



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ANTİFUNGAL ETKİLİ NAFTİFİN HİDROKLORÜR'ÜN
SPEKTROFOTOMETRİK VE HPLC YÖNTEMLERİYLE
KANTİTATİF ANALİZİ**

Zehra CİVELEK

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Saadet DERMİŞ**

**ANKARA
2021**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİFUNGAL ETKİLİ NAFTİFİN HİDROKLORÜR'ÜN
SPEKTROFOTOMETRİK VE HPLC
YÖNTEMLERİYLE KANTİTATİF ANALİZİ**

Zehra CİVELEK

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Saadet DERMiŞ**

**ANKARA
2021**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Antifungal Etkili Naftifin Hidroklorür'ün Spektrofotometrik ve HPLC Yöntemleriyle Kantitatif Analizi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı ve Soyadı : Zehra CİVELEK
Tarih :
İmza :

KABUL VE ONAY



İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Naftifin HCl Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri	2
1.2. Naftifin HCl Farmakolojik Etkisi	3
1.3. Naftifin HCl ile Yapılmış Literatürdeki Analitik Çalışmalar	7
1.4. Tezin Amacı	8
2. GEREÇ VE YÖNTEM	10
2.1. Gereçler	10
2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Madde ve Piyasa Preparatları	10
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	11
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	11
2.1.4. Kullanılan Cam ve Diğer Malzemeler	11
2.2. Yöntemler	12
2.2.1. Spektroskopi	12
2.2.1.1. Spektrofotometri	13
2.2.1.2. Işığın Absorpsiyonu	14
2.2.1.3. Absorpsiyon Yasaları	14
2.2.1.4. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopisi	16
2.2.1.5. Spektrofotometre	17
2.2.1.5.1. Tek Işık Yollu Spektrofotometreler	20
2.2.1.5.2. Çift Işık Yollu Spektrofotometreler	21
2.2.1.6. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometreleri	22
2.2.2. Kromatografi	23
2.2.2.1. Kromatografik Yöntemler	24
2.2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	26
2.2.2.2.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi	27
2.2.2.2.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi	28
2.2.2.3. HPLC Cihazı Bileşenleri	29
2.2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri	31
2.2.2.3.2. Pompalama Sistemleri	32
2.2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri	33
2.2.2.3.4. Kolon	33
2.2.2.3.5. Dedektörler	35
2.2.2.3.6. Kayıt Cihazı	38

2.2.2.4. Temel Kromatografi Parametreleri ve Sistem Uygunluk Testleri	38
2.2.3. Analitik Yöntemin Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)	43
2.2.3.1. Karakteristik Validasyon Parametreleri	44
2.2.3.1.1. Seçicilik	44
2.2.3.1.2. Doğrusallık	45
2.2.3.1.3. Aralık	46
2.2.3.1.4. Teşhis Sınırı (LOD)	46
2.2.3.1.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)	47
2.2.3.1.6. Kesinlik	47
2.2.3.1.7. Sağlamlık (Kararlılık)	48
2.2.3.1.8. Tutarlılık	49
2.2.3.1.9. Doğruluk (Geri Kazanım)	49
2.2.3.1.10. Stabilitate	50
2.2.3.1.11. Duyarlılık	51
3. BULGULAR	
3.1. Naftifin HCl Saflık Kontrolü	52
3.1.1. IR Spektroskopisi	52
3.1.2. Erime Noktası Tayini	52
3.1.3. UV Spektrumu	52
3.2. Spektrofotometri	54
3.2.1. Analitik Şartlar	54
3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması	54
3.2.3. Yöntemin Validasyonu	55
3.2.3.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	55
3.2.3.2. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	58
3.2.3.3. Doğruluk (Geri Kazanım)	59
3.2.4. Farmasötik Preparata Uygulama	59
3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	60
3.3.1. Analitik Şartlar	60
3.3.1.1. Hareketli Fazın Hazırlanması	61
3.3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması	61
3.3.2. Yöntemin Optimizasyonu	62
3.3.2.1. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	62
3.3.2.2. Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi	64
3.3.2.3. Dalga Boyunun Belirlenmesi	66
3.3.2.4. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları	68
3.3.3. Yöntemin Validasyonu	69
3.3.3.1. Seçicilik ve Spesifiklik	70
3.3.3.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	71
3.3.3.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	75
3.3.3.4. Doğruluk (Geri Kazanım)	76
3.3.3.5. Kesinlik	77
3.3.4. Farmasötik Preparata Uygulama	78
3.4. Naftifin HCl Analizi İçin Geliştirilen HPLC ve UV-GB Spektrofotometri Yöntemlerinin Karşılaştırılması	78

4. TARTIŞMA	81
4.1. UV-GB Spektrofotometri Analizleri	81
4.2. HPLC Analizleri	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
ÖZET	90
SUMMARY	91
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	94



ÖNSÖZ

Tez çalışması kapsamında Naftifin HCl etken maddesinin analizi için duyarlı, hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Naftifin HCl'nin Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-GB) spektrofotometrik ve ters faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemleriyle analizi ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yöntem geçerlilik ve HPLC için sistem uygunluk testleri neticesinde geliştirilen yöntemlerin seçici, duyarlı ve etken maddenin farmasötik dozaj şekillerinden analizi için uygun olduğu görülmüştür.

Öncelikle tecrübeleriyle tez sürecimi aydınlatan ve her zaman yanımda olan çok kıymetli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Saadet DERMİŞ'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, deneyim ve bilimsel desteklerini esirgemeyen Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Sonsuz sevgi, sabır ve anlayışla beni bu tezi yazabilecek günlere getiren canım aileme teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, her daim desteğini esirgemeyen, beni sürekli motive eden hayat arkadaşım ve canım eşim Ramazan CİVELEK'e sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik Fakörü
A _S	Pik Asimetrisi, Pik Simetri Oranı
atm	Atmosfer
Bias	Bağlı Hata (%)
BSS	Bağlı Standart Sapma (%)
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Birliği
FDD	Foto Diyot Dizi
g	Gram
GB	Görünür Bölge
h	Hacim
HCl	Hidroklorür
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, High Performance Liquid Chromatography
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi, The International Council for Harmonisation
IR	İnfrared, Kızılötesi
k	Kapasite Faktörü, Alıkonma Faktörü
L	Litre
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
m	Eğim
mg	Miligram
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mL	Mililitre
mm	Milimetre

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
N	Kolon Etkinliği, Etkin Tabaka Sayısı
n	Kesişim
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
pg	Pikogram
PTFE	Politetrafloroetilen
r	Korelasyon Katsayısı
R^2	Determinasyon Katsayısı
R_s	Ayrırma Gücü
sn	Saniye
SS	Standart Sapma
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
T	Kuyruklanma Faktörü
t_0	Ölü Zaman, Ölü Hacim
t_R	Alıkonma Zamanı (dk)
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole
UV-GB	Ultraviyole-Görünür Bölge

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Naftifin HCl Kimyasal Yapısı	2
Şekil 2.1.	Spektrofotometrenin Temel Yapısı	17
Şekil 2.2.	Tek Işık Yollu Spektrofotometre Yapısı	21
Şekil 2.3.	Çift Işık Yollu Spektrofotometre Yapısı	22
Şekil 2.4.	Kromatografik Ayrımın Temel Görünümü	24
Şekil 2.5.	Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	26
Şekil 2.6.	HPLC Cihazı Şeması	30
Şekil 2.7.	Çift Işık Yollu UV-GB Dedektörü	37
Şekil 2.8.	HPLC Örnek Kromatogram	38
Şekil 3.1.	Naftifin HCl'nin IR spektrumu	53
Şekil 3.2.	Naftifin HCl'nin 32,38 µg/mL Konsantrasyonundaki UV Spektrumu	54
Şekil 3.3.	255 nm'de, Naftifin HCl'nin 6,476-32,380 µg/mL Konsantrasyon Aralığında Absorbansları	57
Şekil 3.4.	Naftifin HCl Kalibrasyon Grafiği (UV-GB Spektrofotometri)	57
Şekil 3.5.	23 °C'de, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 1,5 mL dk akış hızı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	63
Şekil 3.6.	25 °C'de, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 1,5 mL dk akış hızı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	63
Şekil 3.7.	27 °C'de, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 1,5 mL dk akış hızı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	64
Şekil 3.8.	1,45 mL/dk akış hızında, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	65
Şekil 3.9.	1,50 mL/dk akış hızında, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	65

Şekil 3.10.	1,55 mL/dk akış hızında, 254 nm’de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL’lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	66
Şekil 3.11.	250 nm dalga boyunda, 1,50 mL/dk akış hızında, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL’lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	67
Şekil 3.12.	254 nm dalga boyunda, 1,50 mL/dk akış hızında, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL’lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	67
Şekil 3.13.	258 nm dalga boyunda, 1,50 mL/dk akış hızında, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL’lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram	68
Şekil 3.14.	32,38 µg/mL Naftifin HCl konsantrasyonunda SUT’a ait kromatogram	69
Şekil 3.15.	Seçicilik ve Spesifiklik Kromatogramları	70
Şekil 3.16.	16,19 µg/mL’lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı	72
Şekil 3.17.	24,28 µg/mL’lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı	72
Şekil 3.18.	32,38 µg/mL’lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı	73
Şekil 3.19.	40,46 µg/mL’lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı	73
Şekil 3.20.	48,26 µg/mL’lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı	74
Şekil 3.21.	Naftifin HCl Kalibrasyon Grafiği (HPLC)	74

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Antifungal İlaçların Sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2.	Naftifin HCl ile Yapılmış Analitik Çalışmalar	7
Çizelge 2.1.	Çalışılan Etken Madde	10
Çizelge 2.2.	Çalışılan Farmasötik Preparat	10
Çizelge 2.3.	Türkiye İlaç Piyasasında Bulunan Naftifin HCl Farmasötik Preparatları	10
Çizelge 2.4.	Kullanılan Cihazlar	11
Çizelge 2.5.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	11
Çizelge 2.6.	Kullanılan Cam ve Diğer Malzemeler	12
Çizelge 2.7.	Elektromanyetik Işımaya Dayanan Yaygın Spektroskopik Yöntemler	12
Çizelge 2.8.	Lambert - Beer Yasasından Sapma Nedenleri	16
Çizelge 2.9.	HPLC'nin Avantajları	27
Çizelge 2.10.	Normal ve Ters Faz Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması	28
Çizelge 2.11.	Normal ve Ters Faz Sıvı Kromatografilerinde Kullanılan Fazlar	29
Çizelge 2.12.	HPLC Pompalama Sisteminde Bulunması Gereken Özellikler	32
Çizelge 2.13.	Kolonların Sınıflandırılması	34
Çizelge 2.14.	Dedektörlerde Olması Gereken Temel Özellikler	36
Çizelge 2.15.	Dedektör Tipleri ve Özellikleri	36
Çizelge 2.16.	Sistem Uygunluk Testleri Parametreleri	42
Çizelge 2.17.	Validasyon Parametreleri	43
Çizelge 2.18.	Validasyon Geçerliliği İçin Yapılması Gerekenler	44
Çizelge 2.19.	Seçiciliğin Belirlenmesine Yönelik Yöntemler	45
Çizelge 2.20.	Biyolojik Sıvılarda LOQ Saptanmasında Yerine Getirilmesi Gereken Şartlar	47
Çizelge 2.21.	Doğruluk Saptama Yaklaşımları	50
Çizelge 2.22.	Stabilite Çalışmaları	51
Çizelge 3.1.	Naftifin HCl Kalibrasyon Eğrisi Özellikleri (UV-GB Spektrofotometrisi)	58
Çizelge 3.2.	LOD ve LOQ (UV-GB Spektrofotometrisi)	58
Çizelge 3.3.	Naftifin HCl Geri Kazanım Sonuçları (UV-GB Spektrofotometrisi)	59
Çizelge 3.4.	Naftifin HCl Farmasötik Preparat Sonuçları (UV-GB Spektrofotometrisi)	60
Çizelge 3.5.	Naftifin HCl Analizi İçin Optimize Edilmiş Kromatografik Koşullar	68
Çizelge 3.6.	SUT Parametreleri	69
Çizelge 3.7.	Naftifin HCl Kalibrasyon Eğrisinin Özellikleri (HPLC)	75

Çizelge 3.8.	LOD ve LOQ (HPLC)	75
Çizelge 3.9.	Naftifin HCl Geri Kazanım Sonuçları (HPLC)	76
Çizelge 3.10.	Naftifin HCl Kesinlik Sonuçları (HPLC)	77
Çizelge 3.11.	Naftifin HCl Farmasötik Preparat Sonuçları (HPLC)	78
Çizelge 3.12.	Naftifin HCl Analizi İçin Geliştirilen HPLC ve UV-GB Spektrofotometri Yöntemlerinin Çalışma Koşulları	79
Çizelge 3.13.	Naftifin HCl Analizi İçin Geliştirilen HPLC ve UV-GB Spektrofotometri Yöntemlerinin Kalibrasyon Eğrisi Özelliklerinin Karşılaştırılması	79
Çizelge 3.14.	Exoderil® Kremde Miktar Tayini Yöntemlerinin Karşılaştırılması	80



1. GİRİŞ

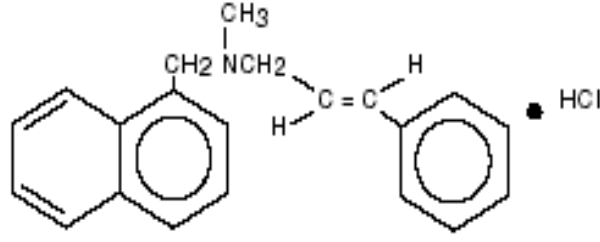
Naftifin, sıklıkla dermatofit olarak bilinen yüzeyel mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bir antifungaldir. Naftifin HCl, allilamin sınıfında yer alır ve skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek etki gösterir. Terapötik dozlarda vücut sıvılarında çok düşük miktarda bulunmasından dolayı naftifinin kantitatif analizi için duyarlı analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır ve bu grup ilaçlar üzerindeki araştırmalar devam etmektedir.

Farmakopede naftifinin miktar tayini analizleri normal faz HPLC yöntemi ile yapılmıştır (USP 36, 2013, s:4436-4437). Schatz ve Haberl'in çalışmasında insan plazma örneklerinde HPLC yöntemi ile naftifin miktar tayini analizleri yapılmıştır. Naftifinin spektrofotometrik kantitatif analizi için ise herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Naftifin HCl etken maddesinin ters faz HPLC ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak miktar tayini analizi yönünde çalışma bulunmaması nedeniyle geliştirilen yöntemler orjinal olup ilacın miktar tayini açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, Naftifin HCl etken maddesinin ters faz HPLC ve UV-GB spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmesi, analizler için optimum koşulların saptanabilmesi ve analiz sonuçlarının nitel ve nicel değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Naftifin HCl Kimyasal Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri



Şekil 1.1. Naftifin HCl Kimyasal Yapısı

Naftifin HCl, naftifinin hidrokloroid tuz formudur, sentetik bir allilamin türevi geniş spektrumlu antifungaldir. Naftifin HCl'nin kimyasal formülü C₂₁H₂₁N.HCl (Şekil 1.1); IUPAC isimlendirmesi “(E)-N-methyl-N-(naphthalen-1-ylmethyl)-3-phenylprop-2-en-1-amine;hydrochloride” dir (USP 36, 2013, s:4436-4437). Molekül ağırlığı 323,86 g/mol'dür. Beyaz ya da beyaza yakın renkte kristal bir tozudur. Erime noktası 175-179 °C'dir. Kurutulmuş bazda %99.0'dan fazla ve %101.0'dan az C₂₁H₂₁N.HCl içerir. 4 saat süreyle 105 °C'de fosfor pentoksitte kurutulduğunda ağırlığının %0,5'inden fazla kaybetmez. Tutuşmada kalıntı %0.1'den daha fazla değildir. 25 °C'nin altındaki oda sıcaklığında ve sıkı kaplarda saklanmalıdır.

Naftifin HCl, inert bir gazla temizlenmesi gereken etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve dimetilformamid (DMF) gibi organik çözücülerde çözünür. Etanol ve DMSO'teki çözünürlüğü yaklaşık 5 mg/mL, DMF'deki çözünürlüğü yaklaşık 10 mg/mL'dir.

Naftifin HCl sulu tamponlarda az çözünür. Sulu tamponlarda maksimum çözünürlük için, genellikle önce DMF içinde çözülmeli ve daha sonra seçilen sulu tampon ile seyreltilmelidir. Bu yöntemle hazırlanan 1:5 DMF:PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,2) çözeltisinde naftifinin çözünürlüğü yaklaşık 0,16 mg/mL'dir.

1.2. Naftifin HCl Farmakolojik Etkisi

Naftifin HCl, allilamin sınıfında ilk keşfedilen antifungaldir, 1974 yılında keşfedilmiştir (Berney ve Schuh, 1978). Naftifin sadece topikal aktiviteye sahiptir. Naftifin HCl, skualen epoksidaz enzim inhibisyonu yaparak ergosterol sentezini engeller. Naftifin fungistatik ve fungisidal etkiye sahiptir. Ayrıca naftifinin lokal bakterisidal, vazokonstriktif, antihistaminik, kortikosteroidal ve antiinflamatuvar etkileri de bulunmaktadır (Jung, 1987 ve Tronnier, 1987).

Mantarlar morfolojik özelliklerine göre maya ve küf olarak gruplanan ökaryotik canlı mikroorganizmalardır. Klorofil taşımazlar. Parazit veya saprofit olarak yaşayabilen mantarlar eşeyli veya eşeysiz üreyebilirler. Mantar hücre duvarında kitin, mannan ve glukan bulunur. Mantar hücre zarında ise ergosterol ve zimesterol gibi steroller bulunur. Hücre duvarında bulunan kitin antibiyotiklerden etkilenmezken, hücre zarında bulunan steroller ise çoğu antifungalın etkili olduğu bölgedir.

Mantarların organizmaya yerleşerek hasar vermesi sonucunda meydana getirdiği semptom ve bulgular fungal enfeksiyon olarak ifade edilmektedir. Dermatofitik, mukokütanöz, sistemik ve fırsatçı fungal enfeksiyonlar görülebilir. Son yıllarda kronik hastalıklar ve immün supresyona neden olan durumların artışı nedeniyle fungal enfeksiyonlar sık görülmektedir.

Antifungaller mantar enfeksiyonlarına karşı etkili ilaçlardır, antibakteriyel etkileri zayıftır veya yoktur. Memeli hücrelerinin de mantar hücreleri gibi ökaryotik olması nedeniyle antifungal ilaçların toksik etkileri antibakteriyel ilaçlara göre daha fazladır. Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde çeşitli antifungal ilaçlar kullanılmaktadır. Mantarların tür ve cins dağılımının değişkenlik göstermesi, ilaçlara karşı direnç ve/veya çapraz direnç gelişimi tedaviyi zorlaştıran etmenlerdendir. Antifungal ilaçlar kimyasal yapılarına, etki mekanizmalarına ve tedavi uygulama şekillerine göre sınıflandırılabilir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Antifungal İlaçların Sınıflandırılması

Tedavi Şekline Göre	
Topikal	Mikonazol, Ketokonazol, Sulkonazol, Tiokonazol, Klotrimazol, Ekonazol, Efikonazol, Lulikonazol, Klotrimazol, Oksikonazol, Sertakonazol, Naftifin, Terbinafin, Butenafin.
Sistemik	Amfoterisin B, Lipozomal Amfoterisin B, Flusitozin, Kasprofungin, Mikafungin, Andulafungin, Flukonazol, Vorikonazol, Posakonazol, Ketokonazol, İtrakonazol, Terbinafin, Griseofulvin.
Kimyasal Yapılarına Göre	
Poliyenler	Amfoterisin B, Nistatin, Hamycin
Ekinokandinler	Kasprofungin, Mikafungin, Andulafungin
Heterosiklik Benzofuran	Griseofulvin
Antimetabolit	Flusitozin
Azoller	İmidazoller (Klotrimazol, Mikonazol, Ketokonazol, Oksikonazol, Bifonazol, Butokonazol, Ekonazol, Fentikonazol, İzokonazol, Klimbazol, Lanokonazol, Lulikonazol, Omokonazol, Oksikonazol, Sertokonazol, Tiyokonazol, Terkonazol, Triazoller Flukonazol, İtrakonazol, Vorikonazol, Posakonazol, Albakonazol, Efikonazol, İzavukonazol, Ravukonazol.
Allilaminler	Naftifin, Terbinafin, Butenafin
Etki Mekanizmasına Göre	
Hücre zarı geçirgenliğini değiştirenler	Azoller, Poliyenler, Allilaminler (Naftifin, Terbinafin)
Beta-glukan sentezini bloke edenler	Ekinokandinler
Nükleik asit sentezini bloke edenler	Flusitozin
Mikrotübül işlevlerini bozanlar	Griseofulvin

Allilaminler, skualen epoksidaz enzimi seviyesinde mantar hücre zarının önemli bir ögesi olan ergosterolün sentezini inhibe eden antifungallerdir. Allilaminler, skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek hücre içinde skualen birikimine neden olurlar ve böylece mantar hücre membran fonksiyonunu ve hücre duvar sentezini bozarlar. Allilamin sınıfındaki tüm antifungallerde tersiyer allilamin fonksiyonunun moleküler yapısında komşu çift bağa sahip azot atomu bulunur. Naftifin, Terbinafin ve Butenafin allilamin sınıfında bulunan antifungallerdir (Kayaalp, 2002, s:306 ve Petranyi ve ark., 1984).

Allilaminler dar etki spektrumuna sahiptirler, terapötik doz düzeyinde dermatofit enfeksiyonlarına karşı etkileri oldukça yüksektir. Allilaminler dermatofitlere karşı gravimetrik etki gücü en fazla olan ve fungisidal etkili antifungallerdir (Georgopoulos ve ark., 1981 ve Kayaalp, 2002, s:306).

Naftifin HCl Farmakodinamik Özellikleri: Naftifin HCl topikal etkili bir antifungaldir. Dermatofitlere (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) karşı oldukça etkilidir. Maya (*Candida*, *Pityriasis versicolor*), küf (*Aspergillus*) ve diğer funguslara (*Sporothrix schenckii* gibi) karşı orta derecede etkilidir (Gupta ve ark., 2008).

İn vitro ortamda dermatofitler ve küflere karşı fungisidal etki gösterir. Mayalara karşı, suşa bağlı olarak, fungistatik (esas olarak) veya fungisidal etkilidir. Georgopoulos ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada in vitro ortamda naftifinin dermatofitlere karşı fungisidal (Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) aralığı 0.1-0.2 µg/mL); *Candida parapsilosis* ve *Candida albicans* dahil *Candida* türlerine karşı fungisidal (MIC aralığı 1,5-100 µg/mL); *Aspergillus* (MIC aralığı 0,1-12,5 µg/mL) ve *Sporothrix schenckii* (MIC aralığı 0,8-1,5 µg/mL)'ye karşı iyi etki profili gösterdiği tespit edilmiştir (Georgopoulos ve ark., 1981).

Ayrıca naftifin, %0.04-1.25 minimum bakterisidal konsantrasyonlarında gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı lokal antibakteriyel etki gösterir (Muhlbacher, 1991).

Naftifin HCl Farmakokinetik Özellikleri: Deriye transdermal yoldan kolayca penetre olur, cildin geçirgenliği emilim üzerinde etkilidir. Epiderminin *stratum corneum* tabakasına penetre olur.

Derinin çeşitli katmanlarında uzun süre antifungal konsantrasyonda bulunur. Derinin tüm katmanlarına nüfuz eder, maksimum konsantrasyon yüzeysel tabakalarda gözlenir. Stiittgen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, in vitro ortamda C-

14 işaretli naftifinin, transdermal penetrasyonu sonrasında, farklı deri tabakalarında farklı konsantrasyonlarda (stratum korneumda 1300 pg/mL, epidermisin diğer katmanlarında 38 pg/mL, koriumda 13,5 pg/mL ve subkutiste 0,5 pg/mL) bulunduğu gösterilmiştir (Stiittgen, 1987).

Sağlıklı gönüllülerde ³H işaretli Naftifin HCl %1 krem uygulaması sonrası, uygulanan naftifin dozunun %4,2'sinin emildiği ve %6'sının sistemik dolaşıma geçtiği gösterilmiştir. Sağlıklı gönüllülerde ³H işaretli Naftifin HCl %1 krem uygulanmasından 5-10 gün sonra bile epidermiste *Tricophyton mentogrophytes* için belirlenen MIC'dan 3-5 kat daha yüksek konsantrasyonda naftifin saptanmıştır (Muhlbacher, 1991).

Naftifin HCl neredeyse tamamen metabolize olur. Mühlbacher'in yaptığı bir çalışmada, C-14 işaretli naftifinin intravenoz olarak verilen dozunun köpeklerde %57'sinin ve ratlarda ise %70'inin safrada elimine edildiği gösterilmiştir (Muhlbacher, 1991). Naftifin HCl antifungal etkisi olmayan metabolitlere dönüştürülerek dışkı ve idrarla atılır. Yarı ömrü yaklaşık 2-3 gündür.

Naftifin etkisi pH bağımlıdır, nötr pH aralığında en yüksek aktivite derecesini gösterir. Naftifinin çözünürlüğü siklodekstrinlerle kompleks oluşturularak artırılabilir (Uzqueda ve ark., 2006).

Naftifin HCl Endikasyonları: Naftifin HCl *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermopyton floccosum* 'un neden olduğu çeşitli dermatomikozlara; Onikomikoza; İnflamatuvar dermatomikoza (kaşıntılı veya kaşıntısız); Kutanöz kandidiyazisa; *Pitriyazis versicolor*'a karşı etkilidir (Rx Media Pharma® 2020).

Naftifin HCl Pozoloji ve Uygulama Şekli: Enfeksiyonlu bölgeye akşam yatmadan önce, hedef bölge pamuk ve ılık suyla iyice temizlenip kurulandıktan sonra hafifçe ovuşturularak uygulanmalıdır. Enfeksiyonlu bölge ve etrafındaki 2 cm'lik hastaliksız bölgeye ince bir katman şeklinde uygulanmalıdır. Günde bir kez

uygulanır. Dermatomikozlarda 2-4 hafta (ciddi vakalarda 4-8 hafta), kutanöz kandidiyaziste 4 hafta, onikomikozda 6 aya kadar ve *pitriyazis versicolor* tedavisinde 2 hafta süreyle kullanılmalıdır (Rx Media Pharma® 2020).

1.3. Naftifin HCl ile Yapılmış Literatürdeki Analitik Çalışmalar

Literatürde, bilindiği kadarıyla, Naftifin HCl'nin krem ve jel dozaj şekillerinden Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile analizi için sadece iki adet çalışma bulunmaktadır, spektrofotometrik kantitatif analizi için ise herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Çizelge 1.2) (Schatz ve Haberl, 1986 ve USP 36, 2013).

Çizelge 1.2. Naftifin HCl ile Yapılmış Analitik Çalışmalar

	Çalışma-1 (USP 36, 2013, s:4436-4437)	Çalışma-2 (Schatz ve Haberl, 1986)
Yöntem	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) (Plazma analizlerinde). Gaz Kromatografisi (GC) (İdrar analizlerinde).
Örnek	10 mg Naftifin HCl, 50 mL mobil fazda çözülüp dilüe edilerek alınmış kromatogramlar	Hekzan ile ekstrakte edilerek elde edilmiş plazma naftifin ve demetil türevi.
Mobil Faz	N-hekzan; alkol; dimetilformamid; formik asit (200:60:40:2, h/h/h/h)	Asetonitril/su (80/20, h/h) + %0,5 Trimetilamin (h/h); %40 sulu çözelti
Kolon	4,6 mm x 25 cm; 5 µm; L3 kolon	4,6 mm x 25 cm; 7 µm; RP kolon
Akış Hızı	2.0 mL/dk	1.5 mL/dk
Dalga Boyu	270 nm	254 nm
Dedektör	Ultraviyole (UV) dedektör	UV dedektör (HPLC). Alev iyonizasyon dedektör (GC).

USP 36 Farmakopesi'nde Naftifin HCl analizi için HPLC yöntemi önerilmiştir. Kromatografik koşullar; 270 nm dalga boyu, 2,0 mL/dk akış hızı, N-hekzan; alkol; dimetilformamid; formik asit (200:60:40:2, h/h/h/h), L3 (4,6 mm x 25 cm; 5 µm) kolonu ve UV dedektör olarak belirlenmiştir. 10 mg Naftifin HCl 50 mL mobil fazda çözülüp kromatogramlar alınmıştır.

Schatz ve Haberl'in yaptığı çalışmada; Exoderil® kremin naftifin bileşen kısmı ve demetil türevinin kan plazmasında ve naftifin metabolitlerinin (naftoik asit, p-hidroksifenil, 3,4-dihidrodiol naftifin ve 7,8-dihydrodiol-naftifin) idrarda miktar tayini için analitik yöntemler uygulanmıştır. Plazma analizi için, örneklerin hekzan ile ekstraksiyonundan sonra UV dedektörlü bir HPLC yöntemi uygulanmıştır. İdrar analizi için metabolitler dekonjuge edilmiş, kloroformla ekstrakte edilmiş, silislenmiş ve alev iyonizasyon dedektörlü gaz kromatografi yöntemi uygulanmıştır. Validasyon çalışmalarında, ilacın ana bileşen ve metabolitler için standart kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu gözlenmiştir. Validasyon çalışmalarında teşhis sınırı (LOD); naftifin ve demetil türevinde 5 ng/mL, naftoik asitte 1µg/mL ve diğer metabolitlerde 2µg/mL saptanmıştır.

1.4. Tezin Amacı

İlaçların farmasötik preparatlardan duyarlı, hızlı ve kolay analizi için yöntemler geliştirilmesi ve bu yöntemlerin diğer organik ve dolgu maddelerinden etkilenmeden direkt analize olanak sağlaması oldukça önemlidir. Tedavi edici dozlarda ilaçların vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarının oldukça düşük düzeylerde olması, kantitatif analizlerin çok hassas yöntemlerle yapılmasını gerektirmektedir.

Kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler, ilaç analizleri ve klinik çalışmalarda kısa sürede ve basit şekilde analiz yapılmasını mümkün kılmaktadır. Bu yöntemlerde ortamdaki katkı maddeleri ve safsızlıklar analiz sonucunu etkilememektedir. Ayrıca çok az miktardaki ilaçların analizleri yapılabilmektedir. Bu yöntemler farmasötik kalite kontrolünde etkin ilaç maddeleri için oldukça spesifik olarak kullanım olanağı sağlamaktadır.

Literatürde Naftifin HCl miktar tayini için normal faz HPLC kullanılmıştır. Normal faz HPLC, ters faz HPLC'ye göre daha az kullanılmakta ve cihaz geçişlerinde hatların temizliği zaman almaktadır. Aynı zamanda normal faz HPLC'de n-hekzan gibi kanserojenlerin kullanılması ayrı bir sorundur. Naftifin HCl'nin HPLC

ile analizi için sadece iki adet çalışma bulunmaktadır (Schatz ve Haberl, 1986 ve USP 36, 2013). Bu çalışmalarda analizler plazma ve idrar örneklerinde yapılmıştır, doğrudan etken madde üzerinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde Naftifin HCl'nin spektrofotometrik kantitatif analizi için ise herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında Naftifin HCl analizi için orijinal ters faz HPLC ve Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-GB) spektrofotometrik yöntemler geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu tez kapsamında Naftifin HCl'nin ters faz HPLC ve UV-GB spektrofotometrik yöntemlerle miktar tayini analizinin yapılması, yöntemlerin optimizasyonu ve valide edilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen HPLC yöntemi ile yapılan kantitatif tayinin doğruluğunun, UV-GB spektrofotometrik analiz yöntemiyle istatistiksel olarak karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Geliştirilen yöntemler Naftifin HCl krem farmasötik preparatlara da uygulanarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Geliştirilen yöntemlerle az miktarda etken madde ile analiz yapılması; basit, ekonomik ve zaman kaybına neden olmadan kısa sürede sonuç elde edilebilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Madde ve Piyasa Preparatları

Tez kapsamında kullanılan etken madde, farmasötik preparat ve piyasa preparatları çizelge 2.1, çizelge 2.2 ve çizelge 2.3'te belirtilmiştir. Çalışılan tüm kimyasal maddeler, analitik veya kromatografik saflıkta kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Çalışılan Etken Madde

Etken Madde	Firma	Kimyasal Yapısı
Naftifin HCl	Global Calcium Pvt. Ltd. (Hindistan)	$C_{21}H_{21}N \cdot HCl$ (323,86 g/mol)

Çizelge 2.2. Çalışılan Farmasötik Preparat

Farmasötik Preparat	Firma
Exoderil® %1 30 g Krem	Sandoz İlaç San. ve Tic. A.Ş.

Çizelge 2.3. Türkiye İlaç Piyasasında Bulunan Naftifin HCl Farmasötik Preparatları (Rx Media Pharma® 2020)

Müstahzarı	Firma	Farmasötik Şekli	Birim Doz İçeriği
Exoderil®	Sandoz İlaç San. ve Tic. A.Ş.	Krem	% 1'lik 30 g
Exoderil®	Sandoz İlaç San. ve Tic. A.Ş.	Sprey Çözelti	% 1'lik 20 mL
Dermifin®	Farma-Tek İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.	Krem	% 1'lik 30 g
Dermifin®	Farma-Tek İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.	Sprey Çözelti	% 1'lik 20 mL
Exelderm®	Abdi İbrahim İlaç Sa. ve Tic. A.Ş.	Krem	% 1'lik 30 g
Exelderm®	Abdi İbrahim İlaç Sa. ve Tic. A.Ş.	Sprey Çözelti	% 1'lik 20 mL
Funderyl®	Solebio İlaç San. İth. İhr. A.Ş.	Krem	% 1'lik 30 g
Funderyl®	Solebio İlaç San. İth. İhr. A.Ş.	Sprey Çözelti	% 1'lik 20 mL
Nafderilex®	Dinçsa İlaç San. ve Tic. A.Ş.	Krem	% 1'lik 30 g
Naxoder®	Vefa İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.	Krem	% 1'lik 30 g
Naxoder®	Vefa İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.	Sprey Çözelti	% 1'lik 20 mL

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazlar çizelge 2.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. Kullanılan Cihazlar

HPLC Cihazı	Agilent 1100 serisi (UV-GB Dedektör)
HPLC Kolonu	Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm)
UV Spektrofotometresi	Agilent Cary 60 UV-Vis
Hassas Terazı	Radwag ve Ohaus
Manyetik Karıştırıcı	Ikamag RH Jonke & Kunkel IKA-Labortechnik
Ultrasonik Su Banyosu	Selecta
IR Spektrometresi	Diamond ATR Agilent Cary 630 FTIR
Erime Noktası Tayin Cihazı	Büchi Melting Point B-540

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler çizelge 2.5'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril	CH ₃ CN, Sigma-Aldrich (≥99.9% saflıkta)
Trietilamin	C ₆ H ₁₅ N, Sigma-Aldrich (≥99.5% saflıkta)
Metanol	CH ₃ OH, Sigma-Aldrich (≥99.9% saflıkta)
Ultra Saf Su	

2.1.4. Kullanılan Cam ve Diğer Malzemeler

Tez kapsamında kullanılan cam ve diğer malzemeler çizelge 2.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 2.6. Kullanılan Cam ve Diğer Malzemeler

Balon Joje	25 mL, 50 mL, 100 mL, 1000 mL (İsolab)
Beher	30 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL (İsolab)
Mezur	1000 mL (İsolab)
Cam Pipet	1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL (Schott)
Vial	2 mL (Agilent)
Enjektör	5 mL (Aysset)
PTFE Filtre	0,20 µm (Sartorius)
Kuvartz Küvet	(İsolab)
Tartım Kabı	(İsolab)

2.2. Yöntemler

2.2.1. Spektroskopi

Spektroskopi, elektromanyetik ışınların maddeyle olan etkileşiminin incelenmesidir. Spektroskopi yönteminde atom, iyon veya moleküllerin enerji düzeyleri arasında geçerken (bir enerji düzeyinden diğerine) absorplanan elektromanyetik spektrumdaki ışıma ölçülür. Spektroskopinin ana unsurları titreşim, dönme ve elektronik enerjilerde gözlenen değişikliklerdir. Spektroskopik yöntemler, kalitatif ve kantitatif analiz, asit-baz dengesi sabitlerinin belirlenmesi ve saflık kontrolü gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır. Genellikle elektromanyetik ışımaya dayanan spektroskopik yöntemler kullanılır (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7. Elektromanyetik Işımaya Dayanan Yaygın Spektroskopik Yöntemler

- Gama-ışını emisyonu
- X-ışını absorpsiyonu, emisyonu, floresansı ve kırınımı
- Vakum ultraviyole absorpsiyonu
- Ultraviyole-görünür absorpsiyonu, emisyonu ve floresansı
- İnfrared absorpsiyon ve Raman saçılması
- Mikrodalga absorpsiyonu
- Elektron spin rezonansı
- Nükleer manyetik rezonans

Elektromanyetik ışımaya, çok yüksek hızlı bir enerji çeşitidir. En sık rastlanan çeşitleri görünür ışık ve kızılötesi (infrared) ışımalarıdır; X-ışınları, mikrodalga, ultraviyole ve radyo ışınları diğer ışımaya çeşitleridir.

Elektromanyetik spektrum, oldukça geniş bir dalga boyunu ve enerji aralığını kapsamaktadır. Elektromanyetik ışınlar, dalga boyu ve frekansına göre sınıflandırılabilir. Ultraviyole, görünür bölge ve infrared ışınlarının kullanıldığı spektroskopik yöntemler optik yöntemler olarak adlandırılır (Skoog ve ark., 1998, s.:116-140 ve Tunalı ve Özkar, 2011).

İnsan gözü, 390-780 nm dalga boyu aralığında ışıkları algılayabilir. Spektroskopik olarak daha düşük dalga boylarında ve büyük dalga boylarında ölçüm yapabilmektedir. Bu durum göz önünde bulundurularak belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. UV-GB spektroskopisi 110-1000 nm dalga boyları arasında, IR spektroskopisi 2500-30000 nm dalga boyları arasında ve NMR spektroskopisi ise yüzlerce metre dalga boylarına ulaşabilen radyo dalgaları ile çalışabilen cihazlardır.

2.2.1.1. Spektrofotometri

Spektrofotometrik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiyi temel alan, organik ve inorganik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde sıklıkla kullanılan analitik yöntemlerdir. Spektrofotometrik yöntemlerle çözültideki atom, molekül veya iyonların enerji düzeyleri arasında geçişi esnasında absorplanan elektromanyetik ışımaya ölçülür ve yorumlanması yapılır. Spektrofotometri, çözültideki madde miktarının, bir fotoelektrik transüder veya başka türden elektroanalitik araç ile çözültinin içinen geçen ya da çözülti tarafından tutulan ışık miktarından yararlanılarak ölçülmesidir. Spektrofotometrik yöntemlerle madde tarafından absorplanan ışınların dalga boyları da saptanır (Skoog ve ark., 1998, s.:116-140 ve Tunalı ve Özkar, 2011).

2.2.1.2. Işığın Absorpsiyonu

Işığın absorpsiyonu, çeşitli dalga boyundaki ışık demetinin saydam bir ortamdan geçirilmesi sırasında, ışık demeti içindeki bazı dalga boylarının alıkonmasıdır.

Absorbans, absorplanan ışığın miktarıdır. Molekülün yapısı, ışığın dalga boyu, ışığın çözelti içinde aldığı yolun uzunluğu ve çözelti derişimi absorbansı belirleyen faktörlerdir. Absorbans ölçümü ile analitlerin kalitatif analizi yapılırken uyulması gereken kurallar vardır. Bunlar; uygun konsantrasyon, tanecik ve çözücü arasında etkileşim olmaması, gelen ışının monometrik (tek dalga boyu) özellikte olması ve saçılmaları en aza indirgeyecek tanecik büyüklüğüdür.

Atom, molekül veya iyonlar, belirli enerji düzeylerinde bulunabilirler. Uyarıcı foton enerjisi, temel ve uyarılmış enerji seviyeleri arasında oluşan farka eşit olduğunda ışın absorplanır. Temel ve uyarılmış enerji seviyeleri arasındaki fark herbir maddenin kendine özgüdür, yani her maddenin kendine has absorpsiyon spektrumu vardır. Bundan dolayı, maddenin ışığı absorplama özelliğinden yararlanılarak kantitatif analizler yapılabilir. Işığın absorpsiyonu, moleküldeki atomların türüne, büyüklüğüne, moleküllerin şekillerine ve düzenlenmesine göre sınıflandırılabilir.

2.2.1.3. Absorpsiyon Yasaları

Beer Yasası, Lambert Yasası ve Lambert-Beer Yasası, absorpsiyon yasalarıdır. Lambert-Beer Yasası, spektrofotometrik ve kolorometrik analizlerde kullanılır.

Beer Yasası: P_0 şiddetinde monokromatik bir ışın demeti çözültiden geçerken absorpsiyon meydana gelir ve ışın demetinin şiddetinde bir miktar azalma meydana gelir. Işın demetinin şiddetindeki azalma, çözültide tamamen çözünmeyen

maddelerin derişimiyle ilişkilidir. Absorbans, ışının absorblayıcı ortamda aldığı yol ve absorblayıcı türün derişimi ile doğru orantılıdır.

$$\log \frac{P_0}{P} = k'C$$

Lambert Yasası: Saydam çözeltilerden geçen monokromatik ışın demetinin başlangıç şiddeti (P_0), çözelti içinde aldığı yola/absorblayıcı ortamın kalınlığına bağlı logaritmik veya üstel veya geometrik olarak azalmaktadır.

$$\log \frac{P_0}{P} = kb$$

Lambert-Beer Yasası: Beer yasası ve Lambert yasasının tek bir eşitlikte birleştirilmesi ile elde edilir. Lambert-Beer yasası ile moleküllerin çalışılan dalga boyundaki ışını absorblaması sonucu ortaya çıkan azalma belirlenir.

Lambert-Beer yasasına göre;

1. Çözeltiye gelen ve çözeltilerden ayrılan ışık arasında matematiksel bir ilişki vardır.
2. Absorbans, absorblayan maddenin konsantrasyonu ve çözeltilerden geçen ışığın aldığı yolun uzunluğu ile doğru orantılıdır.
3. Ölçülen maddenin konsantrasyonu arttıkça absorbans artar.

Lambert-Beer yasasının geçerli olabilmesi için; analiz esnasında maddenin özelliklerindeki değişiren olaylar (disosiasyon, asosiasyon, polimerleşme, kompleks oluşumu gibi) ve parazit olaylar (kırılma, yansıma ve difüzyon gibi) meydana gelmemeli ve kullanılan ışık monokromatik (tek dalga boyunda) olmalıdır (Gündüz, 2002).

$$A = \Sigma \cdot b \cdot C$$

$$\log \frac{P_0}{P} = abc$$

P: Çözeltilerden geçmiş monokromatik ışığın gücü, **P₀:** Gelen ışın demetinin başlangıç gücü, **a:** Spesifik absorpsiyon katsayısı veya absorptivite (g/L), **b:** Absorblayıcı ortamın kalınlığı (ışığın numune içerisinde aldığı yol) (cm), **k:** Monokromatik ışının dalga boyuna bağlı sabit bir katsayı, **Σ:** Molar absorptivite katsayısı (mol/L), **A:** Absorbans, **C:** Çözeltinin konsantrasyonu (g/mL veya mol/L).

Lambert-Beer Yasası, sadece çok seyreltik çözeltilere uygulanabilir. Analizi yapılan çözeltilerdeki iyonların konsantrasyonu yüksek olduğunda ve ortamda yabancı bileşik varlığında yasadan sapmalar olmaktadır. Taneciklerin birbirlerinin yük dağılımını değiştirmesiyle absorbansta büyük değişimler gözlemlenebilir. Ortamda yüklü

tanecikler ne kadar fazla olursa sapmalar da o oranda büyük olur. Böyle durumlarda maddenin absorpsiyon-konsantrasyon grafiğinde bir doğru elde edilemez ve doğruluktan sapmalar gözlenir. Lambert-Beer Yasası'ndan sapma nedenleri çizelge 2.8'de belirtilmiştir (Gündüz, 2002).

Çizelge 2.8. Lambert - Beer Yasasından Sapma Nedenleri

Cihaz kaynaklı sapmalar	<ul style="list-style-type: none">• Cihaza düzgün potansiyel gelmemesi• İyi çalışmayan ışın kaynağı• İyi çalışmayan detektör sistemi• Kaçak ışın varlığı• Hatalı monokromatör varlığı• İyi ayarlanamayan slit aralık
Kimyasal madde kaynaklı sapmalar	<ul style="list-style-type: none">• Disosiyasyon• Asosiyasyon• İyonlaşma• pH ayarlaması• Fosforesans ve floresans• Çözücü değişmesi• Sıcaklık
Analizci hatası kaynaklı sapmalar	

2.2.1.4. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopisi

UV-GB spektroskopisi, maddenin moleküler bağları ile ışığın etkileşimi neticesinde elektronların uyarılmasında, fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve bu grupları bulunduran bileşiklerin analizinde kullanılır. Işın demetinin, örnek içerisinden geçmesi ya da örneğin yüzeyinden yansıtılması sonrası, azalması ölçülür. Sıklıkla çözelti içerisindeki moleküler, inorganik iyon ve komplekslerin ölçülmesinde yararlanır.

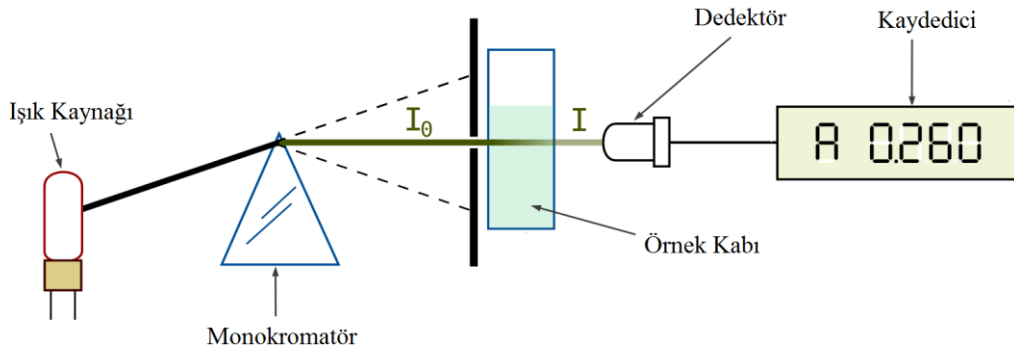
UV-GB spektroskopisi, elektronik geçiş spektrumuna sahiptir, 200-400 nm aralığında UV ve 400-700 nm aralığında GB'yi kapsar. GB'de absorpsiyon yapan bileşik absorpladığı rengin tamamlayıcı renginde olacak şekilde renklidir. UV-GB yönteminde absorpsiyon pikleri, uyarılan elektronlar bir elektronik seviyeden

diğerine geçerken, elektronların bir yörüngeden daha yüksek bir yörüngeye çıkması ile meydana gelir. Absorpsiyon piklerinin keskinliğı, moleküllerde elektronik hareketin yanında dönme ve titreşme hareketlerinin olması nedeniyle azalır. Molekülün absorpsiyon yapan fonksiyonel grubu (kromofor grubu), hep aynı bölgede absorpsiyon yaparken molekülün geri kalanı absorpsiyon yapmaz. Aynı molekülde iki veya daha fazla kromofor bulunduğunda ve bu gruplar en az ikili bağ içerdiklerinde, absorpsiyon değeri bu grupların absorpsiyonlarının toplamına eşittir ve bu durum toplanabilirlik kuralı olarak ifade edilir. Toplanabilirlik kuralı, karışımlara ait bileşenlerle yapılan çalışmalarda da kullanılır (Erdik ve ark., 2001).

2.2.1.5. Spektrofotometre

Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun fonksiyonu olarak analitin absorbans veya geçirgenliğini ölçmede kullanılır. Spektrofotometre, çözelti içerinden geçen veya çözelti tarafından tutulan ışık miktarını tespit ederek çözeltide bulunan madde miktarını ölçebilir. Spektrofotometre, çözeltinin içerisinden geçtiğı halde absorplanmayan ışığın yoğunluğunu saptayarak çözelti içeriğinde çalışılan maddenin miktarına yönelik kantitatif veriler elde edilmesini sağlar.

Işık kaynağı, dalga boyu seçicisi, örnek kabı, dedektör ve kaydedici olmak üzere beş temel kısımdan oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Spektrofotometrenin Temel Yapısı

Işık Kaynağı: Çözelti üzerine düşürülecek ışığın üretildiği sürekli ışık kaynaklarıdır, 20-700 nm dalga boyları arasında ışık üretebilirler. Döteryum (D₂), Hidrojen (H₂), Ksenon (Xe), Tungsten (W) flaman lambası ve civa buhar lambası, UV ve GB için kullanılabilen sürekli ışık kaynaklarıdır. Döteryum (D₂) ve Hidrojen (H₂) elektriksel boşalım lambaları, UV bölge için en sık kullanılan ışık kaynaklarıdır, 180-380 nm dalga boyları arasında ışık yayarlar. Ksenon (Xe) ve civa buhar lambaları, UV-GB bölgenin tamamında (150-700 nm) kullanılabilir. Tungsten (W) flaman lambası; yakın IR bölge (320-3000 nm) ve GB’de kullanılır.

Monokromatör (Dalga boyu seçiciler): Işık kaynağından gelen beyaz ışıktan sadece belli dalga boyundaki ışığın çözelti üzerine düşürülmesini ve polikromatik ışıktan monokromatik (tek dalga boyu) ışık elde edilmesini sağlarlar. Genellikle prizma ya da optik ağ gibi parçalar, monokromatör olarak kullanılmaktadır. Filtreli fotometrelerde ışık filtresi, spektrofotometrelerdeyse ışık prizması monokromatör olarak kullanılır. Çözelti üzerine düşürülecek ışığın daha monokromatik hale gelmesini sağlamak amacıyla çift monokromatörlü spektrofotometreler kullanılabilir.

Işık filtreleri; uygun boyayla boyanan cam yapıda filtredir. Portatifirler, istenildiğinde uygun dalga boyundaki ışık filtresi cihaza takılarak kullanılır. Geçirdikleri dalga boyları ışık filtrelerinin üzerinde yazılıdır. Işık filtresinin rengi çözeltinin rengi dikkate alınarak seçilir. Örneğin madde mavi ışığı tutuyorsa sadece mavi ışığa geçirgen ışık filtresi seçilir.

Işık giriş aralığı (Slit, Giriş yarığı); sadece istenen dalga boyunda elde edilen ışığın monokromatör konumunun ayarlanarak sisteme ince hüzmeye şeklinde girişini sağlayan küçük geçiş aralığını ifade eder. Elde edilecek spektrumun şekli, pik yapısı, keskinliği, ölçüm duyarlılığı ve sinyal/gürültü gibi parametreleri etkiler.

Prizma; cam ya da kuartz yapıdadır. Cam prizmalar, düşük UV ışınlarını iyi geçirmezler, GB için uygundur. Kuartz prizmalarsa, UV ve GB ışınlarını iyi

geçirirler ve IR'e yakın bölgeler için uygundur. Kuartz prizmalar daha pahalı spektrofotometrelerde bulunur.

Isık çıkış aralığı (Slit, Giriş yarığı); istenen dalga boyu dışında kalan ışığın küvete ulaşmasını engel olan geçiş aralığıdır.

Örnek Kabı (Numune veya Çözücü kısmı): Çözelti ve çözücü konulan şeffaf kap ve yerleştirildikleri bölmelerdir. Çalışılan spektrum bölgesinde ışını geçiren maddelerden yapılırlar. UV bölgesinde (200-400 nm dalga boyu aralığında) çalışılıyorsa kuartz veya erimiş silis küvetler, GB (400-800 nm dalga boyu aralığında)'de çalışılıyorsa cam ve kuartz küvetler kullanılır. Kuartz hücreler, yakın IR çalışmaları için de kullanılır.

Dedektör: Işığın madde tarafından absorplanıp absorplanmadığını saptamak amacıyla kaynaktan gelen ışık şiddetini ölçmeye yarayan düzenektir. Optik sinyali (ışın enerjisini) elektrik enerjisine dönüştürür ve böylece optik sinyalin kaydediciye ulaşmasını sağlar. Fototüpler, fotoçoğaltıcı tüpler, silisyumlu fotodiodlar, fotovoltaik hücreler, fotoiletken hücreler ve yük aktarım düzenekleri sıklıkla kullanılan dedektörlerdir. Fotovoltaik hücreler, fototüpler ve fotoçoğaltıcı tüpler UV-GB'de kullanılabilen dedektörlerdir. Işına duyarlı olma, ışın şiddetiyle doğru orantılı sinyal üretilmesi, kararlı olma ve üzerine düşürülen ışığa yanıt zamanının kısa olması tüm dedektörlerde bulunması gereken özelliklerdir.

Kaydedici: Dedektörden gelen elektrik sinyalini ölçen, burada elde edilen değerleri (dalga boyu, ışığın şiddeti) rakamsal olarak ifade eden ve gelen sinyalleri bilgisayar ekranı ve kağıt üzerine aktaran kısımdır.

Ayna; çift ışın yollu spektrofotometrelerde, gelen ışığı ikiye bölerek numune ve referans hücreye eşit ışık gönderilmesini sağlayan düzeneklerdir.

Metre; ölçülen ışık miktarı sayısal olarak ifade eden kısımdır.

Referans hücresi; kör olarak kullanılan çözücülerin bulunduğu bölümdür. Hücre yapıları numune hücresi ile aynıdır.

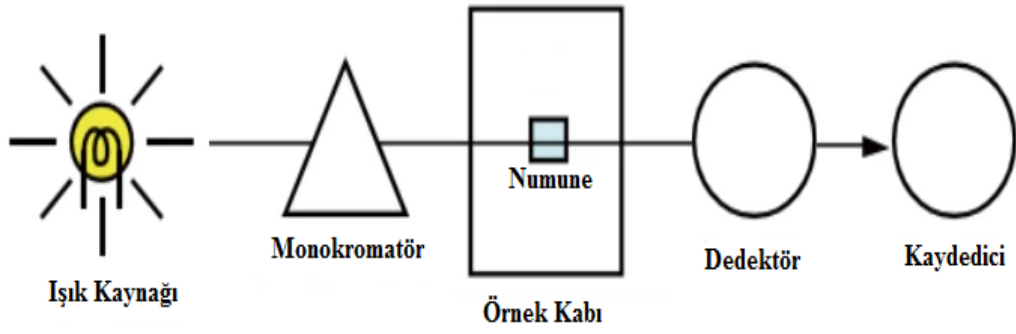
Kör; Cihazın optik ayarlarının yapılması amacıyla kullanılan çözeltilerdir. En yaygın kullanılanı distile su ködür ve her zaman absorbans değerinin sıfırlanmasında yararlanır. Reaktif ködür, analizde gerekli reaktif için hazırlanır. Numune ködür, analizdeki reaktif/numune oranı dikkate alınarak distile su ya da serum fizyolojikle numunenin karıştırılması ile hazırlanan ködür.

Standart; analiz edilecek maddenin bilinen konsantrasyondaki çözeltilisini ifade eder.

Numune; içerisinde bulunan madde miktarı belirlenmek istenen çözeltiliyi ifade eder.

2.2.1.5.1. Tek Işık Yollu Spektrofotometreler

Tek ışık yollu spektrofotometrelerde bileşenlerin tamamı aynı ışık yolu üzerine yerleştirilir. Tek bir ışın demeti kullanır ve sıfır ayarı ile ölçüm işlemleri ayrı ayrı yapılır. Absorpsiyon ve yüzde geçirgenlik ölçümlerinde kullanılırlar. Kantitatif analizler için uygun, basit, ucuz ve bakımları kolay cihazlardır. Işın kaynağı, monokromatör, dedektör ve kaydedici kısımlarından oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Tek Işık Yollu Spektrofotometre Yapısı

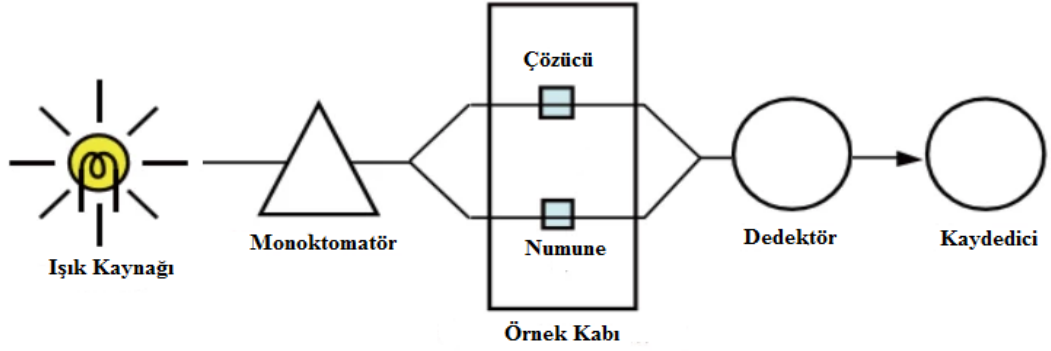
2.2.1.5.2. Çift Işık Yollu Spektrofotometreler

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, monokromatörden gönderilen ışık numuneye ve çözücüye şiddetleri eşit olacak şekilde iki demete ayrılarak gönderilir. Böylece her dalga boyunda “sıfır” ve “yüz” ayarlarının yapılması gerekmez, zaman kayıpları yaşanmaz, aynı anda numune ile çözücünün geçirgenlik değeri karşılaştırılır. Işığın ikiye ayrılmasıyla, iki ayrı dedektör (birbiri ile uyumlu, eşit şiddette ışıkla aynı sinyali üreten) kullanılarak üretilen sinyallerin oranı ölçülür. Bu tür cihazlara çift ışın yollu spektrofotometre denilir ve 190-800 nm aralığında çalışırlar (Şekil 2.3).

Çift ışık yollu spektrofotometre, tungsten ve döteryum lambaları, yansıtımlı grating monokromatörü ve bir foto çoğaltıcı dedektör komponentlerini bulundurur. Motorla dönen ve “çopi” olarak adlandırılan ışın bölücüsü, birincisi saydam, ikincisi yansıtıcı, üçüncüsü ise opak olan üç bölmeli disk yapısındadır. Detektör her dönüşte ilki P_0 'a, ikincisi P 'ye, üçüncüsü de karanlık akıma karşılık gelen üç ayrı sinyal alır. Bu sinyallerden yararlanılarak numunenin geçirgenliği veya absorbansı tespit edilir.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, numune ve çözücü içerisinden geçen ışık ışınları, dedektörün önüne yerleştirilen döner bir ışık ayırıcısı aracılığıyla ve peş peşe tek bir dedektöre gönderilerek de ölçüm yapılabilir. Burada meydana gelen alternatif (periyodik) sinyal, ışık bölücünün frekansına ayarlanmış bir elektronik çoğaltıcı yardımıyla kaydedilir.

Çift ışık yollu spektrofotometreler, voltaj değişikliklerinden etkilenmezler ve zaman kaybına neden olmazlar. Işık kaynağındaki dalgalanmaları, kaçak ışınları ve saçılan ışın kaynaklı sapmaları giderebilirler. Tek ışık yollu spektrofotometrelere göre karmaşıktırlar ve daha az hassasiyete sahiptirler.



Şekil 2.3. Çift Işık Yollu Spektrofotometre Yapısı

2.2.1.6. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometreleri

UV-GB absorpsiyon spektrofotometreleri, nitel ve nicel spektrofotometrik analizlerde sıklıkla kullanılan cihazlardandır. UV-GB absorpsiyon spektrofotometreleri, 110-1000 nm dalga boyu aralığında çalışırlar. 110-200 nm dalga boyları arasında çalışan UV-GB spektrofotometreler, vakum tertibatlıdır ve oldukça pahalıdırlar. Laboratuvar ortamlarında yaygın olarak 200-800 nm dalga boyu aralığında çalışan UV-GB spektrofotometre cihazları kullanılır. UV-GB spektrofotometrelerde 160-375 nm dalga boyu nda ışın üretmek amacıyla döteryum lambası ve 350-2500 nm dalga boyunda ışın üretmek amacıyla ise tungsten lambası kullanılır. UV-GB spektrofotometrelerin çalışma prensibi, Lambert-Beer yasasına göre, moleküller tarafından monokromatik ışınların absorplanması esasına dayanır. UV-GB absorpsiyon spektrofotometreleri; tek ve çift ışık yollu spektrofotometreler olmak üzere ikiye ayrılırlar. UV-GB absorpsiyon spektrofotometreler molekül yapısını aydınlatma, kalitatif ve kantitatif analiz yapma amacıyla kullanılabilirler (Skoog ve ark, 1998, s:300-325).

2.2.2.Kromatografi

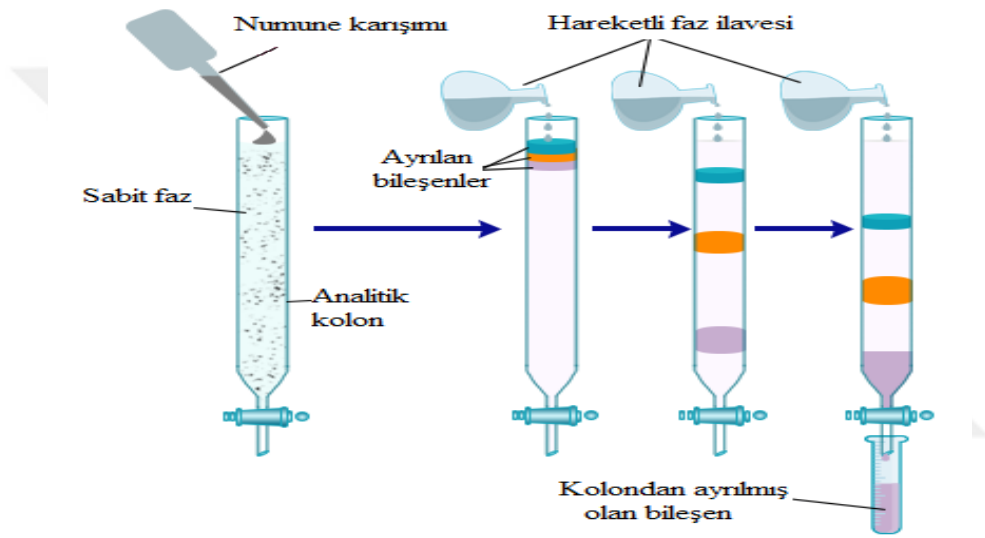
Kromatografi, birbirine karışmayan iki fazlı (bir hareketli faz ve bir sabit faz) bir sistem kullanılarak, fiziksel-kimyasal özellikleri benzer maddelerin veya karışım halindeki bileşenlerin ayrılmasını, saflaştırılmasını, tespit edilmesini ve analizini sağlayan analitik bir yöntemdir (Skoog ve ark., 1998, s.:674-696 ve USP 40, 2017). Kromatografi, yunanca chromatus (renk) ve graphein (yazma) kelimelerinden türemiştir.

İlk olarak, 1906 yılında, Tsvett tarafından CaCO_3 kolon ve petrol eteri kullanılarak bitki pigmentlerinin (klorofil) renklerine ayrıldıktan sonra renk (chroma) verici komponentlerin tayin edilmesinde kullanılmıştır, bu çalışmada renkli maddelerin ayrı bandları elde edilmiştir. Sonrasında, sırasıyla, 1938 yılında İsmailov ve Shraiber tarafından ince tabaka kromatografi ve 1941 yılında Martin ve Syngge tarafından gaz ve sıvı kromatografi çalışmaları yapılmıştır.

Kromatografi analizi, karışımdaki bileşenlerin hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinden taşınarak ayrılması prensibine dayanır. Adsorpsiyon (katı-sıvı), ayrılma (katı-sıvı) ve molekül ağırlığındaki farklılıklar ayırma işlemi etkileyen faktörlerdir. Sabit faz tarafından daha kuvvetli tutulan bileşikler daha yavaş hareket eder, sabit faz tarafından daha zayıf tutulan bileşenler ise daha hızlı hareket eder, böylece ayırım gerçekleşir. Bu prensip, yani bileşenlerin farklı göç oranına sahip olması, ayırımın temelini oluşturur.

Sabit faz, hareketli faz ve analit kromatografi yönteminin ve moleküllerin birbirlerinden ayrılmasının 3 temel bileşenidir. Kromatografi yöntemlerinin hepsinde bir sabit faz ve bir hareketli faz bulunur. Sabit faz, katı bir faz veya yüzeyinde katı bir destek adsorbe edilmiş sıvı bir fazdır. Hareketli faz, sıvı veya gaz halinde bir fazdır, analiti içeren fazdır. Kromatografik ayırmalarda bileşenler hareketli faz üzerinden sistemde taşınır. Hareketli faz kendisiyle karışmayan sabit faz içerisinden geçirilir ve böylece bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak kromatografik ayrılma

gerçekleşir (Şekil 2.4). Madde, sabit faza ilgisi yüksekse daha yavaş hareket ederken hareketli faza ilgisi yüksekse daha hızlı hareket eder. Kolondan ayrılan bileşenin derişim profilini gösteren piklerin oluşturduğu tabloya kromatogram denir. Sabit fazla bileşen arasında fiziksel veya kimyasal etkileşim meydana gelebilir. Bileşenlerin alıkonma zamanı (t_R), sabit veya hareketli faza olan ilgisine göre değişim gösterir. Kromatografide kolon (tür ve boyut), hareketli faz (tür, bileşim ve akış hızı), dedektör (tür ve dalga boyu) ve örnek (hacim ve derişim) gibi parametreler ayırmayı etkileyebilir (Hamilton ve Sewell, 1982 ve Skoog ve ark., 1998, s:674-696).



Şekil 2.4. Kromatografik Ayırımın Temel Görünümü

2.2.2.1. Kromatografik Yöntemler

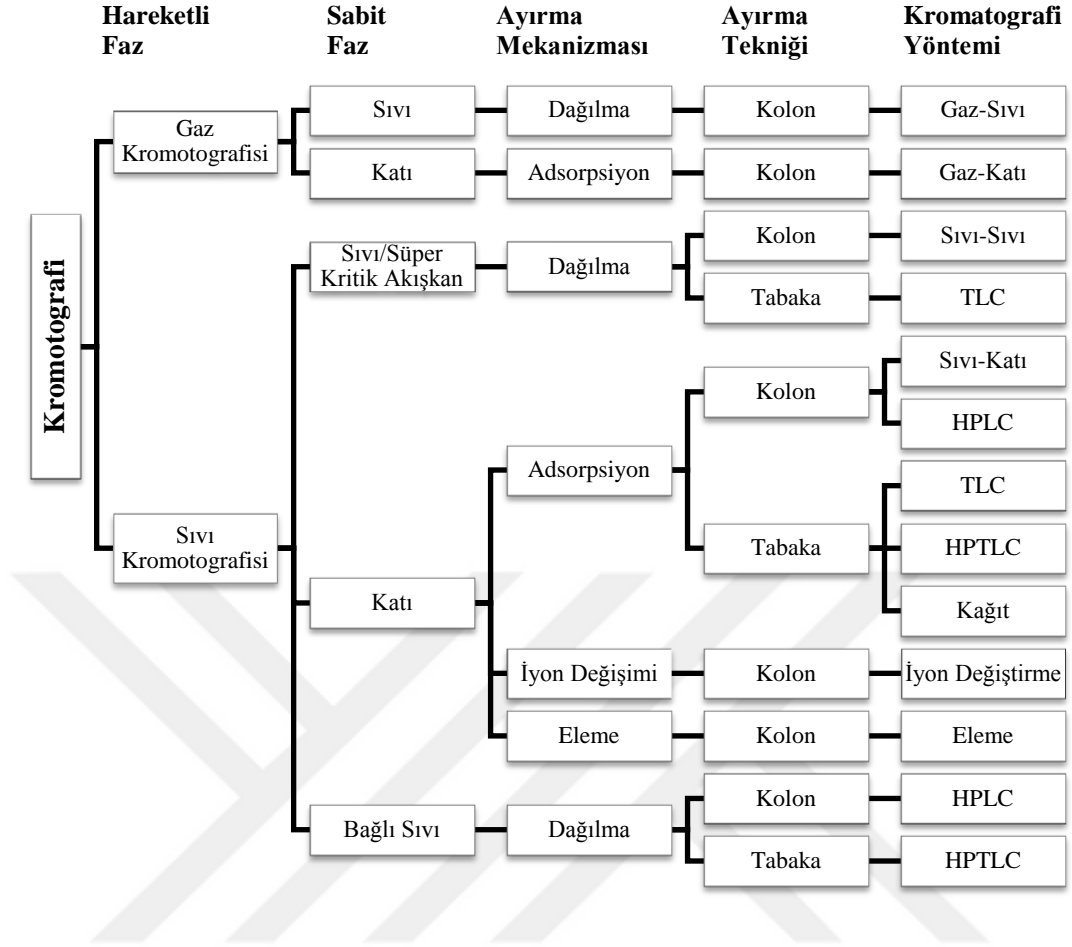
Kromatografik yöntemler hareketli faz (gaz veya sıvı), sabit faz (katı veya sıvı) ve ayırma (mekanizma ve teknik) özelliklerine göre sınıflandırılabilir (Şekil 2.5) (Adamovics, 1997 ve Sewell ve ark, 1987). Kromatografik sınıflandırmalarda hareketli faz ile sabit fazın polarlık ve fiziksel durumu, ortamdaki fiziksel koşullar, örneğin ortama verilme şekli ve ayırma mekanizması gibi kriterler temel alınmaktadır. Uygun bir zaman aralığında tatmin edici bir ayırım elde etmek amacıyla kantitatif analiz yöntemi olarak kullanılan kromatografi yöntemleri (kolon, ince

tabaka, iyon değişim, afinite, gaz, jel geçirgenlik, kağıt ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi) geliştirilmiştir.

Kromatografik yöntemler hareketli fazın sıvı veya gaz olmasına bağlı olarak sıvı veya gaz kromatografisi olarak isimlendirilir. Kromatografik yöntemler ayrılma mekanizmalarına göre adsorpsiyon, dağılma (partisyon), boyutlandırma (eleme: jel filtrasyon ve jel geçirgenlik), iyon değiştirme ve afinite olmak üzere beşe ayrılır. Kromatografik yöntemler uygulama şekline göre kolon ve düzlemsel olarak ikiye ayrılır (Bidlemeyer, 1992, s:2-25ve Skoog ve Leary, 1992).

Kolon kromatografisinde sabit faz kolona yerleştirilir, hareketli fazın yer çekim/basınç altında sabit faz üzerinden hareket etmesi sağlanır. Sabit faz, düzlemsel kromatografide düzgün bir yüzey ya da kağıt arasına yerleştirilir. Düzlemsel kromatografide yer çekimi, kapiler ve elektriksel potansiyel etkisiyle hareketli faz sabit faz üzerinden hareket eder.

Gaz kromatografisi gaz, uçucu sıvı ve katı maddelerin, sıvı kromatografisi ise ısıl karasız ve uçucu olmayan maddelerin karışımlarının analizinde kullanılır. Partisyona dayalı kromatografi küçük moleküllerin ayrılmasında ve amino asitler, karbonhidratlar ve yağ asitleri olarak tanımlanmasında; afinite kromatografileri makromoleküllerin nükleik asitler ve proteinler olarak ayrılmasında; kağıt kromatografisi proteinlerin ayrılmasında ve protein sentezi ile ilgili çalışmalarda; gaz-sıvı kromatografisi alkol, ester, lipid ve amino gruplarının ayrılmasında ve enzimatik etkileşimlerin gözlemlenmesinde; moleküler elek kromatografisi proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde; agaroz-jel kromatografisi RNA, DNA parçacıkları ve virüslerin saflaştırılmasında kullanılır.



Şekil 2.5. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması (Sewell ve ark., 1987)

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi, HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, HPTLC: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Sıvı Kromatografisi.

2.2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, yüksek duyarlılığı, doğru kantitatif analizlere kolay uygulanabilmesi, uçucu olmayan/sıcaklıkla kolay bozulabilen maddelerin ayırımına imkan tanınması ve geniş kullanım yelpazesine sahip olması nedeniyle analitik ayırma yöntemleri arasında en yaygın kullanılan yöntemdir. İlk uygulanan sıvı kromatografileri, uygun akız hızları elde etmek için, çapı genellikle 150-200 µm olan sabit fazı oluşturan taneciklerle, 1-5 cm çaplı ve 50-500 cm uzunluğa sahip cam kolonlarda uygulanmıştır, bu durumda akış hızlarının düşük ve ayırma zamanının çok uzun olduğu gözlenmiştir. Gelişen teknoloji ile sabit fazda kolon çapı ve kolon dolgu

maddesi tanecik boyutu azaltılarak, kolon veriminin arttığı farkedilmiştir. Akış hızı, çok daha küçük tanecikli kolonlar hazırlanıp tabaka sayıları iyileştirilerek ve kolona yüksek basınçlar uygulanarak arttırılmıştır. HPLC, 2-10 µm boyutlu kolon dolgu maddesi kullanılarak uygun akış hızı elde etmek için gerekli yüksek pompa basınçlarında (100-400 atm) uygulanan modern bir sıvı kromatografi yöntemidir. Diğer kromatografi sistemlerine göre daha pahalıdır ve daha detaylı bir işçiliğe gereksinim duymaktadır. Ayrıca, çizelge 2.9'da gösterildiği üzere diğer kromatografik yöntemlere göre bazı avantajları vardır (Skoog ve ark., 1998, s.:725-765).

Çizelge 2.9. HPLC'nin Avantajları

-
- Dedektör seçme olanağına sahip olması
 - Maddenin geri kazanımının kolay olması
 - Düşük sıcaklıklarda uygulanabilir olması
 - Geniş derişim aralıklarında çalışma olanağına sahip olması
 - Analiz sürelerinin kısa olması, hızlı sonuç verebilmesi
 - Nitel ve nicel analize uygun olması
 - Kullanıcıya daha az bağımlı olması
 - Tekrarlanabilirliğinin yüksek olması
 - Çok yüksek duyarlılığa sahip olması
 - Az miktarda örnekle analiz yapılabilmesi
 - Çok küçük partikül boyutuna sahip maddeler için uygulanabilmesi
 - Uçucu olmayan/ sıcaklıkla bozulabilen maddelerin ayırımına imkan tanınması
 - Rejenerasyon olmaksızın defalarca kullanılabilir olması
-

2.2.2.2.1. Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit faz polardır (daha yüksek polariteli). Hareketli faz apolardır (daha düşük polariteli). Başka bir ifadeyle sabit faz hareketli faza göre daha polardır. Hareketli fazda sıklıkla apolar çözücüler (hekzan, metilen klorür, dietil eter, kloroform, vd.) kullanılır. Silika ve alümina en çok tercih edilen sabit fazlardır.

2.2.2.2.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit faz apolardır (daha düşük polariteli). Hareketli faz polardır (daha yüksek polariteli). Başka bir ifadeyle hareketli faz sabit faza kıyasla daha polardır. Apolar materyaller kolonda tutulur. Çok sayıda organik bileşiği ayırabilmesi nedeniyle sıklıkla kullanılır.

Genellikle kimyasal olarak bağlanmış fonksiyonel gruplar taşıyan sabit fazlar (oktadesilsilan) kullanılır. Kısa zincirli (C2, C8 vb.) fonksiyonel gruplar taşıyan, fenil bağlı veya siyano bağlı sabit fazlar da kullanılabilir. Hareketli faz bileşeni tampon çözeltiler oldukça önemlidir, tampon çözeltiler saf su ile hazırlanmalıdır. Su, metanol veya asetonitril gibi çözücüler hareketli fazlarda kullanılan organik çözücülerden bazılarıdır.

Sıklıkla apolar maddelerin ayırımında kullanılır. Polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar. Apolar maddelerse kısa alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar. Bundan dolayı uzun alkil zincirli sabit fazlar (C18) apolar maddelerin ayırımında, kısa alkil zincirli sabit fazlarsa (C8, C2) polar maddelerin ayırımında kullanılır. İlaçların genellikle apolar yapıda olması, kromatografik ayırma önemli olan solvofobik etkiler, hareketli faz organik çözücülerinin ucuza maliyeti ve sulu tampon çözeltisi oranının yüksek ayarlanabilmesi gibi faktörlerden dolayı ilaç analizlerinde ters faz kromatografisi daha fazla tercih edilmektedir. Ters faz ve normal faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması çizelge 2.10'da ve kullanılan fazlar ise çizelge 2.11'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.10. Normal ve Ters Faz Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması

	Ters Faz	Normal Faz
Hareketli Fazın Polaritesi	Ortadan Yüksekçe	Düşükten Ortaya
Hareketli Faz Polaritesinin Artmasının Etkisi	Elüsyon zamanı artar	Elüsyon zamanı azalır
Sabit Fazın Polaritesi	Düşük	Yüksek
Alıkonma Sırası	En polar önce	En az polar önce

Çizelge 2.11. Normal ve Ters Faz Sıvı Kromatografilerinde Kullanılan Fazlar

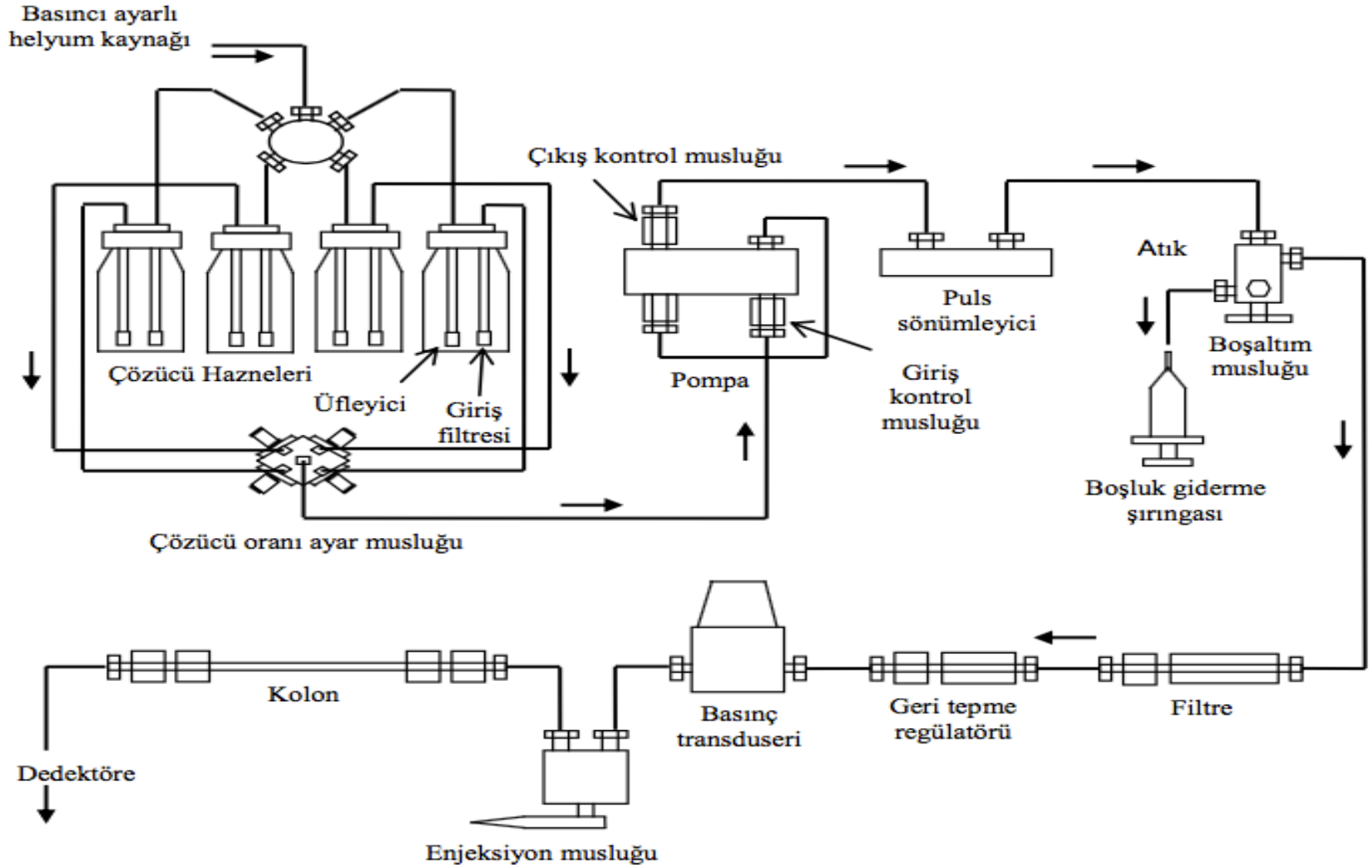
Ters Faz Sıvı Kromatografisi	
Sabit Faz	Dimetilpolisiloksan, CN, ODS, Fenil, NH ₂ , C ₂ , Hidrokarbonlar.
Hareketli Faz	Asetonitril/Metanol/su, Metanol/su, Asetonitril/su.

Normal Faz Sıvı Kromatografisi	
Sabit Faz	Dimetilsülfoksit, Su-etilen glikol, β,β' -oksidipropionitril, Su, 1,2,3-Tris (2-siyanoetoksi) propan (Fraktonitril), Etilendiamin, Nitrometan.
Hareketli Faz	Hekzan, Butanol, Karbon tetraklorür, İzooktan, Dioksan, Pentan, Siklopentan, Kloroform, Tetra hidro furan.

Normal faz kromatografisinde sıvı fazın kontrolü güçtür, hareketli faz bileşimindeki ufak değişiklikler analizde belirgin farklılıklara sebep olabilir. Normal faz kromatografisinde dengeye ulaşma ters faz kromatografiye göre çok daha yavaştır. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonunun çok yavaş olması yaygın pik oluşmasına sebep olmaktadır. Ayrıca apolar çözücüler oldukça pahalıdır ve nemden korumak oldukça zahmetlidir. Bu durumlar, ters faz kromatografinin normal faz kromatografiye karşı avantajlı olmasını sağlamaktadır (Skoog ve ark., 1998, s.:725-765).

2.2.2.3. HPLC Cihazı Bileşenleri

HPLC cihazının temel bileşenleri şekil 2.6'da şema ile gösterilmektedir.



Şekil 2.6. HPLC Cihazı Şeması (Perkin- Elmer Corporation, Norwalk, CT)

2.2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri

HPLC sistemleri, herbiri 200-1000 mL aralığında çözücü bulundurabilen paslanmaz çelik veya camdan yapılmış, bir veya birden fazla hazne içerir. Hazneler, genellikle, gaz oluşturarak kolon ve dedektörlerde bozucu etki gösteren çözücü gazların etkilerini gidermek için bir cihazla donatılır. Band genişlemesi ve dedektör performansında azalma bu gazların bozucu etkilerindedir. Gaz giderme düzeneği basit bir üfleyici olabileceği gibi; damıtma sistemi, vakum pompa sistemi ve çözücü ısıtan ve karıştıran bir kısımdan da oluşabilir. Ayrıca, bu sistemler çözücüde bulunan partikül ve tozları süzme özelliğine sahiptir. Böylece pompa ve enjektör sisteminin zarar görmemesi, sistemde korozyon gelişiminin önlenmesi, oksitlenmenin engellenmesi ve kolonun tıkanmaması sağlanır. Gaz gidericiler ve süzme düzeneğinin HPLC cihazının ana bileşeni olması zorunlu değildir.

Elüsyon, maddenin fazlar (sabit ve hareketli faz) arasındaki dağılım farklılıklarından yararlanılarak başka maddelerden kromatografik olarak ayrımının sağlanmasıdır. İzokratik elüsyon, sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayrımdır. Gradyent elüsyon ise polaritesi aynı olmayan iki veya üç çözücü sistem kullanılarak yapılan ayrımdır. Gradyent elüsyonla ayırım esnasında verimlilik büyük ölçüde artırılır. Gradyent elüsyonda, elüsyon başladıktan sonra, zamana bağlı olarak, belli bir program dahilinde (sürekli veya seri basamak şeklinde), çözücü oranları değiştirilir. HPLC cihazları, günümüzde, çözücü hacim oranlarını lineer olarak değiştirebilen ve ≥ 2 hazneden alınan çözümleri bir karıştırma ortamında değişken hızlarla bir araya getirebilen sistemler ile dizayn edilmiştir.

HPLC’de analizin başarılı olabilmesi çözücünün uzaklaştırılabilmesi için kaynama noktasının yüksek olmamasına, kolon basıncının yüksek olmaması için viskozitesinin düşük olmasına, dedektör ile uyumlu olmasına, analizi yapılacak analitin sinyalini engellememesine, güvenli ve toksisitesinin düşük olmasına bağlıdır.

2.2.2.3.2. Pompalama Sistemleri

HPLC pompalama sisteminde çizelge 2.12'de belirtilen özellikler bulunmalıdır.

Çizelge 2.12. HPLC Pompalama Sisteminde Bulunması Gereken Özellikler

-
- Yeterli basınç (400 atm'e kadar) üretmelidir.
 - Pulssuz basınç çıkışı olmalıdır.
 - Akış hızı 0,1 mL/dk aralığında olmalıdır.
 - Bağıl tekrarlanabilir akış kontrolü %0,5 veya daha iyi olmalıdır.
 - Korozyona dayanıklı olmalıdır (sızdırmaz, paslanmaz çelik veya teflon).
-

Pistonlu, sürgülü (şırınga) ve pnömotik (sabit basınç) olmak üzere üç tip HPLC pompalama sistemi bulunmaktadır (Skoog ve ark., 1998, s.:729-730).

Pistonlu pompalar, sıklıkla kullanılan pompa sistemidir (piyasadaki HPLC cihazlarının %90'ında). Motorlu bir piston ileri ve geri hareket ettirilerek çözücü pompalanmasının gerçekleştirildiği küçük bir silindir yapıdan oluşur. Çözücünün silindire giriş ve çıkış akışı iki adet kontrol musluğu tarafından kontrole edilir ve çözücü piston ile doğrudan temas halindedir. Küçük iç hacmine sahip olması (35-400 µL), yüksek çıkış basıncına sahip olması (~700 atm), kolon geri basıncı ve çözücünün vizkositesinden bağımsız sabit akış hızına sahip olması ve gradiyent elüsyona uyarlanabilmesi pistonlu pompaların üstünlükleridir.

Sürgülü pompalar, vidalı güdüm mekanizmasıyla kontrol edilir, gereken güç kademeli motordan sağlanır. Sızdırmaz sürgülü, şırıngaya benzeyen silindir şeklinde bir kaptır. Vizkosite ve geri basınç bağımsız bir akış üretilir. Pulssuz çıkış akımına sahiptirler. Çözücü kapasitesinin sınırlı olması (~250 mL) ve çözücü değiştirilmesinde yaşanan güçlükler dezavantajlarıdır.

Pnömotik pompalarda sıvı; hareketli ve sıkıştırılmış bir gazla basınçlandırılabilen bir kaba yerleştirilen taşınabilir bir kabın içirisine konulmaktadır. Pahalı olmayan, pulssuz, kapasitesi sınırlı, çıkış basıncı düşük, çıkış

hızı vizkosite ve geri basınç bağımlı, gradiyent elüsyona uygun olmayan ve basınçları genelde 135 atm'den düşük olan pompalama sistemleridir.

Günümüzde birçok HPLC cihazı, pompalama sisteminin bir parçası olarak bilgisayar kontrollü, pompa çıkışında bulunan bir geri tepme tıkaçı boyunca basınç azalmasını belirleyerek akış hızı ölçümü yapan bir sisteme sahiptir. Ayrıca, çözücünün bileşimini sürekli olarak veya basamaklı olarak değiştiren bir sisteme de sahiptir. Sinyalin önceden belirlenen değerindeki herhangi bir değişim, pompa motor hızını artırmak veya azaltmak için kullanılır.

2.2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliği HPLC'de ölçümlerin kesinliğini etkileyen faktördür. Aşırı örnek verilmesi sonucunda görülen bant genişlemesi kesinliği etkiler. Sisteme verilen numune enjeksiyon hacmi, μL 'nin birkaç ondalığından 500 μL 'ye kadar değişebilen miktarlarda olmalıdır. Sistem basıncı düşmeden, hareketli faz akışı durmadan veya akış hızı değişmeden örneğin sisteme verilmesi sağlanmalıdır. Numune giriş sarımlarının kullanılması, sıvı kromatografisinde numune vermek için en yaygın kullanılan yöntemdir. Numune giriş sarımları değiştirebilme özelliğine sahiptir, 5-500 μL arasında değişen hacimlerde örnek hacmi seçimine olanak sağlar, 7000 psi basınca kadar minimal hata oranına sahip kesinlikte numunenin kolona verilebilmesini sağlar (Skoog ve ark., 1998, s.:730-731).

2.2.2.3.4. Kolon

Kolonlar, HPLC cihazının en önemli parçasıdır, analiz veya maddelerin ayrımı kolonda gerçekleşir. Kolonlar, genellikle, yüksek basınca, düşük pH'ya ve kimyasal aşınmaya dayanıklı, düzgün iç çaplı, paslanmaz çelikten yapılıdır. Çoğu analitik kolonun çapı 2-5 μm , uzunluğu 5-25 cm ve tanecik çaplarıysa 2,5-10 μm

aralığında değişir. Kolon uzunluğu ve i çapı kolonun etkinliğini ve hassasiyetini, analiz süresini ve basıncı etkileyen faktörlerdendir. Daha uzun kolonlar daha iyi ayırım yapılmasını sağlamaktadır. Kolonlar izelge 2.13’de belirtildiği gibi sınıflandırılabilir.

Çizelge 2.13. Kolonların Sınıflandırılması

Üretim Materyaline Göre	Paslanmaz elik, PEEK, Titanyum
Kromatografi Türüne Göre	Normal Faz, Ters Faz, İyon Değiştirme, Moleküler Eleme
Destek Fazlarına Göre	Silika, Polimer, Zirkonyum, Hibrid
Boyutlarına Göre	Preparatif, Analitik, Mikro, Nano

HPLC’de iki çeşit dolgu maddesi kullanılır. Bu dolgu maddeleri film ve gözenekli dolgular olarak ikiye ayrılır. Silis, HPLC’de en yaygın kullanılan dolgu maddesidir (Skoog ve ark., 1998, s.:732-733). Film dolgular küresel, gözeneksiz, 30-40 m çapında, cam veya polimer yapıdadır. Yüzeylerine silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reinesı yada iyon değiştirici reçine kaplanmış ince gözenekli film tanelerden oluşur. Bazı uygulamalarda sabit faz olarak, yzeyele absorpsiyonla tutunabilen uygun bir sıvı ek bir tabaka şeklinde kaplanabilir. Organik bir tabaka yüzeyi elde etmek için kimyasal işlem uygulanabilir. Günümüzde film dolgular, emniyet kolonlarında kullanılmakta iken analitik kolonlarda kullanılmamaktadır. HPLC’de 3-10 m çaplı gözenekli partiküller kullanılmaktadır. Partikül yapısı “silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reinesı ya da bir iyon değiştirici reçine” olabilir.

Kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar, birçok uygulama için kolon sıcaklığının takip edilmesi gerekli değildir. Kolon sıcaklığı minimal hata ile sabit tutularak analiz yapıldığında daha iyi kromatogramlar elde edilir. Günümüzdeki oğu HPLC cihazları, kolondaki sıcaklığı oda sıcaklığı seviyesinden 100-150 C’ye tüm sıcaklıklarda minimal hata payıyla sabitleyebilen kolon termostatlarına sahiptir.

Analitik Kolonlar: HPLC’de kolon uzunluğu sıklıkla 10-30 cm aralığındadır. Genellikle düz kolon kullanılır ama bazen sarmal kolon da kullanılabilir. Kolon iç çapı sıklıkla 4-10 mm arasındadır. Kolon dolgu maddesi tanecik büyüklüğü genellikle 5-10 µm aralığında olanlar kullanılır. Günümüzde sıklıkla 25 cm uzunluğa ve 4,6 mm iç çapa sahip ve tanecik büyüklüğü 5 µm kolon dolgu maddesi ile doldurulan kolonlar kullanılır ve 40000-60000 tabaka/metre içerirler (Skoog ve ark., 1998, s.:732).

Son yıllarda, 1-4,6 mm iç çaplı ve 3-5 µm tanecik büyüklüğündeki dolgu maddesiyle doldurulan, sıklıkla boyu 3-7,5 cm’den daha küçük boyutlu, yüksek hız ve performansa sahip kolonlar üretilmektedir. Bu tür kolonlar 100000 tabaka/metre içerirler, hız ve minimum çözücü sarfiyatı avantajları vardır. Bu tür kolonlarda bulunan minimum çözücü sarfiyatı avantajı oldukça önemlidir. Çünkü HPLC’de kullanılan çözücülerin temini zordur ve maliyeti fazladır.

Emniyet Kolonları: HPLC cihazlarında, analitik kolondan önce kısa bir kolon yerleştirilerek analitik kolonun kullanım süresinin uzatılması amaçlanır. Emniyet kolonu olarak adlandırılan bu kısa kolonlar yabancı madde ve bileşenleri tutar. Emniyet kolonları, hareketli fazı sabit fazla doyurarak çözücü kaybını minimuma indirir. Dolgu maddesi bileşiminin emniyet kolonu ve analitik kolonda oldukça benzer olması sağlanmalıdır. Tanecik boyutu basınç azalmasını minimize etmek için sıklıkla daha büyüktür. Emniyet kolonları kirlendiğinde yeni bir emniyet kolonuyla değiştirilmeli veya yeniden dolgu maddesiyle doldurulmalıdır. Böylece daha pahalı olan analitik kolon korunabilir.

2.2.2.3.5. Dedektörler

Dedektörler, HPLC cihazının en önemli kısımlarındandır, kolondan çıkan maddelerin derişiminin ölçülmesinde kullanılırlar, elektromanyetik dalga formundaki enerji akışını ölçülebilir niceliklere çevirirler ve kayıt ederler. HPLC için dedektörlerde olması gereken temel özellikler çizelge 2.14’te belirtilmiştir. Maddeye

ve çözeltiye yönelik dedektörler olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar. Dedektör tipleri ve özellikleri çizelge 2.15’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.14. Dedektörlerde Olması Gereken Temel Özellikler

-
- Yeterli duyarlılığa sahip olmalı
 - Yüksek kararlılık ve tekrarlanabilirlik oranına sahip olmalı
 - Doğrusal çalışma aralığı geniş olmalı
 - Akış hızından bağımsız küçük cevap zamanına sahip olmalı
 - Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığına sahip olmalı
 - Band genişlemesini azaltmak için minimal iç hacmine sahip olmalı.
 - Her türlü analite karşı benzer cevap alınabilmeli
 - Numuneyi parçalamamalı
-

Çizelge 2.15. Dedektör Tipleri ve Özellikleri

Maddeye Yönelik Dedektörler (Yığılma Özelliği Dedektörleri)	<ul style="list-style-type: none">• Hareketli fazdaki maddenin özelliklerini tayin etmek için kullanılır.• Numunenin değiştirilen madde özelliğine (hareketli faz kırma indisi, yoğunluk, dielektrik sabiti vb) cevap verirler.• Alt tipleri: Fotometrik (UV-GB, Floresans, Foto diyot dizi (FDD), İnfrared Absorbans) dedektörler, Ayrım sonrası tepkime dedektörleri, Elektrokimyasal dedektörler, Kütle spektrometreleri, Radyoaktivite dedektörleri.
Çözeltiye Yönelik Dedektörler (Analit Özelliği Dedektörleri)	<ul style="list-style-type: none">• Numune özelliklerinin ölçülmesi için kullanılırlar.• Hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklere (Numune UV absorbans, difüzyon akım, floresans şiddet vb.) cevap verirler.• Alt Tipleri: Dielektrik sabiti dedektörleri, Refraktif indeks dedektörleri, Yoğunluk dedektörleri, İletkenlik dedektörleri.

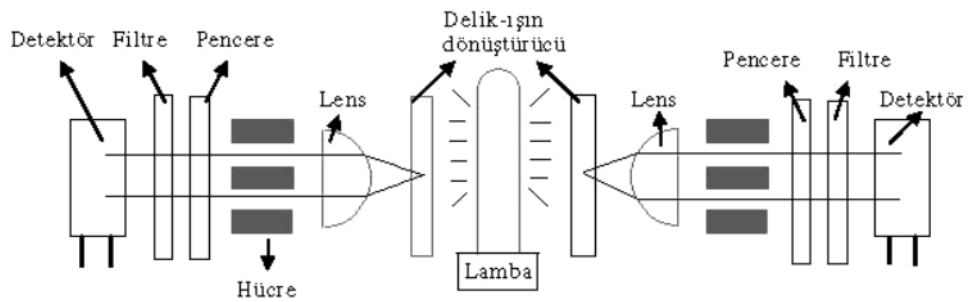
HPLC sisteminde sıklıkla UV-GB dedektör, FDD, Floresans dedektör ve elektrokimyasal dedektörler kullanılmaktadır.

UV-GB Dedektörler: UV-GB dedektörler, ışığın absorblanması ilkesini baz alan dedektörlerdir, ışığı 180-350 nm arasında absorbe eden maddelere cevap verirler. UV-GB dedektörlerde 4 veya 8 μ L hacim, 1 mm çap ve 10 mm uzunluğunda silindirik akış hücresi kullanılır. Şekil 2.7’de şematik olarak gösterildiği üzere UV-GB dedektörlerin çoğu çift ışık yolludur. İki ışının şiddetinin karşılaştırılması için fotoelektrik dedektörler kullanılır. Akış hücrelerinin hacimleri mümkün olduğunca en aza indirilerek kolon dışı bant genişlemesi en aza indirilmeye çalışılır (Skoog ve ark., 1998, s.:733-739).

UV ışın belirli boşluklardan geçirilerek çalışılması planlanan dalga boyuna ayarlandıktan sonra UV ışının odaklaması lens ile yapılır ve böylece ışının hücreye paralel geçişi sağlanır. Akış hücresinden geçerek fotoelektrik dedektöre gelir. Daha sonra sinyal değiştirici bir amplifikatöre gider. Son olarak, sinyaller ışının şiddeti ile orantılı olarak kayıt edilmek üzere kayıt cihazı ya da veri toplama sistemine gönderilir.

Lambert-Beer Yasası'na uygun olarak, absorbans değeri derişimle doğru orantılı bir şekilde artar. Bağlanmamış elektron içeren bileşikler, tek veya daha fazla çift bağ (π elektron) bileşikler ve türevlendirme ile absorpsiyon yapabilen maddeler UV-GB dedektörle saptanabilir.

Genellikle kuartz-iyot/tungsten (350-700 nm dalga aralığı), döteryum (190-400 nm dalga aralığı) ve civa lambası (254, 280, 313, 334 ve 365 nm dalga boylarında) olmak üzere farklı dalga boylarında ışın yayan 3 tip lamba kullanılır. Değişken dalga boyunda ışın yayabilen lamba kullanılması ile; eş zamanlı olarak birçok madde için yüksek absorbans değerleri saptanarak duyarlılık artırılır, yüksek seçicilik elde edilir ve gradiyent elüsyon için kullanım kolaylığı sağlanır. UV-GB dedektörler nükleik asitler, proteinler, toksik ve terapötik ilaç düzeylerini analiz etmek için kullanılabilir.



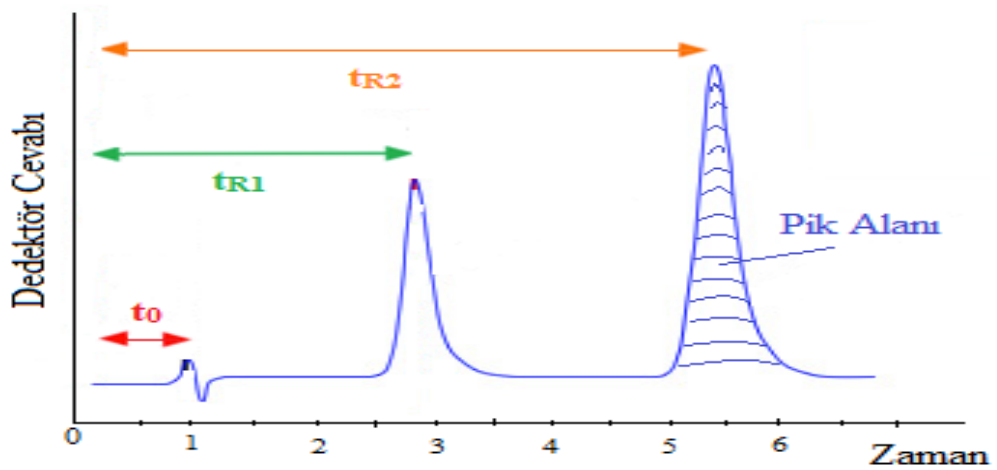
Şekil 2.7. Çift Işık Yollu UV-GB Dedektörü (Scott, 1996)

2.2.2.3.6. Kayıt Cihazı

Karmaşık integratörler, tek kalemli yazıcılar, mikroişlemciler veya bilgisayarlar dedektörlerden gelen sinyallerin kaydedilmesinde kullanılır. Merkezi veri kayıt cihazı ile hareketli faz akış hızı, kolon, örnek alma sistemi, enjektör, dedektör ve veri kayıt sistemi kontrol edilir. Mikroişlemci ve bilgisayar kullanımı ile tekrarlanabilirlik artırılmış ve sistem validasyon parametrelerinde daha doğru sonuçlar elde edilmiştir.

2.2.2.4. Temel Kromatografi Parametreleri ve Sistem Uygunluk Testleri

Kromatogram; analiz edilen numunenin bileşenleri için belirli zaman dilimlerinde konsantrasyon değerine karşı saptanan yanıtın ideal dedektörler kullanılarak elde edilen piklerini gösteren grafikdir. HPLC kromatogramını yorumlamada kullanılan ana parametreler alıkonma zamanı, kapasite faktörü, seçicilik, kolon etkinliği, ayırma gücü ve pik simetri oranıdır. Kromatogramda ideal pik şekli keskin, dar ve iki tarafı eşit olmalıdır (Şekil 2.8) (USP 40, 2017).



Şekil 2.8. HPLC Örnek Kromatogram

Alıkonma Zamanı (t_R), numunenin kolona enjekte edilmesinden sonra cevap sinyali olarak görülen pikin dedektörlere gelmesine kadar geçen süredir. Numunede bulunan her bir analit için farklıdır. Nitel analizlerin belirleyici faktörüdür. Aynı zamanda alıkonma hacmi olarak da ifade edilebilir. Alıkonma hacmi, ayrımı yapılan maddenin sabit fazdan elüe olabilmesi için gereken hareketli faz hacmini ifade eder; alıkonma zamanıyla hareketli faz akış hızının çarpımı yapılarak elde edilebilir.

Ölü Zaman veya Ölü Hacim (t_0), sabit faz ile etkileşmeyen veya hareketli fazdan kaynaklanan piklerin çıktığı zamanı ifade eder, ters faz sıvı kromatografik yöntemlerde urasil, potasyum bromür gibi polarlığı çok yüksek olan bileşikler kullanılarak saptanır.

Kapasite Faktörü (Alıkonma Faktörü) (k), kolondaki maddenin ilerleme hızıdır ve maddenin özelliklerine (fiziksel ve kimyasal) ve uygulanan yöntemle göre farklılık gösterir. Kapasite faktörü büyükse bileşen sabit fazda iyi tutulur ve kolonda yavaş ilerler; küçükse analit çözücü pikinden ayrılamaz ve çok büyük olursa analiz süresi uzar. İyi bir ayırım için kapasite faktörü 1-10 arasında olmalıdır. Hareketli ve sabit faz bileşimleri değiştirilerek kapasite faktörü değerlerinin 1-10 arasında olması sağlanır.

Seçicilik Faktörü (α), esas olarak sabit fazın ve kısmen de olsa hareketli fazın özelliklerine göre değişkenlik gösterir. Kolon içerisinde kalış süresi daha uzun olan maddenin kapasite faktörünün, kalış süresi daha kısa olan maddenin kapasite faktörüne oranı elde edilerek saptanır ve daima birden büyüktür.

Kolon Etkinliği (Etkin Tabaka Sayısı) (N), kolondan çıkan piklerin sivri, dar ve birbirlerinden iyi ayrılması ile ilişkilidir. Kolonun en önemli özelliklerindedir. Analiz sonucunun verimi hakkında bilgi verir. Kolon türü, sabit fazın türü ve boyutu, hareketli fazın bileşimi ve akış hızı kolon verimliliğini etkileyebilir. Analiz edilen maddenin cinsi ve deney koşulları (akış hızı, kolon sıcaklık kalitesi, tek biçimli dolum varlığı) gibi parametrelerden etkilenebilir. Etkin tabaka sayısının >2000 olması önerilmektedir.

Kuyruklanma Faktörü (T), kromatogramda elde edilen piklerin simetrisiyle ilgilidir. Her zaman simetrik olan pikler tercih edilmelidir. Pik taban yüksekliğinin %5'lik kısmından ölçülerek hesaplanır. Simetrik olmayan pikler seçilirse; yanlış tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları, unstabil miktar tayini, tespit edilemeyen pik kuyruklanmaları ve alıkonma tekrarlanabilirliğinin düşüklüğü gibi sorunlar gözlenebilir. Kolonlar uzun süre kullanıldığında kuyruklanma sık görülür ve doğru sonuçlar alınmaz.

Ayırma Gücü (R_s), kolon ve çözücü etkinliğinin ortak etkisini ifade eder. Kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılarak hesaplanır. Ard arda gelen iki pikin R_s değerinin $\geq 1,5$ olması ayırımın tam olarak gerçekleştiğini gösterir. Seçicilik faktörü arttıkça ayırma gücü belli bir değere kadar artıktan sonra sabitlenir, seçicilik faktörü=1 olunca bileşenler arasında ayırım gerçekleşmez. Kapasite faktörü=0 iken ayırım gerçekleşmez, ideal kapasite faktörü değerine (1-10 arası) ulaşıldığında istenilen ayırım gerçekleşir, kapasite faktörü 10 değerine ulaşana kadar ayırım gücü artar ve daha sonra sabit kalır.

Pik Asimetrisi (Pik Simetri Oranı) (A_s), kuyruklanma faktörü ile beraber analit pikinin eğrilikliğini, pikin sağa veya sola dayalı olup olmadığını ve pikin kesinliğini belirlemede kullanılır. Pik taban yüksekliğinin %10'luk kısmından ölçülerek hesaplanır.

Pik Alanı Tekrar Edilebilirliği (% BSS), analit sisteme en az 5-6 defa ard arda verildikten sonra elde edilen pik alan ve yüksekliklerinin bağıl standart sapmasıdır. Pik alanının, belirlenen koşullarda tekrar edilebilirliği yöntemin kesinliğini gösterir.

Amerikan Farmakopesi (USP), Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation, ICH), Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) ve diğer farmakopelerce tavsiye edilen sistem uygunluk testleri yöntemin doğruluk ve kesinliğinin yeterli olup olmadığını belirlemek için yapılır ve böylece

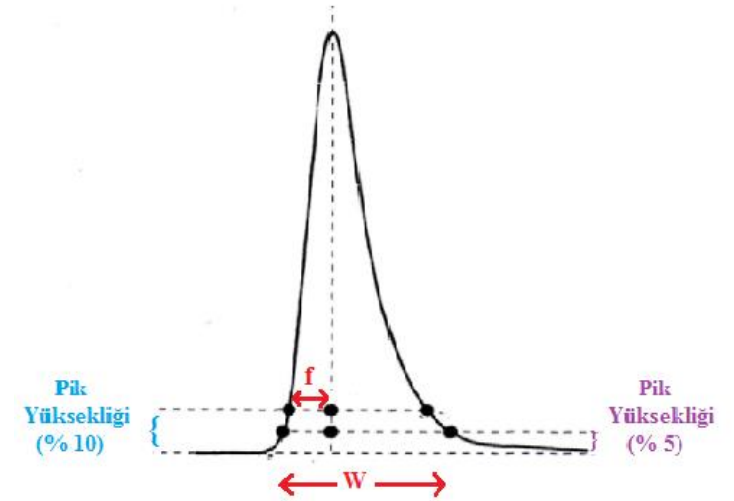
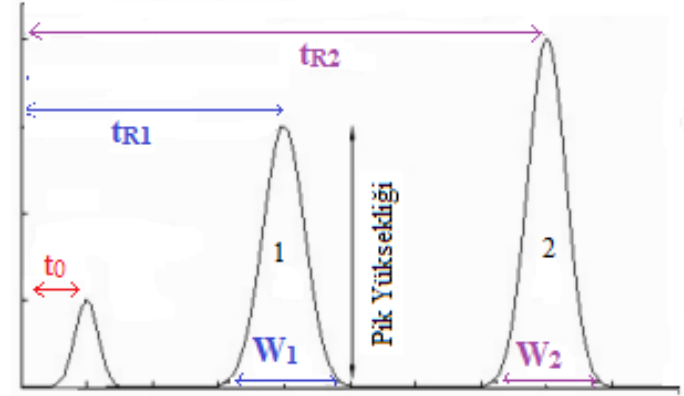
kromatografik bir sistemin analize uygun olup olmadığı saptanır. Sistemdeki en ufak bir değişiklikte sistem uygunluk testleri yeni sistem için tekrar gözden geçirilmelidir.

Alıkonma zamanı ve pik genişliği, kromatogram ve sistem uygunluk testlerinin değerlendirilmesinde temel parametrelerdir. Çizelge 2.16'da Amerikan Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri ile ilgili detaylı bilgiler belirtilmiştir (USP 40, 2017).



Çizelge 2.16. Sistem Uygunluk Testleri Parametreleri

Parametre / Sembol	Formül	Limit (USP 40, 2017).
Kapasite Faktörü (k)	$k = (t_R - t_0)/t_0$	$1 \leq k \leq 10$
Seçicilik Faktörü (α)	$\alpha = k_2/k_1 = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0)$	$\alpha > 1$
Kolon Etkinliği (N)	$N = 16(t_R/W)^2$	$N > 2000$
Kuyruklanma Faktörü (T)	$T = W_{0,05} / 2f$	≤ 2
Ayrırma Gücü (R_S)	$R_S = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{1,h/2} + W_{2,h/2})$	$R_S > 1.5$
Pik Asimetrisi (A_S)	$A_S = (W_{0,10} - f_{0,10})/f_{0,10}$	$0.95 \leq A_S \leq 2$
Pik Alanı Tekrar Edilebilirliği (% BSS)	$\% BSS = (SS / \bar{X}) \times 100$	$\% BSS < 1,5$



2.2.3. Analitik Yöntemin Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)

Analitik yöntem geçerliliği (validasyon), yapılan analiz, yöntem ve uygulamaların doğru, tekrarlanabilir ve belirli parametreler bazında ölçülebilirlik gibi özelliklerinin uluslararası standartlara uygun olduğunu ifade eder.

Analitik yöntemler, ilaç etken maddesi ve katkısız halinin farmasötik dozaj formu ve biyolojik örneklerden analizinde yararlanılan yöntemlerdir. Yöntemlerin kullanılabilmesi için iyi karakterize edilen, güvenilir sonuçlar veren ve tamamıyla geçerli yöntemler geliştirilmelidir. Çizelge 2.17’de yapılması gereken validasyon parametreleri belirtilmiştir (ICH, 2005a; ICH, 2005b ve USP 40, 2017).

Çizelge 2.17. Validasyon Parametreleri

	Parametre	ICH Klavuzu	USP Klavuzu
	Seçicilik	+	+
	Doğrusallık	+	+
	Aralık	+	+
	Teşhis Sınırı (LOD)	+	Sınır testleri için
	Tayin At Sınırı (LOQ)	+	Kantitatif testler için
	Tekrarlanabilirlik	+	+
Kesinlik	Gün içinde tekrar edilebilirlik	+	-
	Günler arasında tekrar edilebilirlik	+	-
	Doğruluk	+	+
	Sağlamlık	Tavsiye edilir	+
	Tutarlılık	Tavsiye edilir	+
	Çözelti Stabilitesi	+	Tavsiye edilir
	Duyarlılık	Tavsiye edilir	+

Validasyon, analitik yöntemlerin ve laboratuvarın analitik verilerinin güvenilirliğini ortaya koymak ve ne kadar güvenilir olduğununun gösterilmesi için gereklidir. Çizelge 2.18’de validasyonun geçerliliği için yapılması gerekenler belirtilmiştir.

Çizelge 2.18. Validasyon Geçerliliği İçin Yapılması Gerekenler

-
- Cihaz/Ekipman Kalite Kontrolü ve Validasyonu: Tüm cihazların donanımsal ve yazılımsal kontrollerinin yapılması.
 - Geliştirilen bir yöntemin geçerlilik durumunu göstermek için veya geliştirilmekte olan bir yöntemin parametrelerinde yapılan herhangi bir değişiklik sonrası metodun validasyonu
 - Ayırma yöntemleri için yapılan sistem uygunluk testleri ve ilgili parametrelerinin saptanması
-

2.2.3.1. Karakteristik Validasyon Parametreleri

ICH ve Farmakopeler tarafından yeni analitik yöntemler için gerekli validasyon parametreleri (yöntem geçerlilik parametreleri) ve bu parametrelerde bulunması gereken değerler belirlenmiştir. Validasyon, tek başına bir yöntemin uygulanmasında düşünülmemeli, yöntem kullanıldığı sürece her zaman ve her ortamda geçerli olmalıdır. Analiz yöntemi, çeşitli kılavuzlar ve farmakopelerde belirtilen etkinlik parametrelerini sağlamalıdır.

2.2.3.1.1. Seçicilik

Seçicilik, numune bileşiminde bulunan diğer bileşenlerden (safsızlık, bozunma ürünleri veya ortamdan gelebilecek) etkilenmeden analizi yapılacak olan maddenin tayin edilmesidir, validasyonun en önemli parametresidir. Seçicilik yeterli düzeyde olmadığında yöntemin doğrusalılığı, doğruluğu ve kesinliği hakkında yanlış sonuçlar saptanabilir. Seçiciliğin belirlenmesine yönelik yöntemler çizelge 2.19'da belirtilmiştir.

Çizelge 2.19. Seçiciliğin Belirlenmesine Yönelik Yöntemler

1.Yöntem	Ayrırma gücü (R_s) değerlerine bakılabilir. Bu yöntemdeki işlemler için; <ol style="list-style-type: none">1. Analizi yapılan bileşik ile dozaj formu içindeki yardımcı maddeler ve bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen benzer maddeler birlikte kolona verilir. Geliştirilen yöntemle analiz yapılır, cevaptaki değişim incelenir. $R_s \geq 2,0$ olmalıdır.2. Geliştirilen yöntemin koşullarında (çözelti bileşimi, tampon çözelti pH'sı, sıcaklık vb) minimal değişiklikler yapılır. Yapılan değişikliklerin pik performansına olan etkiler araştırılır (cevapta farklılık, ek pik oluşumu ve madde pikinin etkilenme durumu).3. FDD dedektörü ve yazılım kullanılarak pik saflıkları kontrol edilir, mevcut pikin dışında herhangi bir ilave pik olup olmadığı kontrol edilir.
2.Yöntem	Duyarlı dedektörler seçilir. Analizi yapılacak bileşiğe yanıt özelliği bulunan dedektörler (elektrokimyasal veya radyoaktivite dedektörleri) belirli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin giriş yapma olasılığını ortadan kaldırır.

2.2.3.1.2. Doğrusallık

Doğrusallık, konsantrasyona karşı cevabın doğru orantılı olarak artmasını ifade eden analit derişiminin bir fonksiyonudur. Piklerin grafiksel olarak yorumlanması ile belirlenir, çizilen grafiklerde noktalar düz bir çizgi üzerinde yer alır. Analit konsantrasyonunun ölçülen sinyallere karşı regresyon analizi kullanılarak hesaplanan “eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (r)” parametrelerinden yararlanılarak doğrusallık elde edilir. Korelasyon katsayısının (r) 0,999 ve üzerinde olması doğrusallık sağlandığını gösterir.

Doğrusallık belirlenirken, stok çözülden en az 5 farklı derişim (alt sınır hedefin %50'sinden düşük, üst sınır %150'sinden yüksek) hazırlanır, analiz edilir. İşlem en az 3 defa tekrarlanır. Analiz sonuçları çözelti derişimlerine göre nokta şeklinde grafiğe işaretlenir. Noktalar, eğim çizgisinin üzerinden ya da çok yakından geçmelidir. Böylece korelasyon katsayısı (r) veya determinasyon katsayısı (R^2) değerleri 1'e yaklaşır. Doğrusallıkla ilgili sonuçlarla birlikte eğim ve kesişim değeri %BSS'si veya standart hatası da hesaplanmalıdır.

Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği): Analitin bilinen derişimleriyle geliştirilen yöntemde saptanan değerler arasındaki ilişkiyi gösterir. Daha önceden yapılan çalışmalarda belirlenen derişimler belirlenerek kalibrasyon eğrisi hazırlanır. Sonuçlar doğrusal olabilir veya olmayabilir. Geliştirilen yöntemde, analiz yapılması planlanan aralıkta en az 5 derişimle (kör hariç) (alt ve üst sınır konsantrasyonları dahil) saptanan değerler baz alınarak hazırlanır. Doğrusal olmayan eğrilerde standart derişim oranı fazla olanlar seçilmelidir.

2.2.3.1.3. Aralık

Aralık, doğru ve duyarlı olarak değerlendirilen bir yöntemin geçerli kabul edildiği alt ve üst sınırlar arasında bulunan derişim aralığıdır. Nicel yöntemlerde mutlaka belirlenmelidir. En iyi sonuçlar elde edilen aralık genellikle hedef seviyelerin %50-150'si arasındadır.

2.2.3.1.4. Teşhis Sınırı (LOD)

Teşhis Sınırı, analitin görüldüğü ama kantitatif sınırlar içerisinde olmayan en düşük konsantrasyonu ifade eder. LOD, hesaplanarak veya doğrudan yapılan deneylerle tespit edilebilir. Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı, deneylerden gözlenerek yapılan hesaplamalarda genelde üç olarak alınır. Hesaplama yoluyla $LOD = 3.3 \times SS / m$ eşitliği kullanılarak saptanır (SS: Yöntemde kör çözeltilerle (en az 5 adet) saptanan sonuçların yada ilgili y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m: ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeri).

2.2.3.1.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Tayin Alt Sınırı, kabul edilebilir seviyede kesinlik ve doğrulukta analitteki miktar tayininin yapılabildiği, doğrusallık sınırlarında olmayan ya da kalibrasyon eğrisindeki en alt konsantrasyondur. Biyolojik sıvılarda LOQ saptanmasında yerine getirilmesi gereken şartlar çizelge 2.20’de belirtilmiştir. LOQ, hesapla veya doğrudan yapılan deneylerden bulunabilir. Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı, deneylerden gözlenerek yapılan hesaplamalarda genelde on olarak alınır. Hesaplama yolu ile $LOQ = 10 \times SS / m$ eşitliği kullanılarak hesaplama yapılır (SS: Yöntemde kör çözeltilerle (en az 5 adet) saptanan sonuçların yada ilgili y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m: ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeri).

Çizelge 2.20. Biyolojik Sıvılarda LOQ Saptanmasında Yerine Getirilmesi Gereken Şartlar

-
- Analitin LOQ derişiminde saptanan yanıt körde saptanan yanıtın k katından fazla olmalı.
 - Analitle yapılan analizde saptanan pik ya da alınan yanıt tanımlanabilmeli ve girişim yapabileme olasılığı olan diğer maddelerden ayrı olmalı.
 - %20 kesinlik ve %80-120 arasında doğrulukla tekrar edilebilmeli.
-

2.2.3.1.6. Kesinlik

Kesinlik, yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğidir. %BSS (Bağlı Standart Sapma) ya da %VK (Varyasyon Katsayısı) şeklinde belirtilir. Analite aynı yöntem birçok defa uygulandığında bulunan sonuçların birbirine yakınlığı gösterir. Analizler çalışılan tüm derişimlerde en az 5-6 analiz yapılmalı, bu derişimlerden üç ve üçten fazlası %BSS açısından %15’inden daha fazla sapma göstermemeli ve LOQ için saptanan sapma % BSS 20’yi geçmemelidir.

Orta-Kesinlik: Orta-kesinlik, laboratuvar içi deneysel farklılıkları gösteren kesinlik ölçüsüdür. Farklı günlerde ve/veya farklı cihazlarla ve/veya farklı analizcilerce gerçekleştirilerek saptanabilir. Deneyler, çalışmalar veya günler arası kesinliği ifade eder, yöntemin tam olarak kesinliğini gösterir. Orta-kesinliği karşılayan yöntem diğer kesinlik ölçütlerini de sağlar. Analitin çalışma ortamındaki

çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır, farklı günlerde ve/veya farklı cihazlarla ve/veya farklı analizcilerce, çözeltilerin her biri en az üçer defa analiz edilir. Orta kesinlik, %BSS olarak verilir ve ≤ 2.0 olmalıdır. Biyolojik numunelerde yapılan çalışmalarda %BSS 10-15'e kadar çıkabilir.

Tekrarlanabilirlik: Kısa bir zaman aralığında aynı işlem koşulları altındaki kesinlik ölçüsüdür. Gün içi veya çalışma esnasındaki kesinlik olarak da bilinir. Analitin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanarak en az 10 (tercihen 30-40) ölçüm yapılır. Tekrarlanabilirlik, %BSS olarak verilir ve $\%BSS \leq 1.0$ olmalıdır.

Tekrar Elde Edilebilirlik: Tekrar elde edilebilirlik, ortak çalışmalarda bulunan farklı laboratuvarlarca tespit edilen ve deneysel farklılıkları gösteren kesinlik ölçüsüdür. Yöntem standardizasyon çalışmalarında kullanılır. Geliştirilecek yöntem farklı laboratuvarlarca eş zamanlı olarak uygulanacaksa bu kesinlik değeri mutlaka hesaplanmalıdır. Numune çözeltileri ayrı laboratuvarlarda, farklı analizcilerle ve farklı zamanlarda (bir kaç gün arayla) analize hazır hale getirilir. Çözeltilerinin tamamından en az üçer defa ölçüm alınır. Tekrar elde edilebilirlik, %BSS olarak verilir ve ≤ 2.0 olmalıdır. Biyolojik numunelerde yapılan çalışmalarda %BSS 10-15'e kadar çıkabilir.

2.2.3.1.7. Sağlamlık (Kararlılık)

Sağlamlık, geliştirilen yöntemin analiz parametrelerindeki (organik çözücünün yüzde oranı, pH, iyonik güç, sıcaklık vb) minimal değişimlerden etkilenmeden uygulanabilmesidir. Kararlılık, geliştirilen yöntemin normal kullanımdaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür.

2.2.3.1.8. Tutarlılık

Tutarlılık, geliştirilen yöntemin gerçek uygulama koşullarında tekrar edilebilirliğidir. Tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerleriyle ilişkilidir. Tutarlılık değerlendirmesi için çalışma aynı laboratuvarında farklı analizeciler veya farklı cihazlar tarafından yapılmalı, standart test koşulları (reaktif ve çözücü markası değişimi, farklı gün, farklı sıcaklık, vb) değiştirilmeli ve ayırmada aynı model ve markada yeni bir kolon kullanılarak analizler tekrarlanmalıdır. Yöntem farklı bir laboratuvarında gerçekleştirildiğinde, tutarlılık oldukça önemlidir ve sonuçlar %BSS olarak ifade edilir.

2.2.3.1.9. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, analizde edilen değer referans değere yakınlığının ölçüsüdür, numunenin analiz ortamından ne oranda geri alınabildiği hakkında bilgi verir, ortalama % geri kazanım olarak ifade edilir. Doğruluk analizleri, alçak (konsantrasyon aralığı alt sınırı veya alt sınırına yakın), orta (konsantrasyon aralığı ortası) ve yüksek (konsantrasyon aralığı üst sınırı veya üst sınırına yakın) olmak üzere en az üç farklı konsantrasyonda yapılır. Herbir konsantrasyon için en az üç analiz yapılır. Sonuçlar %100'e ne kadar yakınsa, yöntem o kadar doğrudur. Elde edilen değerler, ortalamanın %15'inden fazla sapmamalı ve alçak konsantrasyondaki sapmaysa % 20'yi aşmamalıdır. Doğruluk üç farklı yaklaşımla saptanabilir (Çizelge 2.21).

Çizelge 2.21. Doğruluk Saptama Yaklaşımları

Referans Standart ile Karşılaştırma	<ul style="list-style-type: none">• 3 farklı derişimde (genellikle hedef değerin %25, %50 ve %100'üne eşdeğer), en az üçer ölçüm yapılır.• Değerler % geri kazanım değerlerine çevrilerek bir arada toplanır.• Sonuçlar referans sonuçlarla istatistiksel olarak karşılaştırılır
Kör Matriks Ortamına Analiz Edilen Maddeyi Ekleme	<ul style="list-style-type: none">• Matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığında kullanılır.• Analit boş matrikse farklı derişimlerde ilave edilir. Matriks ilaç dozaj formların için (etken madde içermeyen) yardımcı maddeler içerir.• Sıklıkla %50, %75, %100, %125 ve %150 oranında numune ilave edilir, herkonsantrasyonda en az üç kez ölçüm alınır.• Sonuçlar % geri kazanım olarak ve %BSS ve/veya %Bias ile birlikte verilir.
Standart Ekleme Yöntemiyle Saf Madde İlavesi	<ul style="list-style-type: none">• Boş bir matriks bulunmaması durumunda kullanılır.• Katkı maddeleri ve yardımcı maddeler hakkında bilgi olmadığında uygulanır.• Analitin bilinen ve farklı oranları, matriksde bulunan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce saptanmış aynı maddeye eklenir.• Asıl numunedeki etken madde konsantrasyonu analizlerle elde edilen veriler matematiksel olarak hesap edilir.• Sıklıkla %25, %50, %100 oranında madde eklenir. Analit eklenmiş ve eklenmemiş tüm örneklerde en az üç defa ölçüm yapılır.• Sonuçlar eklenen ve ölçülen madde miktarları belirtilerek verilir.• Sonuç ortalamaları, %BSS ve/veya % Bias ile beraber verilir.

2.2.3.1.10. Stabilitte

Stabilitte, analitlerin kararlılığı ile ilişkilidir, analitin farklı koşullarda ne kadar kararlı kalabildiği hakkında bilgi verir. Zorunlu bir validasyon parametresi değildir, yapılması tavsiye edilir. Oluşan bozunma ürünlerinin etken madde yanında tayin edilebildiğini gösterir. Stabilitte çalışmaları, yöntemin tekrar edilebilirliğinin ve sonuçların güvenilirliğinin değerlendirilmesine olanak sağlar. Numune, standart madde ve çözücülerin stabilitesinin korunması tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde etmek için oldukça önemlidir. Stabilitte çalışmaları 4 farklı şekilde yapılabilir (Çizelge 2.22).

Çizelge 2.22. Stabilite Çalışmaları

Kısa süreli stabilite çalışmaları	<ul style="list-style-type: none">• Farklı konsantrasyonlardaki örneklerin oda sıcaklığında çözünmesi sağlanır.• Çalışılan ortamda 4-24 saat süreyle kalması ayarlanır.• Elde edilen verilerin, taze çözeltiye ait sonuçlarla karşılaştırması yapılır.
Uzun süreli stabilite çalışmaları	<ul style="list-style-type: none">• Etken maddenin kararlı kaldığı toplam zaman tespit edilir.• Ölçümler 3, 6 ve 12 aylık periyotlarla tekrarlanır.• Elde edilen verilerin, taze çözeltiye ait sonuçlarla karşılaştırması yapılır.
Dondurma-çözme stabilitesi çalışmaları	<ul style="list-style-type: none">• Üç döngüde gerçekleşir.• Çözeltilerin (üç farklı konsantrasyonda) belirlenen sıcaklıkta 24 saat süreyle dondurulması sağlanır.• Donmuş çözeltilerin daha sonra kendiliğinden çözünmesi beklenir.• İşlem 2 kez daha tekrarlanır, analizler tamamlanır ve elde edilen verilerin karşılaştırması yapılır.
Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları	<ul style="list-style-type: none">• Etken madde hızlıca bozundurulur.• Safsızlık veya bozunmayla meydana gelen ürünlerin analize etkisi araştırılır.

2.2.3.1.11. Duyarlılık

Duyarlılık, “doğrusallığın geçerli olduğu aralıkta doğru denkleminin eğimidir, aynı zamanda tayin alt sınırı olarak da tanımlanır ve tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır” (ICH, 2005a ve ICH, 2005b).

3. BULGULAR

3.1. Naftifin HCl Saflık Kontrolü

Deneylere başlamadan önce Naftifin HCl'nin saflık kontrolü için IR spektrumu ile UV spektrumu alınmış ve erime noktası tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler etken maddenin çalışmayı yürütebilecek saflıkta olduğunu göstermiştir.

3.1.1. IR Spektroskopisi

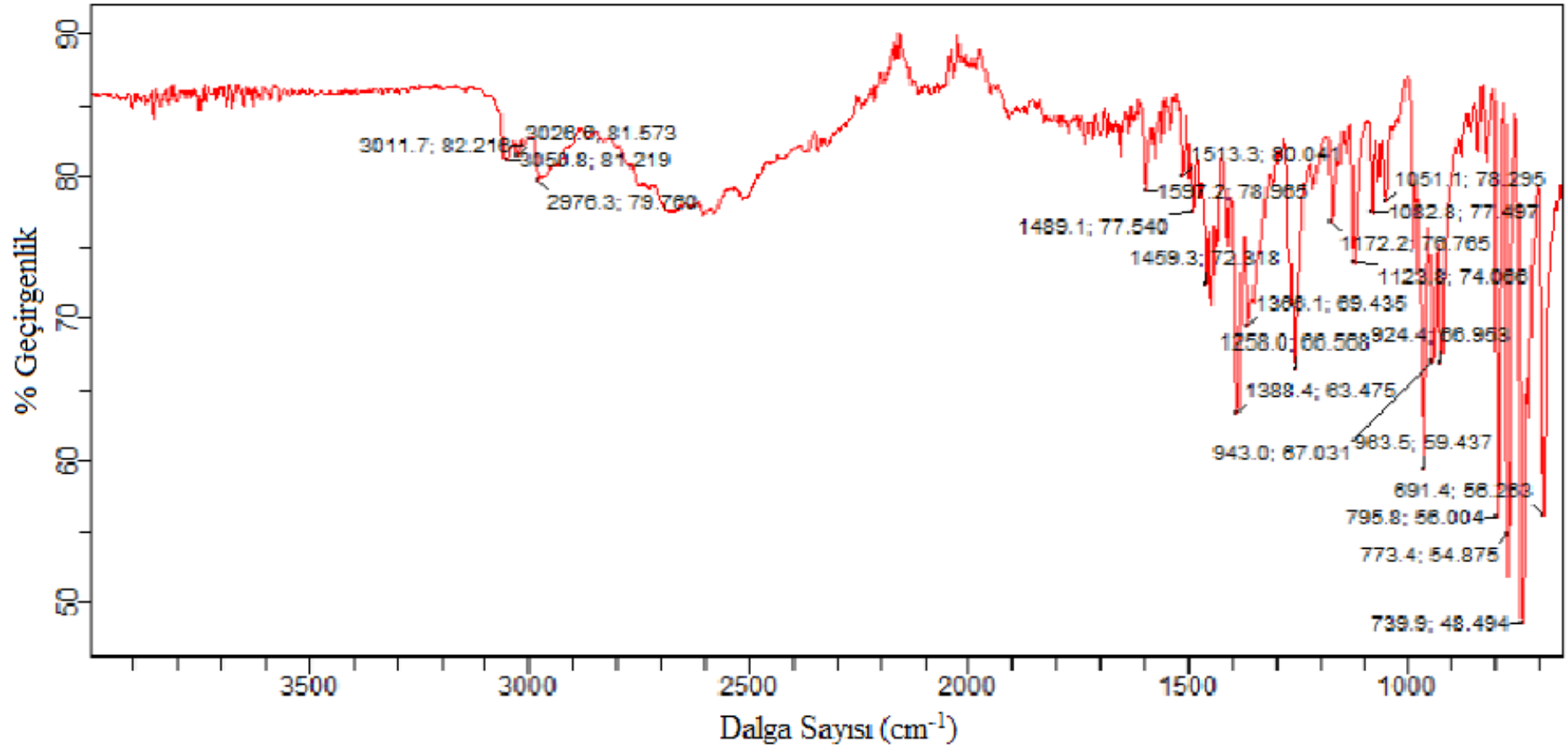
Naftifin HCl saflık kontrolü için IR spektrometresinden yararlanılmıştır (Şekil 3.1).

3.1.2. Erime Noktası Tayini

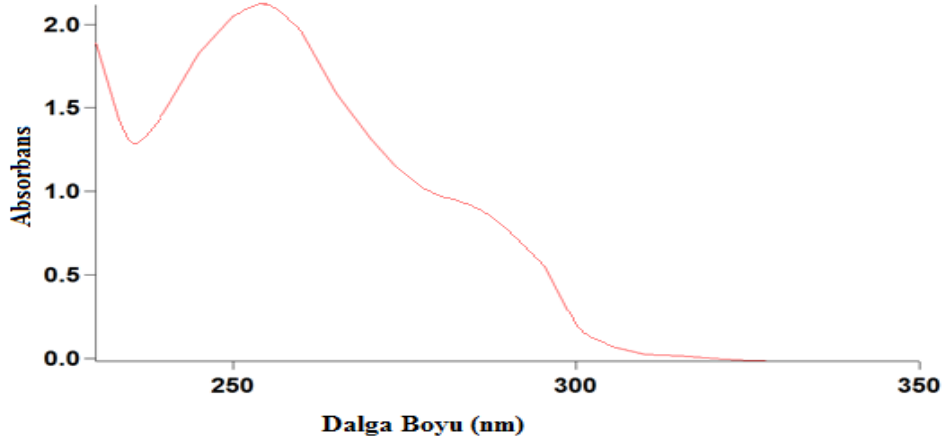
Naftifin HCl'nin saflık kontrolü için erime noktası tayini yapılmıştır. Erime noktası tayini 174 °C – 184 °C sıcaklıkları arasında yapılmıştır. Erime 178,3 °C'de başlamış ve 179,4 °C'de berraklaşarak son bulmuştur. Bu değerlerin farmakope referansıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

3.1.3. UV Spektrumu

Naftifin HCl'nin metanol içerisinde 230-350 nm dalga boyları arasındaki doğrudan UV spektrumu alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Naftifin HCl'nin IR spektrumu



Şekil 3.2. Naftifin HCl'nin 32,38 µg/mL Konsantrasyonundaki UV Spektrumu

3.2. Spektrofotometri

Naftifin HCl'nin spektrofotometrik analizi yapılırken 230 ile 350 nm dalga boyları arasında tarama gerçekleştirilmiş ve maksimum absorbans 255 nm dalga boyunda tespit edilmiştir.

3.2.1. Analitik Şartlar

Spektrofotometrik analizler, 10 mm kuvarz hücreli Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Madde Stok Çözeltisi: 32,38 mg Naftifin HCl tartım alınıp 100 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Metanol ile hacmine tamamlanmış ve sürekli çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır. Böylece 323,8 µg/mL Naftifin HCl içeren stok çözelti hazırlanmıştır.

Farmasötik Preparat Çözeltisi (Exoderil® %1 Krem): 1 gramında 10 mg Naftifin HCl içeren Exoderil® kremden 50 mL'lik balon jojeye 0,12 g tartım alınarak metanol ile hacmine tamamlanmıştır. 15 dakika ultrasonik su banyosunda çözünmesi sağlanmış ve sık sık çalkalanmıştır. Süre sonunda çözelti ultrasonik su banyosundan çıkartılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Hazırlanan çözelti 0.20 µm PTFE şırınga filtresinden geçirilerek süzülmesi sağlanmıştır. Böylece 24 µg/mL Naftifin HCl konsantrasyonuna sahip farmasötik preparat çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.3. Yöntemin Validasyonu

Naftifin HCL için geliştirilen spektrofotometrik yöntemin kanıtlanabilir ve güvenilir olması amacıyla yöntem valide edilmiştir. Yöntemin validasyonunda gerekli yöntem geçerlilik testleri için ICH parametreleri seçilmiş ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Validasyon çalışmalarında doğrusallık, doğrusal aralık, LOD, LOQ, duyarlılık ve doğruluk (geri kazanım) incelenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Doğrusallığın belirlenebilmesi için 323,8 µg/mL Naftifin HCl içeren standart madde stok çözeltisinden faydalanarak 6,476–32,380 µg/mL konsantrasyon aralığında çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

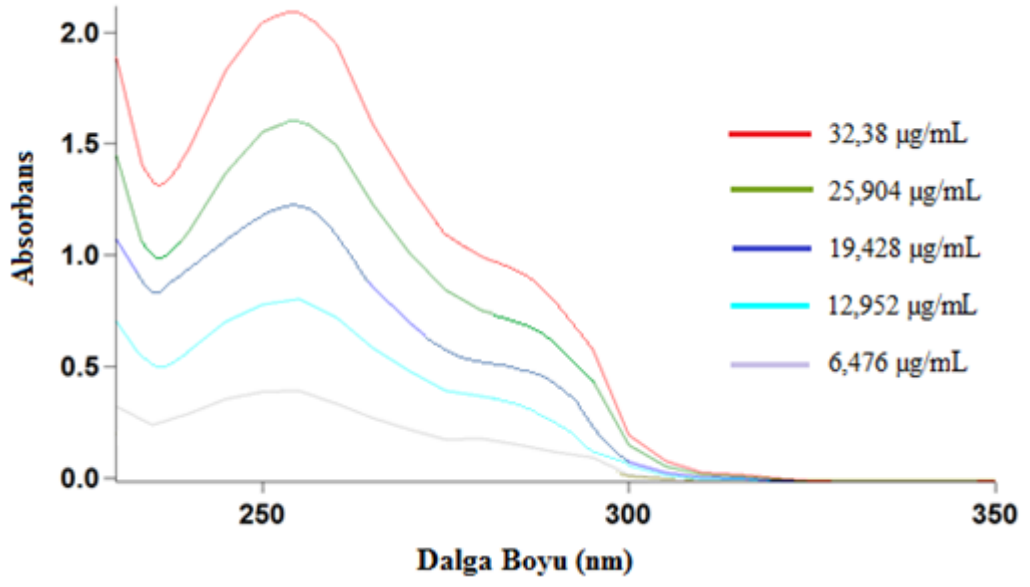
- 6,476 µg/mL'lik konsantrasyon çözeltisi: Stok çözeltilerden 0.5 mL alınıp 25 mL'lik balon jojeye aktararak metanol ile hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır.
- 12,952 µg/mL'lik konsantrasyon çözeltisi: Stok çözeltilerden 1 mL alınıp 25 mL'lik balon jojeye aktararak metanol ile hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır.

- 19,428 µg/mL'lik konsantrasyon çözeltisi: Stok çözeltiden 1,5 mL alınıp 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak metanol ile hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır.
- 25,904 µg/mL'lik konsantrasyon çözeltisi: Stok çözeltiden 2 mL alınıp 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak metanol ile hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır.
- 32,380 µg/mL'lik konsantrasyon çözeltisi: Stok çözeltiden 2,5 mL alınıp 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak metanol ile hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır.

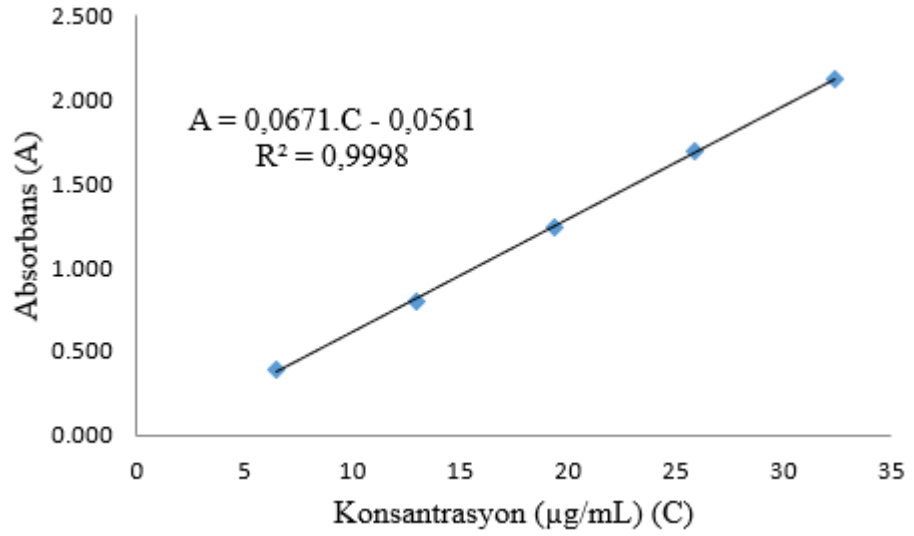
Geliştirilen UV-GB spektrofotometri yönteminde doğrusallığın değerlendirilmesi ve kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi için 6,476 µg/mL, 12,952 µg/mL, 19,428 µg/mL, 25,904 µg/mL ve 32,380 µg/mL konsantrasyonda 5 farklı Naftifin HCl çözeltisinin UV spektrumları alınmış ve maksimum absorbands 255 nm'de kaydedilmiştir (Şekil 3.3). İşlem her konsantrasyon için 3 tekrarlı yapılmıştır.

Her çözelti için kaydedilen absorbands değerlerine karşı konsantrasyon doğrusallık grafiği oluşturulmuş ve doğrusallık parametresi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Kalibrasyon hesaplamaları ile saptanan Naftifin HCl'nin UV-GB spektrofotometri yöntemiyle analizine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Geliştirilen yöntemin, Naftifin HCl için 6,476-32,380 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.3. 255 nm'de, Naftifin HCl'nin 6,476-32,380 µg/mL Konsantrasyon Aralığında Absorbansları



Şekil 3.4. Naftifin HCl Kalibrasyon Grafiği (UV-GB Spektrofotometri)

Çizelge 3.1. Naftifin HCl Kalibrasyon Eğrisi Özellikleri (UV-GB Spektrofotometrisi)

Regresyon Parametreleri	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı (µg/mL)	6,476 – 32,380 µg/mL
Kalibrasyon Denklemi	A = 0,0671.C - 0,0561
Eğim (m)	0,0671
Kesişim (n)	-0,0561
Eğimin Standart Hatası	0,0006
Kesişimin Standart Hatası	0,01188
Regresyon (R ²)	0,9998
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9999
LOD (µg/mL)	1,307
LOQ (µg/mL)	3,959
Bağıl Standart Sapma (%BSS)	% 0,91 (< %2)

3.2.3.2. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

UV-GB spektrofotometrik yöntemle LOD ve LOQ belirlenirken, doğrusallık parametresi altında hazırlanan minimum konsantrasyondaki standart madde çözeltilerinin 255 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinin standart sapması ve kalibrasyon eğrilerinin eğim değeri aşağıda yer alan formülde yerine konularak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \times SS / m$$

$$LOQ = 10 \times SS / m$$

SS : En düşük konsantrasyon için ölçülen değerlerin standart sapması

m : Kalibrasyon eğrisinin eğim değeri

Naftifin HCl'nin UV-GB spektrofotometri yönteminde LOD 1,307 µg/mL, LOQ 3,959 µg/mL ve BSS % 0,91 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.2). Elde edilen bulgular geliştirilen UV-GB spektrofotometri yönteminin Naftifin HCl için duyarlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.2. LOD ve LOQ (UV-GB Spektrofotometrisi)

Kalibrasyon Denklemi	SS	m	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
A = 0,0671.C - 0,0561	0,026	0,0671	1,307	3,959

3.2.3.3. Doğruluk (Geri Kazanım)

Geliştirilen UV-GB spektrofotometrik yöntemin doğruluğunu değerlendirmek amacıyla % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.3'de yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Naftifin HCl Geri Kazanım Sonuçları (UV-GB Spektrofotometrisi)

Standart Madde Çözeltisi Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	% Geri Kazanım
6,476	6,646	102,62
12,952	12,783	98,70
19,428	19,294	99,31
25,904	25,998	100,36
32,380	32,419	100,12
	\bar{X}_{ort}	100,22
	SS	1,492
	% BSS	1,492

\bar{X}_{ort} : Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağıl standart sapma

3.2.4. Farmasötik Preparata Uygulama

Exoderil[®] kremden 50 mL'lik balon jöjeye 0,12 g hassas tartım alınarak metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Bu çözelti hazırlama işleminde yaklaşık 24 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda Naftifin HCl içerecek şekilde farmasötik preparat çözeltisi hazırlanmıştır. Geliştirilen UV-GB spektrofotometrik yöntemle 255 nm dalga boyunda absorbanslar okunarak kalibrasyon denkleminde etken madde miktar tayini hesaplanmıştır. Sonuçlar çizelge 3.4'te yer almaktadır.

Çizelge 3.4. Naftifin HCl Farmasötik Preparat Sonuçları (UV-GB Spektrofotometrisi)

Exoderil® Kremde Etken Madde Miktar Tayini (% Naftifin HCl)			
Numune No	% Naftifin HCl		
1	98,94	\bar{X}_{ort} , %	99,22
2	100,02	SS	0,526
3	99,38	% BSS	0,530
4	99,13		
5	98,62		

\bar{X}_{ort} : Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Naftifin HCl'nin kromatografik davranışlarının incelenmesinde Agilent 1100 marka HPLC cihazı kullanılmıştır. HPLC sistemi, ters faz sıvı kromatografisidir. Ters faz HPLC cihazı, normal faz HPLC ile meydana gelebilecek zaman kayıplarından kaçınmak ve kolay kullanılabilir olması nedeniyle kullanılmıştır. Sistemde; sistem kontrol ünitesi, pompa, dedektör (UV-GB), kolon fırını ve gaz giderme ünitesi bulunmaktadır. Kromatografik ayırma işleminde Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu kullanılmıştır.

3.3.1. Analitik Şartlar

HPLC analizleri, dörtlü gradyan pompası, 100 µL halkalı enjeksiyon vanası, 100 vial kapasiteli otomatik numune alma alanı ve UV-GB dedektörden oluşan Agilent 1100 HPLC cihazı ile yapılmıştır.

3.3.1.1. Hareketli Fazın Hazırlanması

Hareketli fazın hazırlanmasında kromatografik ve analitik saflıkta organik çözücüler kullanılmıştır. Kanserojen olmayan ve kolay temin edilebilen asetonitril kullanılmıştır.

Literatür çalışmalarından yola çıkılarak Asetonitril:Su:Trietilamin hareketli faz çözeltisi kullanılmıştır. Hareketli faz, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h) oranlarında karıştırılıp ultrasonik su banyosunda 15 dakika degaze edildikten sonra oda sıcaklığına getirilerek hazırlanmıştır.

3.3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Madde Stok Çözeltisi: 3,238 mg Naftifin HCl tartım alınıp 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Sürekli çalkalanarak çözünmesi sağlanmış ve böylece 323,8 µg/mL Naftifin HCl içeren stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Farmasötik Preparat Çözeltisi (Exoderil® %1 Krem): 1 gramında 10 mg Naftifin HCl içeren Exoderil® kremden 50 mL'lik balon jojeye 0,12 g tartım alınarak metanol ile hacmine tamamlanmıştır. 15 dakika boyunca ultrasonik su banyosunda çözünmesi sağlanmış ve sık sık çalkalanmıştır. Süre sonunda çözelti ultrasonik su banyosundan çıkartılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Hazırlanan çözeltinin 0.20 µm Politetrafloroetilen (PTFE) şırınga filtresinden geçirilerek süzülmesi sağlanmıştır. Böylece 24 µg/mL'lik Naftifin HCl konsantrasyonuna sahip farmasötik preparat çözeltisi hazırlanmıştır.

Plasebo Çözeltisi: Exoderil® %1 Krem plasebosu “sodyum hidroksit, benzil alkol, sorbitan stearat, setil palmitat, setil alkol, stearil alkol, polietilen glikol-60-sorbitan stearat, isopropil miristat ve saf su yardımcı maddelerini” içermektedir.

Plasebo çözeltisi hazırlanırken 0,12 g numune plasebosu tartım alınıp 50 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. 15 dakika boyunca bir miktar metanol ile ultrasonik su banyosunda çözündürüldükten sonra oda sıcaklığına getirilmiş ve metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0.20 µm PTFE şırınga filtresinden geçirilip süzülmesi sağlanmış ve böylece plasebo çözeltisi hazırlanmıştır.

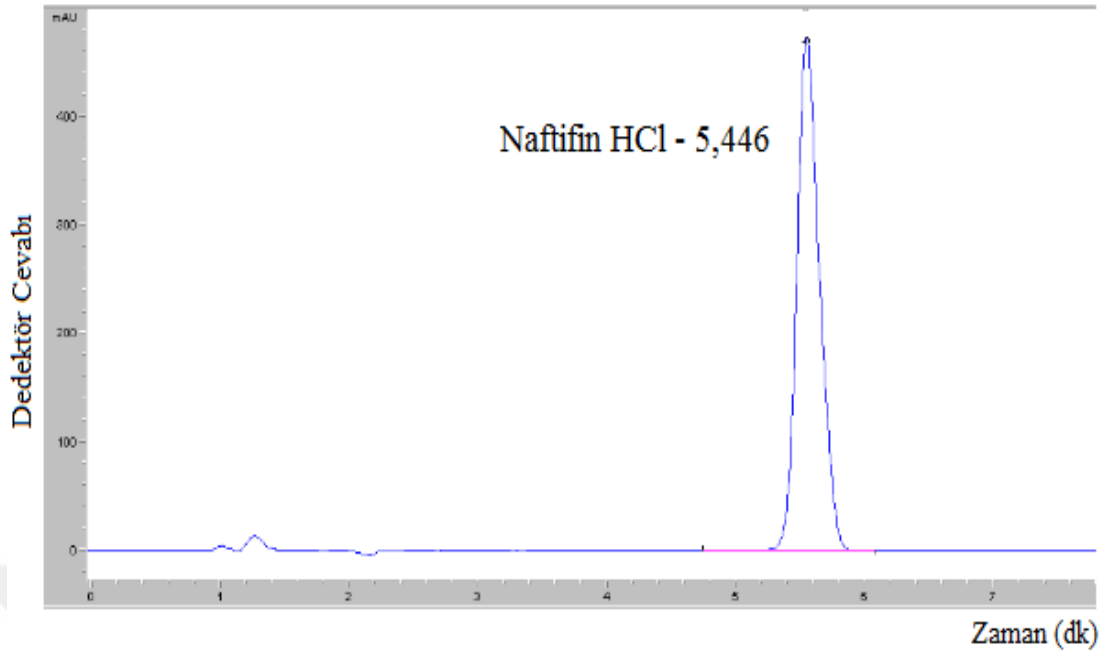
Çözeltiler, analiz çalışmalarında taze ve günlük olarak hazırlanmıştır.

3.3.2. Yöntemin Optimizasyonu

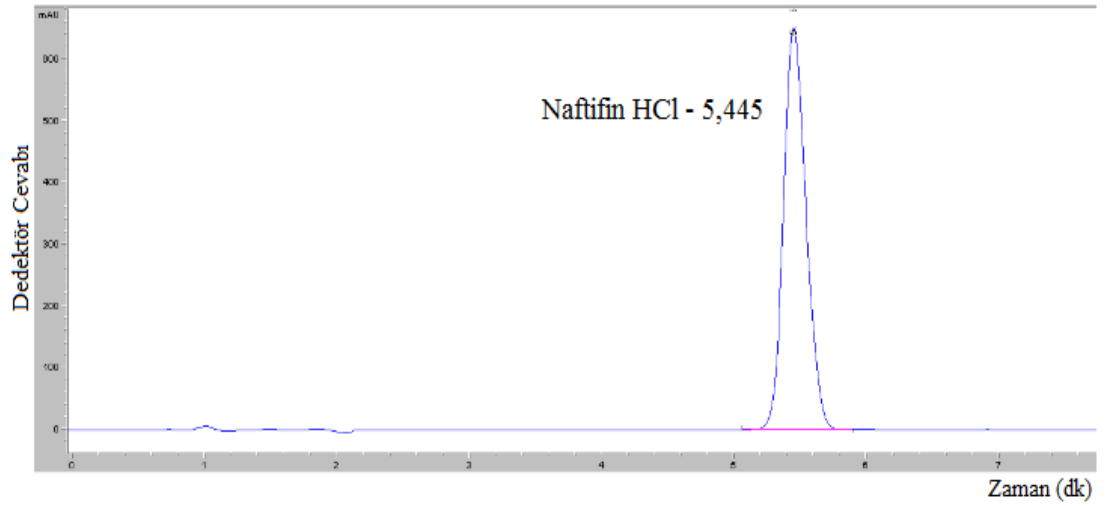
HPLC sistemine çözeltiler enjekte edilmeden önce kanallardaki havanın giderilmesi ve sistemin dengelenmesini sağlamak için hazırlanan hareketli faz kanallardan geçirilmiştir. Böylece kolon şartlandırılmış ve sistem basıncı uygun hale getirilmiştir. Naftifin HCl'nin geliştirilen ters faz HPLC yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı ve dalga boyunun etkileri incelenmiştir.

3.3.2.1. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

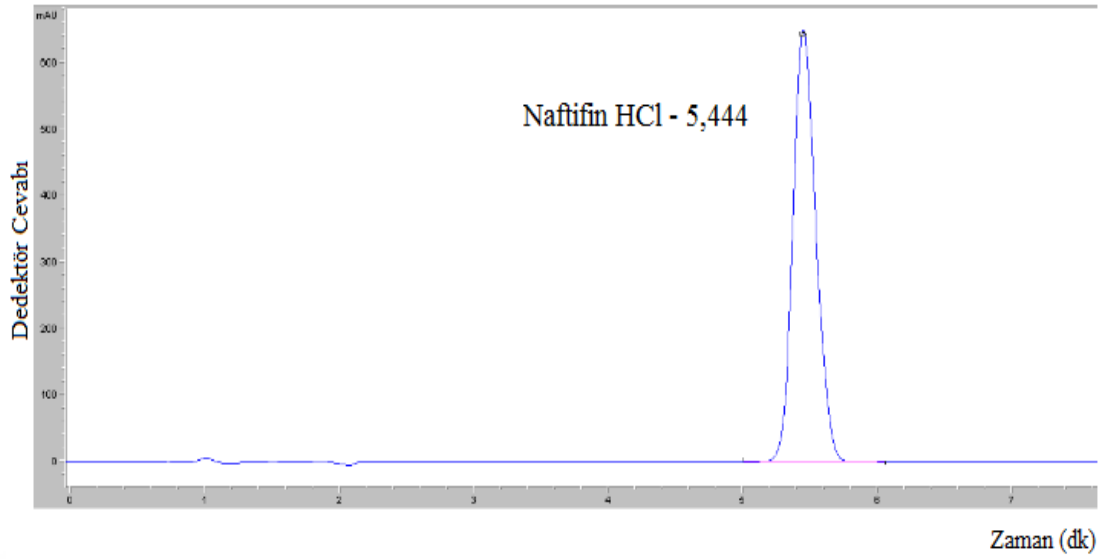
Geliştirilen HPLC yönteminde, kolon sıcaklığının analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. İşlem sırasında deneysel diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur. Kolon sıcaklığı 23 °C, 25 °C ve 27 °C olarak denenmiştir. Elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiş ve en uygun kolon sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7).



Şekil 3.5. 23 °C'de, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 1,5 mL dk akış hızı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram



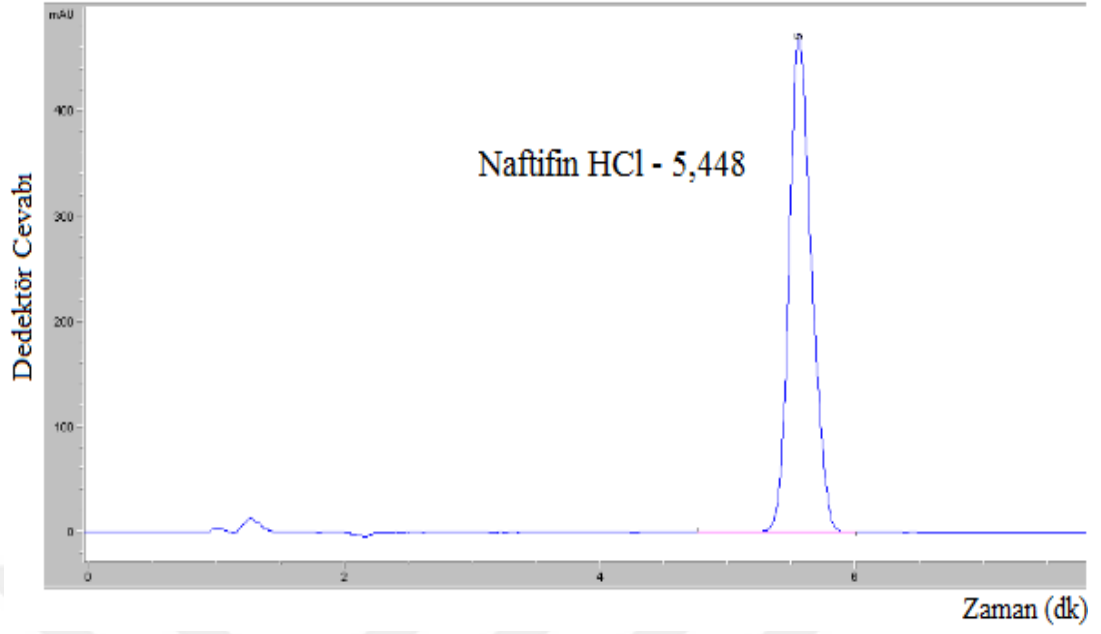
Şekil 3.6. 25 °C'de, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 1,5 mL dk akış hızı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram



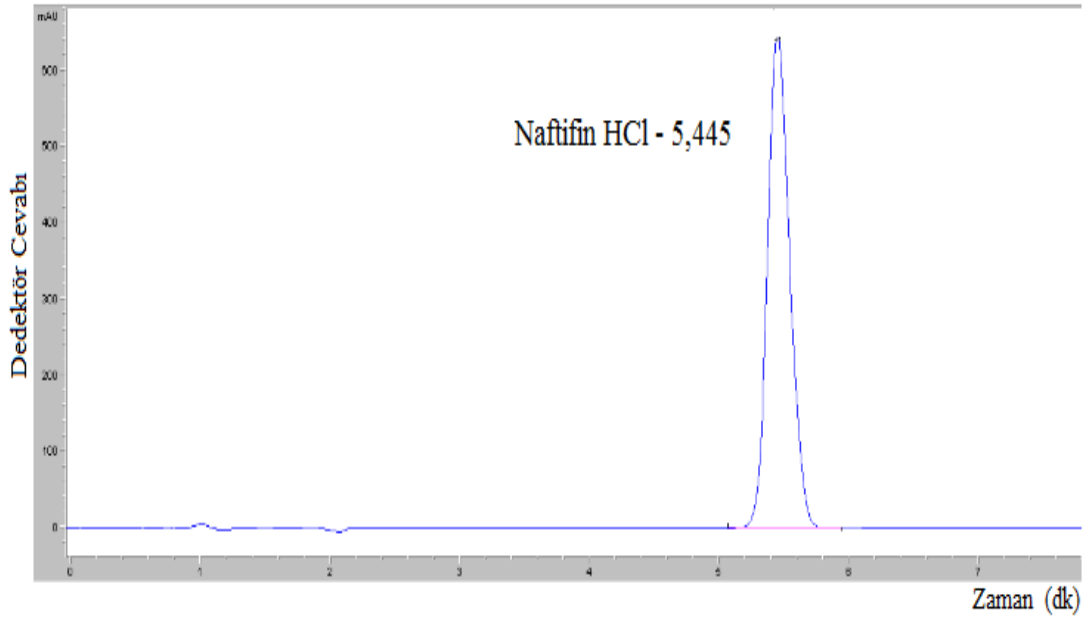
Şekil 3.7. 27 °C'de, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 1,5 mL dk akış hızı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram

3.3.2.2. Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi

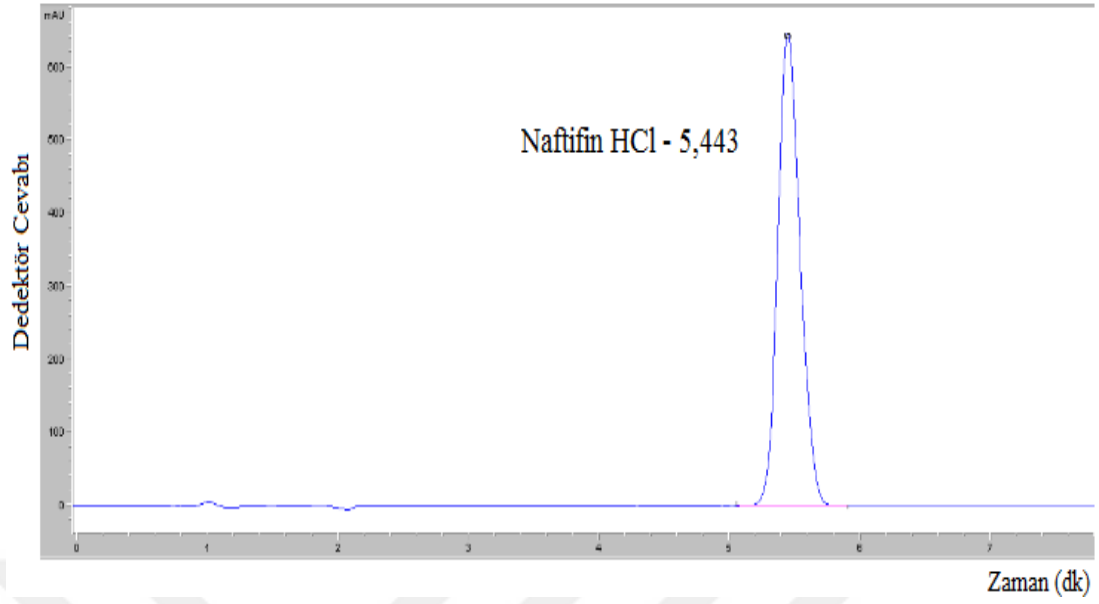
Geliştirilen HPLC yönteminde, hareketli faz akış hızının analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. İşlem sırasında deneysel diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur. Akış hızı 1,45 mL/dk, 1,50 mL/dk ve 1,55 mL/dk olarak denenmiştir. Elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiş ve en uygun akış hızı 1,50 mL/dk olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10).



Şekil 3.8. 1,45 mL/dk akış hızında, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram



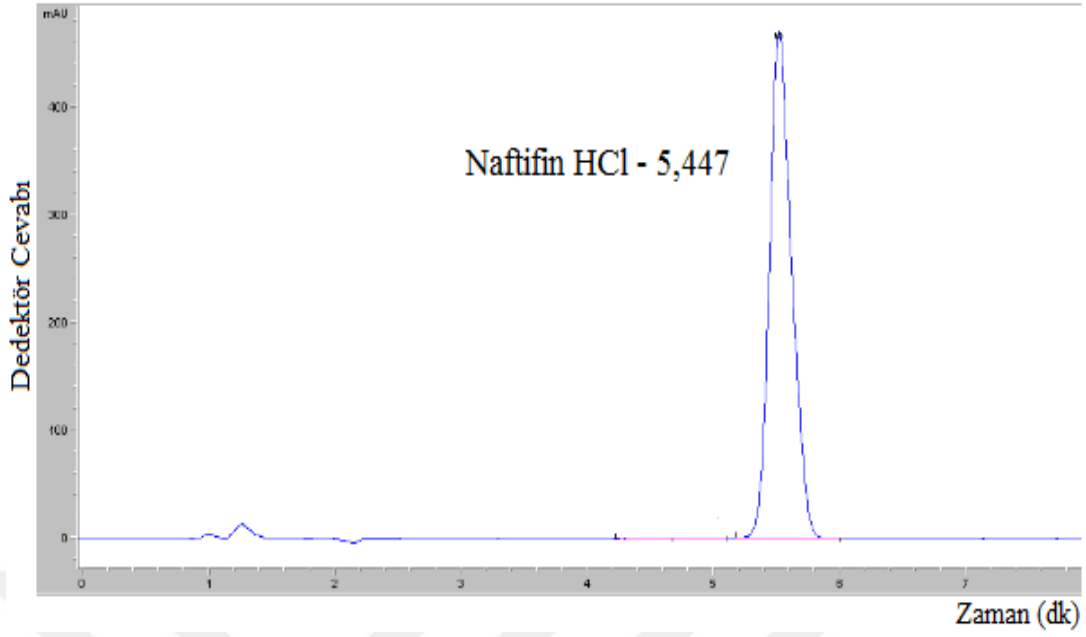
Şekil 3.9. 1,50 mL/dk akış hızında, 254 nm'de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram



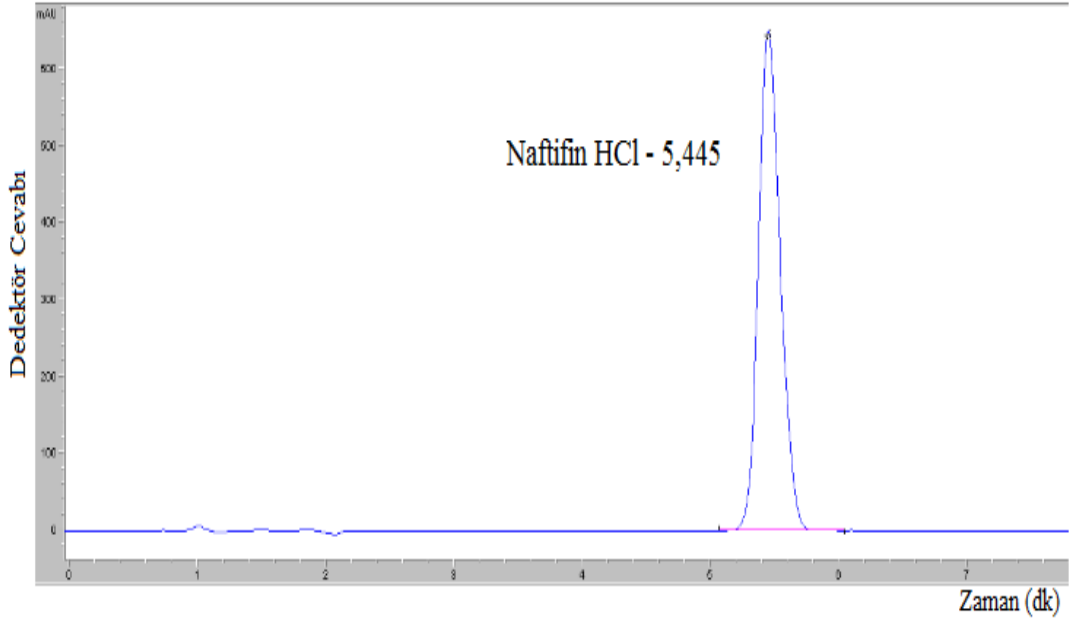
Şekil 3.10. 1,55 mL/dk akış hızında, 254 nm’de, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL’lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram

3.3.2.3. Dalga Boyunun Belirlenmesi

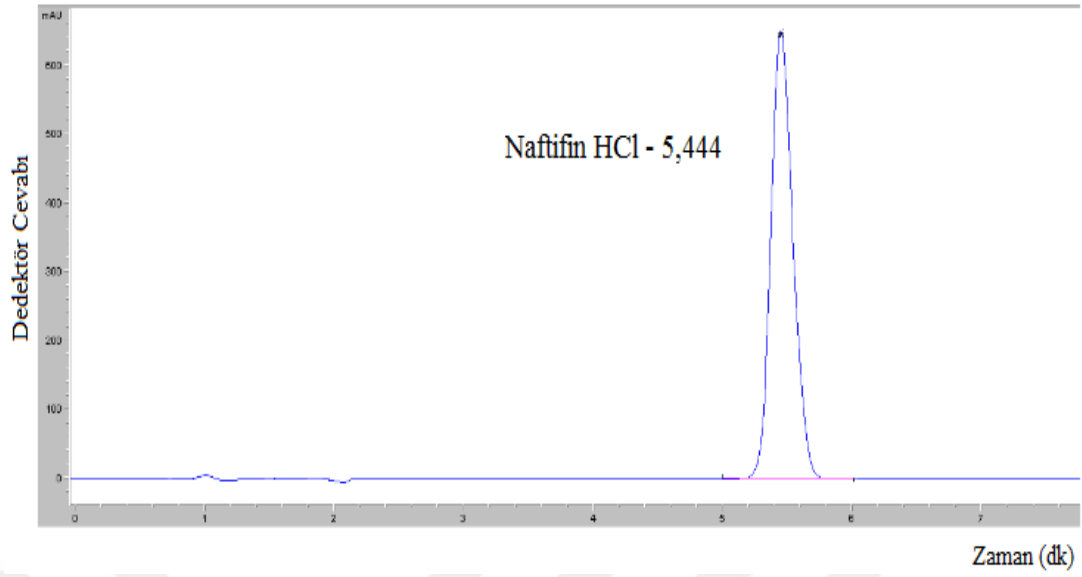
Geliştirilen HPLC yönteminde, dalga boyunun analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. İşlem sırasında deneysel diğer tüm parametreler sabit tutulmuştur. Dalga boyu 250 nm, 254 nm ve 258 nm olarak denenmiştir. Elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiş ve en uygun dalga boyu 254 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13).



Şekil 3.11. 250 nm dalga boyunda, 1,50 mL/dk akış hızında, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram



Şekil 3.12. 254 nm dalga boyunda, 1,50 mL/dk akış hızında, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram



Şekil 3.13. 258 nm dalga boyunda, 1,50 mL/dk akış hızında, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h), Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu, 25 °C kolon sıcaklığı ve 10,0 µL enjeksiyon hacmi ile yapılan 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl analizine ait kromatogram

Optimize edilen son koşullar çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Naftifin HCl Analizi İçin Optimize Edilmiş Kromatografik Koşullar

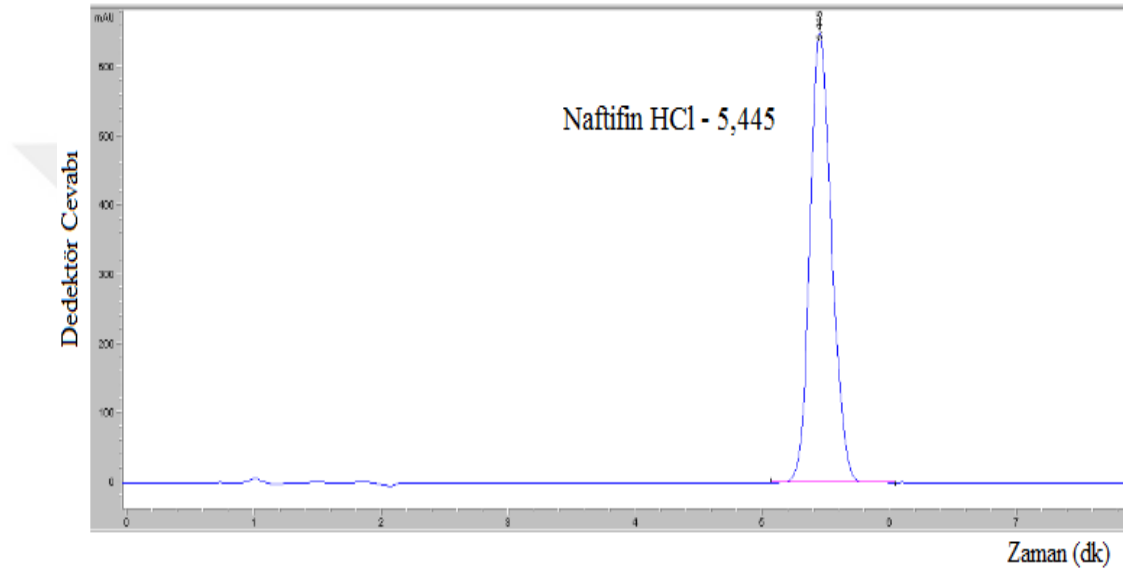
Parametre	Optimize Edilen Koşullar
Kolon	Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm)
Kolon Sıcaklığı (°C)	25 °C
Hareketli Faz Bileşimi	Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h)
Hareketli Faz Akım Hızı (mL/dk)	1,50 mL/dk
Dalga Boyu (nm)	254 nm
Enjeksiyon Hacmi (µL)	10,0 µL

3.3.2.4. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları

Geliştirilen HPLC yöntemi için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. SUT parametreleri geliştirilen HPLC yöntemi için optimize edilen kromatografik koşullarda hesaplanmıştır (Çizelge 3.6, Şekil 3.14).

Çizelge 3.6. SUT Parametreleri

Parametreler	Sonuç	Kabul Kriteri
Alıkonma zamanı (t_R) (dk)	5,445	
Kapasite Faktörü (k)	4,445	$1 \leq k \leq 10$
Kolon Etkinliği (N)	15005	$N > 2000$
Kuyruklanma Faktörü (T)	1,16	≤ 2
Pik Asimetrisi (A_S)	1,32	$0,95 \leq A_S \leq 2$



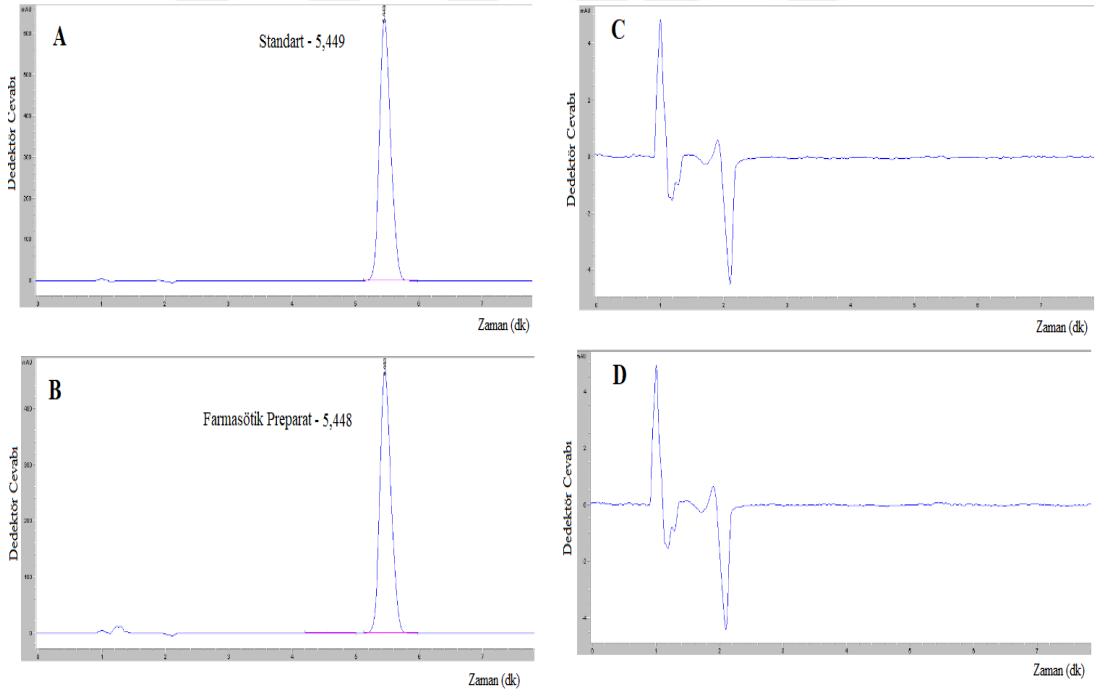
Şekil 3.14. 32,38 µg/mL Naftifin HCl konsantrasyonunda SUT'a ait kromatogram

3.3.3. Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen HPLC yöntemi, geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla valide edilmiştir. Yöntemin validasyonunda gerekli yöntem geçerlilik testleri için ICH parametreleri seçilmiştir ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Validasyon çalışmalarında seçicilik ve spesiflik, doğrusallık, doğrusal aralık, LOD, LOQ, duyarlılık, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

3.3.3.1. Seçicilik ve Spesifiklik

Geliştirilen HPLC yönteminin Naftifin HCl için spesifik olup olmadığının belirlenebilmesi amacıyla seçicilik ve spesifiklik değerlendirilmiştir. Yöntemin spesifik ve seçici olarak değerlendirilmesi için etken madde pikinin alıkonma zamanında plasebo çözeltisinin ve çözücünün herhangi bir pik vermemesi beklenir. Seçicilik ve spesifiklik değerlendirmesinde; standart madde çözeltisi, farmasötik preparat çözeltisi, plasebo çözeltisi ve çözücü olarak kullanılan metanol belirlenen kromatografik koşullarda sisteme verilmiştir. Standart madde çözeltisi ve farmasötik preparat çözeltisi ile 254 nm’de pik oluşumu gözlenmiştir. Aynı alıkonma zamanında, plasebo çözeltisi ve metanolde pik oluşumu gözlenmemiştir. Naftifin HCl içeren çözeltilerde pik gözlenirken Naftifin HCl içermeyen çözeltilerde pik gözlenmemesi geliştirilen yöntemin Naftifin HCl için seçici ve spesifik olduğunu göstermektedir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Seçicilik ve Spesifiklik Kromatogramları

A: Standart Çözelti, B: Farmasötik Preparat Çözeltisi, C: Plasebo, D: Çözücü.

3.3.3.2. Doğrusallık ve Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

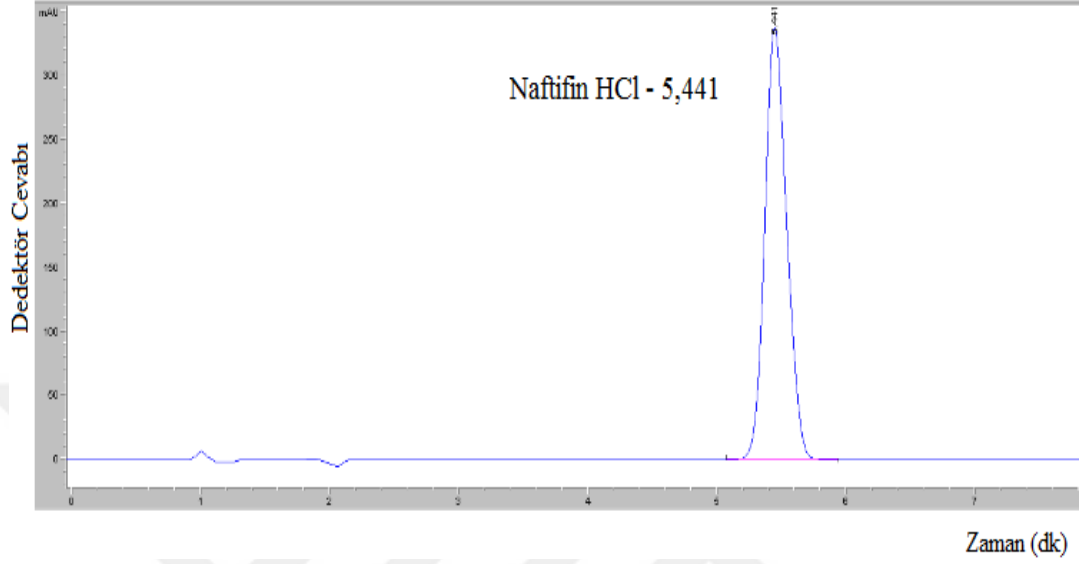
HPLC yönteminde kalibrasyon için 5 ayrı konsantrasyonda çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- 16,19 µg/mL'lik (%50'lik) konsantrasyon çözeltisi: 0,8095 mg Naftifin HCl tartım alınıp 50 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Sürekli çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır.
- 24,28 µg/mL'lik (%75'lik) konsantrasyon çözeltisi: 1,214 mg Naftifin HCl tartım alınıp 50 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Sürekli çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır.
- 32,38 µg/mL'lik (%100'lük) konsantrasyon çözeltisi: 1,619 mg Naftifin HCl tartım alınıp 50 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Sürekli çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır.
- 40,46 µg/mL'lik (%125'lik) konsantrasyon çözeltisi: 2,023 mg Naftifin HCl tartım alınıp 50 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Sürekli çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır.
- 48,26 µg/mL'lik (%150'lik) konsantrasyon çözeltisi: 2,413 mg Naftifin HCl tartım alınıp 50 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Sürekli çalkalanarak çözünmesi sağlanmıştır.

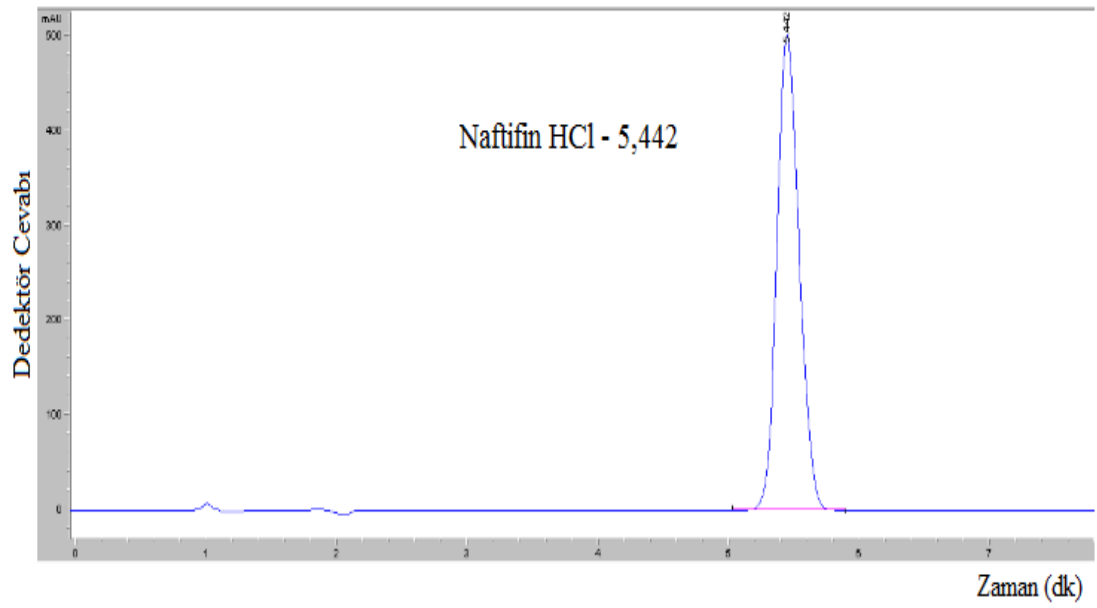
Hazırlanan kalibrasyon çözeltileri viallere konularak cihazın otosampler vasıtasıyla HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Tez çalışması kapsamında belirlenen HPLC koşullarında kromatogramlar elde edilerek pik alanları ölçülmüştür (Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20). İşlemler 6 tekrarlı yapılmıştır. Elde edilensonuçlar doğrultusunda kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır.

Artan konsantrasyonlara ait alanların ortalaması alınarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve doğrusallık parametresi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.21). Kalibrasyon hesaplamaları ile saptanan, Naftifin HCl'nin HPLC yöntemiyle analizine ait kalibrasyon sonuçları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

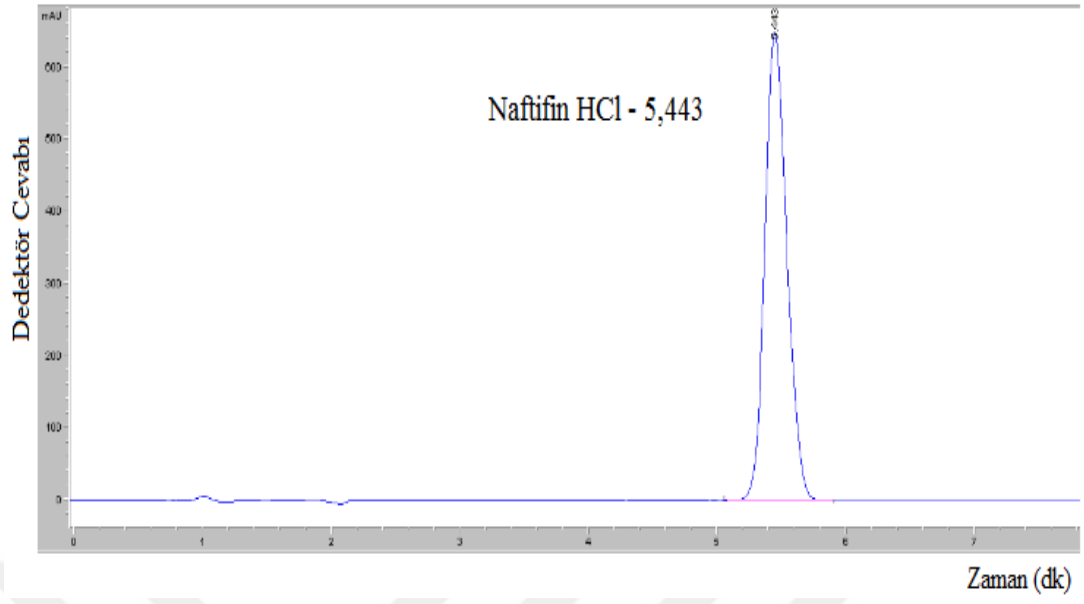
Geliştirilen HPLC yönteminin, Naftifin HCl için 16,19–48,26 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir.



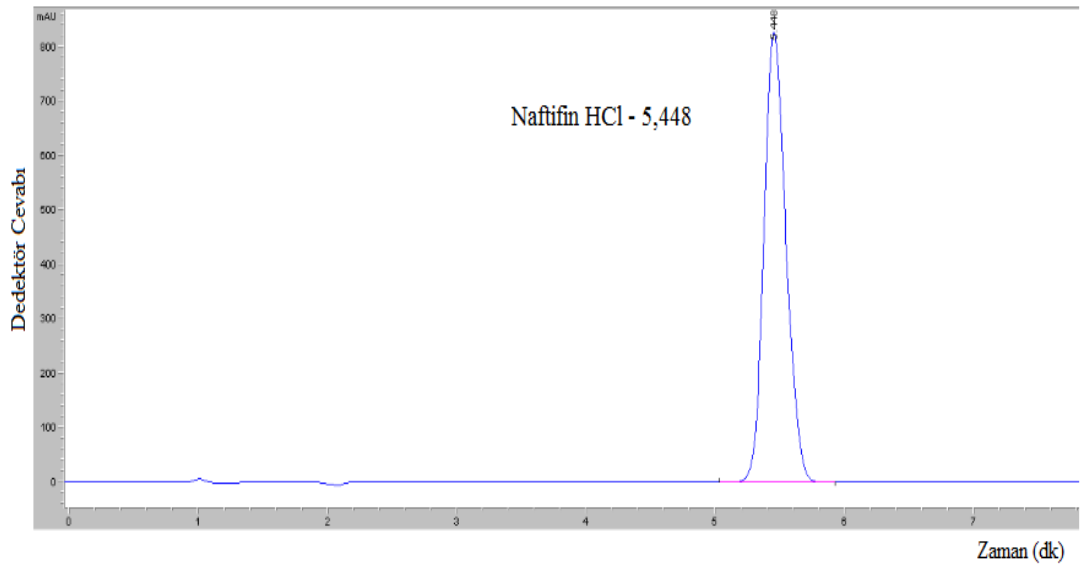
Şekil 3.16. 16,19 $\mu\text{g/mL}$ 'lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı



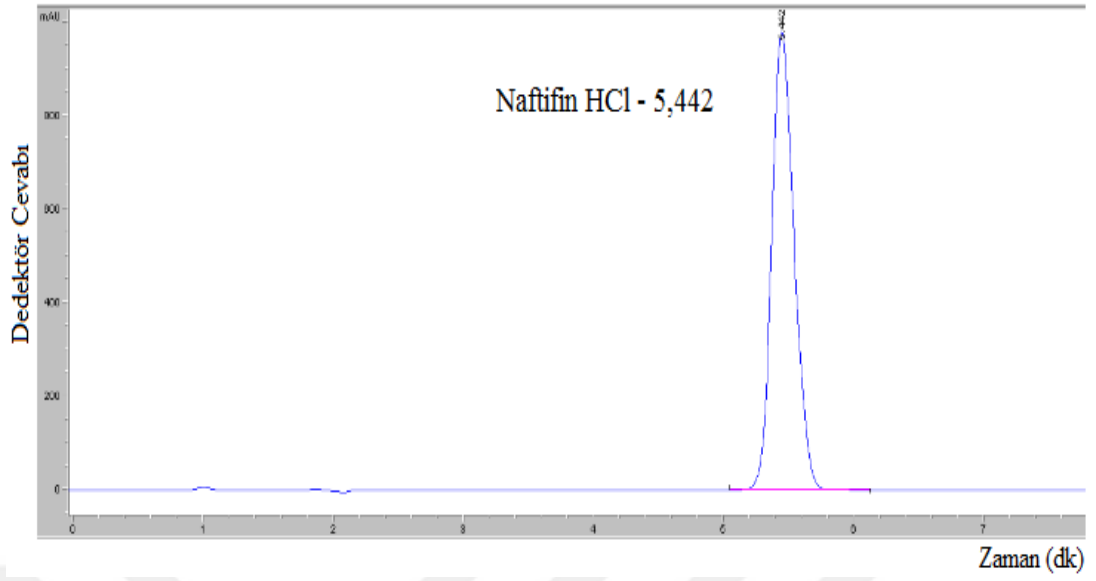
Şekil 3.17. 24,28 $\mu\text{g/mL}$ 'lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı



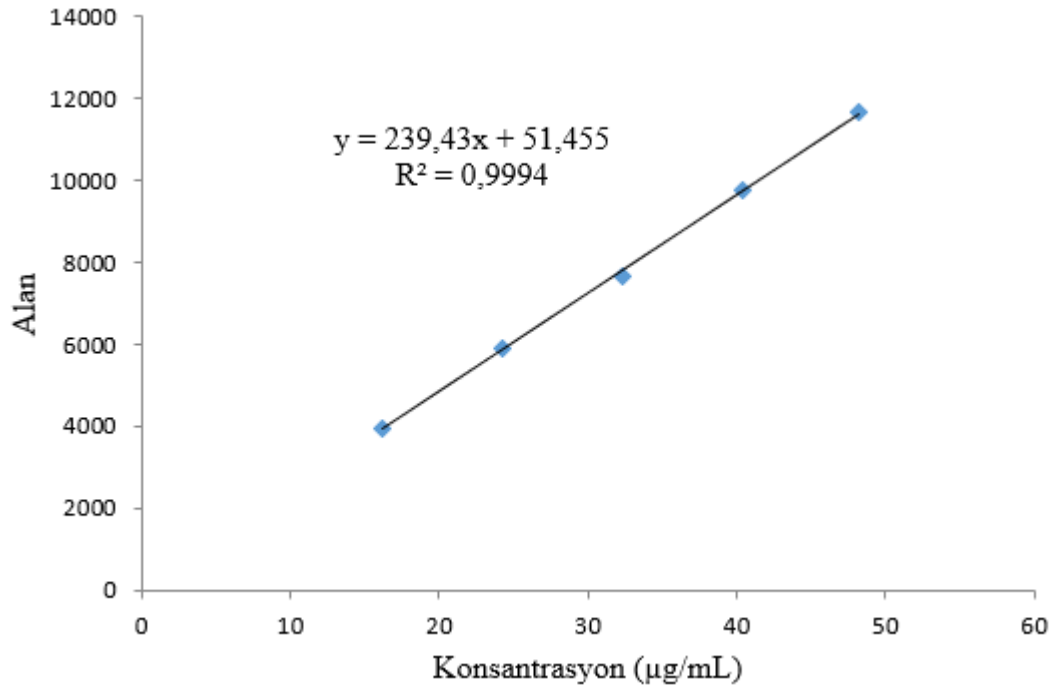
Şekil 3.18. 32,38 µg/mL'lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı



Şekil 3.19. 40,46 µg/mL'lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı



Şekil 3.20. 48,26 µg/mL'lik Naftifin HCl çözeltisinin kromatogramı



Şekil 3.21. Naftifin HCl Kalibrasyon Grafiği (HPLC)

Çizelge 3.7. Naftifin HCl Kalibrasyon Eğrisinin Özellikleri (HPLC)

Regresyon Parametreleri	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı (µg/mL)	16,19 – 48,26 µg/mL
Kalibrasyon Denklemi	$y = 239,43x + 51,455$ (x:Konsantrasyon; y:Alan)
Eğim (m)	239,43
Kesişim (n)	51,455
Eğimin Standart Hatası	3,507
Kesişimin Standart Hatası	120,155
Regresyon (R ²)	0,999
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
LOD (µg/mL)	3,703
LOQ (µg/mL)	11,221
Bağıl Standart Sapma (%BSS)	% 1,16 (< %2)

3.3.3.3. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Artan konsantrasyonlarda hazırlanan Naftifin HCl çözeltileri ile yöntemin doğrusallığı değerlendirilmiş, kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve kalibrasyon eğrisi belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin eğim değeri ve standart sapma değeri ile LOD ve LOQ hesaplamaları yapılmıştır.

$$LOD = 3,3 \times SS / m$$

$$LOQ = 10 \times SS / m$$

SS : En düşük konsantrasyon için ölçülen değerlerin standart sapması
m : Kalibrasyon eğrisinin eğim değeri

Naftifin HCl'nin HPLC yönteminde LOD 3,703 µg/mL ve LOQ 11,221 µg/mL ve BSS %1,16 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.8). Elde edilen bulgular geliştirilen HPLC yönteminin Naftifin HCl için duyarlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.8. LOD ve LOQ (HPLC)

Kalibrasyon Denklemi	SS	m	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
$y = 239,43x + 51,455$	268,675	239,43	3,703	11,221

3.3.3.4. Doğruluk (Geri Kazanım)

Kullanılan müstahzarı oluşturan plasebo maddelerinin varlığında Naftifin HCl'nin tayininin, hangi oranda geri kazanıldığının tespiti için yöntemin doğruluğu araştırılmıştır. Bu doğrultuda 50 mL'lik üç ayrı balon jojedeki 0,12 g'lık plasebo karışımının üzerine 0,55 mg (%50'lik), 1,1 mg (%100'lük) ve 1,65 mg (% 150'lik) Naftifin HCl eklenmiş; balon jodeler metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Her biri ultrasonik su banyosunda bekletilip oda sıcaklığına getirilmiştir. Her birinin 0.20 µm PTFE şırınga filtresinden geçirilerek süzülmesi sağlanmıştır. Her biri belirlenen kromatografik koşullarda sisteme verilmiştir. İşlemler 3 tekrarlı yapılmıştır.

Çalışma konsantrasyonu %50, %100 ve %150'lik derişimde olacak şekilde etken madde ve plasebo tartılıp analiz edilmiştir. Sonuçlar çizelge 3.9'da yer almaktadır.

Çizelge 3.9. Naftifin HCl Geri Kazanım Sonuçları (HPLC)

% Konsantrasyon	Gerçek Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	% Ortalama Geri Kazanım
% 50	11	10,9	98,93	98,94
	11	10,9	99,01	
	11	10,9	98,86	
% 100	22	22,2	101,07	101,06
	22	22,2	101,05	
	22	22,2	101,07	
% 150	33	32,9	99,63	99,65
	33	32,9	99,67	
	33	32,9	99,63	
			\bar{X}_{ort}	98,94
			SS	0,939
			% BSS	0,940

\bar{X}_{ort} : Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.3.3.5. Kesinlik

Geliştirilen HPLC yönteminin kesinliğinin belirlenebilmesi için orta-kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlendirilmiştir.

Orta-kesinlik (Günler arası kesinlik), yöntem için hazırlanan standart madde çözeltisinin üç ayrı günde üçer defa ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik (Gün içi kesinlik), yöntem için hazırlanan standart madde çözeltisinin aynı gün içerisinde ve aynı işlem koşulları altında ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar çizelge 3.10'da yer almaktadır.

Çizelge 3.10. Naftifin HCl Kesinlik Sonuçları (HPLC)

Tekrarlanabilirlik (Gün içi kesinlik)		Orta-kesinlik (Günler arası kesinlik)	
Zaman	Naftifin HCl, %	Zaman	Naftifin HCl, %
0. saat	100,08		100,08
1. saat	100,08	1. Gün	100,08
2. saat	100,08		100,08
4. saat	99,95		99,78
8. saat	99,96	2. Gün	99,40
12. saat	99,99		99,56
\bar{X}_{ort}	100,02		99,30
SS	0,062	3. Gün	100,74
% BSS	0,062		100,32
		\bar{X}_{ort}	99,93
		SS	0,462
		% BSS	0,463

\bar{X}_{ort} : Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.3.4. Farmasötik Preparata Uygulama

HPLC yöntemi için, Exoderil® kremden 50 mL'lik balon jöjeye 0,12 g hassas tartım alınarak metanol ile hacmine tamamlanmıştır. Bu çözelti hazırlama işleminde yaklaşık 24 µg/mL konsantrasyonunda Naftifin HCl içerecek şekilde farmasötik preparat çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyonun kromatografik şartlarında farmasötik preparat çözeltileri HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Kromatogramların alanları okunarak kalibrasyon denkleminde yerine konularak Naftifin HCl'ün miktarı hesaplanmıştır. İşlem 6 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 3.11'de sunulmuştur.

Çizelge 3.11. Naftifin HCl Farmasötik Preparat Sonuçları (HPLC)

Exoderil® Kremde Etken Madde Miktar Tayini (% Naftifin HCl)			
Numune No	% Naftifin HCl		
1	98,38	\bar{X}_{ort} , %	99,50
2	98,92	SS	0,822
3	99,05	% BSS	0,826
4	100,09		
5	100,24		
6	100,33		

\bar{X}_{ort} : Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağıl standart sapma

3.4. Naftifin HCl Analizi İçin Geliştirilen HPLC ve UV-GB Spektrofotometri Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Naftifin HCl analizi için geliştirilen ve optimize edilen kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin koşulları çizelge 3.12'de verilmiştir. Naftifin HCl analizi için geliştirilen ve optimize edilen kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerle yapılan analizler neticesinde elde edilen kalibrasyon eğrilerinin özellikleri çizelge 3.13'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Naftifin HCl Analizi İçin Geliştirilen HPLC ve UV-GB Spektrofotometri Yöntemlerinin Çalışma Koşulları

HPLC Metodu	
Cihaz	Agilent 1100 serisi
Dedektör	UV-GB
Kolon	Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm)
Dalga Boyu	254 nm
Akış Hızı	1,5 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Hareketli Faz	Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h)
Çözücü	Metanol
Standart Madde Stok Çözeltisi	323,8 µg/mL
Farmasötik Preparat Çözeltisi	24 µg/mL

UV-GB Spektrofotometri Metodu	
Cihaz	Agilent Cary 60 UV-Vis
Dedektör	UV
Dalga Boyu	255 nm
Çözücü	Metanol
Standart Madde Stok Çözeltisi	323,8 µg/mL
Farmasötik Preparat Çözeltisi	24 µg/mL

Çizelge 3.13. Naftifin HCl Analizi İçin Geliştirilen HPLC ve UV-GB Spektrofotometri Yöntemlerinin Kalibrasyon Eğrisi Özelliklerinin Karşılaştırılması

Regresyon Parametreleri	HPLC	UV-GB Spektrofotometrisi
Konsantrasyon Aralığı (µg/mL)	16,19 – 48,26 µg/mL	6,476 – 32,380 µg/mL
Kalibrasyon Denklemi	$y = 239,43x + 51,455$	$A = 0,0671.C - 0,0561$
Eğim (m)	239,43	0,0671
Kesişim (n)	51,455	-0,0561
Eğimin Standart Hatası	3,507	0,0006
Kesişimin Standart Hatası	120,155	0,01188
Regresyon (R²)	0,999	0,9998
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999	0,9999
LOD (µg/mL)	3,703	1,307
LOQ (µg/mL)	11,221	3,959
Bağıl Standart Sapma (%BSS)	% 1,16 (< %2)	% 0,91 (< %2)

Geliştirilen HPLC ve UV-GB spektrofotometri yöntemleri Naftifin HCl'nin farmasötik preparatı Exoderil® kreme uygulanmış ve her iki yöntemde elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.14). Yöntemler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı t-testi yapılarak değerlendirilmiştir (Student's t-test, 0,51; p=0,05).

Çizelge 3.14. Exoderil® Kremde Miktar Tayini Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Numune No	HPLC (% Naftifin HCl)	UV-GB Spektrofotometri (% Naftifin HCl)
1	98,38	98,94
2	98,92	100,02
3	100,32	99,38
4	100,09	99,13
5	100,24	98,62
\bar{X}_{ort} , %	99,59	99,22
SS	0,885	0,526
% BSS	0,889	0,530
Güven Aralığı (%)	99,59 ±0,77	99,22 ±0,46
Teorik Değer	100	100
t-testi (n=5, p=0,05)	0,51 ($t_{tablo} = 2,78$)	

4. TARTIŞMA

Naftifin HCl, naftifinin hidrokloroid tuz formudur, allilamin türevi topikal etkili bir antifungaldir. Naftifin HCl'nin terapötik dozlarda vücut sıvılarında çok düşük miktarlarda bulunmasından dolayı kantitatif analizi için duyarlı analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde, Naftifin HCl'nin HPLC ile analizi için sadece iki adet çalışma bulunmaktadır, spektrofotometrik kantitatif analizi için ise herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Tez kapsamında Naftifin HCl'nin ters faz HPLC ve UV-GB spektrofotometrik yöntemlerle miktar tayini analizi, yöntem optimizasyonu ve validasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Naftifin HCl'nin analizi için, spektrofotometrik yöntemle rastlanmaması nedeniyle hızlı, basit, ekonomik ve rutin kullanıma uygun bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. UV-GB spektrofotometri yöntemi ile yapılan kantitatif tayinin doğruluğu, HPLC yöntemiyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Uygulanacak yöntemlere ait çalışmalara başlamadan önce Naftifin HCl etken maddesinin saflık kontrolü için, IR spektrumu ile UV spektrumu alınmış ve erime noktası tayin edilmiştir. Elde edilen bulgular etken maddenin yeterli saflıkta olduğunu ve çalışmaların bu maddeyle yürütülebileceğini göstermiştir.

4.1. UV-GB Spektrofotometri Analizleri

Naftifin HCl'nin spektrofotometrik analizlerinde, 230 - 350 nm dalga boyları arasında tarama yapılmış ve maksimum absorbans 255 nm dalga boyunda tespit edilmiştir.

Yöntemin geçerliliğinin kanıtlanabilmesinde gerekli yöntem geçerlilik testleri için ICH parametreleri seçilmiş ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında doğrusallık, doğrusal aralık, LOD, LOQ ve doğruluk (geri kazanım) parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3).

Doğrusallık için UV-GB spektrumlarındaki absorbans değerlerinden hareketle kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Doğrusallık 6,476-32,380 µg/mL konsantrasyon aralığında, doğrusallık doğru denklemi $A=0,0671.C-0,0561$ olarak ve bu denklemin determinasyon katsayısı (R^2) 0,999 saptanmıştır (Şekil 3.3, Şekil 3.4, Çizelge 3.1). Elde edilen korelasyon katsayısının (r) 0,999 olması geliştirilen yöntem kullanılarak yapılacak analizlerde iyi sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir.

UV-GB spektrofotometrik analizlerde, Naftifin HCl etken maddesinin LOD 1,307 µg/mL, LOQ 3,959 µg/mL ve BSS %0,91 saptanmıştır (Çizelge 3.2).

Geliştirilen UV-GB spektrofotometrik yöntemin doğruluğunu değerlendirmek amacıyla % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. En düşük geri kazanım %98,7, en yüksek geri kazanım %102,62, ortalama geri kazanım %100,22 ve BSS ise %1,492 saptanmıştır (Çizelge 3.3).

Yöntemden yararlanılarak Naftifin HCl içeren Exoderil® kremde etken madde miktar tayini yapılmıştır ve bulunan BSS değerlerinin yöntemin doğruluğunu ve duyarlılığını gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.4).

Sonuç olarak Naftifin HCl etken maddesinin UV-GB spektrofotometri yöntemi ile analiz çalışmalarında, spektrofotometrik tarama 230 - 350 nm dalga boyları arasında yapılmış ve maksimum absorbans 255 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemde, Naftifin HCl için doğrusallık 6,476-32,380 µg/mL konsantrasyon aralığında, LOD 1,307 µg/mL ve LOQ ise 3,959 µg/mL olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar neticesinde, geliştirilen yöntemin hızlı, basit, ucuz ve zaman kaybına neden olmadan analizler için kullanılabilir bir yöntem olduğu gözlenmiştir.

4.2. HPLC Analizleri

Naftifin HCl'nin HPLC analizleri için ters faz sıvı kromatografisi kullanılmıştır. HPLC yöntemi ile yapılan çalışmalarda UV-GB dedektör kullanılmıştır. HPLC analizleri için; sabit faz (kolon) olarak ters faz sıvı kromatografilerinde sıkça kullanılan ve kimyasal olarak bağlı fonksiyonel gruplar içeren Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolon kullanılmıştır.

Naftifin HCl'nin HPLC yöntemiyle analizine yönelik kromatografik koşulların belirlenmesinde hareketli faz (kolon sıcaklığı, dalga boyu, akış hızı) özellikleri incelenmiştir.

Hareketli faz organik düzenleyicisi olarak asetonitril kullanılmıştır. Literatür çalışmalarından yola çıkılarak hazırlanan hareketli faz, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h) oranlarında karıştırılıp ultrasonik su banyosunda 15 dakika degaze edildikten sonra oda sıcaklığına getirilerek hazırlanmıştır. Asetonitrilin asiditesinin düşük olması birçok kimyasal maddenin analizinin kolayca gerçekleştirilmesini sağlar. Ayrıca düşük toksisiteye sahip olması asetonitrilin sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır.

Kolon sıcaklığının analize etkisini incelemek için 23 °C ve 27 °C kolon sıcaklığı test edilmiş, analizler başlangıçta kullanılan 25 °C kolon sıcaklığı ile karşılaştırılmıştır. Kolon sıcaklığı değişiminin analize önemli bir katkı sağlamadığı tespit edilmiş ve analizlere kolon sıcaklığı 25 °C olacak şekilde devam edilmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7).

Hareketli faz akış hızının analize etkisini incelemek için 1,45 mL/dk ve 1,55 mL/dk akış hızları test edilmiş, analizler başlangıçta kullanılan 1,50 mL/dk akış hızıyla karşılaştırılmıştır. Akış hızı değişiminin analize çok büyük katkı sağlamadığı tespit edilmiş ve analizlere 1,50 mL/dk akış hızıyla devam edilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10).

Dalga boyu değişiminin analize etkisini incelemek için 250 ve 258 nm dalga boyu test edilmiş, analizler başlangıçta kullanılan 254 nm dalga boyu ile karşılaştırılmıştır. Dalga boyu değişiminin analize önemli bir katkı sağlamadığı tespit edilmiş ve analizlere 254 nm dalga boyunda devam edilmiştir (Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13).

Sonuç olarak Naftifin HCl'nin HPLC analiz şartları 25 °C kolon sıcaklığı, 1,50 mL/dk akış hızı, 254 nm dalga boyu, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h) karışımı hareketli faz, Supelco C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

HPLC yönteminin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra sistem uygunluk testleri yapılmıştır. SUT parametreleri doğrultusunda yöntemin uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.6).

HPLC yönteminin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra validasyon aşamasına geçilmiştir. Yöntemin geçerliliğinin kanıtlanabilmesinde gerekli yöntem geçerlilik testleri için ICH parametreleri seçilmiş ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında seçicilik ve spesiflik, doğrusal aralık, LOD, LOQ, duyarlılık, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.7, Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Çizelge 3.10, Şekil 3.21).

Seçicilik ve spesifikklik için plasebo çözeltilisi, standart çözeltili, farmasötik preparat çözeltilisi ve çözücü olarak kullanılan metanol enjektinde edilmiş, Naftifin HCl'nin alıkonma süresince yardımcı madde ve/veya çözücüye dair girişim yapan herhangi bir madde tespit edilmemiştir. (Şekil 3.15).

Doğrusallık için dış kalibrasyon tekniği kullanılmıştır, doğrusallık 16,19–48,26 µg/mL aralığında elde edilmiştir. Naftifin HCl analizi için geliştirilen HPLC yönteminin doğrusal aralık doğru denklemi $y=239,43x+51,455$ ve bu denklemin determinasyon katsayısı (R^2) ise 0,999 olarak saptanmıştır (Şekil 3.21, Çizelge 3.7).

Naftifin HCl etken maddesinin HPLC analizinde LOD 3,703 µg/mL, LOQ 11,221 µg/mL ve BSS %1,16 saptanmıştır (Çizelge 3.8).

HPLC yönteminin doğruluğunun bulunması için geri kazanım çalışmaları yapılmış ve gerekli parametreler hesaplanmıştır. Doğruluk ve duyarlılık parametreleri %100'lük Naftifin HCl konsantrasyonunun %50, %100 ve %150'si konsantrasyonlarında (11; 22; 33 µg/mL) üçer adet örnek hazırlanıp test edilmiştir. En düşük geri kazanım %98,86, en yüksek geri kazanım %101,07, ortalama geri kazanım %98,88 ve BSS ise % 0,94 saptanmıştır (Çizelge 3.9).

Validasyon parametrelerinden kesinlik parametresi orta-kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlendirilerek incelenmiştir. Orta-kesinlik (Günler arası kesinlik) yöntem için hazırlanan standart madde çözeltilisinin üç ayrı günde altışar defa ölçümü yapılarak saptanmıştır. Tekrarlanabilirlik (Gün içi kesinlik) yöntem için hazırlanan standart madde çözeltilisinin aynı gün içerisinde ve aynı işlem koşulları altında ölçümü yapılarak saptanmıştır. Orta-kesinlik BSS'sı %0,463 ve tekrarlanabilirlik BSS'sı %0,062 bulunmuştur (Çizelge 3.10).

Ayrıca, geliştirilen yöntemde Naftifin HCl içeren Exoderil® kremde etken madde miktar tayini yapılmıştır ve bulunan BSS değerlerinin yöntemin doğruluğunu ve duyarlılığını gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.11).

Sonuç olarak Naftifin HCl etken maddesinin HPLC yöntemi ile analiz çalışmaları, Supelco C-18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm) kolonda, 25 °C sıcaklık ve 1,50 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Analiz yapılan dalga boyu 254 nm olarak belirlenmiştir ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Hareketli faz bileşimi, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h) oranlarında hazırlanmıştır. Bu koşullarda Naftifin HCl'nin alıkonma zamanı 5,445 dk olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntemde Naftifin HCl için doğrusallık 16,19 – 48,26 µg/mL aralığında, LOD 3,703 µg/mL, LOQ 11,221 µg/mL olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar neticesinde, geliştirdiğimiz yöntemin gerekli optimizasyon ve validasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve iyi bir geri kazanım, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerlerine ulaşılmıştır. Validasyon parametreleri incelendiğinde ise yöntemin doğru ve duyarlı bir yöntem olduğu görülmüştür.

Geliştirilen HPLC ve UV-GB spektrofotometri yöntemleri Naftifin HCl'nin farmasötik preparatı Exoderil® kreme uygulanmış ve her iki yöntemde elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan t-testi sonucunda yöntemler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.14).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Naftifin HCl, naftifinin hidrokloroid tuz formudur, allilamin türevidir, fungisidal ve fungistatik etkili, topikal bir antifungaldir. IR spektrumu ile UV spektrumu ve erime noktası tayini ile Naftifin HCl'nin safsızlık kontrolü yapılmış ve yeterli saflıkta olduğunu gözlenmiştir.

Bu tezin ilk kısmında Naftifin HCl analizi için bir UV-GB spektrofotometri yöntemi geliştirilmiştir. 230 - 350 nm dalga boyları arasında tarama yapılmış ve maksimum absorbans 255 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Yöntemin geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Validasyon çalışmalarında doğruluk, doğrusal aralık, LOD, LOQ ve doğruluk (geri kazanım) parametreleri incelenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

UV-GB spektrofotometrik analizlerde, Naftifin HCl için doğruluk 6,476-32,380 µg/mL konsantrasyon aralığında, doğruluk doğru denklemi $A=0,0671.C-0,0561$ olarak ve bu denklemin determinasyon katsayısı (R^2) 0,999 saptanmıştır. UV-GB spektrofotometrik analizlerde, Naftifin HCl için LOD 1,307 µg/mL, LOQ 3,959 µg/mL ve BSS % 0,91 saptanmıştır. Geliştirilen UV-GB spektrofotometrik yöntemin doğruluğunu değerlendirmek amacıyla yapılan analizlerde en düşük geri kazanım %98,7, en yüksek geri kazanım %102,62, ortalama geri kazanım %100,22 ve BSS ise %1,492 saptanmıştır. Ayrıca geliştirilen UV-GB spektrofotometrik yöntemle Exoderil® kremde Naftifin HCl etken madde miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde, geliştirdiğimiz UV-GB spektrofotometri yönteminin Naftifin HCl analizleri için hızlı, basit, ucuz ve zaman kaybına neden olmadan kullanılabilir bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında Naftifin HCl analizi için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. HPLC analizlerinde UV-GB dedektörlü ters faz sıvı kromatografisi kullanılmıştır. HPLC yöntemine yönelik kromatografik koşulların belirlenmesinde hareketli faz (kolon sıcaklığı, dalga boyu, akış hızının etkileri) özellikleri

incelenmiştir. HPLC yöntemi için en uygun kromatografik koşullar; 25 °C kolon sıcaklığı, 1,50 mL/dk akış hızı, 254 nm dalga boyu, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h) karışımı hareketli faz, C-18 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm) kolonu ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen HPLC yönteminin sistem uygunluk testleri yapılmış ve elde edilen SUT parametreleri doğrultusunda yöntemin uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir. HPLC yönteminin geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Validasyon çalışmalarında seçicilik ve spesifiklik, doğrusallık, doğrusal aralık, LOD, LOQ, duyarlılık, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Naftifin HCl'nin alıkonma süresince yardımcı madde ve/veya çözücüye dair girişim yapan herhangi bir madde tespit edilmemiştir. Doğrusallık 16,19 – 48,26 µg/mL aralığında, doğrusal aralık doğru denklemi $y=239,43x+51,455$ ve bu denklemin determinasyon katsayısı (R^2) 0,999 saptanmıştır. LOD 3,703 µg/mL, LOQ 11,221 µg/mL ve BSS %1,16 saptanmıştır. Doğruluk ve duyarlılık değerlendirmesinde en düşük geri kazanım %98,86, en yüksek geri kazanım %101,07, ortalama geri kazanım %99,88 ve BSS %0,94 saptanmıştır. Kesinlik; orta-kesinlik ve tekrarlanabilirlik değerlendirilerek incelenmiş, orta-kesinlik BSS'sı %0,463 ve tekrarlanabilirlik BSS'sı %0,062 bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen HPLC yöntemi ile Exoderil® kremde Naftifin HCl etken madde miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde, geliştirdiğimiz HPLC yönteminin Naftifin HCl analizleri için seçici ve duyarlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan t-test sonucunda, farmasötik preparat analizleri için, geliştirilen yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Naftifin HCl analizi için kabul edilmiş resmi farmakope yöntemi normal faz HPLC olup mobil faz içeriğinde kanserojen ve kokulu bir kimyasal olan n-hekzan kullanılmaktadır. Normal faz kromatografi yönteminde nonpolar çözücülerden polar çözücülere arada farklı kimyasallar kullanılarak kademeli geçişler yapılması zaman kaybına neden olmaktadır. Tez çalışmamızda geliştirilen yöntemin ters faz HPLC olması ayrı bir üstünlüktür, analizlerde zamandan tasarruf edilmiştir. Geliştirilen yöntemde kalite kontrol laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan ve bulunması kolay olan C-18 kolonunun kullanılmıştır. Mobil faz olarak ise n-hekzan yerine kanserojen olmayan kolay elde edilebilen asetonitril kullanılmış ve böylece basit, kolay, hızlı sonuç elde edilebilir bir yöntem geliştirilirken kanserojen madde maruziyetinden kaçınılmıştır.

Naftifin için spektrofotometri yöntemi ile yapılmış kalitatif ya da kantitatif analiz olmadığı için geliştirilen analiz yöntemi orijinal bir yöntem olup miktar tayini için oldukça önemlidir. Geliştirilen yöntemlerde düşük miktarda madde kullanılmış ve analiz kısa sürede tamamlanmıştır. Geliştirilen her iki yöntemin de kalite kontrol laboratuvarlarında rahatlıkla uygulanabilir yöntem olduğu kararına varılmıştır.

ÖZET

Antifungal Etkili Naftifin Hidroklorür'ün Spektrofotometrik ve HPLC Yöntemleriyle Kantitatif Analizi

Bu tez kapsamında antifungal etkili Naftifin HCl'nin analitik incelenmesinde kromatografi ve spektrofotometri analiz yöntemleri geliştirilmiştir. IR spektrumu, UV spektrumu ve erime noktası tayini ile Naftifin HCl'nin safsızlık kontrolü yapılarak yeterli saflıkta olduğu gözlenmiştir.

UV-GB spektrofotometrede 230 - 350 nm dalga boyları arasında tarama yapılarak maksimum absorbans 255 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Doğrusallık, doğrusal aralık, LOD, LOQ ve doğruluk (geri kazanım) parametreleri incelenerek geliştirilen spektrofotometri yöntemi valide edildi. Spektrofotometri yönteminde doğrusal regresyon kalibrasyon eğrisi 6,476-32,380 µg/mL Naftifin HCl konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu saptanmıştır. Doğrusal regresyon denklemi $A=0,0671.C-0,0561$, determinasyon katsayısı (R^2) 0,999, LOD 1,307 µg/mL ve LOQ 3,959 µg/mL saptanmıştır. Doğruluk ve duyarlılık değerlendirmesinde en düşük geri kazanım %98,7, en yüksek geri kazanım %102,62, ortalama geri kazanım %100,22 ve BSS ise %1,492 saptanmıştır.

HPLC analizleri UV-GB dedektörlü ters faz sıvı kromatografisi kullanılarak yapılmıştır. Optimal kromatografik koşullar; 25 °C kolon sıcaklığı, 1,50 mL/dk akış hızı, 254 nm dalga boyu, Asetonitril:Su:Trietilamin (800:200:0,2; h/h/h) karışımı hareketli faz, Supelco C-18 (5 µm, 15 cm x 4,6 mm) kolonu ve 10 µL enjeksiyon hacmi olarak belirlendi. Alıkonma zamanı, kapasite faktörü, kolon etkinliği, kuyruklanma faktörü ve pik asimetrisi parametreleri incelenerek sistem uygunluk testleri yapıldı. Seçicilik ve spesifiklik, doğrusallık, doğrusal aralık, LOD, LOQ, duyarlılık, doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik parametreleri incelenerek geliştirilen HPLC yöntemi valide edildi. HPLC yönteminde doğrusal regresyon kalibrasyon eğrisi 16,19 – 48,26 µg/mL Naftifin HCl konsantrasyon aralığında doğrusaldı. Doğrusal regresyon denklemi $y=239,43x+51,455$, determinasyon katsayısı (R^2) 0,999, LOD 3,703 µg/mL, ve LOQ 11,221 µg/mL saptandı. Doğruluk ve duyarlılık değerlendirmesinde en düşük geri kazanım % 98,86, en yüksek geri kazanım %101,07, ortalama geri kazanım %99,88 ve BSS ise %0,94 saptanmıştır. Kesinlik değerlendirmesinde orta-kesinlik BSS %0,463 ve tekrarlanabilirlik BSS %0,062 saptanmıştır.

Geliştirilen HPLC ve UV-GB spektrofotometre yöntemleriyle Exoderil® kremde Naftifin HCl etken madde miktar tayini yapılmıştır. Yüksek orandaki geri kazanım, yöntemlerin ilaç formülasyonunda bulunan katkı maddelerinden ve yardımcı maddelerden etkilenmediğini ve geliştirilen yöntemlerin geçerli ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Geliştirilen ve valide edilen yöntemler etken madde ve farmasötik preparatta Naftifin HCl miktar tayininde başarılı olmuştur. Naftifin HCl etken maddesinin ters faz HPLC ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak miktar tayini analizi yönünde çalışma bulunmaması nedeniyle geliştirilen yöntemler orijinaldir. Ayrıca geliştirilen bu yöntemler basit, ekonomik ve zaman kaybına neden olmadığı için kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Antifungal, HPLC, Kantitatif Analiz, Naftifin HCl, UV-GB Spektrofotometri, Validasyon.

SUMMARY

Quantitative Analysis of Antifungal Naftifine Hydrochloride by Spectrophotometric and HPLC Methods.

With the scope of this thesis, chromatography and spectrophotometry analysis methods have been developed for analytical investigation of antifungal Naftifine HCl. IR spectrum, UV spectrum and melting point were determined and it was observed that naftifine HCl was of sufficient purity.

The maximum absorbance was measured at 255 nm wavelength by UV-Vis spectrophotometry scanning at 230 - 350 nm. The developed spectrophotometry method has been validated by examining linearity, linear range, LOD, LOQ and accuracy (recovery). At spectrophotometry method, linear regression calibrations curve was linear 6,476-32,380 µg/mL Naftifine HCl concentration range. The linear regression equation was $A=0,0671.C-0,0561$, the determination coefficient (R^2) was 0.999, the LOD was 1,307 µg / mL, and the LOQ was 3,959 µg / mL. In the accuracy and sensitivity evaluation, the lowest recovery was 98.7%, the highest recovery was 102.62%, the average recovery was 100.22% and the BSS was 1.492%.

HPLC analyzes were performed using reverse phase liquid chromatography with UV-Vis detector. Optimal chromatographic conditions were determined as 25 °C column temperature, 1.50 mL / min flow rate, 254 nm wavelength, Acetonitrile: Water: Triethylamine (800: 200: 0.2; v / v / v) mixed mobile phase, Supelco C-18 (5 µm, 15 cm x 4.6 mm) column and 10 µL injection volume. System compatibility tests (retention time, capacity factor, column efficiency, tailing factor and peak asymmetry) were performed. The developed HPLC method has been validated by examining selectivity and specificity, linearity, linear range, LOD, LOQ, sensitivity, accuracy (recovery) and precision. At HPLC method, linear regression calibrations curve was linear at 16,19 – 48,26 µg/mL Naftifine HCl concentration range. The linear regression equation was $y=239,43x+51.455$, the determination coefficient (R^2) was 0.999, the LOD was 3.703 µg / mL, and the LOQ was 11.221 µg / mL. In the accuracy and sensitivity evaluation, the lowest recovery was 98.86%, the highest recovery was 101.07%, the average recovery was 99.88% and the BSS was 0.940%. In the precision evaluation, the medium-precision BSS was 0.463% and the repeatability BSS was 0.062%.

Quantification analysis of Naftifin HCl was performed in Exoderil[®] cream with the developed HPLC and UV-Vis spectrophotometry methods. The high rate of recovery showed that the methods were not affected by the additives and excipients contained in the drug formulation and that the methods were valid and feasible.

The developed and validated methods were succesful in finding the quantity of Naftifine HCl in the pharmaceutical products and active ingredient. The methods developed are original, since there is no study for the quantitation analysis of the active substance of naftifine HCl using reverse phase HPLC and spectrophotometric methods. In addition, these developed methods can be used in quality control laboratories as they are simple, economical and do not waste time.

Keywords: Antifungal, HPLC, Naftifine HCl, Quantitative Analysis, UV-GB Spectrophotometry, Validation.

KAYNAKLAR

- ADAMOVIĆ S J (1997). Chromatographic analysis of pharmaceuticals, 2nd Ed.. Revised and Expanded Vol 74, New York, Marcel Dekker.
- BERNEY D, SCHUH K (1978). Heterocyclic spiro-naphthalenones. Part I: Synthesis and reactions of some Spiro [(1H-naphthalenone)-1,3',-piperidines]. *Helv Chim Acta*, 61: 1262-73.
- BIDLINGMEYER BA (1992). Practical HPLC Methodology and Applications. John Wiley & Sons Inc, USA.
- ERDİK E, OBALI M, YÜKSEKİŞİK N, ÖKTEMER A, PEKEL T (2001). Denel Organik Kimya, 4. Baskı. Bölüm D.
- GEORGOPOULOS A, PETRANYI G, MIETH H, DREWS J (1981). In vitro activity of naftifine, a new antifungal agent. *Antimicrob Agents Chemother*, 19: 386-389.
- GUPTA AK, RYDER JE, AND COOPER EA (2008). Naftifine: A Review. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, Vol 12, No 2, p.:51–58.
- GÜNDÜZ T (2002). İnrümentel Analiz, 6. Baskı. Gazi Kitabevi.
- HAMILTON RJ, SEWEL PA (1982). Introduction to HPLC, 2nd Ed.. Chapman and Hall, New York; p.:1-160.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) (2005a). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Genova, Q2A (R1).
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) (2005b). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Genova, Q2B (R1).
- JUNG EG (1987). The anti-inflammatory efficacy of naftifine as evaluated from the erythema response to ultraviolet light. *Mykosen*, 30 (suppl 1): 88–91.
- KAYAALP SO (2002). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı, s.:301-309.
- MUHLBACHER JM (1991). Naftifine: a topical allylamine antifungal agent. *Clin Dermatol*, 9: 479–85.
- PETRANYI G, RYDER NS, STUTZ A (1984). Allylamine derivatives: new class synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. *Science*, 224: 1239-1241.

RX MEDIA PHARMA® (2020). İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.

SCHATZ F, HABERL H (1986). Analytical methods for the determination of naftifine and its metabolites in human plasma and urine. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.*, 36 (12): 1850-1853.

SCOTT RPW (1996). Chromatographic Detectors. *Chromatographic Science Series*. Volume 73.

SEWELL PA, CLARKE B, KEALEY D (1987). Chromatographic Separations. John Wiley & Sons Inc, London, UK, p.:13-80.

SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA (1998). Enstrümantal Analiz İlkeleri, 5. Baskı (KILIÇ E., KÖSEOĞLU F., YILMAZ H. Çeviri). Bilim Yayıncılık.

SKOOG DA, LEARY JJ (1992). Principles of Instrumental Analysis, 4th Ed.. Harcourt Brace College Publishers, New York; p.:22-27.

STIITGEN G (1987). Biopharmaceutical aspects of topically applied antifungal treatment. *Mykosen*, 30 (suppl 1): 7-14.

TRONNIER H (1987). Inflammatory dermatomycoses-comparative study of naftifine and a combination of a corticosteroid and an imidazole derivative. *Mykosen*, 30 (suppl 1): 78-87.

TUNALI NK, ÖZKAR S (2011). Anorganik Kimya, 8. Baskı. Gazi Kitabevi, s.:3-96.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 36 (2013). Official Monographs, p.:4436-4437.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 40 (2017). Chapter 621.

UZQUEDA M, MARTIN C, ZORNOZA A, SANCHEZ M, MARTINEZ-OHARRIZ MC, VELAZ I (2006). Characterization of complexes between naftifine and cyclodextrins in solution and in the solid state. *Pharm Res*, 23: 980-8.