimin her aşamasında yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nilgün GÜNDEM GÖĞER'e,

Çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, zamanını ve desteğini esirgemeyen, deneysel çalışmalarımı yürütürken fikir alışverişinde bulunduğum Sayın Araş. Gör. Dr. H. Eda ŐATANA'ya,

Çalışmalarım boyunca bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Nusret ERTAŞ'a,

Tez çalışmam boyunca yakın ilgi ve moral desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. M. Tefvik ORBEY'e,

Tez yazım aşamasında bana desteğini esirgemeyen Analitik Kimya Anabilim Dalı Sekreteri Sayın Cennet GÜVENCİ'ye,

Her türlü destek ve dostluklarından dolayı tüm Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
Kabul ve Onay	I
Şekiller	V
Tablolar	VII
I.GİRİŞ VE AMAÇ	1
II.GENEL BİLGİLER	2
II.1. Mantar İnfeksiyonları ve Antifungal Tedavi	2
II.1.1 Antifungal Antibiyotikler ve Diğer Antifungal İlaçlar	2
II.1.2. İmidazol ve Triazol Türevi Antifungal İlaçlar	3
II.1.3. Alilamin Türevleri	4
II.2. İzokonazol nitrat	4
II.2.1. Kimyasal Yapısı	5
II.2.2. Farmakolojik Özellikleri	5
II.2.3. Analiz Yöntemleri	6
II.3. Diflukortolon Valerat	7
II.3.1. Kimyasal Yapısı	7
II.3.2. Farmakolojik Özellikleri	8
II.3.3. Analiz Yöntemleri	9
II.4.Yarı Katı Farmasötik Preparatlar	11
II.4.1.Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar	11
II.4.1.1.Kremler	12
II.4.2. İzokonazol nitrat - Diflukortolon valerat Kremlerin İçerdiği Katkı Maddeleri	14
II.4.2.1.Petrolatum	14
II.4.2.2.Polisorbata 60	15
II.4.2.3.Setostearil alkol	15
II.4.2.4.Sorbiton stearat	15
II.4.2.5.EDTA	16
II.4.2.6. Sıvı Vazelin	16
II.5. Kullanılan Yöntemler	17
II.5.1. UV Spektroskopisi	17
II.5.1.1. UV Türev Spektroskopisi	20
II.5.2. Kromatografi	25
II.5.2.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	32
III. MATERYAL VE YÖNTEM	34
III.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	34
III.2. Kullanılan Kimyasallar	34
III.3. Kullanılan Farmasötik Preparat	34
III.4. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi için Ön Çalışmalar	35
III.4.1. İzokonazol nitratın UV Spektrumunun Alınması	35
III.4.2. Diflukortolon valeratın UV Spektrumunun Alınması	35
III.4.3. İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat içeren Sentetik Karışımın UV Spektrumunun Alınması	35
III.4.4.İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat içeren Krem	35

Çözeltilisinin UV Spektrumunun Alınması	36
III.4.5.Kremdeki Katkı Maddelerinin Etanol İçindeUV Spektrumlarının alınması	36
III.4.5.İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Çalışma Dalga Boylarının Seçilmesi	37
III.5. Farmasötik Kremlerde İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Miktar Tayini	38
III. 5. 1. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi ile Miktar Tayini	38
III. 5. 2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Miktar Tayini	39
III.5.3. Geri Kazanım	40
III.5.3.1. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi ile Geri Kazanım	40
III.5.3.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Geri Kazanım	40
IV.BULGULAR	41
IV.1. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular	41
IV.1.1. Ön Çalışma Sonuçları	41
IV.1.1.1.İzokonazol Nitrat ve Diflukortolon valeratın UV Spektrumları	41
IV.1.1.2. Sentetik Karışımın UV Spektrumu	42
IV.1.1.2. Krem Çözeltilisinin UV Spektrumu	43
IV.1.1.3. Farmasötik Kremdeki Katkı Maddelerinin UV Spektrumları	43
IV.1.1.4. Sentetik Karışım ve Krem Çözeltililerinin Spektrumları	44
IV.1.2. Çalışma Dalga Boylarının Seçimi	47
IV.1.3. Kremlerde UV Türev Spektroskopisi Yöntemi ile İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları	50
IV.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Elde Edilen Bulgular	53
IV.2.1. Ön Çalışma Sonuçları	53
IV.2.2. Kremlerde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları	55
V.3. Geri Kazanım Sonuçları	58
IV.3.1. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle Geri Kazanım Sonuçları	58
IV.3.2. Kremlerde HPLC Yöntemiyle Geri Kazanım Sonuçları	59
IV.4. UV Türev Spektroskopisi ve HPLC Yöntemlerinden Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması	60
V.TARTIŞMA ve SONUÇ	62
VI.ÖZET	66
VII.SUMMARY	67
VIII.KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1. Türev Spektrumları	21
Şekil 2. Örtüşen Piklerin Türev Spektrumlarında Ayrılmaları	21
Şekil 3. Hareketli faz akış hızının tabaka yüksekliğine etkisi	28
Şekil 4. Sıvı Kromatografi Uygulamaları	33
Şekil 5. İzokonazol nitratın etanolde 100 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	41
Şekil 6. Diflukortolon valeratın etanolde 10 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	42
Şekil 7. 100 µg/ml <i>İzokonazol nitrat</i> ve 10 µg/ml <i>Diflukortolon valerat</i> içeren sentetik karışım çözeltisinin UV spektrumu	42
Şekil 8. 100 µg/ml <i>İzokonazol nitrat</i> ve 10 µg/ml <i>Diflukortolon valerat</i> içeren krem çözeltisinin UV spektrumu	43
Şekil 9. Aynı miktar <i>İzokonazol nitrat</i> ve <i>valerat</i> içeren sentetik karışım ve krem çözeltilerinin UV Spektrumları	43
Şekil 10. Petrolatumun etanolde 480 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	44
Şekil 11. Polisorbitat 60'ın etanolde 31000 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	44
Şekil 12. Setostearil Alkol'ün etanolde 2100 µg /ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	45
Şekil 13. Sorbiton stearat'ın etanolde 1800 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	45
Şekil 14. Di Sodyum EDTA'nın distile suda 2500 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	46
Şekil 15. Di Sodyum EDTA'nın etanolde 160 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	46
Şekil 16. Sıvı vazelinin etanolde 2500 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu	47
Şekil 17. (a)100 µg/ml İzokonazol nitrat (b)10 µg/ml Diflukortolon valerat (c)100 µg/ml İzokonazol nitrat ve 10 µg/ml Diflukortolon valerat içeren krem çözeltisinin 2.türev (n=5) spektrumları	48
Şekil 18. (a)100 µg/ml İzokonazol nitrat (b)10 µg/ml Diflukortolon valerat (c)100 µg/ml İzokonazol nitrat ve 10 µg/ml Diflukortolon valerat içeren krem çözeltisinin 2.türev (n=9) spektrumları	49
Şekil 19. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle <i>İzokonazol nitrat</i> tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu	50
Şekil 20. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle <i>Diflukortolon valerat</i> tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu	51

Şekil 21. (a)100µg/ml İzokonazol nitrat (b)100µg/ml Diflukortolon valerat (c)100µg/ml İzokonazol nitrat ve 100µg/ml Diflukortolon valerat içeren sentetik karışım çözeltilerinin kromatogramları	54
Şekil 22. Krem çözeltilisi kromatogramı (a)İzokonazol nitrat, (b)Diflukortolon valerat	55
Şekil 23. HPLC yöntemiyle İzokonazol nitrat tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu	55
Şekil 24. HPLC yöntemiyle Diflukortolon valerat tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu	56

TABLÖLAR

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 1. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle Elde Edilen Analitik Parametreler	52
Tablo 2. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle İzokonal nitrat Miktar Tayini Sonuçları	52
Tablo 3. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları	53
Tablo 4. Kromatografik Koşullar Optimize Edildiğinde İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat için Elde Edilen Doğrusal Parametreler	56
Tablo 5. HPLC Yönteminde Sistem Uygunluk Testi Sonuçları	57
Tablo 6. Kremlerde HPLC Yöntemiyle İzokonal nitrat Miktar Tayini Sonuçları	57
Tablo 7. Kremlerde HPLC Yöntemiyle Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları	58
Tablo 8. Krem Preparatlarında <i>İzokonazol nitrat</i> için Yapılan Geri Kazanım Sonuçları	58
Tablo 9. Kremde Diflukortolon valerat Geri Kazanım Sonuçları	59
Tablo 10. <i>İzokonazol nitrat</i> Geri Kazanım Sonuçları	59
Tablo 11. Diflukortolon valerat Geri Kazanım Sonuçları	60
Tablo 12. Kremlerde İzokonazol nitrat Sonuçlarının Karşılaştırılması	60
Tablo 13. Kremlerde Diflukortolon valerat Sonuçlarının Karşılaştırılması	61

I. GİRİŞ VE AMAÇ

İzokonazol nitrat, candida türleri ve dermatofitleri de kapsayan geniş etki spektrumlu imidazol türevi topikal antifungal bir ilaç etken maddesidir. *Diflukortolon valerat* ise, enflamasyonlu deri hastalıklarında kullanılan topikal bir kortikosteroiddir. *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* kombinasyonları, genel olarak deri mantar enfeksiyonlarında topikal olarak kullanılır.

Türk ilaç pazarında *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* kombinasyonu içeren iki krem preparatı, *İzokonazol nitrat*ı tek başına içeren bir krem preparatı, *Diflukortolon valerat*ı tek başına içeren bir krem ve bir merhem preparatı bulunmaktadır.

Çalışmanın amacı, *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* birlikte içeren kremlerde, etken maddelerin miktar tayinleri için rutin analizlerde kullanılabilen hızlı, kolay ve duyarlı analiz yöntemleri geliştirilmesidir. Hedef, önerilen analiz yöntemleri ile *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat*ın bir arada bulunduğu farmasötik kremlerde etken maddelerin herhangi bir ayırma işlemine tabi tutulmadan aynı anda miktar tayinlerinin yapılabilmesini sağlamaktır.

Bu çalışma kapsamında ikili karışım halinde bulunan *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat*ın aynı anda miktar tayinleri için yapılacak analizlerde UV türev spektroskopisi yöntemi temel alınmıştır. Geliştirilen Yüksek Basıncılı Sıvı kromatografisi yöntemi ile de sonuçların karşılaştırılması ve bu yöntemlerin *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* içeren farmasötik kremlere uygulanmasının sağlanması amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. Mantar İnfeksiyonları ve Antifungal Tedavi

Tedavi açısından mantar infeksiyonları (mikozalar) üç gruba ayrılırlar. Bunlardan mukokütanöz mantar infeksiyonları ve sistemik mantar infeksiyonlarına, immün sistemi yeterli bireylerde pek rastlanmaz; buna karşılık nötropenik hastalarda, immünoşüpresyon yapılmış hastalarda ve AIDS'lilerde nisbeten sık görülürler; teşhisleri zordur, sıklıkla postmortem incelemeler sırasında fark edilebilir. Bu nedenle geniş spektrumlu antibakteriyel ilaç veya kombinasyona cevap vermeyen, açıklanamayan ateşi olan nötropenik hastalara bazı hekimler ampirik olarak antifungal tedavi uygularlar. Cilt ve ekleri üzerine yerleşen dermatofitik mantar infeksiyonlarının teşhisi ve tedavisi daha kolaydır.

II.1.1 Antifungal Antibiyotikler ve Diğer Antifungal İlaçlar

Bu gruptaki antibiyotikler ve sentetik ilaçlar cilt ve mukozaların lokal mantar infeksiyonlarına ve/veya çeşitli sistemik mantar infeksiyonlarına karşı etkili ilaçlardır. Antifungal ilaçlar genel olarak antibakteriyel ilaçlara göre daha toksik ilaçlardır; bunun temel nedeni mantar hücrelerinin, prokaryotik olan bakteri hücrelerinin aksine, fakat memeli hücreleri gibi, ökaryotik olmalarıdır. Bundan dolayı antifungal ilaçların, her ikisi de ökaryotik olan mantar ve memeli hücresi arasındaki seçicilik olanağı düşüktür.

Antifungal antibiyotiklerden en çok kullanılanlar amfoterisin B, nistatin ve griseofulvindir. Antifungal antibiyotikler grubunda trikomisin ve pimarisin de bulunur.

Antibiyotik olamayan bazı sentetik ilaçlar da genellikle lokal uygulanmak suretiyle fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılır. Bunlardan bazıları, ketokonazol, flukonazol, flusitozin, mikonazol ve iyodürler sistemik uygulanabilirler. Sentetik antifungal ilaçlar içinde nispeten yeni olan imidazol ve triazol türevleri, başta ketokanozol olmak üzere, cilt ve mukozaların lokal mantar infeksiyonları ile kronik mükokütanöz kandidiyazis ve bazı sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde önemli gelişmelere neden olmuşlardır.

II.1.2. İmidazol ve Triazol Türevi Antifungal İlaçlar

İmidazol türevi çeşitli antifungal ilaçlar, geniş spektrumlu fungistatik ilaçlardır. Cilt ve mukozaların mantar infeksiyonları ile kronik mukokutanöz kandidiyazis tedavisinde diğer ilaçlara göre üstünlük gösterirler. Sistemik kullanılanlar sistemik mantar infeksiyonlarına karşı etkilidirler; ancak bu tür infeksiyonların çoğunda amfoterisin B den daha etkili değildirler. Fakat ondan daha az toksiktirler.

İmidazol türevi antifungal ilaçlardan sonra yapıcı onlara benzeyen N-sübstitüe triazol türevi fungistatik ilaçlar geliştirilmiştir. İmidazol ve triazol türevi antifungallere ortak bir adla azoller denir. Klotrimazol, *izokonazol*, ekonazol, tiyokonazol, oksikonazol ve butokonazol, ketokonazol, mikonazol, flukonazol, itrakonazol ve terkonazol bu gruba dahildir.

Yukarıda sayılan, lokal kullanılan imidazol türevi antifungal ilaçlar etkinlik ve yan tesirler yönünden birbirlerine yakından benzerler.

Uygulandıkları cilt bölgelerinden yavaş olarak ve düşük derecede absorbe edilirler. Belirgin bir sistemik etki oluşturmazlar. Başlıca yan tesirleri uygulandıkları yerde bazen eritem, kepeklenme, kaşıntı, iğnelenme, ödem ve ürtiker yapmalarıdır.

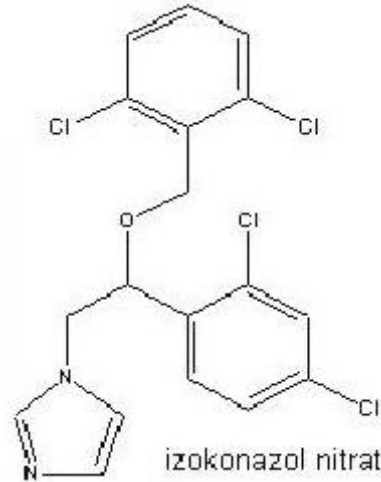
II.1.3. Alilamin Türevleri

Bu grupta nisbeten yeni antifungal ilaçlar olan naftitin ve terbinafin vardır. Dar spektrumludurlar, terapötik doz düzeyinde esas olarak dermatofitlere karşı etkilidirler¹.

II.2. İzokonazol nitrat

II.2.1. Kimyasal Yapısı

1-(2,4-dikloro-beta-(2,6-diklorobenziloksi)fenetil) imidazol nitrat



$C_{18}H_{14}Cl_4N_2OH NO_3$

M.A.=479.1 g/mol

Metanol ve etanolde çözünür, suda az çözünür^{2,3,4}.

II.2.2. Farmakolojik Özellikleri

İzokonazol nitrat, *Candida* türleri ve dermatofitleri de kapsayan geniş etki spektrumlu imidazol türevi topikal antifungal bir ilaç etken maddesidir. Stafilokok, streptokok ve mikrokoklar gibi ikincil enfeksiyon lezyonlarına yol açan gram-pozitif bakterilerle karışık mantar enfeksiyonlarında da etkilidir. Deri ve vajinadaki mantar enfeksiyonlarına karşı kullanılan krem ve ovülleri vardır.

İzokonazol nitrat, başta *Candida albicans* olmak üzere deri ve mukoza membranlarda fungal enfeksiyona yol açan mikroorganizmalar üzerinde fungostatik ve fungisit etki yapar. Bazı gram-pozitif mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etki de gösterir. Çoğalma fazında bulunan ve bulunmayan bakteri ya da mantar hücrelerine ve konidiosporlara karşı etkilidir.

İzokonazol nitrat deriye topikal olarak uygulanır. Kremleri deri üzerine uygulandığında *İzokonazol* hızla absorbe olur. En geç bir saat içinde epidermis tabakasında doruk konsantrasyona ulaşır. *İzokonazol* deride metabolize olmaz. Sistemik absorpsiyonu çok düşük düzeydedir. Absorbe edilen etken madde organizmada tümüyle metabolize edilerek 1/3'ü böbrek yoluyla ve 2/3'sü safra ile olmak üzere hızla elimine edilir^{1,2, 3,4}.

II.2.3. Analiz Yöntemleri

Di Pietra ve arkadaşları ketokonazol, klotrimazol, tiokonazol, bifonazol, *izokonazol*, ekonazol, mikonazol ve fentikonazol gibi imidazol grubu antimikotik etken maddelerin ayrımları için farklı kolon dolgu maddelerinin (Hypersil C-18, Spherisorb-CN, Chromspher-B) kullanıldığı bir ters faz HPLC yöntemi önermişlerdir. Çalışmada post-kolon on-line fotokimyasal reaktör kullanımının UV dedektörlü HPLC analizinin duyarlılığının artırılmasında yararlı olduğu gösterilmiştir. Önerilen HPLC yöntemleri, ticari dozaj formlarının (kremlerin) analizinde, numune hazırlanması için uygun bir teknik olarak görülen diol sorbentin kullanıldığı katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile birlikte uygulanmışlardır⁵.

Kublin ve arkadaşları, içlerinde *İzokonazol nitrat*ın da olduğu bir grup imidazol türevi antimikotik ilaç etken maddesinin kremlerden ve merhemlerden tayini için basit bir gaz kromatografik miktar tayini yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada UCW-98 Chromosorb WAW kolon ve alev iyonizasyon dedektörü kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler, önerilen yöntemin farmasötik formlarda doğru ve kesin sonuçlar verdiğini göstermiştir⁶.

Van Eeckhaut ve arkadaşları, içlerinde *izokonazol nitrat*ın da olduğu bir grup ilaç etken maddesinin kiral ayrımları için siklodekstrin kullanılan kapiler zon elektroforez yöntemi önermişlerdir. Yöntem geliştirmede en önemli basamak, kiral seçici olarak kullanılan nötral siklodekstrinlerin en iyi ayrımı sağlayacak miktarlarının belirlenmesidir. Enantiomer komplekslerinin bağlanma sabitleri ile ilgili bir bilgi mevcutsa, optimum siklodekstrin konsantrasyonunun hesaplanmasında en iyi yolun, $[S]_{(opt)}=1/(K_1K_2)^{1/2}$ eşitliğinin kullanılması olduğu belirtilmiştir. Bu değerler, her bir enantiomerin etkin hızının kiral selektör derişiminin bir fonksiyonu olarak ölçülmesi ve non-lineer en küçük kareler regresyonundan yararlanılmasıyla elde edilebilir. Düşük siklodekstrin konsantrasyonları ile birkaç deney yaparak optimum siklodekstrin konsantrasyonunu öngörmek de bir alternatif yaklaşımdır. Önerilen model, bazı antimikotik imidazol türevleri (ekonazol, mikonazol ve *izokonazol*) test maddesi olarak kullanılarak geliştirilmiş ve hidroksiopropil beta siklodekstrin kiral selektör olarak kullanılmıştır⁷.

BP 2004, *İzokonazol nitrat* miktar tayini için 1 hacim susuz asetik asit ve 7 hacim metil etil ketonda çözülen maddenin perklorik asit ile titrasyonuna dayanan bir potansiyometrik yöntem önermiştir⁸.

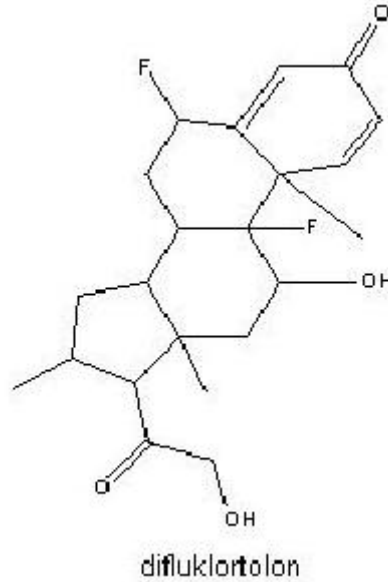
Avrupa Farmakopesi (EP), *İzokonazol nitrat* miktar tayini için 1 hacim susuz asetik asit ve 7 hacim metil etil ketonda çözülen maddenin perklorik asit ile titrasyonuna dayanan potansiyometrik yöntem önermiştir³.

Wang ve arkadaşları, kremlerde *izokonazol nitrat* tayini için bir kromatografik yöntem önermişlerdir. Çalışmada Zorbax C 18 kolon, mobil faz olarak %2 amonyum asetat- metanol- asetonitril (270:375:355) karışımı, 2.0 ml/dak. akış hızında, kullanılmış, UV dedektör 235 nm.ye ayarlanmıştır. Doğrusal çalışma aralığı 40-250 µg/mL (r=0.9999, n=6), geri kazanım değeri, %101.1 (BSS=%1.1) bulunmuştur. Yöntemin, duyarlı, doğru ve basit olduğu ve kremlerde *İzokonazol nitrat* kalite kontrolünde kullanılabileceği belirtilmiştir⁹.

II.3. Diflukortolon Valerat

II.3.1. Kimyasal Yapısı

6α,9α-Difloro-11β,21-dihidroksi-16α-metilpregna-1,4-dien-3,20-dion 21- valerat



$C_{27}H_{36}F_2O_5$

M.A.=478.6 g/mol

Suda çözünmez, dikloro metan, 1,4 dioksan, metanol, eter ve etanolde çözünür^{2,4,8}.

II.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Diflukortolon Valerat, çeşitli deri hastalıklarının tedavisinde topikal olarak kullanılan güçlü bir kortikosteroiddir. Daha az güçlü kortikosteroidlere cevap vermeyen inatçı egzama gibi şiddetli ve dirençli enflamasyonla belirgin deri hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Kullanıldığı başlıca olgular şunlardır: Bakteri ve/veya mantarlarla enfekte ekzema tipi deri hastalıkları, inflamasyonla birlikte olan piyoderma, folikülit, impetigo ve eritrazma gibi bakteriyel infeksiyonlar, dermatofit, maya benzeri mantarlara bağlı dermatomikozlar, tinea ve kandidiyazis gibi belirgin akut enflamasyon veya sekonder egzama olguları. *Diflukortolon valerat*, bakteri ve mantar infeksiyonlarına karşı profilaksi uygulanmasını gerektiren enflamatuvar ve alerjik deri hastalıklarında da kullanılabilir. %1 lik ve %0.3'lük preparatları vardır. Şiddetli olgularda genellikle kısa süreli yoğun (%0.3) tedavi uygulanır. Haftada %0.3'lük preparatı 60 g'dan fazla uygulanmamalıdır. Yüksek düzeyde absorpsiyon sonucu sistemik etkilere yol açabileceğinden zedelenmiş deriye uygulanmamalıdır.

Diflukortolon valerat antiinflamatuvar, antiprütik ve vazokonstrüktör etkilidir. Derideki antiinflamatuvar etkiler ödem, fibrin birikimi ve keloid oluşumu gibi geç enflamatuvar süreçler de topikal kortikosteroidler tarafından inhibe edilirler. Klinikte bu etkiler ilişkili hastalıklarda görülen pullanma, eritem, pruritus ve plak oluşumu gibi belirtilerin azalmasına karşı gelir.

Diflukortolon valerat topikal olarak uygulanır. Deriye uygulandığı yerden hızla absorbe olarak stratum corneum'da yüksek konsantrasyona ulaşır ve bu sayede etkisi hızla başlar ve uzun sürer. Deride metabolize ve inaktive edilemez. Sadece lokal etki gösterirler. Deriden absorpsiyon oranı düşüktür. Zedelenmiş deriden bile 7 saat içinde sadece %2 kadarı absorbe olur, absorbe edilerek sistemik dolaşıma

ulaşan bölümü hızla metabolize edilerek tümüyle atılıma uğrar. Atılımın %25'i safra ve %75'i böbrek yoluyla olur².

II.3.3. Analiz Yöntemleri

Maeda ve arkadaşları, 11 kortikosteroidin (prednisolon, triamsinolon asetonid fluokinolon asetonid, hidrokortizon butirat, fluosinonid, difluprednat, deksametazon valerat, betametazon valerat, prednisolon valerat-asetat, beklometazon dipropiyonat ve *Diflukortolon valerat*) ve 4 paraben'in (metil, etil, n-propil ve n-bütül) HPLC yöntemi ile eş zamanlı kantitatif tayinleri için kolay ve pratik bir yöntem önermişlerdir. Çalışmada C18 kolon, mobil faz olarak (50:50) ve (60:40) metil alkol - su karışımı, iç standart olarak sek-bütül paraben kullanılmış, UV dedektör dalga boyu 254 nm ye ayarlanmıştır. Kalibrasyon doğruları parabenler için 0.002 - 0.05 mg/mL, kortikosteroidler için 0.01 - 0.25 mg/mL aralığında doğrusaldır. Bağıl standart sapma değerlerinin %1.3 den düşük olduğu yöntemin rutin analizlerde kullanılabileceği belirtilmiştir¹⁰.

Maeda ve arkadaşları yaptıkları bir başka çalışmada merhemlerde 11 kortikosteroidin (prednisolon, triamsinolon asetonid, fluokinolon asetonid, hidrokortizon butirat, fluosinonid, difluprednat, deksametazon valerat, betametazon valerat, prednisolon valerat-asetat, beklometazon dipropiyonat ve *diflukortolon valerat*) ve 4 paraben'in (metil, etil, n-propil ve n-butül) HPLC yöntemi ile eş zamanlı kantitatif tayinleri için hızlı, kolay ve güvenilir bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem, SepPak silika jel kartuş üzerinde 10 ml hekzan- kloroform karışımı ile yağda çözünen ekspiyanların uzaklaştırılması ve daha sonra 10 ml etil asetat ile kortikosteroidlerin ve parabenlerin bu kartujlardan elüsyonunu da kapsar. Tayinler, ters faz kolonda, mobil faz olarak su- metanol karışımları(50:50 ve 60:40), internal standart olarak sek-butül paraben kullanılarak 240 nm. de UV dedeksiyonla gerçekleştirilmiştir. Merhemlere eklenen standart

kortikosteroidler ve parabenlerin geri kazanım çalışmalarından %98.4-%103.2 geri kazanım değerleri, %0.4-%2.4 bağıl standart sapma değerleri ile, elde edilmiştir¹¹.

Gagliardi ve grubu, *Diflukortolon valeratı* da içeren 51 kortikosteroidin kozmetik numunelerden analizi için katı faz ekstraksiyonu sonrasında sıvı kromatografisi yöntemi önermişlerdir. Çalışmanın amacı, tanımlanmamış sentetik kortikosteroidlerin varlığının kontrolüdür. Silika jel plaklar üzerinde farklı elüentler ve farklı dedeksiyon reaktifleri kullanılarak ince tabaka kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu ön kromatografik ayrımlar, steroid bileşenlerinin varlığını gösterdiğinde gerçek numunelerden alınan metanolik ekstraktlar, C-18 katı faz ekstraksiyon kartuşlarına aktarılmış ve analitler etil eterle elüe edilmiştir. Bu analitlerin tanınması ve miktar tayinleri için daha sonra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik ayrımlar, bir Purospher RP-18 kolon kullanılarak ve asetonitril-metanol karışımının izokratik veya gradient elüsyonu ile ve fotodiyod array dedektörle gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğruluğu geri kazanım çalışmalarıyla kontrol edilmiştir¹².

BP 2004, kremlerde *Diflukortolon valerat* miktar tayini için bir kromatografik yöntem önermiştir. Klokortolon valeratın internal standart olarak kullandığı yöntemde çözücü olarak metanol, mobil faz olarak distile su: metanol (25:75) karışımı (2 ml/dakika akış hızı), 30x3.9 cm Mikro Bondapak C18 kolon kullanılması ve UV dedeksiyonun 245 nm de yapılması önerilmektedir⁸.

Palabıyık ve arkadaşları, kremlerde *Diflukortolon valerat* ve klorkinaldolün eş zamanlı ayrımları için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve spektrofotometrik yöntem önermişlerdir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde optimum kromatografik ayırım için ACE C18 kolon ve 1.0 ml/dakika akış hızında metanol/fosfat tamponundan (pH 5.5; 0.1 M) (95:5, h/h) oluşan mobil faz içeren izokratik bir sistem kullanılmış

ve UV dedeksiyon 220 nm de yapılmıştır. İç standart olarak efedrin hidroklorür kullanılmıştır. Spektrofotometride kemometrik teknik olarak Temel Bileşen Regresyonu (PCR) tekniği kullanılmıştır. Bu teknikle, metanol/su (3:1) içinde etken maddeleri içeren sentetik karışımlar kullanılarak derişim veri matrisi hazırlanmıştır. Derişim veri matrisine karşılık gelen absorbans veri matrisi, *Diflukortolon valerat* ve klorkinaldolün ikili karışımlarının sıfıncı derece spektrumlarında 230-348 nm aralığında 60 dalga boyunda, $\Delta\lambda$ 2 iken, absorbanslar ölçülerek elde edilmiştir. Doğrusal aralık, LC yönteminde *Diflukortolon valerat için* 2.40-300 $\mu\text{g/mL}$, klorkinaldol için 0.72-240 $\mu\text{g/mL}$, PCR yönteminde yönteminde *Diflukortolon valerat için* 0.88-3.0 $\mu\text{g/mL}$, klorkinaldol için 1.0-11.2 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. Önerilen yöntemlerin doğruluk, kesinlik ve doğrusal aralık açısından değerlendirilmesi sonucu adı geçen etken maddeleri içeren sentetik karışımların analizlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Önerilen iki yöntem, iki farmasötik krem preparatına uygulanmış ve sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır¹³.

II.4.Yarı Katı Farmasötik Preparatlar

II.4.1.Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar

Bu grup preparatlar merhemler, patlar, kremler, seralar, sabunlar, yakılar, pastalar, macunlar, lapalar ve bazı jel şeklindeki farmasötik formülleri kapsar. Uygulandıkları cilt üzerinde yıkanınca veya silininceye kadar kadar geçen süre içinde kalırlar. Bu yapışıcı (adhesif) karakter, formülün plastik ve reolojik özelliğine dayanır. Yarı katı preparatlardan bazıları cilde uygulanan ve etken maddeler için sivağ olarak kullanılır. Ayrıca yumuşatıcı, koruyucu, örtücü amaçla da sivağ olarak verilmektedir. Bu preparatların rektal, vajinal, üretral mukozalara, zarlara, kornea, kulak ve burun mukozalarına uygulanan formüllerinin özelliklerinde bazı farklılıklar bulunmaktadır.

Merhemler genellikle sıvı, katı ve yüksek erime noktasına sahip katı hidrokarbonlar, mineral yağlar, polietilen glikoller veya bunların belirli oranlardaki karışımları ile hazırlanan yardımcı maddeler ile sıvı veya katı halde etken maddeler içeren preparatlardır.

Patlar, temel yapıları merhemlere benzeyen ancak yüksek oranda (%50 ve daha fazla) katı madde içeren, deri üzerinde koruyucu tabaka oluşturan kütlelerdir.

Kremler opak görünümlü yarı katı emülsiyon sistemleridir. Kıvam ve viskoziteleri, emülsiyon tipine (su/yağ veya yağ/su olduğuna göre) ayrıca iç fazdaki katı maddenin tabiatına göre değişir.

Jel şeklinde ve yarı preparatlar doğal ve sentetik zamklardan meydana gelen üç boyutlu polimer yapılı esas kütle içinde, katı veya sıvı bir fazın dağılımı ile oluşan yarı katı preparatlardır. Doğal zamklardan kitre zamkı, pektin, karragen, agar ve aljinik asit; sentetik ve yarı sentetik materyallerden de metil selüloz, hidroksi etil selüloz, karboksi metil selüloz ve Carbopoller ile hazırlanır. Esas kütle jelleştirme veya ergitme suretiyle hazırlanır. Preparatları yarı katı hale getiren ikinci grup maddeler de içerisine özelliklerine uygun şekilde ilave edilir.

Sabunlar cilt temizliği ve deri ile saç vb. organların tedavisinde kullanılır (kükürtlü, katranlı sabunlar vb.)

II.4.1.1.Kremler

Bilinen kremler haricen yerel olarak deri üzerinde tedavi edici veya cildi güzelleştirmek amacıyla uygulanan ve genellikle su içinde yağ (yağ/su) sistemleridir, ancak yağ oranı merhemden daha azdır. Farmasötik Teknoloji yönünden kremler emülsiyon şeklindeki preparat grupları içinde

de örneklendirilebilir. Yumuşak, kolay uygulanabilir kıvamdadır. Kozmetik alanda temizleyici ve koruyucu amaçla tercih edilen preparatlardır. Cildi güneş ışınlarından koruyan kremler, temizleyici kremler, el ayak kremi ve yüz kremi v.b. şeklinde gruplanır. Preparatın pH'sı belirleyici olmamakla beraber, deri pH'sına yakın, yani hafif asidiktir. Farmasötik kremler haricen kullanılmak üzere hazırlanmış emülsiyon şeklindeki preparatlardır, süspansiyon olanlar da vardır ve etken madde içerirler. Krem ifadesi emülsiyon şeklindeki taşıyıcılara özgü bir terimdir^{14,15}.

Krem sivağları

Genellikle, merhem sivağı olarak kullanılan maddeler ve bunların ayrı ayrı veya farklı oranlardaki karışımları da krem sivağı olarak kullanılır. Burada doğal yapılı mumlar, katı ve sıvı yağlar, lanolin, sentetik yağlar ve sentetik mumlar sayılabilir. Tıbbi madde içeren kremler suda çözünen, su ile temizlenebilen sivağlarla hazırlanır.

Krem sivağları başlıca üç gruba ayrılır:

1. Suda eriyen sivağlar
2. Emülsiyon tipi sivağlar
3. Sabun tipi sivağlar

Krem formülleri

Krem formüllerine sivağlarından başka, diğer gerekli maddeler ilave edilir ve genellikle aşağıda gösterilen şekilde gruplanır.

1. Yağlı kremler: Gece kremi.
2. Yarı yağlı kremler: Bunlara temizleyici krem adı da verilir ve %20-30 yağ içerir.
3. Yağsız kremler: Mat kremler, stearat kremleri, gündüz kremi ve temizleyici kremler.

Kremlerin bazı formülleri bir veya birden çok etken madde içerir. Kozmetik kremlerde doğal kaynaklı maddelerle (plasenta ekstresi, bazı hormonlar, bitki özleri v.b.) de krem formülleri hazırlanmıştır.

Kold Krem değişik formüllerde hazırlanan ve en eski krem formülleri arasında olup, Stearat Kremi (Vanishing Cream, Yağsız Krem) ile birlikte kozmetik formüllerde kullanılır.

Yumuşatıcı (emolien) Kremlerin esas kütlesi lanolin, vazelin, gül suyu olup cildi tazelemek ve yumuşak bir görünüm vermek için kullanılır.

Cildi temizlemek amacı ile kullanılan kremler genellikle stearat sabunlarını, trietanolamin sabunu şeklindeki emülsiyonları ve bir değerli metal sabunlarını emülgatör olarak içeren formüllerdir. Genel olarak yağ/su, bazen de su/yağ emüsyonları şeklinde hazırlanır^{14,15}.

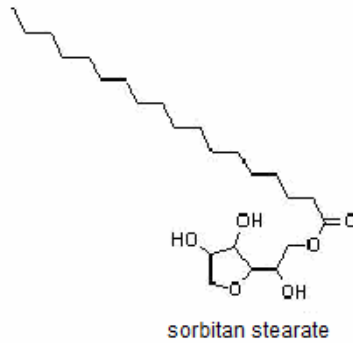
II.4.2. İzokonazol nitrat - Diflukortolon valerat Kremlerin İçerdiği Katkı Maddeleri

II.4.2.1.Petrolatum(C_nH_{2n+2}): Petrolden elde edilir. Yarı katı doymuş hidrokarbonların saflaştırılmış bir karışımıdır. Petrolatum, soluk sarı renkte, yarı şeffaf ve yumuşak kıvamlıdır. Kokusuz ve tatsızdır. Aseton, alkol, gliserin ve suda pratik olarak çözünmez; benzen, karbon disülfür, kloroform, eter, hegzan ve çok sayıda sabit ve uçucu yağda çözünür. Kuru ve serin yerde saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır^{15, 16, 17}.

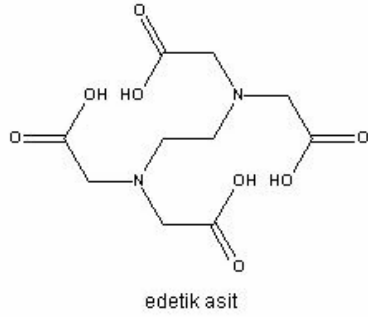
II.4.2.2.Polisorbitat 60: Molekül formülü $C_{64}H_{126}O_{26}$ dır. Polisorbat 60, sorbitol ve anhidritlerin kısmi stearik esterlerinin bir karışımıdır. Sarı-turuncu renkli yağlı bir sıvı, yarı jel ya da sarımsı kahverengi renkli jelatimsi bir maddedir. Sıvı parafin ve sabit yağlarda pratik olarak çözünmez. Kuvvetli asit ve bazlarla sabunlaşmaya neden olabilir. Polisorbatlar, hidrofilik noniyonik yüzey aktif maddelerdir ve farmasötik preparatlarda emülgatör olarak kullanılırlar^{15, 16, 17}.

II.4.2.3.Setostearil alkol: Setil alkol ve stearil alkolden oluşan katı alifatik alkollerin bir karışımıdır. Uygun yağ asitlerinin indirgenmesiyle elde edilir. Hafif karakteristik kokulu, beyaz veya soluk sarı renkte mumsu kitle ya da beyaz pulcuk veya granüller halinde bulunur. Suda pratikte çözünmez, eterde kolayca çözünür, alkol ve petrol eterinde çözünür. Stearil alkol, merhemlerde ve kremlerde inceltici olarak ve su tutma kapasitesini artırıcı olarak kullanılır^{15,16,17}.

II.4.2.4.Sorbiton stearate: Molekül formülü yaklaşık olarak $C_{24}H_{46}O_6$ dır. Sorbitol ve sorbitol'ün mono ve dianhidridlerinin stearik asit ile yaptığı kısmi esterlerin bir karışımıdır. Açık sarı ya da kahve renkli sarı renkte mumsu bir katıdır. $50-55^{\circ}C$ arasında erir. Suda pratik olarak çözünmez, fakat dağılır, alkolde güç çözünür. Sorbiton esterleri, lipofilik noniyonik yüzey aktif maddelerdir ve emülsiyonlarda, kremlerde, merhemlerde ve bazı kozmetik ürünlerde emülgatör olarak kullanılırlar^{15,16,17}.



II.4.2.5.EDTA: Farmasötik preparatlar, gıdalar ve kozmetik ürünlerde şelatör olarak kullanılır. Toprak alkali ve ağır metal iyonlarıyla suda çözünen ve şelat olarak adlandırılan kompleksler yapar. Bu iyonlar kompleks haline dönüştüklerinde serbest haldeki özelliklerini yitirirler. EDTA, beyaz renkte kristalize bir tozudur. Suda güç çözünür, alkali hidroksit çözeltilerinde çözünür. Katı halde oldukça stabildir. Di sodyum tuzu, suda çözünür. Kozmetik ürünlerde ve farmasötik preparatlarda antioksidant etki gösterir^{15,16,17}.



II.4.2.6. Sıvı Vazelin: Sıvı parafin, topikal farmasötik preparatlarda yoğun şekilde kullanılır. Yumuşatıcı özelliğinden faydalanmak amacıyla merhem sivağlarının bileşiminde yer alır. Yağ/su tipi emülsiyonlarda kullanılır. Tablet ve kapsüllerde lubrikan olarak yer alır. Lubrikan özelliği nedeniyle oftalmik formülasyonlarda da kullanılır. Sıvı parafin, petrolden elde edilen doymuş sıvı hidrokarbonların bir karışımıdır. Şeffaf, renksiz, kokusuz ve viskoz bir sıvıdır. Gün ışığında floresans göstermez. Tatsız ve kokusuz bir maddedir, fakat ısıtıldığında hafif bir koku yayar. Su, gliserin ve alkolde pratik olarak çözünmez; benzen, aseton, kloroform, eter, karbon disülfür ve petrol eterinde çözünür. Uçucu ve ve sabit yağların (hint yağı hariç) çoğu ile karışır. Düşük miktarlarda yüzey aktif madde ilavesi karışma/çözünürlük artışı sağlar. Hava geçirmeyen kaplarda saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır^{15,16,17}.

II.5. Kullanılan Yöntemler

II.5.1. UV Spektroskopisi

Elektromanyetik spektrumun 100-200 nm dalga boyları arası vakum ultraviyole olarak, 200-380 nm dalga boyları arası ise ultraviyole olarak adlandırılır.

Bir molekülün total enerjisi, elektronik, titreşimsel ve dönme enerjileri toplamıdır. Elektronik enerji en büyük, rotasyonel enerji en küçük kuantlı enerjidir. Bu durum, $E_E > E_T > E_D$ olmak üzere,

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Elektronik}} + E_{\text{Titreşim}} + E_{\text{Dönme}} \text{ şeklinde ifade edilir.}$$

Normal durumda molekülün E_0 temel enerjisi UV ışığın absorpsiyonundan sonra E_1 uyarılmış değerine yükselir ve aradaki enerji farkı ($E_1 - E_0 = \Delta E$) absorplanan enerjiyi verir, elektronik geçişe neden olan bu enerji farkı ile ışığın hızı (c), dalga boyu (λ) ve frekansı (ν) arasında şu bağıntı vardır: $E = h\nu = hc/\lambda$

Enerji farkı ile absorplanan ışığın dalga boyu arasında ters bir orantı vardır, enerji farkı ne kadar küçükse, dalga boyu o kadar büyüktür. Absorplanan enerji, molekülün iyonizasyonuna neden olabildiği gibi bir süre sonra da ($\sim 10^{-8}$ s.) ısı ya da ışık olarak da geri verilebilir. Enerjinin ışık olarak açığa çıkması floresans veya fosforesans ile sonuçlanır.

Molekül tarafından absorblanan ultraviyole ışınlar, bağ elektronlarının elektronik enerji seviyelerini etkiler ve moleküler orbitaldeki elektronların daha yüksek enerjili orbitallere sıçramasına neden olur.

UV-VIS bölgedeki radyasyonların moleküller tarafından absorplanması ile elektronik enerji seviyelerindeki pek çok geçişlerin yanı sıra pek çok titreşim ve dönme enerji seviyelerinde de geçişler olur ve her geçişe karşı farklı bir dalga boyu absorplanır. Bu dalga boylarının yan yana

dizilmesiyle ortaya çıkan molekülün absorpsiyon spektrumu bir bant spektrumudur.

Absorpsiyonun şiddeti ise elektronların uyarılmış duruma geçebilme olasılıklarına ve ayrıca bu uyarılmış durumun polarlığına bağlıdır, elektronik geçişin dipol momentinde neden olduğu değişme (uyarılmış durumun polarlığı) ne kadar büyük ise absorpsiyon şiddeti o kadar büyük olur.

Absorplanan ışığın miktarı absorbans olarak ölçülür. Absorbans molekülün yapısına, ışığın dalga boyuna, ışığın çözelti içinde aldığı yolun uzunluğuna ve çözelti derişimine bağlıdır. Bu durum Lambert-Beer Kanunu olarak aşağıdaki gibi ifade edilir. Absorbans(A),

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

ϵ : Çözünen maddeye ve dalga boyuna bağlı molar absorptivite katsayısı (L/mol.cm)

l: Işığın çözelti içinde aldığı yol (cm)

C: Çözeltinin derişimi (mol/L)

l sabit tutulduğunda, a, ϵ ve l'yi içeren orantı katsayısı olmak üzere Lambert-Beer ifadesi şu şekilde yazılabilir: $A = a \cdot C$

Önceki durumda da absorbans, çözelti derişimi ile orantılı olup absorbansın derişimle değişimini veren grafik orjinden geçen ve eğimi a'ya eşit olan bir doğru şeklindedir.

Bilinen artan derişimlerdeki çözeltilerin absorbansları ölçülüp, derişim absorbans grafiği çizerek bir kalibrasyon doğrusu elde edilir. Bilinmeyen derişimdeki maddenin aynı şartlarda absorbansı okunarak kalibrasyon doğrusu yardımıyla derişimi bulunabilir¹⁸.

UV Spektroskopisinin Nicel Kullanımı

Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektrometrisi, kimyacıların nicel analizlerde en çok yararlandıkları yöntemlerden biridir. Spektrofotometrik ve fotometrik yöntemlerin başlıca özellikleri:

Yaygın uygulanabilirlik: Pek çok sayıda inorganik, organik ve biyokimyasal madde, ultraviyole ve görünür ışınları absorplar ve bu yüzden doğrudan nicel tayinleri mümkündür. Pek çok madde de, kendisi absorpsiyon yapmasa da absorplayıcı türevlere dönüştürülerek tayin edilebilir. Klinik laboratuvarlarda yapılan analizlerin %90'ı ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisine dayanmaktadır.

Hassasiyet: Absorpsiyon spektroskopisinin tipik tayin sınırları $10^{-4}M$ - $10^{-5}M$ arasındadır, işlemlerde bazı iyileştirmelerle bu sınırların $10^{-6}M$ 'a, hatta $10^{-7}M$ 'a indirilmesi de mümkündür.

Orta yüksek seçicilik: Analitin tek başına absorpsiyon yaptığı bir dalga boyu bulunabilirse, ön ayırmalara gerek kalmaz. Ayrıca, kimi hallerde, başka bir maddenin absorbansı ile analitinki örtüşse bile, başka dalga boylarında da ölçüm yapılarak bir ayırma işleminden kaçınılabılır.

Yüksek doğruluk: Ultraviyole/görünür bölge spektrofotometrik veya fotometrik ölçümleri sonucu elde edilen derişim değerlerinin bağıl hatası %1-5 arasındadır. Özel önlemler alınarak bu hatalar binde birkaç mertebesine indirilebilir.

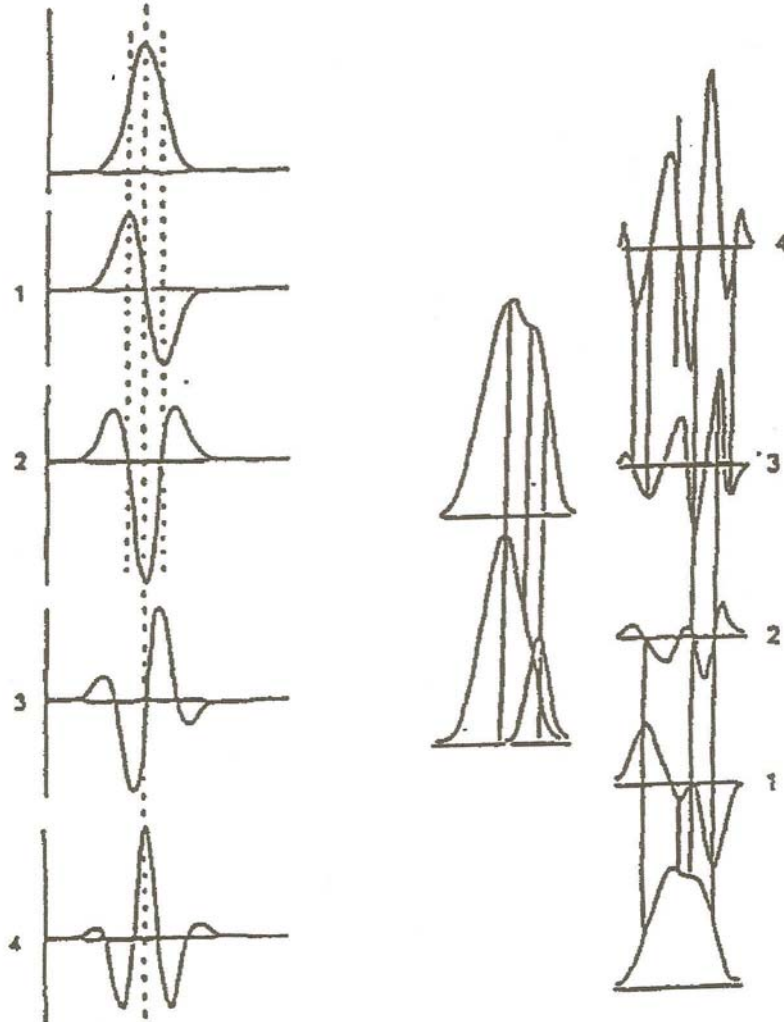
Kolaylık ve rahatlık: Modern cihazlarla, spektrofotometrik ve fotometrik ölçümler kolaylıkla ve hızlı bir şekilde yapılabilir. Ayrıca bu yöntemler otomasyona da uygundur¹⁸.

II.5.1.1. UV Türev Spektroskopisi

x bağımsız, y bağımlı değişken olmak üzere, bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi dx/dy 'dir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda türev $dA/d\lambda$ olacaktır. Spektrumun her bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp dalga boyunun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde 2.,3.,...n. türev spektrumları sırasıyla $d^2A/d\lambda^2$, $d^3A/d\lambda^3$, $d^nA/d\lambda^n$ değerleri ile dalga boyları arasında oluşturulabilir. Şekil 1'de basit bir pikin 1. 2. 3. ve 4. türev spektrumları verilmiştir. Pikin birinci türevi alındığında yükselen bölgeler pozitif, inen bölgeler negatif pikler oluşturmakta, dönüm noktalarının bulunduğu dalga boylarında ekstremumlar oluşmakta, orijinal pikteki ekstremumların karşılığı olan dalga boylarında ise türev eğrisi sıfırdan geçmektedir. Orijinal spektrumdaki bir pike karşılık n. türev spektrumunda n+1 adet pik oluşmakta, türevin derecesi arttıkça pikler keskinleşmekte ve daralmaktadır. Orjinal spektrumda absorpsiyon maksimumunun bulunduğu dalga boyunda 2. türev spektrumunda bir minimum, 4. türev spektrumunda bir maksimum ortaya çıkmakta, 1. ve 3. türev spektrumları ise bu dalga boyunda sıfırdan geçmektedir. Türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla ayırıcılık (rezolüsyon) artmaktadır. Bundan spektral ayrıntıların aydınlatılmasında yararlanır, bu durum da saflık testleri ve teşhiste önemlidir. Orjinal spektrumda bulunan omuzlar tek sayılı türev spektrumlarında ekstremumlara dönüşmektedir. Bu durumdan ise çakışan piklerin çözümlenmesinde yararlanır. Şekil 2'de görüldüğü gibi iki maddenin absorpsiyon pikleri üst üste geldiği zaman orijinal spektrumda küçük pik omuz şeklinde görülür. Bu omuzdan tek dereceli türev spektrumlarında oluşan ekstremumlar her iki maddenin diğerinin etkisi olmaksızın nicel tayinine olanak sağlar. Bu durum eser analizlerde önemlidir.

Absorpsiyon spektrumunda herhangi bir dalga boyunda Lambert Beer yasası geçerli ise n. dereceden türev spektrumunda türev türev absorbansı, D_n aşağıdaki eşitlik ile verilebilir.

$$D_n = d^n A / \lambda^n = (d^n \epsilon / \lambda^n) l \cdot C$$



Şekil 1. Türev Spektrumları Şekil 2. Örtüşen Piklerin Türev Spektrumlarında Ayrılımları

Görüldüğü gibi Lambert-Beer yasasının geçerli olması koşuluyla türev absorbans değerleri ile derişim arasında doğrusal bir ilişki vardır. Türev spektrofotometrisi ile kantitatif analizin temelini bu eşitlik oluşturur. Direkt spektrofotometride derişim ile absorbans arasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri türev spektrofotometrisinde standart çözeltilerin derişimi (C) ile karşılık olan türev absorbans değerleri (Dn) arasında çizilir.

Türev absorbans değerlerinin ölçülmesinde çeşitli teknikler uygulanmaktadır.:

Tanjant Tekniği: Birbirini izleyen iki maksimum ya da iki minimuma ortak teğet çizilir. Bu teğetin aradaki ekstremuma olan uzaklığı ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik, doğrusal bir zemin olduğu zaman daha tatminkar sonuçlar verir ve zeminin spesifik olmayan etkilerinin elimine edilmesinde ya da azaltılmasında yararlıdır.

Pik-Pik Tekniği: Birbirini izleyen iki ekstremum arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülür. Bu teknik genellikle zemin absorbansının giderilmesinde, çok bileşenli karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.

Pik-Sıfır Tekniği: Peak-zero ya da zero-crossing tekniği olarak adlandırılan bu teknik pik tepesinin absise olan uzaklığının ordinata paralel olarak ölçülmesidir. Çok bileşenli karışımların analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Zemin etkisinin giderilmesinde yararı olmaz.

Pik-Pik Oranı Tekniği: Birbirine komşu iki pikin oranı alınır. Bu teknik ikili karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır¹⁹.

UV-Türev Spektrofotometrisinin Avantajları ve Kullanım Alanları

Maksimum Absorpsiyon Dalga Boyunun Kesin Olarak Belirlenmesi: Özellikle geniş absorpsiyon bantlarının bulunduğu absorpsiyon spektrumlarında absorpsiyonun maksimum olduğu dalga boyunun kesin bir şekilde saptanmasında 1. türev spektrumu çok yararlıdır. Orijinal spektrumda λ_{max} 'un bulunduğu dalga boyunda 1.türev eğrisi sıfırdan geçeceği için bu dalga boyu çok daha kesin bir şekilde kolayca saptanabilir.

Rezolüsyonda Artış: Türev spektrumlarının ikinci avantajı da orjinal spektrumda zor görülebilen spektral ayrıntıların ortaya çıkması yani ayıricılığın artmasıdır. Bunun için çift sayılı türev spektrumları daha avantajlıdır. Çünkü orjinal spektrumda bulunan maksimum ve minimumlar bu spektrumlarda yine aynı dalga boylarında birer ekstremum halinde ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde türev spektrumlarının alınması ile spektral ayrıntıların netleştirilmesi tanıma, saflık testleri ve eser analizde çok yararlı olmaktadır.

Teşhis: Özellikle absorpsiyonu görünür bölgede olan renkli maddelerin absorpsiyon spektrumlarının geniş bantlar halinde olduğu için bu spektrumlar maddenin karakterizasyonu ve saptanmasında önem taşımaz. Buna karşın orijinal spektrumdaki omuzların türev spektrumlarında, özellikle yüksek dereceli olanlarda ekstremum haline dönüşmesi, piklerin sayısının artması ve keskinleşmesi ile spektral ayrıntılar ortaya çıkar ve infrared parmak izi spektrumlarına benzeyen spesifik spektrumlar elde edilir. Bu şekilde absorpsiyon spektrumları birbirine çok benzeyen benzer kimyasal yapıdaki bileşiklerin türev spektrumlarının alınması bunların farklılandırılmasına olanak sağlar.

Saflık Kontrolü: Türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar maddelerin saflık testlerinde de avantaj sağlamaktadır. Eser miktardaki safsızlıklara ait küçük absorpsiyon pikleri türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür. Test edilen numune spektrumlarının, saf

maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumlarıyla karşılaştırılmasıyla ham madde, ara ürün ve nihai ürünlerde saflık kontrolü yapılır.

Eser Analiz: İlaç maddeleri, besinler vb. maddelerde bulunabilen eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarlarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır.

Karışımların Bir Arada Analizi: Türev Spektrofotometrisinin oldukça yaygın bir kullanım alanı da absorpsiyon bantları çakışan ve bu sebeple bir ön ayırma yapmaksızın doğrudan tayin edilemeyen karışımların eş zamanlı analizidir. Bu analizlerde pik-sıfır, pik-pik ve pik-pik oranı teknikleri kullanılmaktadır. Her üç teknikte de kalibrasyon eğrileri, derişim ile bu parametrelerden biri arasında hazırlanır. Burada önemli nokta standart ve bilinmeyen çözeltilerin spektrumlarının aynı enstrümantal parametrelerle alınmasıdır.

Bulanık Çözeltilerde Nicel Analiz: Bulanık çözeltiler ve süspansiyon veya emülsiyon şeklindeki çözeltilerde spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur. Özellikle ultraviyole alanda ışın saçılması sebebiyle analitin spektrumu kuvvetli ya da zayıf bir zemin absorpsiyonu ile örtüşür. Bulanıklığın sebep olduğu geniş bantlı zemin absorpsiyonu dalga boyu ile hafif bir derişim gösterir. Türev spektrumlarındaki karakteristik pik-pik mesafeleri değerlendirilerek bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi yok edilebilir.

Matriks Etkisinin Giderilmesi: Türev spektrumları alınması ile orjinal spektrumdaki keskin spektral özellikler kuvvetlenmekte buna karşın geniş ve yaygın bantlar daha da basıklaşmaktadır. Bu özellik analit piki ile çakışan derişken zemin absorpsiyonunun düzeltilmesine ve bu şekilde matriks etkisinin giderilmesine olanak sağlar^{18,19}.

II.5.2. Kromatografi

Kromatografi, kompleks karışımlarda bulunan bileşenleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Tüm kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı (ya da süperkritik bir akışkan) olan bir mobil faz ile taşınır. Bu mobil faz, bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş (ve kendisiyle karışmayan) bir sabit faz içinden geçmeye zorlanır. Sabit ve mobil fazlar, numune bileşenlerinin bu fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Kromatografik ayırma sırasında sabit faz tarafından kuvvetle tutunan numune bileşenleri, mobil fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, sabit faz tarafından zayıfça tutunan bileşenler, hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen farklı bantlar ve bölgeler şeklinde ayrılırlar.

Kromatografik yöntemler için çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Bu sınıflandırmalardan birinde hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildikleri esas alınır. **Kolon kromatografide** sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz yer çekimi veya basınç etkisiyle bu kolondan geçirilir. **Düzlemsel kromatografide** ise, sabit faz düz bir yüzeyde veya bir kağıdın gözenekleri arasında tutulur. Bu durumda hareketli faz, sabit faz üzerinde kılcal etki veya yerçekimi etkisi ile hareket eder.

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması, kullanılan sabit ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelere göre yapılır: **Sıvı kromatografi**, **gaz kromatografi** ve **süperkritik akışkanlı kromatografi**¹⁸.

Kromatogramlar

Analitlerin derişimi ile orantılı bir cevap verebilen bir dedektör, kolon çıkışına yerleştirilirse ve dedektör sinyali zamanın veya hareketli faz hacminin bir fonksiyonu olarak kaydedilirse pikler elde edilir. Kromatogram olarak adlandırılan bu grafikler, hem kalitatif hem de kantitatif analiz için kullanılır. Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerinin kalitatif tayininde kullanılır, pik yükseklikleri veya pik alanları ise her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür.

Dağılma Sabitleri (Kromatografide Partisyon Oranları)

Çoğu zaman kromatografide dağılma dengeleri, analitin hareketli ve sabit fazlar arasında dağılma (partisyon) derecesi ile ilgili nispeten basit eşitliklerle tanımlanır. Bu nedenle bir A çözünüeni için

$$A_{\text{hareketli}} = A_{\text{sabit}} \text{ yazılabilir.}$$

Bu reaksiyonun denge sabiti K'ya **Dağılma sabiti** veya **Partisyon katsayısı** denir.

$$K = \frac{C_s}{C_M} \text{ şeklinde gösterilir.}$$

Burada C_s , analitin sabit fazdaki molar konsantrasyonu, C_M ise hareketli fazdaki molar konsantrasyonudur. K, geniş bir analit derişim aralığında sabittir, bu nedenle C_s , C_M ile doğru orantılıdır. Bu eşitliğin geçerli olduğu kromatografiye *doğrusal kromatografi* denir ve simetrik Gauss tipi pikler verir.

Alıkonma Zamanı

Numune enjeksiyonundan sonra analit pikinin dedektöre ulaşması için geçen zamana **alıkonma zamanı** denir ve t_R sembolü ile gösterilir. Çoğu zaman numune veya hareketli faz kolonda tutunmayan bir tür içerir. Kolonda tutunmayan maddenin dedektöre ulaşması için geçen zamana ölü zaman (t_M) denir. Tutunmayan türlerin göç hızı, hareketli faz moleküllerinin ortalama hareket hızına eşittir.

Analitin Göç Hızı: Kapasite Faktörü (k') (Alıkonma Faktörü)

Bir A analiti için Kapasite faktörü, k_A' ,

$$k_A' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{eşitliği ile tanımlanır.}$$

t_R ve t_M , kromatogramdan kolaylıkla bulunabilir. İdeal ayrımlar, karışımdaki analitler için, k' değerlerinin 1 ile 5 arasında olmasını sağlayacak şekilde yapılır.

Bağıl Göç Hızları: Seçicilik Faktörü

A ve B gibi iki tür için bir kolonun seçicilik Faktörü (α)

$$\alpha = \frac{k_B'}{k_A'} \quad (k_A' \text{ ve } k_B' \text{ sırasıyla A ve B için kapasite faktörleridir})$$

k' değerleri t_R ve t_M cinsinden yazılarak α 'nın deneysel kromatogramdan hesaplanabileceği bir bağıntı elde edilir.

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Kolon Verimliliği: Kromatografik kolon verimliliğinin kantitatif bir ölçüsü olarak genellikle birbirleri ile ilgili iki terim kullanılmaktadır: (1) **Tabaka yüksekliği, H** ve (2) **Tabaka sayısı, N**. Bu iki terim arasında

$$N = \frac{L}{H}$$

ilişkisi vardır. Bu ilişkide L, kolonun uzunluğudur (genellikle cm.). Kromatografik kolonun verimliliği tabaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça artar.

Tabaka yüksekliği ve teorik tabaka sayısı terimleri Martin ve Synges'in teorik çalışmalarında açıklanmıştır. Bu çalışmada kromatografik kolon, teorik tabaka olarak adlandırılan, birbirini izleyen, fakat ayrı ince tabakalardan oluşmuş bir damıtma kolonuna benzermiş gibi düşünülmüştür.

Her bir tabakada, analitin sabit ve hareketli fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilir.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Böylece N, iki zaman ölçümü (t_R ve W) ile hesaplanabilir. H'ı hesaplayabilmek için kolon uzunluğu (L) de bilinmelidir.

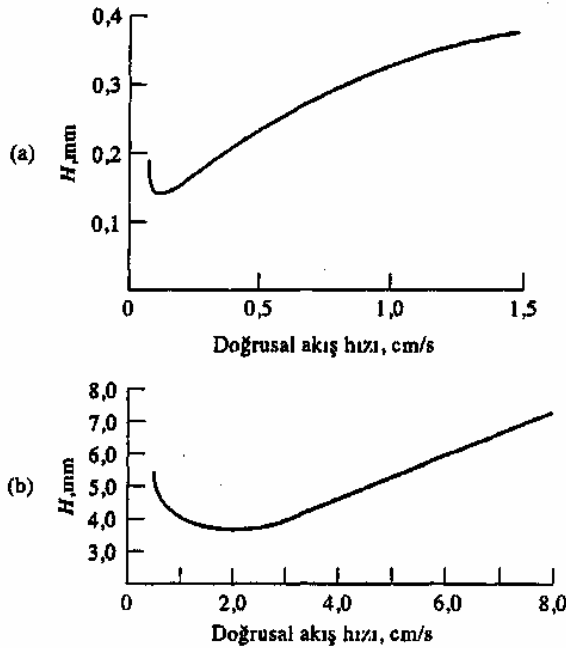
Bir diğer formül ise;

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

$W_{1/2}$ eşitliği ile verilir.

Hareketli Faz Akış Hızının Kolon Verimliliğine Etkisi

Kinetik etkilerin kolon verimliliğine etkisi, hareketli fazın sabit fazla temas ettiği sürenin uzunluğuna, bu da hareketli fazın akış hızına bağlıdır. Bu nedenle verim incelemeleri genellikle hareketli faz hızı u'nun bir fonksiyonu olarak H'nin tayinine dayanır. Bu tür çalışmalardan elde edilen tipik sonuçlar, Şekil 3'deki iki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3. Hareketli faz akış hızının (u) tabaka yüksekliğine (H) etkisi
a)Sıvı kromatografide b)Gaz kromatografide

Her iki grafik de düşük akış hızlarında bir minimum H değeri (veya maksimum verimlilik) gösterir. Sıvı kromatografideki minimum, gaz kromatografideki minimuma göre çok daha küçük akış hızlarında görülür ve çok küçük olması nedeniyle çoğu zaman normal çalışma koşullarında gözlenemez. H'ın u'ya karşı grafiği *Van Deemter* grafiği olarak adlandırılır. Şekil 3.de görüldüğü gibi, sıvı kromatografide akış hızları gaz kromatografidekine göre oldukça düşüktür. Bu nedenle gaz kromatografik ayırmalar, sıvı kromatografik ayırmalara göre genellikle daha kısa sürede tamamlanır. Ayrıca, şekilde görüldüğü gibi, sıvı kromatografi kolonunda karşılaşılan tabaka yükseklikleri gaz kromatografi kolonunda karşılaşılanlara göre bir ondalık mertebesi veya daha da küçüktür. Ancak, bu avantaja karşılık, yaklaşık 25-50 cm.den uzun sıvı kromatografi kolonu kullanmak pratik değildir, buna karşılık gaz kromatografide 50 m veya daha uzun kolonlar kullanılabilir. Böylece, toplam tabaka sayısı ve bunun sonucu tüm kolonun verimliliği genellikle gaz kromatografik kolonlarda daha iyidir. Böylece, gaz kromatografi ve sıvı kromatografinin bir kıyaslaması yapılırsa, gaz kromatografi daha hızlı ve daha yüksek verimli ayırma yapabilir, ancak bu iki üstünlük aynı anda bulunmayabilir.

Tabaka Yüksekliği ile Kolon Değişkenleri Arasındaki İlişki

Kromatografik kolon davranışlarına matematiksel yaklaşım, 1950'li yıllarda Hollandalı kimya mühendisinin Van Deemter eşitliğinin bulunması ile sonuçlanan incelemeleri ile başlamıştır. Bu eşitlik,

$$H = A + B/u + C u$$

$$H = A + B/u + (C_s + C_M)$$

şeklinde yazılabilir. Bu eşitlikte H cm olarak tabaka yüksekliği, u saniyede cm olarak hareketli fazın doğrusal hızı ve A, B ve C sıra ile çoklu akış yolları, boyuna difüzyon ve fazlar arasında kütle aktarım olayları ile ilgili katsayılarıdır. Sağda gösterildiği gibi, C katsayısı biri sabit fazla ilgili (C_s) ve diğeri hareketli fazla ilgili (C_M) olan iki katsayıya ayrılabilir¹⁸.

Kolon Ayırma Gücü

Bir kolon ayırma gücü (R_s), kolonun iki analiti ayırabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Kolon ayırma gücü,

$$R_s = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad \text{olarak tanımlanır.}$$

Kapasite ve Seçicilik Faktörlerinin Ayırma Gücüne Etkisi

Kolon ayırma gücü (R_s) ile iki analit için kapasite faktörleri (k'_A) ve (k'_B), seçicilik faktörü (α) ve kolonu oluşturan tabaka sayısı N arasında matematiksel bir ilişki kurmak amacıyla $W_A = W_B \approx W$ olduğu varsayılabilecek kadar alıkonma süreleri birbirine yakın olan A ve B analitleri ile çalışıldığı varsayılarak aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

Çalışmalarda genellikle istenen ayırma gücünü sağlamak için gerekli olan teorik tabaka sayısının hesaplanması gerekir. Bunun için yukarıdaki eşitlik yeniden düzenlenerek yeni bir eşitlik elde edilir:

$$N = 16 R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$$

Bazen ayırmaları güçleştirecek kadar dağılma sabitleri yakın olan iki analite yukarıdaki son iki eşitliğin basitleştirilmiş şekillerinin uygulandığı görülür. Böylece $K_A \approx K_B$ olduğunda, $\alpha = K_B/K_A$ eşitliği gereğince $k'_A \approx k'_B = k'$ olur. Bu yaklaşımlarla yukarıdaki eşitlikler

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)$$
$$N = 16 R_s^2 \left(\frac{1}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'}{k'} \right)^2$$

şeklinde basitleştirilir. Buradaki k' değeri, k'_A ve k'_B nin ortalamasıdır.

Alıkonma Zamanına Ayırma Gücünün Etkisi

Burada $(t_R)_B$, hareketli fazın hızı u iken, B bileşenini kolonun sonuna getirmek için gereken süredir.

$$(t_R)_B = \frac{16 R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1+k_B')^3}{(k_B')^2}$$

Kolon Performansına Etki Eden Değişkenler

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B'}{1+k_B'} \right)$$

$$(t_R)_B = \frac{16 R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1+k_B')^3}{(k_B')^2}$$

eşitlikleri, kromatografi kullanıcısının amacı olan en kısa sürede net bir ayırmayı sağlayacak koşulların seçiminde rehber olmaları nedeniyle önemlidir. Bu eşitliklerin incelenmesi, her birinin üç bölümden oluştuğunu ortaya çıkarır. Bunlardan bant genişlemesi, nedeni kinetik etkilerle ilgili olan birincisi \sqrt{N} ya da H/u dan oluşur. İkinci ve üçüncü terimler, ayrılan bileşenlerin termodinamiği, yani dağılma sabitlerinin bağıl büyüklüğü ve hareketli ve sabit fazların hacimleri ile ilgilidir. Yukarıdaki eşitliklerde α içeren oran terimi, yalnızca iki analitin özelliklerine bağlı olan seçicilik terimidir. k_B' nin bölüm ifadesi olan üçüncü terim, hem analitin hem de kolonun özelliklerine bağlıdır.

İstenen ayırmayı sağlamak için optimum koşullar araştırılırken α , k' , N (veya H) gibi temel parametrelerin az ya da çok birbirinden bağımsız olarak ayarlanabileceği unutulmamalıdır. Böylece α ve k' , sıcaklığı veya hareketli faz bileşimini değiştirerek en kolay şekilde değiştirilebilir. Daha az elverişli olmakla beraber başka bir kolon dolgusu kullanılabilir. N , kolon uzunluğu değiştirilerek ve H , hareketli faz akış hızı, dolgu tanecik boyutu, hareketli faz viskozitesi ve sabit fazı oluşturan adsorplanmış sıvı film kalınlığı değiştirilerek kontrol edilebilir¹⁸.

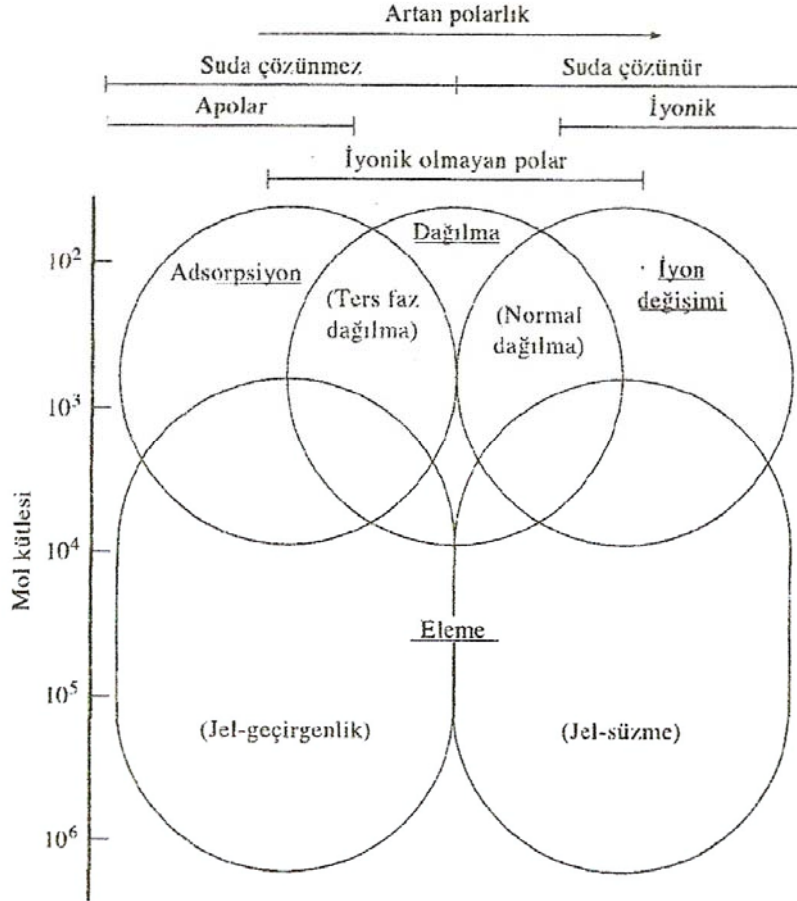
II.5.2.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografinin geliştiği ilk yıllarda, kolon veriminin, dolguda kullanılan taneciklerinin boyutunun azaltılması ile önemli ölçüde artacağı fark edildi. Ancak, tanecik çapı 3-10 µm kadar küçük olan dolgu maddelerinin üretim teknolojisinin gelişmesi ve kullanılması 1960'lı yılların son dönemlerine kadar başarısız oldu. Bu teknoloji, klasik yer çekimi-akışlı sıvı kromatografinin basit cam kolonlardaki durumun aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermektedir. **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi** (HPLC) ismi, preparatif amaçla halen kullanılan temel ayırma yöntemlerinden daha yeni işlemleri ayırt etmek için kullanılmaktadır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi dört ana başlık altında incelenir. Bunlar, **dağılma kromatografisi**, **adsorpsiyon kromatografisi**, **iyon değiştirme kromatografisi** ve **boyut eleme kromatografisi**dir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin yaygın kullanılmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve geniş bir aralıktaki maddelere uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir.

Şekil 4, sıvı kromatografi işlemlerinin uygulama alanları bakımından birbirini tamamlama eğiliminde olduğunu göstermektedir. Örneğin, mol kütlesi, 10.000 g dan daha büyük maddeler için **eleme kromatografisi** daha çok kullanılır. Daha küçük mol kütleli iyonik türler için, **iyon değiştirme kromatografisi** yaygın bir şekilde kullanılır. Küçük, polar, ancak iyonik olmayan türler için en iyi yöntem, **dağılma kromatografisi**dir. Ayrıca, bu işlem, homolog serilerin ayrılması için çoğu zaman kullanışlıdır. **Adsorpsiyon kromatografisi**, çoğu zaman polar olmayan türlerin, yapısal

izomerlerin ayrılması ve alifatik hidrokarbonlar gibi bileşik sınıflarının alifatik alkollerden ayrılması için seçilir.



Şekil 4. Sıvı Kromatografi Uygulamaları

Sıvı Kromatografi Sistemleri

1. Hareketli Faz Hazneleri
2. Pompalama Sistemleri
3. Akış Kontrolü ve Programlama Sistemleri
4. Numune Enjeksiyon Sistemleri
5. Sıvı Kromatografi Kolonları
 - Analitik Kolonlar
 - Emniyet Kolonları
 - Kolon Termostatları
6. Dedektörler¹⁸

III. MATERYAL VE YÖNTEM

III.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

UV spektrofotometresi (Shimadzu UV 160 A)
HPLC (Agilent Technologies 1200 series)
Santrifüj (Nüve Fuge CN 090)
Hassas terazi (Shimadzu xx200)
Ultrasonik Banyo (Bondelin Sonarex)
Vakum pompası

III.2. Kullanılan Kimyasallar

İzokonazol nitrat
Diflukortolon valerat
Petrolatum
Polisorbat 60
Setostearil alkol
Sorbiton stearat
Di sodyum EDTA (Aklar Kimya)
Vazelin
Etanol (Riedel-de Haen)
Metanol (Riedel-de Haen)

III.3. Kullanılan Farmasötik Preparat

Travazol krem, 15 g (%1 *İzokonazol nitrat*, %0,1 *Diflukortolon valerat* içerir).

III.4. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi için Ön Çalışmalar

III.4.1. İzokonazol nitratın UV Spektrumunun Alınması

25.0 mg standart *İzokonazol nitrat* hassas terazi ile tartıldı. Etanolde çözülüp 25.0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltilerden 1.0 mL alınıp etanol ile 10.0 mL ye seyreltildi. Böylece elde edilen 100 µg/mL'lik *İzokonazol nitrat* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

III.4.2. Diflukortolon valeratın UV Spektrumunun Alınması

2.5 mg *Diflukortolon valerat* hassas terazi ile tartıldı. Etanolde çözülüp 25.0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltilerden 1.0 mL alınıp etanol ile 10.0 mL ye seyreltildi. Böylece elde edilen 10 µg/mL'lik çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

III.4.3. İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat içeren Sentetik Karışımın UV Spektrumunun Alınması

25.0 mg *İzokonazol nitrat* hassas olarak tartıldı, etanolde çözülüp 25.0 mL ye tamamlandı. 2.5 mg *Diflukortolon valerat* hassas olarak tartıldı ve etanolde çözülüp 25.0 mL ye tamamlandı. Elde edilen 1000 µg/mL'lik *İzokonazol nitrat* ve 100 µg/mL'lik *Diflukortolon valerat* çözeltilerinden 1'er mL alınıp etanolle 10.0 mL ye tamamlandı. Bu şekilde hazırlanan 100 µg/mL *İzokonazol nitrat* ve 10 µg/mL *Diflukortolon valerat* içeren sentetik karışım çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu çekildi.

III.4.4. İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat içeren Krem Çözeltisinin UV Spektrumunun Alınması

İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat içeren kremden 2.5 g hassas olarak tartıldı. Bu krem, bir beher içinde baget yardımıyla üzerine küçük hacimlerde etanol eklenerek karıştırıldı. Böylece daha az yoğun heterojen yapıya sahip bir karışım oluşturuldu ve 10 dakika ultrasonik banyoda karıştırıldı. Beherdeki çözelti balonjojeye aktarıldı ve 25.0 ml ye etanolle tamamlandı. Bu çözeltiden 1 ml alınarak etanolle 10.0 ml ye tamamlandı. Böylece elde edilen 100 µg/ml *İzokonazol nitrat* ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* içeren krem çözeltisinin 200-400 nm aralığında UV spektrumu çekildi.

III.4.5. Kremdeki Katkı Maddelerinin Etanol İçinde UV Spektrumlarının alınması

Petrolatum: 100.0 mg Petrolatum hassas olarak tartıldı, 25.0 ml kloroformla çözüldü ve buradan 3.0 ml alındı ve etanol ile ısıtılarak 25.0 ml ye tamamlandı. Böylece elde edilen 480 µg/ml lik çözeltinin 200-400 nm. dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

Polisorbat 60: 310.0 mg polisorbat 60 hassas olarak tartıldı. Etanol ile 10.0 ml ye tamamlandı. Böylece elde edilen 31 mg/ml lik polisorbat 60 çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spekturumu alındı.

Setostearil alkol: 21.0 mg setostearil alkol alınarak 10.0 ml ye etanol ile tamamlandı. Elde edilen 2100 µg/ml'lik Setostearil alkol çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

Sorbiton stearat: 18.0 mg sorbiton stearat hassas olarak tartıldı ve 10.0 ml ye etanol ile tamamlanarak 1800 µg/ml'lik çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

Di Sodyum EDTA: 25.0 mg Di Sodyum EDTA hassas olarak tartıldı, 10.0 ml distile suda çözülerek hacme tamamlandı. Böylece elde edilen 2500 µg/ml'lik sulu çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı. Etanolik çözelti hazırlamak amacıyla ise, 100.0 mg Di Sodyum EDTA hassas olarak tartıldı, 25.0 mL distile suda ısıtılarak çözüldü. Bu çözeltiden 1.0 ml alınıp 25.00 ml.ye etanolle tamamlandı. Böylece elde edilen 160 µg/ml'lik etanollü çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

Sıvı vazelin: Sıvı vazelininden 250 µl alınarak 10.0 ml ye etanolle seyreltildi ve elde edilen 25 µg/ml'lik çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

III.4.5. İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Çalışma Dalga Boylarının Seçilmesi

100 µg/ml *İzokonazol nitrat* ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* içeren sentetik çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında alınan UV spektrumu ile tam ve hassas olarak aynı miktar, 100 µg/ml *İzokonazol nitrat* ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat*, içeren krem çözeltisinin UV spektrumları arasında fark gözlemlendi. Bu nedenle 100 µg/ml *İzokonazol nitrat* çözeltisinin, 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* çözeltisinin ve 100 µg/mL *İzokonazol nitrat* ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* içeren krem çözeltisinin 1., 2., 3. ve 4. türev spektrumları, her bir türev derecesinde 9 n değeri kullanılarak, alındı. Her bir türev derecesinde ve n değerinde elde edilen üç spektrum (*İzokonazol nitrat*, *Diflukortolon valerat* ve Krem) karşılaştırıldı. Kremde *İzokonazol nitrat* tayini için *Diflukortolon valerat* çözeltisinin türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu ve krem çözeltisinin türev absorbans değerinin *İzokonazol nitrat* çözeltisinin türev absorbans değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu, *Diflukortolon valerat* miktar tayini için de *İzokonazol nitrat* çözeltisinin türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu ve krem çözeltisinin türev absorbans değerinin *Diflukortolon valerat* çözeltisinin türev absorbans değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu araştırıldı.

III.5. Farmasötik Kremlerde *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* Miktar Tayini

III. 5. 1. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi ile Miktar Tayini

Kalibrasyon Doğrusu için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

25.0 mg standart *İzokonazol nitrat* hassas olarak tartıldı, etanolde çözülerek 25.0 ml ye tamamlandı. Böylece elde edilen 1000 µg/ml'lik *İzokonazol nitrat* çözeltisinden 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 ve 5.0 ml'lik çözeltiler alınarak etanolle 10.0'ar ml ye seyreltildi. Böylece elde edilen 100, 200, 300; 400 ve 500 µg/ml'lik *İzokonazol nitrat* çözeltilerinin 289.2 nm'deki (2. türev, n=5) türev absorbans değerleri okunarak *İzokonazol nitrat* için kalibrasyon grafiği çizildi.

25.0 mg *Diflukortolon valerat* hassas olarak tartıldı, etanolde çözülerek 25.0 ml ye tamamlandı. Buradan 125, 250, 375, 500 ve 625 µl'lik çözeltiler alınarak herbiri 10.0 ml ye etanol ile seyreltildi. Böylece elde edilen 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/ml'lik çözeltilerin 262 nm'deki (2. türev, n=9) türev absorbans değerleri okunarak *Diflukortolon valerat* için kalibrasyon grafiği çizildi.

İzokonazol nitrat ve *Diflukortolon valerat* içeren kremden 2.5 g hassas olarak tartıldı. Bu krem, bir beher içinde baget yardımıyla üzerine küçük hacimlerde etanol eklenerek karıştırıldı. Böylece daha az yoğun heterojen yapıya sahip bir karışım oluşturuldu ve 10 dakika ultrasonik banyoda karıştırıldı. Beher, etanolle yıkanarak çözelti balonjojeye aktarıldı ve 25.0 ml ye etanolle tamamlandı. Bu çözeltiden 1.0 ml alınarak etanolle 10.0 ml ye seyreltildi. Böylece elde edilen 100 µg/ml *İzokonazol nitrat* ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* içeren krem çözeltisinin 289.2 nm (2. türev, n=5) ve 262 nm (2. türev, n=9) lerdeki türev absorbans değerleri okundu ve aynı dalga boylarında çizilen kalibrasyon doğruları yardımıyla kremin içerdiği *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* miktarları hesaplandı.

III. 5. 2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Miktar Tayini

Kromatografik koşullar Kolon:
C 18 Phenomenex (250x4.6 mm) Hareketli
faz: Metanol- deiyonize su (80:20, h/h) Enjeksiyon hacmi:
25 µl Akış hızı: 1 ml/dakika
Dedeksiyon: UV, 220 nm

Kalibrasyon Doğrusu için Kullanılan Çözeltinin Hazırlanması

50.0 mg *İzokonazol nitrat* hassas olarak tartıldı ve metanolde çözülüp 25.0 ml ye tamamlandı (2000µg/ml). Buradan 75, 150, 300, 600 ve 1200µl'lik çözeltiler alınarak 10.0 ml ye mobil fazla tamamlandı. Böylece elde edilen 15, 30, 60, 120, 240 µg/ml lik çözeltiler kullanılarak *İzokonazol nitrat* için kalibrasyon doğrusu oluşturuldu.

24.0 mg *Diflukortolon valerat* hassas olarak tartıldı ve metanolde çözülüp 25.0 ml.ye tamamlandı (960µg/ml). Buradan 62.5; 125; 250; 500 ve 625 µl'lik çözeltiler alınarak 10.0 ml.ye mobil fazla tamamlandı. Böylece elde edilen 6, 12, 24, 48 ve 60 µg/ml lik çözeltiler kullanılarak *Diflukortolon valerat* için kalibrasyon doğrusu oluşturuldu.

İzokonazol nitrat ve *Diflukortolon valerat* içeren kremden 2.5 g hassas olarak tartıldı. Bu kreme, bir beherde baget yardımıyla az miktarda metanol ilavesiyle daha az yoğun heterojen bir karışım elde edildi. Bu karışım ultrasonik banyoda 10 dakika karıştırıldı ve 25.0 ml. lik balonjojeye aktararak metanolle hacme tamamlandı. Bu çözelti 10 dakika daha ultrasonik banyoda karıştırılarak kremin iyice çözünmesi sağlandı. Bu çözeltilerden 1.0 ml alınarak mobil fazla (metanol-deiyonize su, 80:20) 10.0 ml ye tamamlandı. Böylece elde edilen 100 µg/ml *İzokonazol nitrat* ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* içeren krem çözeltisi 5 dakika süre ile santrifüj edildi ve süzülerek kromatografik sisteme verildi. Elde edilen kromatogramdan pik alanları ölçülerek kalibrasyon doğruları yardımıyla kremin içerdiği *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* miktarları hesaplandı.

III.5.3. Geri Kazanım

III.5.3.1. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi ile Geri Kazanım

Kremde *İzokonazol nitrat* Geri Kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 100 µg/ml *İzokonazol nitrat* içeren krem çözeltisi üzerine 20 µg/ml stok *İzokonazol nitrat* çözeltisi eklendi. Elde edilen çözeltinin 289.2 nm (2. türev, n=5) deki türev absorbans değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon doğrularından hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Kremde *Diflukortolon valerat* Geri Kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* içeren krem çözeltisi üzerine 10 µg/ml stok *Diflukortolon valerat* çözeltisi eklendi. Elde edilen çözeltinin 262 nm (2. türev, n=9)deki türev absorbans değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon doğrularından hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

III.5.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Geri Kazanım

1.0 g krem hassas olarak tartıldı ve belirtilen koşullarda 25.0 ml metanolde çözüldü. Bu çözeltiden 2.0 şer ml alınıp üzerine 1000 µg/ml lik standart *İzokonazol nitrat* çözeltisinden 50.0 µl ve 40.0 µl, 1000 µg/ml lik standart *Diflukortolon valerat* çözeltisinden 4.0 µl ve 3.0 µl eklenerek 10.0 ar ml ye tamamlandı. Elde edilen 85 µg/ml ve 84 µg/ml lik *İzokonazol nitrat*, ve 12 µg/ml ve 11 µg/ml lik *Diflukortolon valerat* çözeltilerinin kromatogramlarından okunan pik alanı değerlerinden hareketle ilgili kalibrasyon doğrularını kullanarak % geri kazanım değerleri hesaplandı.

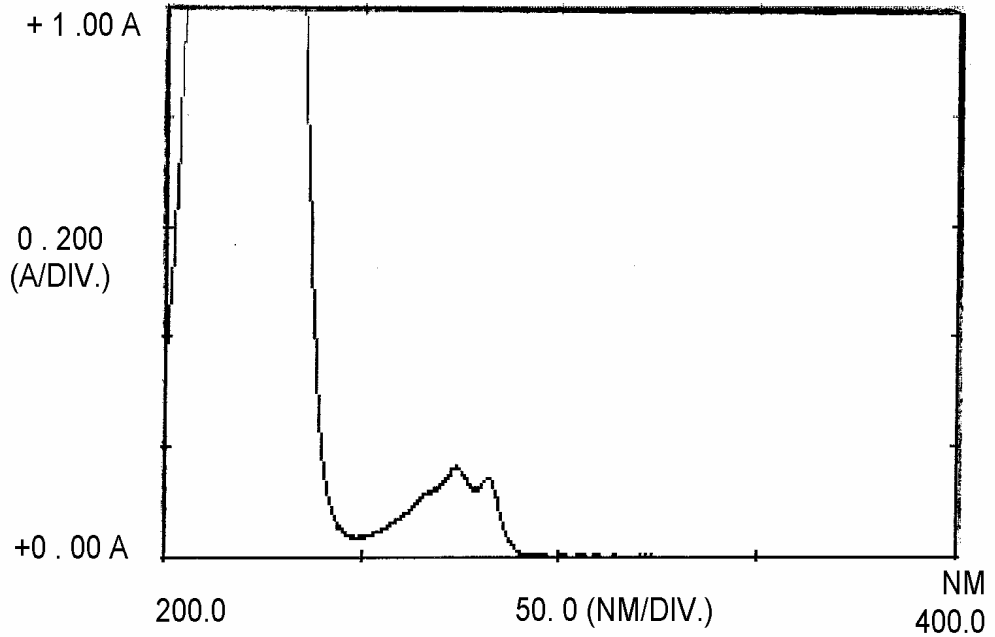
IV. BULGULAR

IV.1. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular

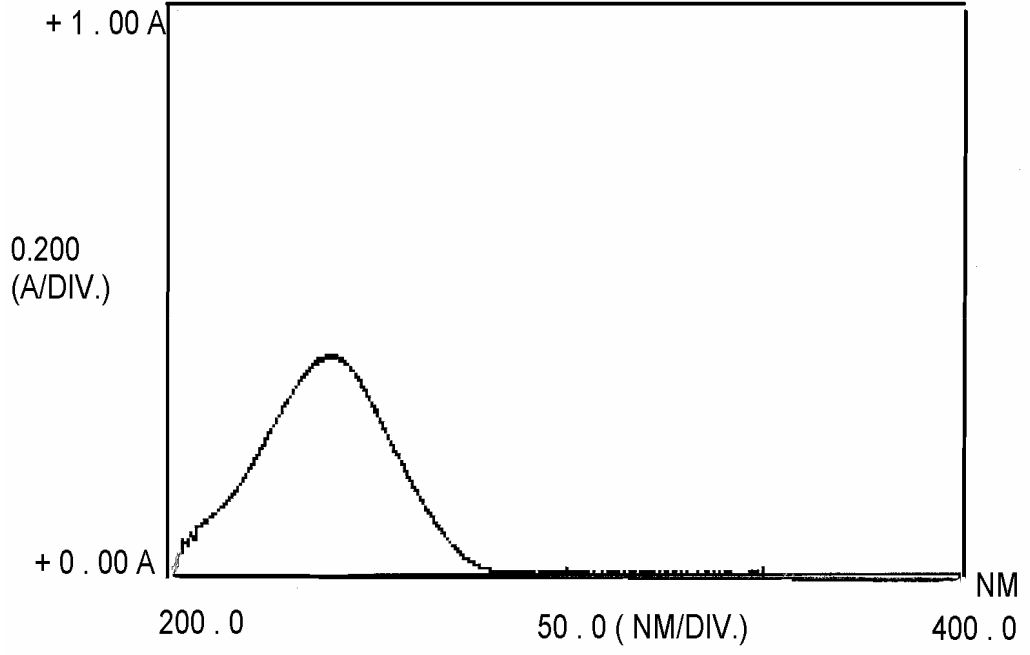
IV.1.1. Ön Çalışma Sonuçları

IV.1.1.1. İzokonazol Nitrat ve Diflukortolon valeratın UV Spektrumları

Belirtilen şekilde hazırlanan çözeltilerin spektrumları, aşağıdaki şekillerde görülmektedir.

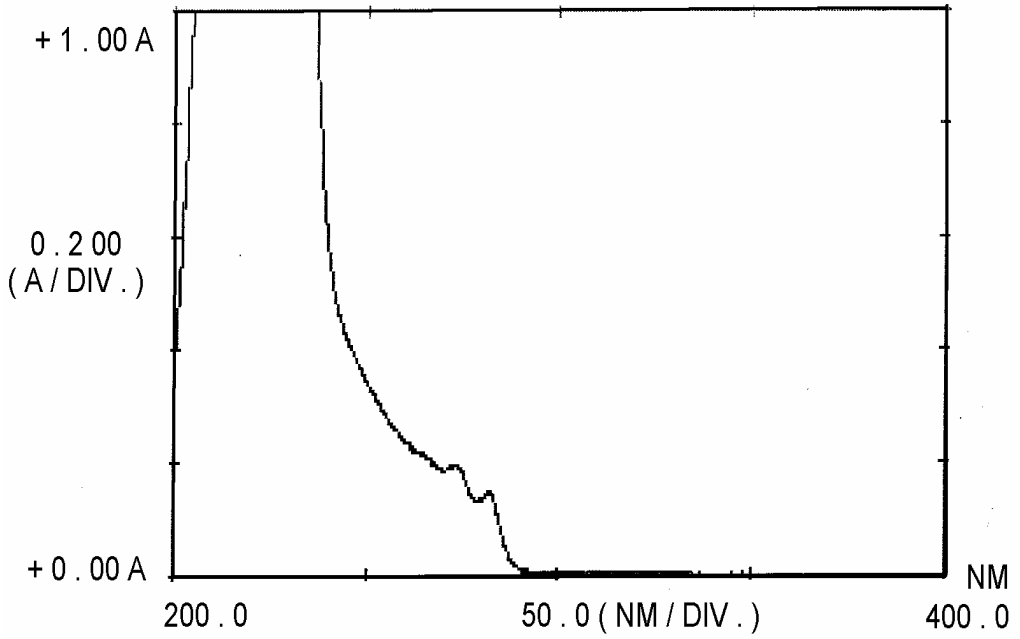


Şekil 5. İzokonazol nitratın etanolde 100 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu



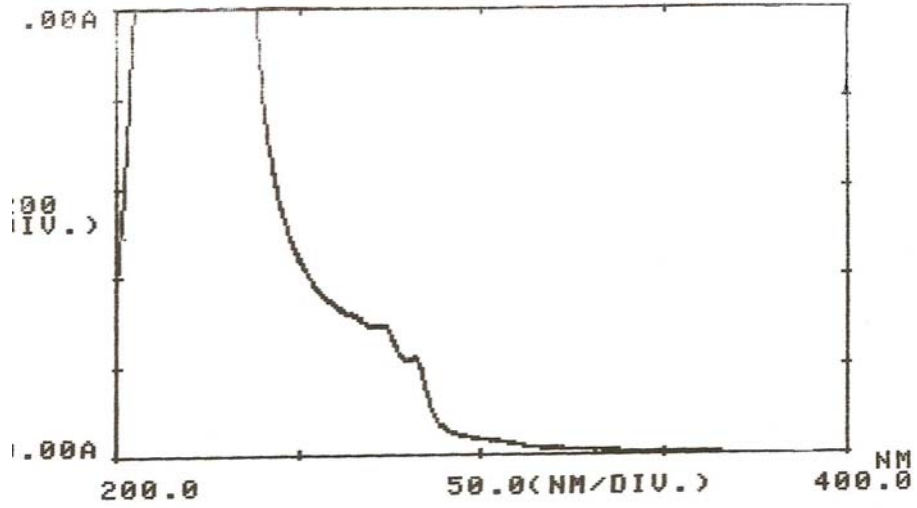
Şekil 6. Diflucortolon valeratın etanolde 10 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu

IV.1.1.2. Sentetik Karışımın UV Spektrumu



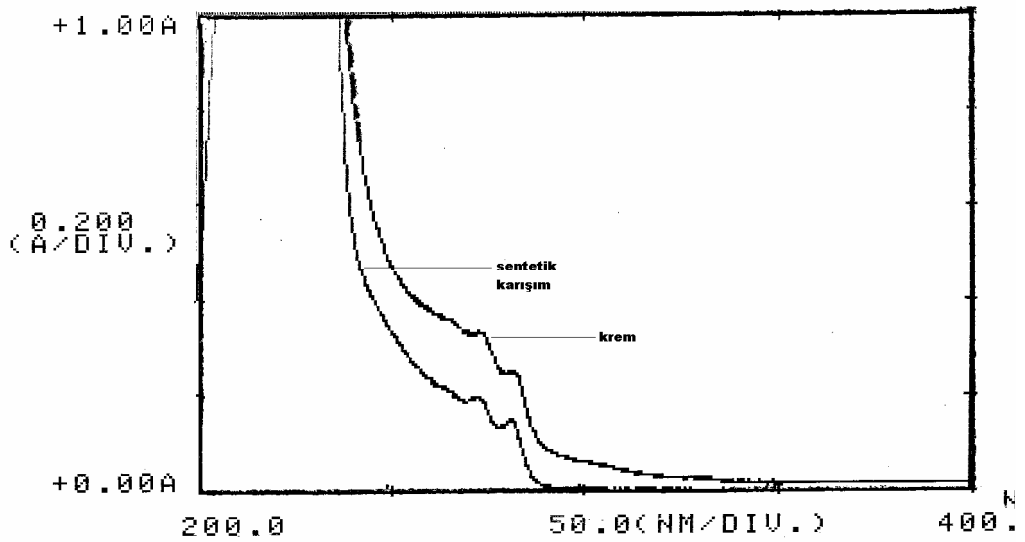
Şekil 7. 100 µg/ml İzonazol nitrat ve 10 µg/ml Diflucortolon valerat içeren etanolde hazırlanmış sentetik karışım çözeltisinin UV spektrumu

IV.1.1.2. Krem Çözeltisinin UV Spektrumu



Şekil 8. 100 µg/ml İzokonazol nitrat ve 10 µg/ml Diflukortolon valerat içeren etanolde hazırlanmış krem çözeltisinin UV spektrumu

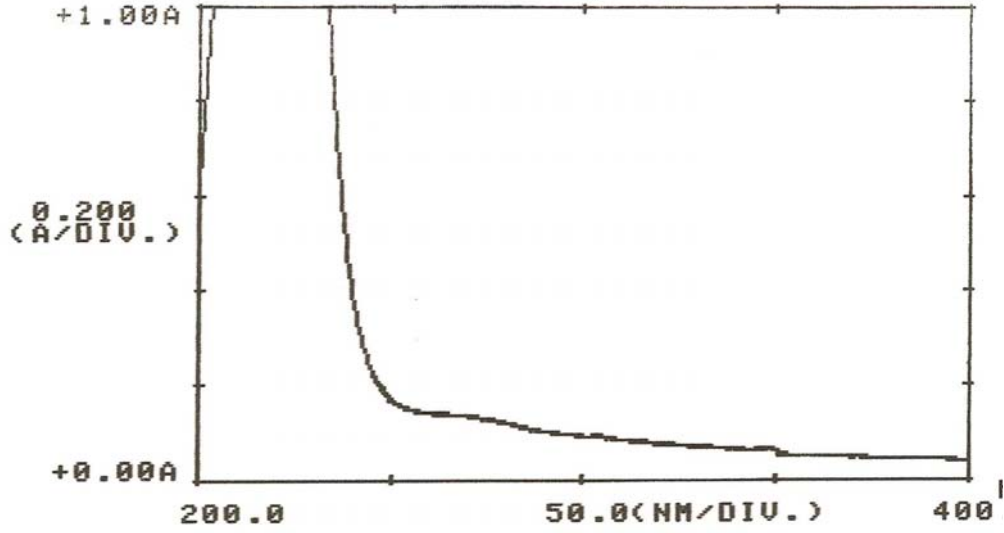
IV.1.1.3. Sentetik Karışım ve Krem Çözeltilerinin Spektrumları



Şekil 9. Aynı miktar (100 µg/ml İzokonazol nitrat ve 10 µg/ml Diflukortolon valerat) içeren etanolde hazırlanmış sentetik karışım ve krem çözeltilerinin UV Spektrumları

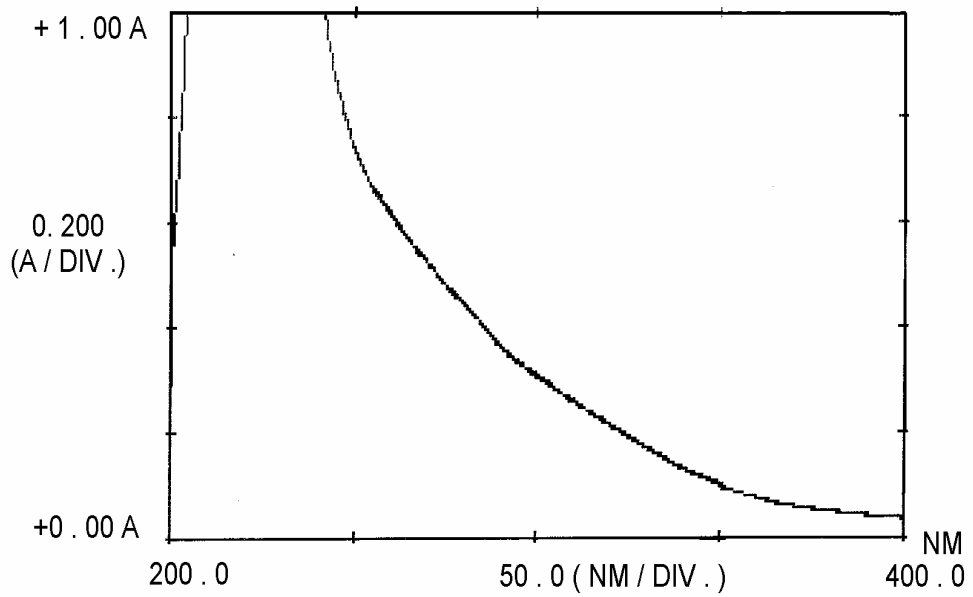
IV.1.1.4. Farmasötik Kremdeki Katkı Maddelerinin UV Spektrumları

Petrolatum



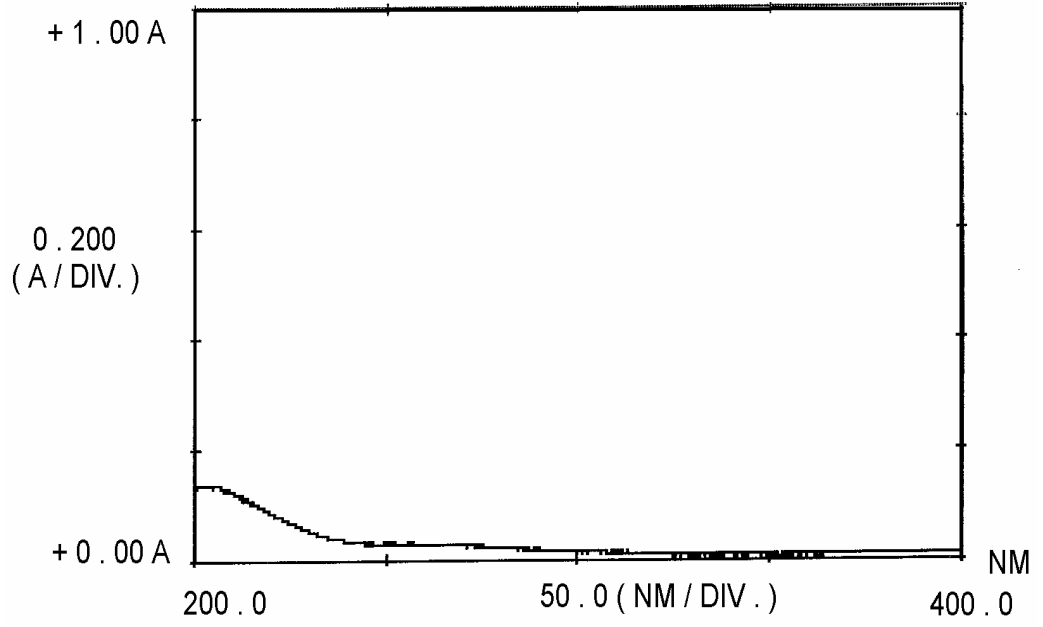
Şekil 10. Petrolatumun etanol içindeki 480 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu

Polisorbat 60



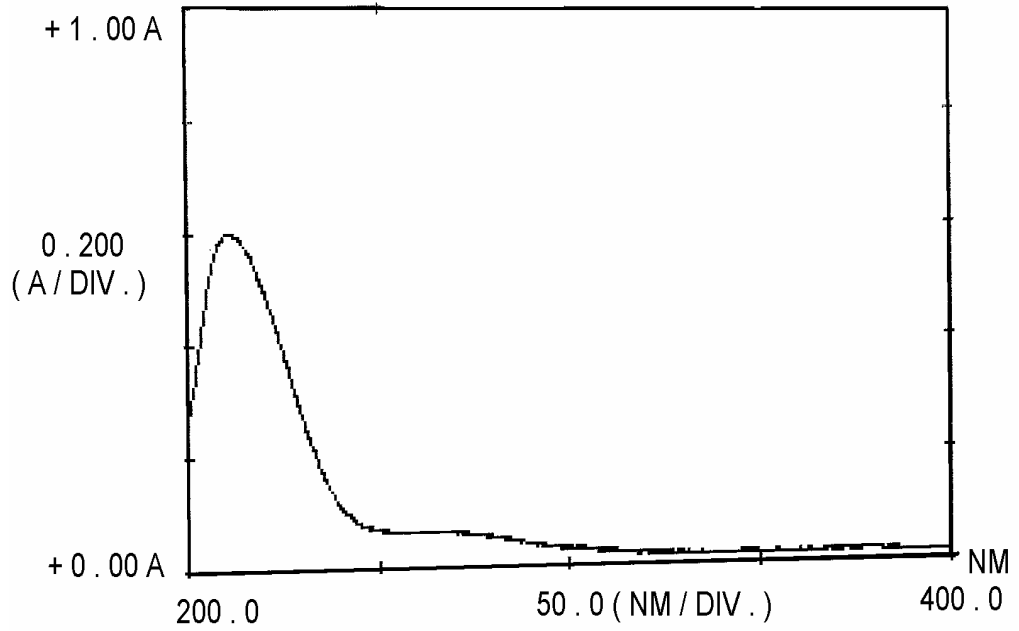
Şekil 11. Polisorbat 60'ın etanolde 31000 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu

Setostearil Alkol



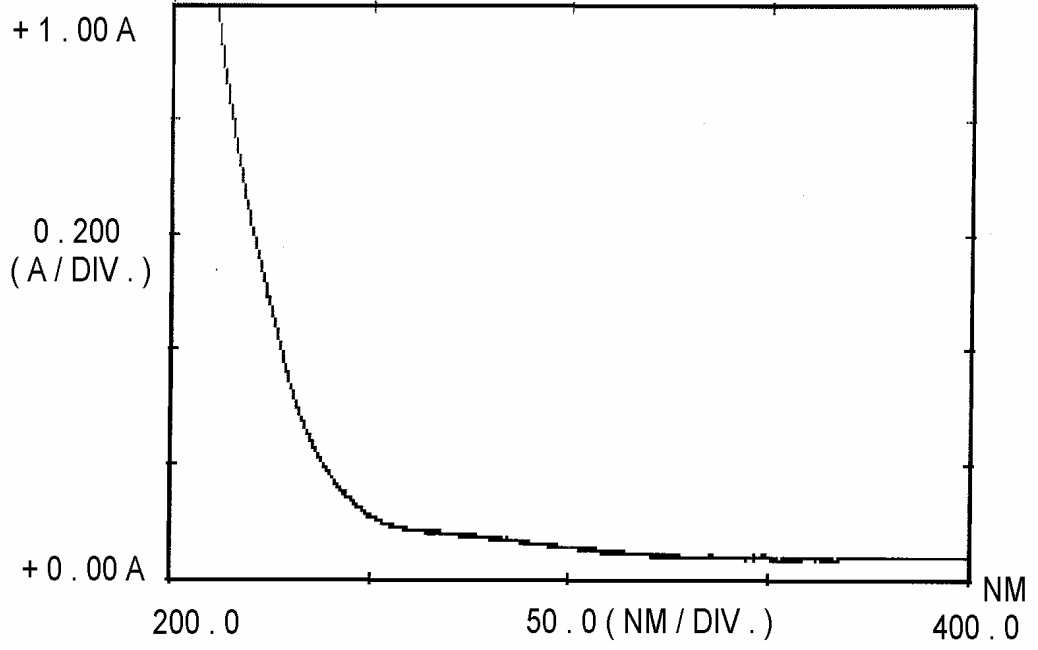
Şekil 12. Setostearil Alkol'ün etanolde 2100 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu

Sorbiton Stearat

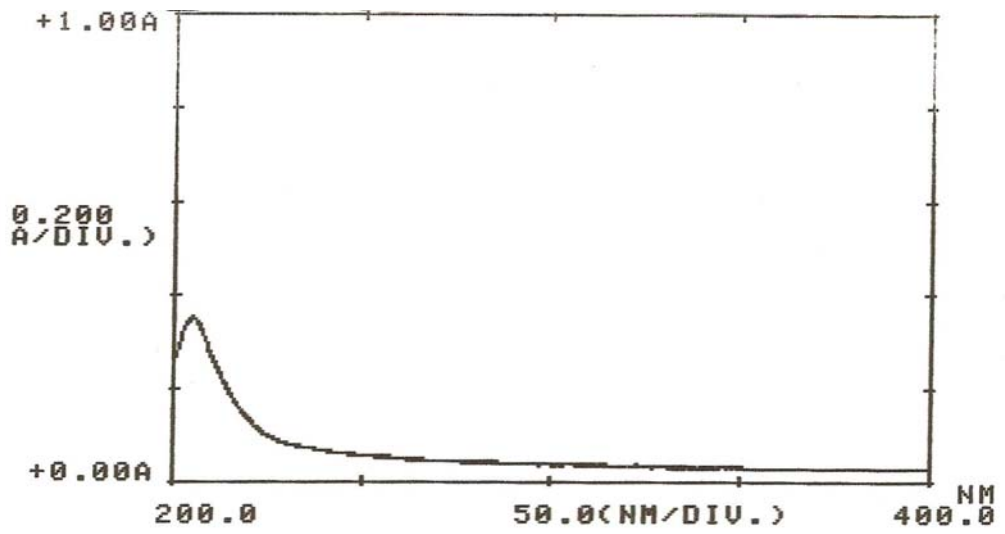


Şekil 13. Sorbiton stearat'ın etanolde 1800 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu

Di Sodyum EDTA

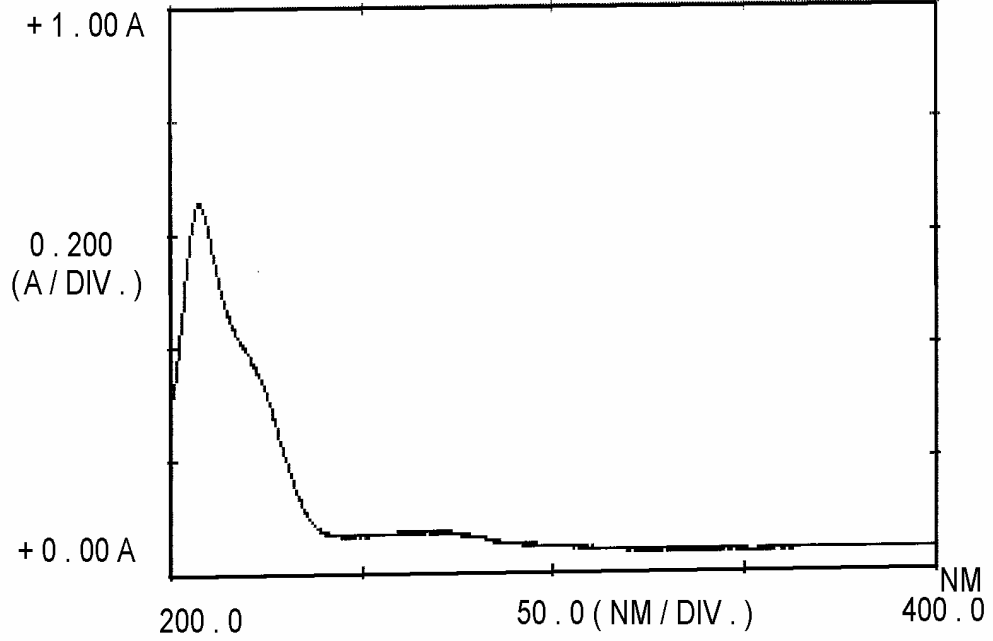


Şekil 14. Di Sodyum EDTA'nın distile suda 2500 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu



Şekil 15. Di Sodyum EDTA'nın etanolde 160 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu

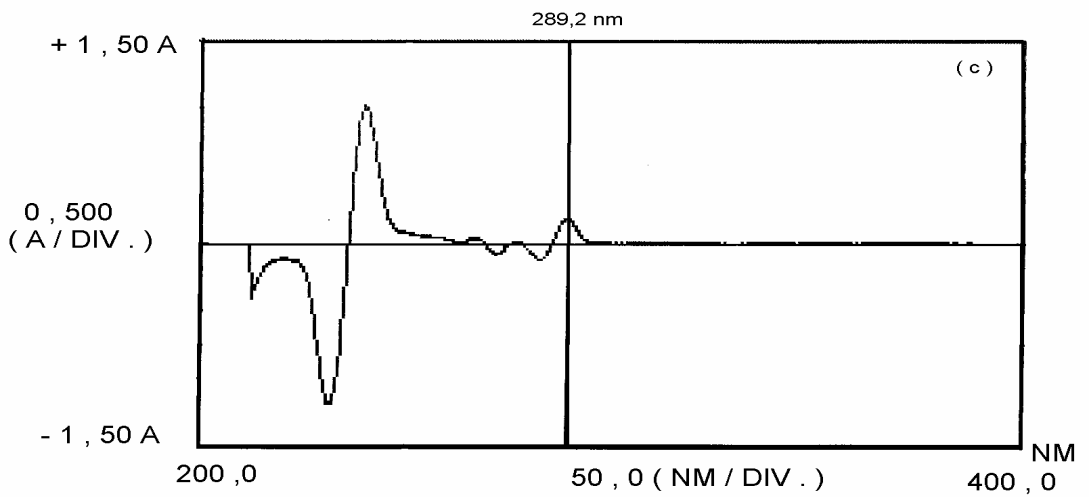
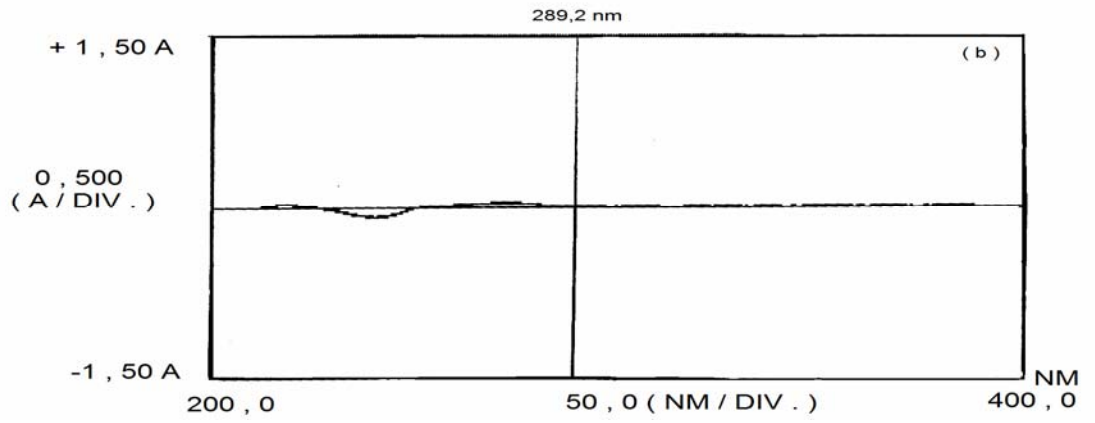
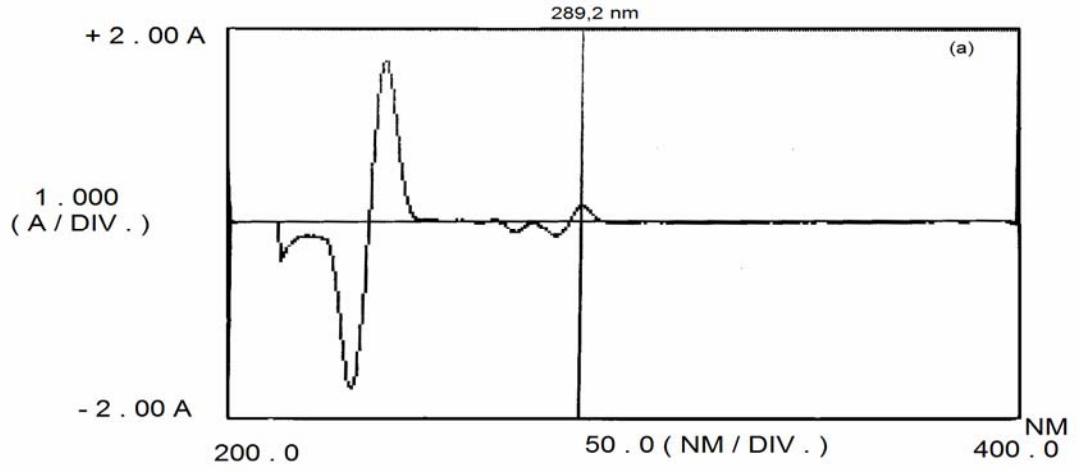
Sıvı Vazelin



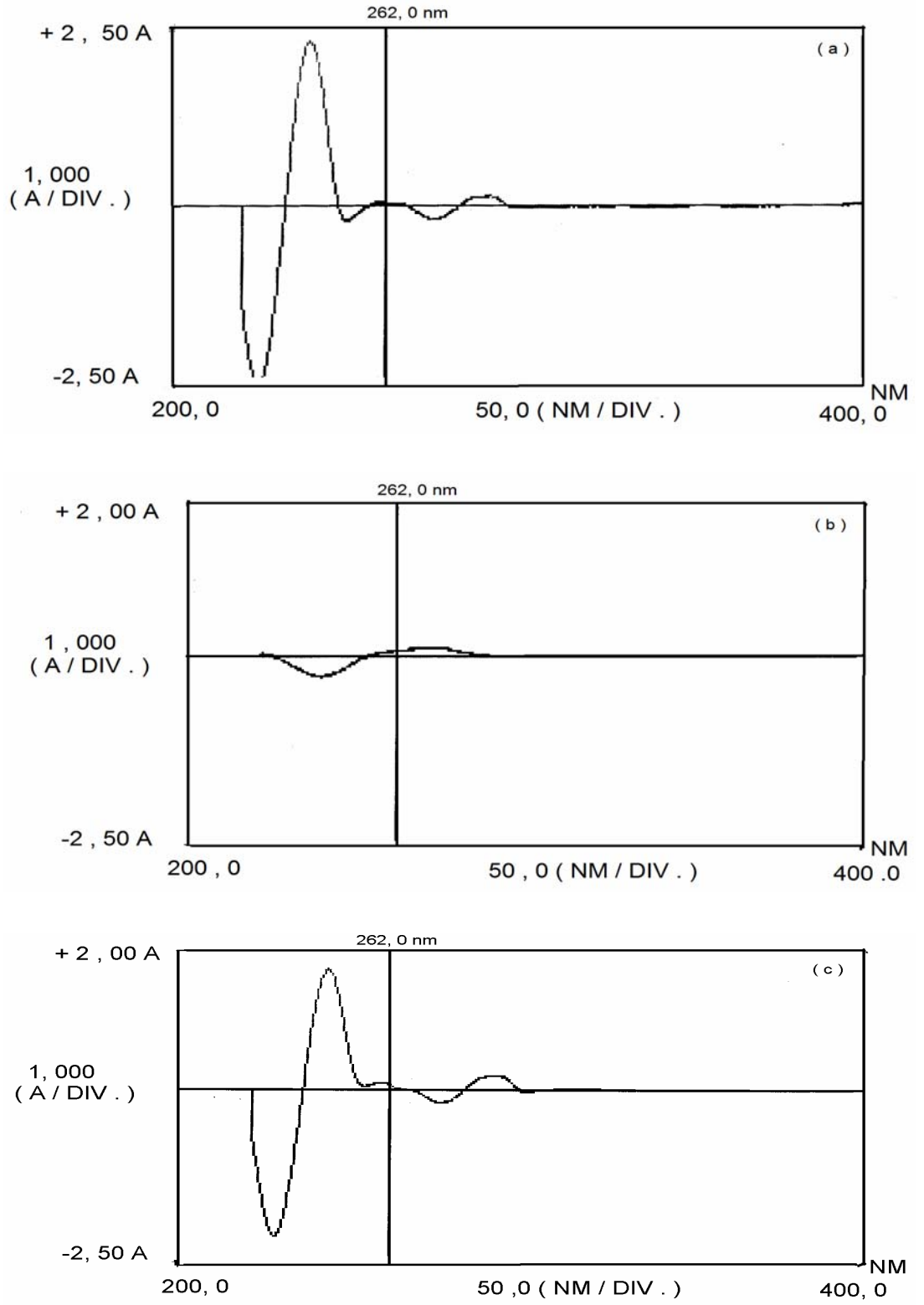
Şekil 16. Sıvı vazelinin etanolde 2500 µg/ml'lik çözeltisinin UV spektrumu

IV.1.2. Çalışma Dalga Boylarının Seçimi

100 µg/ml *İzokonazol nitrat* çözeltisi(1), 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* çözeltisi(2) ve eşdeğer miktarda *İzokonazol nitrat* (100 µg/ml) ve *Diflukortolon valerat*(10 µg/ml) içeren krem çözeltisi(3) hazırlandı. (1), (2) ve (3) no.lu çözeltilerin 2. türev (n = 5) spektrumları ve *İzokonazol nitrat* tayini için seçilen dalga boyu (289.2 nm), Şekil 17'de gösterilmiştir. (1), (2) ve (3) no.lu çözeltilerin 2. türev (n=9) spektrumları ve *Diflukortolon valerat* tayini için seçilen dalga boyu (262 nm) ise Şekil 18'de gösterilmiştir.



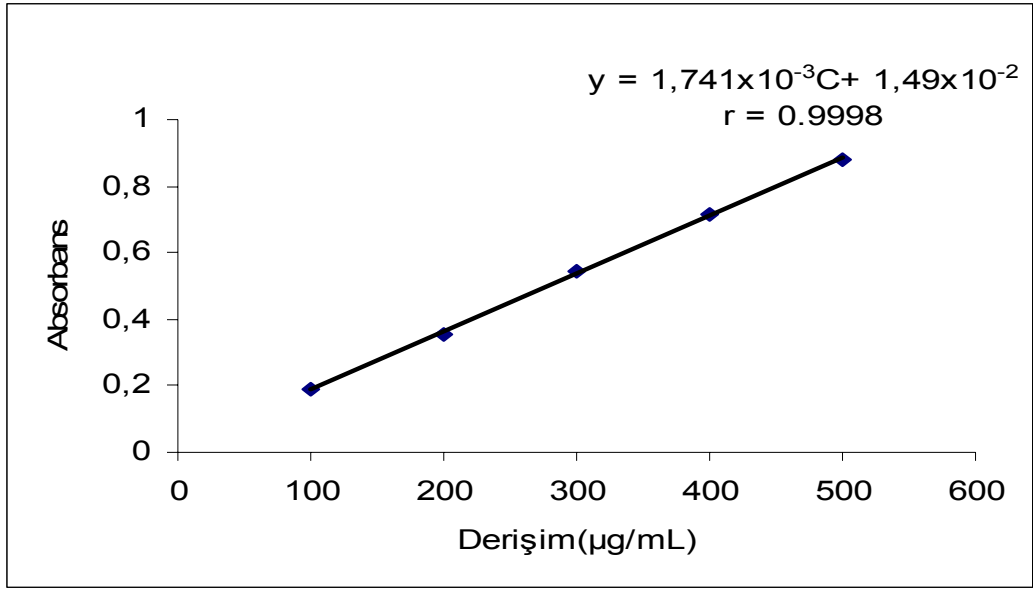
Şekil 17. (a)100 µg/ml İzokonazol nitrat **(b)**10 µg/ml Diflukortolon valerat **(c)** 100 µg/ml İzokonazol nitrat ve 10 µg/ml Diflukortolon valerat içeren krem çözeltisinin 2.türev (n=5) spektrumları



Şekil 18. (a)100 µg/ml İzokonazol nitrat (b)10 µg/ml Diflukortolon valerat (c)100 µg/ml İzokonazol nitrat ve 10 µg/ml Diflukortolon valerat içeren krem çözeltisinin 2.türev (n=9) spektrumları

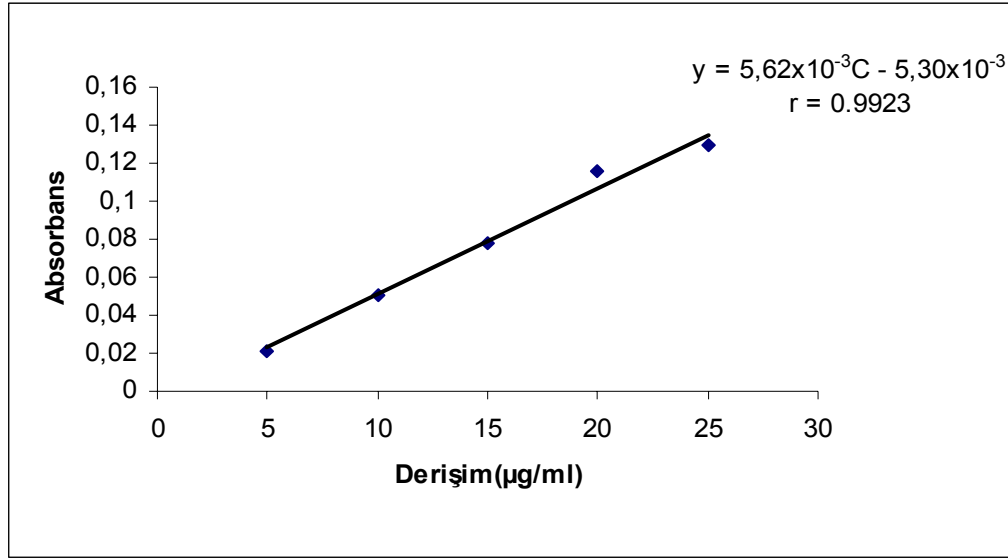
IV.1.3. Kremlerde UV Türev Spektroskopisi Yöntemi ile İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları

Kremlerde *İzokonazol nitrat* miktar tayini için 2. türev (n=5) spektrumunda 289.2 nm. de çizilen kalibrasyon doğrusu Şekil 19. da gösterilmiştir.



Şekil 19. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (289.2 nm, 2.türev n=5) *İzokonazol nitrat* tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu
Derişim aralığı = 100-500 µg/ml

Kremlerde *Diflukortolon valerat* miktar tayini için 2. türev (n=9) spektrumunda 262 nm. de çizilen kalibrasyon doğrusu Şekil 20. de gösterilmiştir.



Şekil 20. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (262 nm, 2.türev n=9) Diflukortolon valerat tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu Derişim aralığı = 5-25 µg/ml

Yöntemde çalışma aralığı *İzokonazol nitrat* için 100-500 µg/ml, *Diflukortolon valerat* için 5-25 µg/ml olarak alınmıştır. *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* için sırasıyla LOD değerleri 2,63 µg/ml ve 0.54 µg/ml, LOQ değerleri ise 8,78 µg/ml ve 1.78 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 1. de gösterilmiştir.

Tablo 1. UV türev spektrofotometrisi Yöntemiyle elde edilen analitik parametreler

	<i>İzokonazol nitrat</i>	<i>Diflukortolon valerat</i>
Doğrusal çalışma aralığı(µg/ml)	100-500	5-25
Eğim	1.741×10^{-3}	5.62×10^{-3}
Standart Sapma	2.28×10^{-5}	4.03×10^{-4}
Kesişim	1.49×10^{-2}	-5.3×10^{-3}
Standart Sapma	7.58×10^{-3}	6.68×10^{-3}
Korelasyon katsayısı	0.9998	0.9923
*LOD (µg/ml)	2.63	0.53
**LOQ(µg/ml)	8.78	1.78
Tekrar edilebilirlik (SS)	Gün içi:0,66 Günler arası:0,62	Gün içi:0,16 Günler arası:0,17

* LOD: Yakalama alt sınırı (Limit of Detection)

**LOQ: Tayin alt sınırı (Limit of Quantification)

Kremlerde UV türev spektrofotometrisi yöntemiyle elde edilen *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* miktar tayini sonuçları Tablo 2 ve Tablo 3. de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle İzokonal nitrat Miktar Tayini Sonuçları

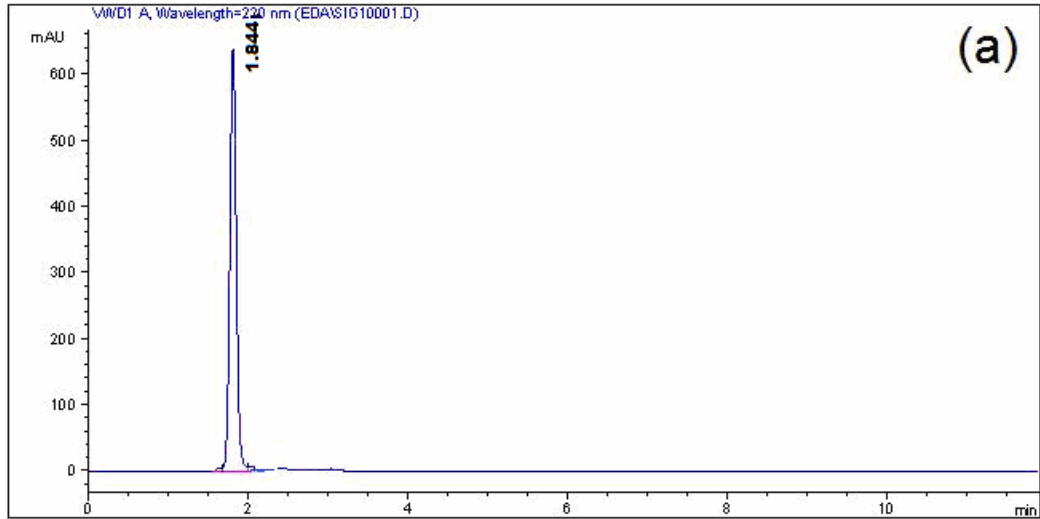
Numune No.	Mg/1g krem	Belirtilen Miktar 10 mg/1 g krem
1	9.59	$X_{Ort} = 9.82$
2	9.89	SS = 0.19
3	9.82	%BSS = 2.03
4	9.71	GA=9.63 - 10.01
5	10.12	(p=0.05)

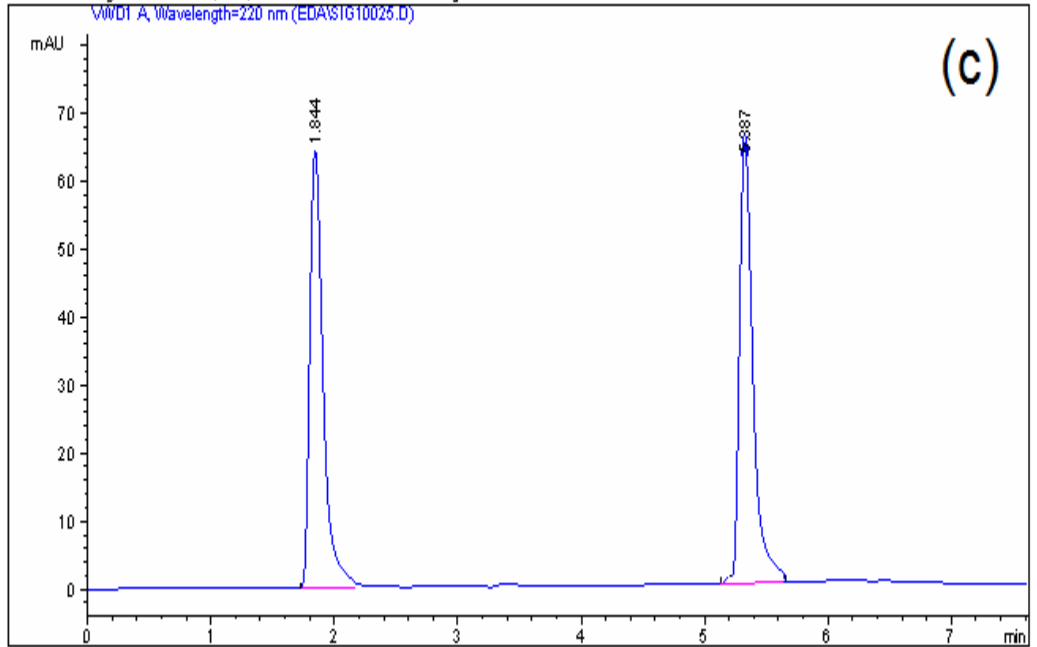
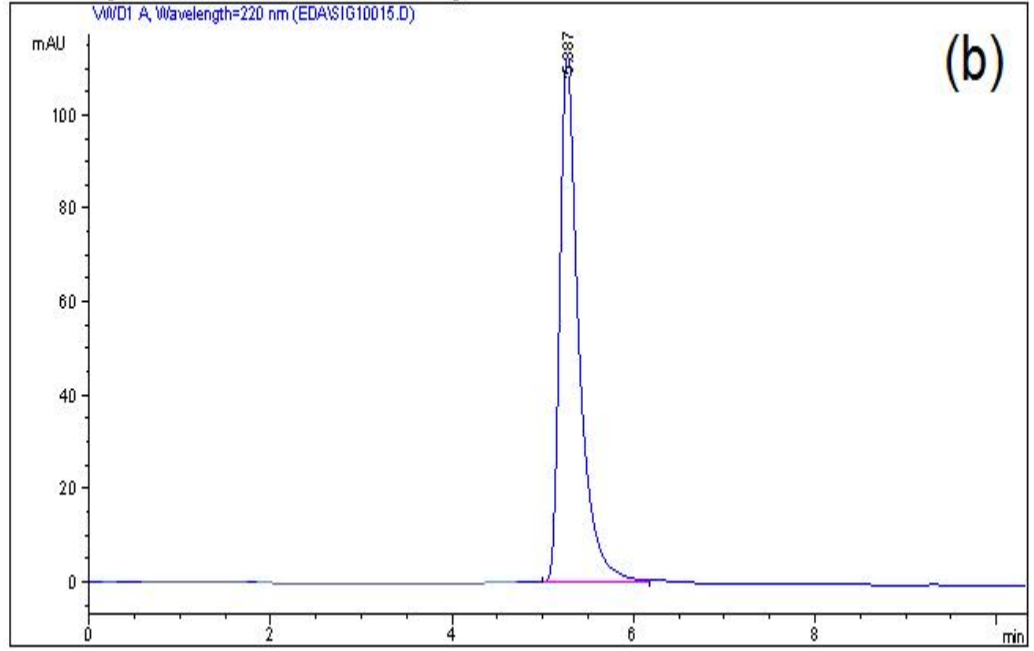
Tablo 3. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları

Numune No.	mg/1g krem	Belirtilen Miktar 1.0 mg/1 g krem
1	1.03	$X_{Ort} = 1.0$ $SS = 0.04$ $\%BSS = 3.67$ $GA=0.97-10.03$ ($p=0.05$)
2	0.94	
3	1.00	
4	1.00	
5	1.03	

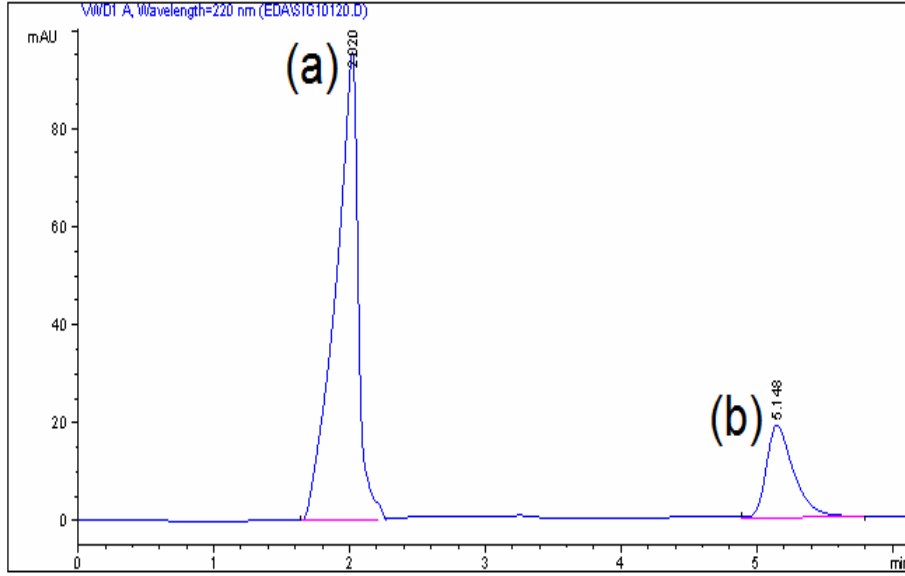
IV.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Elde Edilen Bulgular

IV.2.1. Ön Çalışma Sonuçları





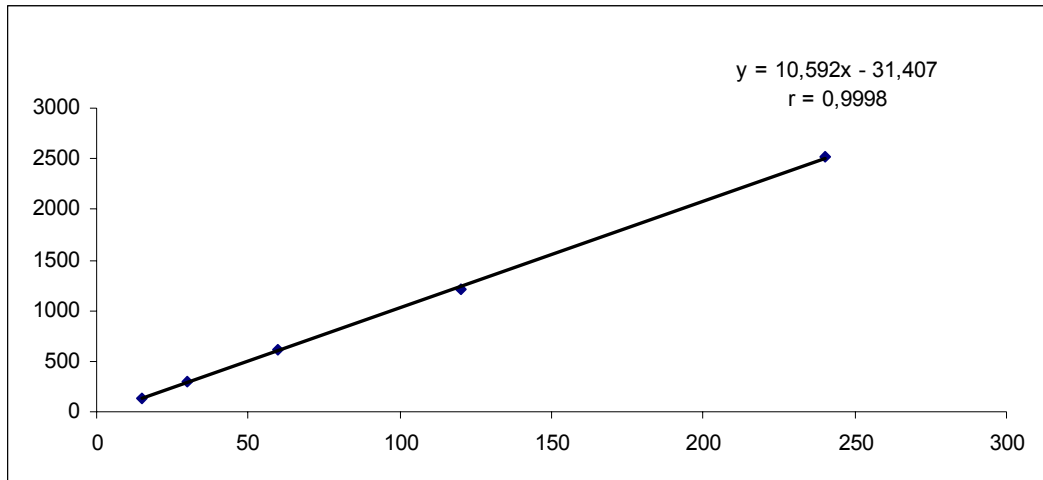
Şekil 21. (a)100µg/ml İzokonazol nitrat (b) 100µg/ml Diflukortolon valerat (c) 100µg/ml İzokonazol nitrat ve 100µg/ml Diflukortolon valerat içeren sentetik karışım çözeltilerinin kromatogramları



Şekil 22. Krem çözeltisi kromatogramı (a)İzokonazol nitrat, (b)Diflukortolon valerat

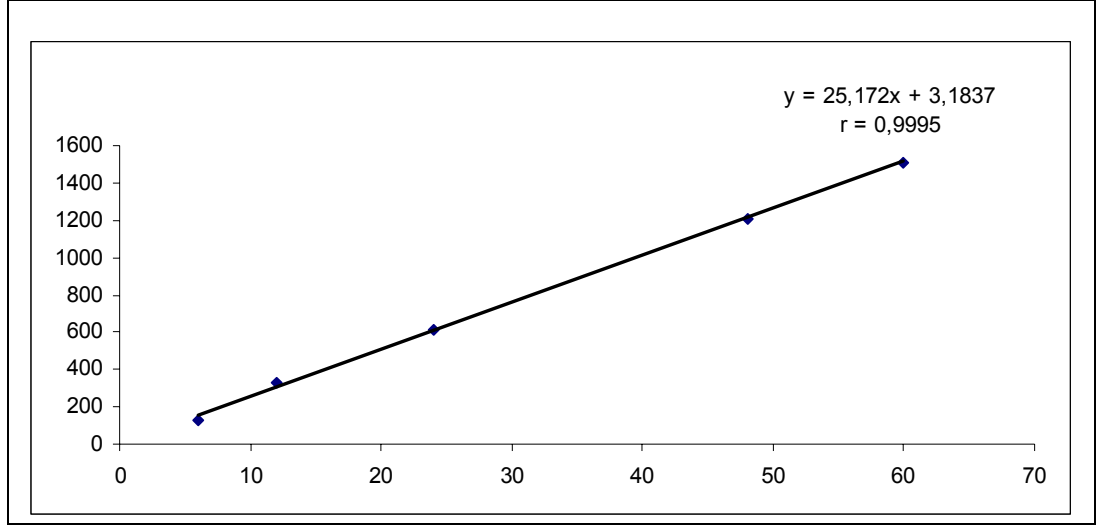
IV.2.2. Kremlerde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları

Kremlerde *İzokonazol nitrat* miktar tayini için kalibrasyon doğrusu Şekil 23. de gösterilmiştir.



Şekil 23. HPLC yöntemiyle İzokonazol nitrat tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

Kremlerde *Diflukortolon valerat* miktar tayini için kalibrasyon doğrusu Şekil 24. de gösterilmiştir.



Şekil 24. HPLC yöntemiyle Diflukortolon valerat tayininde kullanılan kalibrasyon doğrusu

Belirtilen Kromatografik koşullarda *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* için elde edilen doğrusal parametreler Tablo 4.de gösterilmiştir.

Tablo 4. Kromatografik koşullarda İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat için elde edilen doğrusal parametreler

	İzokonazol nitrat	Diflukortolon valerat
Doğrusal çalışma aralığı(µg/ml)	15-240	6-60
Eğim	10.592	25.172
Standart sapma	1.15	0.41
Kesişim	-31.407	3.1837
Standart sapma	19.19	15.15
Korelasyon katsayısı	0.9998	0.9995
LOD(µg/ml)	0.25	0.45
LOQ (µg/ml)	0.82	1.5
Tekrar edilebilirlik (SS)	Gün içi:0.83 Günler arası:0.68	Gün içi:0.40 Günler arası:0.31

Yöntemde sistem uygunluk testleri yapılmış, elde edilen sonuçlar Tablo 5 de gösterilmiştir.

Tablo 5. HPLC yönteminde sistem uygunluk testi sonuçları

Parametreler	<i>İzokonazol nitrat</i>	<i>Diflukortolon valerat</i>
Teorik tabaka sayısı	$21,77 \times 10^2$	$51,84 \times 10^2$
Kapasite faktörü	5	16
Pik Asimetrisi	1,25	3,20
Seçicilik faktörü	3.2	
Rezolüsyon	5,39	

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemiyle elde edilen *İzokonazol nitrat* sonuçları Tablo 6.da ve *Diflukortolon valerat* sonuçları Tablo 7.de gösterilmiştir.

Tablo 6. Kremlerde HPLC Yöntemiyle İzokonal nitrat Miktar Tayini Sonuçları

Numune No.	mg/1g krem	Belirtilen Miktar 10 mg/1 g krem
1	10.21	$X_{Ort} = 10.11$ $SS = 0.28$ $\%BSS = 2.80$ $GA = 9.84 - 10.38$ $(p=0.05)$
2	10.06	
3	10.54	
4	9.78	
5	9.99	

Tablo 7. Kremlerde HPLC Yöntemiyle Diflukortolon valerat Miktar Tayini Sonuçları

Numune No.	mg/1g krem	Belirtilen Miktar 1 mg/1 g krem
1	1.04	$X_{Ort} = 1.03$
2	1.03	$SS = 0.02$
3	1.01	$\%BSS = 1.63$
4	1.05	$GA=1.02 - 1.04$
5	1.04	$(p=0.05)$

IV.3. Geri Kazanım Sonuçları

IV.3.1. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle Geri Kazanım Sonuçları

Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle belirtilen koşullarda yapılan geri kazanım çalışmaları sonuçları *İzokonazol nitrat* için Tablo 8. de, *Diflukortolon valerat* için Tablo 9. da gösterilmiştir.

Tablo 8. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle İzokonazol nitrat Geri Kazanım sonuçları

Numune No.	<i>% İzokonazol nitrat</i>	
1	98.90	$X_{Ort} = 99.67$
2	98.27	$SS = 1.13$
3	100.00	$\%BSS = 1.13$
4	101.20	$GA=98.60 - 100.74$
5	100.00	$(p=0.05)$

Tablo 9. Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemiyle *Diflukortolon valerat* geri kazanımı sonuçları

Numune No.	% <i>Diflukortolon valerat</i>	
1	100.00	$X_{Ort} = 102.03$
2	102.77	SS = 2.00
3	102.77	%BSS = 1.96
4	104.62	GA=100.12 – 103.94
5	100.00	($p=0.05$)

IV.3.2. Kremlerde HPLC Yöntemiyle Geri Kazanım Sonuçları

Kremlerde, HPLC yöntemiyle yapılan geri kazanım çalışması sonuçları *İzokonazol nitrat* için Tablo 10.da, *Diflukortolon valerat* için Tablo 11. de gösterilmiştir.

Tablo 10. Kremlerde HPLC Yöntemiyle *İzokonazol nitrat* Geri Kazanımı sonuçları

Numune No.	% <i>İzokonazol nitrat</i>	
1	97.58	$X_{Ort} = 98.46$
2	95.88	SS = 2.29
3	98.33	%BSS = 2.33
4	102.14	GA=96.28 – 100.64
5	98.33	($p=0.05$)

Tablo 11. Kremlerde HPLC Yöntemiyle *Diflukortolon valerat* geri kazanımı sonuçları

Numune No.	% <i>Diflukortolon valerat</i>	
1	95.91	$X_{Ort} = 99.41$ $SS = 2.63$ $\%BSS = 2.65$ $GA=96.9 - 101.92$ $(p=0.05)$
2	103.09	
3	98.27	
4	100.21	
5	99.57	

IV.4. UV Türev Spektrofotometrisi ve HPLC Yöntemleri ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

UV türev spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri ile elde edilen *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* miktar tayini sonuçları, doğruluk açısından *student t testi*, kesinlik açısından *Fisher testi* ile karşılaştırılmış, elde edilen sonuçlar Tablo 12 ve Tablo 13. de gösterilmiştir.

Tablo 12. Kremlerde *İzokonazol nitrat* Sonuçlarının Karşılaştırılması

<u>Student t</u>		
UV Türev – HPLC	$t_{Hesaplanan}(1.87) < t_{Tablo}(2.31)$	$p=0.05$
<u>Fisher</u>		
UV Türev – HPLC	$F_{Hesaplanan} (2.01) < F_{Tablo}(6.31)$	

Tablo 13. Kremlerde *Diflukortolon valerat* Sonuçlarının Karşılaştırılması

<u>Student t</u>	
UV Türev – HPLC	$t_{\text{Hesaplanan}} (1.91) < t_{\text{Tablo}}(2.31) \quad p=0.05$
<u>Fisher</u>	
UV Türev – HPLC	$F_{\text{Hesaplanan}} (5.86) < F_{\text{Tablo}}(6.31)$

V. SONUÇ ve TARTIŞMA

Çalışmada *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* içeren antifungal ve antiinflamatuvar özellikteki farmasötik kremlerde etken madde miktar tayini için yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla kremin içerdiği standart *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* etanolde çözülmüş ve 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları alınmıştır. Spektrumlarda, her iki etken maddenin birbirleri üzerinde girişim etkileri olduğu gözlenmiştir. Tayin için türev spektrofotometrisi yönteminin kullanımı düşünülmüş, bu amaçla krem etiketinde belirtilen miktarlarda *İzokonazol nitrat* ve *Diflukortolon valerat* içeren sentetik karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrıca eşdeğer miktarlarda etken maddeleri içeren krem çözeltisi aynı koşullarda hazırlanmıştır. Ancak eşdeğer miktarlarda etken maddeleri içeren sentetik karışım ve krem çözeltilerinin spektrumlarının türev spektrofotometrisi yöntemiyle tayini güçleştirecek şekilde farklılaştığı gözlenmiştir. Bu farklılığın krem içeriğindeki etken madde miktarlarının etikette belirtilen oranlardan farklı olması halinde veya krem içeriğindeki katkı maddeleri nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. Krem etiketinde isimleri belirtilmeyen katkı maddeleri için ilaç firmasından bilgi alınarak katkı maddelerinin de aynı koşullarda spektrumları alınmıştır. Bu sırada katkı maddesi miktarları spektrum verebilecek rastgele aralıklarda ve olabildiğince yüksek derişimlerde seçilmiştir. Laboratuvarda ticari preparat benzeri bir preparat hazırlanması yoluna gidilmemesinin nedeni, bu yolla da girişim etkilerinin elimine edilemeyeceği düşüncesidir.

Bilindiği gibi türev spektrofotometrisi yöntemi, normal spektrumda birbirleri üzerinde artırıcı absorbans etkisi göstererek tayin için uygun bir dalga boyu seçilemeyen analitlerin türev spektrumları aracılığıyla birbirlerinin türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu dalga boyunda tayin

edilmeleri esasına dayanmaktadır. Ancak bu tür bir analizin yapılabilmesi için sentetik karışım çözeltisi ile eşdeğer miktarda etken madde içeren krem çözeltisinin spektrumlarının örtüşmesi gerekir. Oysa burada her iki spektrum farklılık göstermekte dolayısıyla türev spektrumlarında tayin imkansız hale gelmektedir. Bu durumda krem spektrumu ile sentetik karışım spektrumunun farklı olmasına neden olan girişim yapıcı madde tanımlanmadan tayin yolları aranmıştır. Bu amaçla kremin içeriğinde etikette belirtilen derişimlerde etken madde olduğu varsayılarak bir yöntem geliştirilmiştir. 100 µg/ml *İzokonazol nitrat* çözeltisi ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrıca 100 µg/ml *izokonazol nitrat* ve 10 µg/ml *Diflukortolon valerat* içeren krem çözeltisi hazırlanmıştır. *İzokonazol nitrat*'ın *Diflukortolon valerat*'a oranı krem etiketinde belirtilen oranlardır. Burada belirleyici olan etken madde derişimleri ile krem içeriğinin tam ve eşit miktarlarda olmasıdır. Daha sonra *İzokonazol nitrat* miktar tayini için *Diflukortolon valerat* çözeltisinin türev absorbans değerinin sıfır olduğu ve krem çözeltisinin spektrumunun *İzokonazol nitrat* çözeltisinin spektrumuyla tümüyle örtüştüğü dalga boyu araştırılmıştır. *Diflukortolon valerat* miktar tayini için de *İzokonazol nitrat* çözeltisinin türev absorbans değerinin sıfır olduğu ve krem çözeltisinin spektrumunun *Diflukortolon valerat* çözeltisinin spektrumuyla tümüyle örtüştüğü dalga boyu araştırılmıştır. Bu yaklaşımın amacı girişime neden olan madde tanımlanmadığında tayini olası kılmaktır. *İzokonazol nitrat* için sadece *Diflukortolon valerat*'ın türev absorbans değerinin sıfır olduğu dalga boyunu kullanmak yeterli değildir, *Diflukortolon valerat*'ın türev absorbans değerinin sıfır olduğu dalga boyunda krem spektrumunda *İzokonazol nitrat* ile aynı türev absorbans değerini verecek dalga boyu araştırılmıştır. Standart *İzokonazol nitrat* ve kremdeki *İzokonazol nitrat* derişimleri aynı olduğu için o dalga boyunda *Diflukortolon valerattan* ve tanımlanmayan diğer maddelerden gelen herhangi bir girişim olmadığı varsayılmıştır. Bu amaçla standart *İzokonazol nitrat* çözeltisinin, standart *Diflukortolon valerat* çözeltisinin ve eşdeğer miktarlarda etken maddeler içeren krem çözeltisinin 1.2.3. ve 4. türev derecesinde her bir

türev derecesi için 9 farklı n değeri ($\Delta\lambda$) kullanarak 36 spektrumu alınmıştır. Aynı türev ve n derecesindeki üçer spektrumun (*İzokonazol nitrat*, *Diflukortolon valerat* ve krem) tüm skalaları eşleştirilerek teker teker çakıştırılmıştır. Bu yolla *İzokonazol nitrat* tayini için 289.2 nm (2. türev, n=5) dalga boyu seçilmiştir. Aynı yaklaşımla, *Diflukortolon valerat* tayini için de 262 nm (2. türev, n=9) seçilmiştir. Bu dalga boylarında çizilen kalibrasyon doğruları aracılığıyla yapılan miktar tayini çalışmaları doğru, kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir. Ayrıca elde edilen % geri kazanım değerleri de önerilen yöntemin doğruluğunun göstergesidir. Grubumuzun bu yöntemle şuruplarda etken madde miktar tayini çalışması da mevcuttur²⁰.

Spektrofotometrik çalışmalar boyunca çözücü olarak etanol kullanılmış, kremden etken maddelerin alınması için azar azar etanol eklenmesi ile emülsiyon oluşumu engellenmiştir. Numune hazırlama aşaması basit ve hızlıdır, sadece süzme işlemi gerektirir.

Yapılan literatür taramalarında adı geçen etken maddelerle ilgili çok az sayıda miktar tayini çalışmasına rastlanmıştır. Bu çalışmaların hiçbiri, her iki etken maddeyi birlikte içeren preparatlar üzerinde değildir. *İzokonazol nitrat* tayini için BP ve EP, potansiyometrik bir yöntem, *Diflukortolon valerat* tayini için de BP kromatografik bir yöntem önermiştir.

Çalışmamızda, karşılaştırma yöntemi olarak, kremlerde etken madde miktar tayini için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde ayırma işlemi için C 18 kolon (250x4.6 mm), hareketli faz olarak metanol:deiyonize su (80:20) karışımı kullanılmış ve UV dedektör 220 nm ye ayarlanmıştır. Çalışmada alıkonma zamanları *İzokonazol nitrat* için 1.84, *Diflukortolon valerat* için 5.39 dakika olarak bulunmuştur. Derişime karşı pik alanları kullanılarak çizilen kalibrasyon doğruları aracılığıyla etken maddelerin kantitatif tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Her iki yöntemden elde edilen sonuçlar, tezin Bulgular bölümünde ayrıntılı şekilde gösterilmiştir. İki yöntem sonuçları tekrarlanabilirlik açısından *Fisher testi*, doğruluk açısından da *Student t testi* ile kıyaslanmış ve sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Önerilen spektrofotometrik yöntem, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemine göre nispeten kolaydır ve daha az çözücü sarfiyatına neden olmaktadır. Ancak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemiyle elde edilen LOD ve LOQ değerleri, bu yöntemin düşük miktarlarda etken madde analizlerinde önerilebileceğini göstermektedir.

Sonuçta her iki yöntem de düşük standart sapma değerleriyle kesinlik ve tekrarlanabilirlik, % geri kazanım çalışmaları sonuçları ile doğruluk ve kalibrasyon doğrularının eğim değerleriyle hassasiyet açısından olumludur ve rutin analizler için önerilebilir.

VII . ÖZET

Farmasötik Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemleriyle İzokonazol nitrat ve Diflukortolon valerat Miktar Tayini

Çalışmamızda bir antifungal etkili ilaç etken maddesi olan İzokonazol Nitrat (İZO) ve antienflamatuvar etkili ilaç etken maddesi Diflukortolon Valerat'ı (DİF) kombine içeren kremlerde aynı anda miktar tayini UV türev spektroskopisi yöntemi temel alınarak yapılmış ve geliştirilen HPLC yöntemi ile sonuçlar kıyaslanmıştır. Spektrofotometrik yöntemde İZO için 2. türev n=5 de 289.2 nm de, DİF için 2.türev n=9 da 262 nm de miktar tayinleri yapılmıştır. Çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Doğrusal çalışma aralığı İZO için 100-500 µg/ml, DİF için 5-25 µg/ml olarak alınmıştır. Ortalama % geri kazanım değerleri İZO için %99.67, DİF için %102.03 ve % bağıl standart sapma değerleri İZO için % 2.03, DİF için %3.67 olarak bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen HPLC yönteminde kolon olarak Phenomenex kolonu (250x4.6 mm), mobil faz olarak metanol:deiyonize su (80:20), akış hızı 1 ml/dak kullanılmış ve UV dedektörü ile 220 nm.de dedeksiyon yapılmıştır. Alıkonma zamanları İZO için 1.8 DİF için 5.4 dakikadır. HPLC yöntemindeki doğrusal çalışma aralığı İZO için 15-240 µg/ml DİF için 6-60 µg/ml, % geri kazanım sonuçları İZO için %98.46 DİF için %99.41, % bağıl standart sapma değerleri ise İZO için % 2.8, DİF için %1.63 olarak bulunmuştur. HPLC yöntemi ile UV türev spektrofotometrisi sonuçları istatistiksel olarak doğruluk ve kesinlik açısından birbirleri ile karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: İzokonazol Nitrat, Diflukortolon Valerat, UV türev spektroskopisi, HPLC, kantitatif analiz, eş zamanlı analiz

VII. SUMMARY

Quantitative Determination of Isoconazole nitrate and Diflucortolone valerate in their Binary Mixtures by Derivative UV Spectrophotometry and HPLC

In this study, in combined creams which contain an antifungal drug Isoconazole nitrate(ISO) and antiinflammatory drug, Diflucortolone valerate (DIF), simultaneous quantitative determination of active substances were determined Derivative UV spectrophotometry and obtained results were compared with those obtained developed HPLC method. In spectrophotometric method, quantitative determinations were performed 289.2 nm (2nd derivative, n=5) for ISO and 262 nm (2nd derivative, n=9) for DIF and ethanol was used as solvent. Linear calibration ranges were 100-500 µg/ml and 5-25 µg/ml for ISO and DIF, respectively. Recoveries and RSD values were 99.67%, 102.03% and 2.03%, 3.67% for ISO and DIF, respectively. An HPLC method was developed with the use of Phenomenex column (250x4.6 mm), metanol: deionised water (80:20) as mobile phase, at 1 ml/min flow rate, and 220 nm wavelenght was used for detection. Retention times were 1.8 and 5.4 min. for ISO and DIF, respectively. In HPLC method, linear calibration ranges, recoveries and RSD values were 15-240 µg/m, 6-60 µg/ml, 98.46% 99.41%, 2.8%, 1.63% for ISO and DIF, respectively. Results obtained from both methods were statistically compared with each others and it was observed that there is no difference between these results.

Key words: Isoconazole nitrate, Diflucortolone valerate, derivative UV spectrophotometry, HPLC, quantitative analysis, simultaneous analysis

VIII. KAYNAKLAR

- 1) Kayaalp, S.O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1. Cilt 7. Baskı. Ankara: Feryal Matbaası; 1994.
- 2) Rx Media Pharma. İnter Aktif İlaç Bilgi kaynağı. Üstüneş L., Gemaş Yayıncılık; 2008.
- 3) European Pharmacopoeia. Volume 2. 6th Edition, Council of Europe, 2007.
- 4) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals, 12nd Ed., Merck and Co., Inc., Rahway, N.J., USA, 2001.
- 5) Di Pietra A M, Cavrini V, Andrisano V, Gatti R. HPLC Analysis of Imidazole Antimycotic Drugs in Pharmaceutical Formulations. J. Pharm. Biom. Anal. 1992; 10(10-12): 873-9.
- 6) Kublin E, Kaniewska, T. Determination of Antimycotic Substances, Derivatives of Imidazole, by Gas Chromatographic Method. Chemia Analityczna 1996; 41(1): 19-25.
- 7) Van Eeckhaut A, Boonkerd S, Detaevernier MR, Michotte Y. Development and evaluation of a linear regression method for the prediction of maximal chiral separation of basic drug racemates by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A. 2000; 903(1-2): 245-254.
- 8) British Pharmacopeia, Her Majesty's Stationery Office, London, 2004.
- 9) Wang, H, Zhang, S, Study on the content of isoconazole nitrate and determination of its related substances in isoconazole nitrate cream by HPLC. Zhongguo Yaopin Biaozhun 2007; 8(3), 60-62.
- 10) Maeda Y, Owada K, Yamamoto M, Sato S, Masui T, Simultaneous analysis of corticosteroids and parabens by reverse phase high performance liquid chromatography. Shizuoka-ken Eisei Kankyo Senta Hokoku 1987; 30: 35-9.
- 11) Maeda Y, Owada K, Yamamoto M, Sano S, Masui T, Nakazawa H, Simultaneous determination of corticosteroids and parabens in ointments by HPLC. Bunseki Kagaku 1988; 37(12): 648-53.

- 12)Gagliardi L,De Orsi D, Del Giudice MR, Gatta F, Porra R, Chimenti P, Tonelli D,. Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products. *Analytica Chimica Acta* 2002; 457(2): 187-198.
- 13)Palabiyık I M, Asan D. Onur F, Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Determination of Diflucortolone Valerate and Chlorquinaldol in Creams. *Journal of Food and Drug Analysis* 2007; 15(2): 145-150.
- 14)Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü. Farmasötik Teknoloji Laboratuar Kitabı. Ankara: Şafak Matbaacılık; 2007.
- 15)Geçgil Ş. Farmasötik Teknolojiye Başlangıç. İstanbul: Cihan Matbaacılık; 1991.
- 16)Martindale, The Extra Pharmacopoeia. 29th Ed. London: Pharmaceutical Press; 1989.
- 17)Güven KC. Tıbbi ve Kozmetik Formülleri. 9. Baskı. İstanbul: Avcı Ofset; 1996.
- 18)Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Enstrümantal Analiz. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H, (Çev.) 1.Basım, Ankara: Bilim Yayıncılık; 1998.
- 19)Levillain P, Fompeydie D. Spectrophotometric Derive Interet Limiteset Applications. *Analysis*1986; 14 (1): 1-20.
- 20)Türkalp A, Günden Göğer N, Aboul-Enein HY. Quantitative Determination of Fluconazole in Syrups by First Order Derivative Spectrophotometry. *Analytical Letters* 2002; 35(7): 1193-1204.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Gürkan

Soyadı : ÖZEN

Doğum Tarih : 01.05.1980

Doğum yeri : Ankara-Merkez

Eğitim : Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü (1999-2003)

Yabancı Dil : İngilizce

Dosya adı: gurkan_ozen_tez
Dizin: F:
Şablon: Normal.dot
Başlık:
Konu:
Yazar: ördek
Anahtar Sözcük:
Açıklamalar:
Oluşturma Tarihi: 29.01.2009 11:42:00
Düzeltilme Sayısı: 7
Son Kayıt: 30.01.2009 09:45:00
Son Kaydeden: kılavuz
Düzenleme Süresi: 164 Dakika
Son Yazdırma Tarihi: 30.01.2009 17:14:00
En Son Tüm Yazdırmada
Sayfa Sayısı: 79
Sözcük Sayısı: 14,700(yaklaşık)
Karakter Sayısı: 83,793(yaklaşık)