

31606

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTUSU

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

TRIAZOL HALKASI İÇEREN ANTİFUNGAL İLAÇLARDA

MIKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz.Fatmagül SELÇUK

Tez Yöneticisi

Doç.Dr.Okan ATAY

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ANKARA - 1993

Yüksek lisans öğrenimim döneminde bana katkıları olan Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Ningur Noyanalpan ve bölümdeki tüm öğretim üyelerine,

Yüksek lisans tez çalışmam süresince her konuda büyük yardım ve desteğini gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç.Dr.Okan Atay'a teşekkürlerimi sunarım.

I C İ N D E K İ L E R

Sayfa No

I. GİRİŞ VE AMAC	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. MANTARLAR	3
II.2. MANTAR HASTALIKLARINDA İNFEKSİYON TİPLERİ	4
II.2.1. Mikozis	4
II.2.2. Mikotoksikozis	4
II.2.1.1. Lokal Mantar İnfeksiyonları	4
II.2.1.1.1. Dermatofitik Mantar İnfeksiyonları	4
II.2.1.1.2. Mükokütanoz Mantar İnfeksiyonları	5
II.2.1.2. Sistemik Mantar İnfeksiyonları	5
II.3. MANTAR VE BAKTERİ İNFEKSİYONLARININ KARŞILAŞ- TIRILMASI	6
II.4. MANTAR İNFEKSİYONLARINDA KULLANILAN İLAÇLAR	6
II.4.1. Antifungal Tedavide Kullanılan Antibiyotikler	6
II.4.1.1. Amfoterisin-B Sulfat	6
II.4.1.2. Griseofulvin	7
II.4.1.3. Nistatin	8
II.4.1.4. Natamisin (Pimarisin)	8
II.4.2. Lokal Kullanılan Antifungal İlaçlar	8
II.4.2.1. Uzun Zincirli Karboksilli Asitler	8
II.4.2.2. Salisilik Asit Türevleri	9
II.4.2.3. Tiokarbamik Asit Türevleri	9
II.4.2.4. İyod	9
II.4.2.5. Halprogin	9

II.4.2.6. Naftifin	10
II.4.3. Sistemik Kullanılan Antifungal İlaçlar	10
II.4.3.1. Potasyum İyodür	10
II.4.3.2. Flusitosin (5-florositosin)	10
II.4.3.3. İmidazol Türevleri	11
II.4.3.4. Triazol Türevleri	12
II.4.4. Antifungal İlaçların Etki Mekanizmaları	12
II.4.4.1. Keratolitik Etki	13
II.4.4.2. Protein denaturasyonu	13
II.4.4.3. Enzim İnhibisyonu	14
II.4.4.4. Mitozis'in İnhibe Edilmesi	15
II.4.4.5. Hücre Membranının Değiştirilmesi	15
II.4.4.6. Nukleik Asid ve Protein Yapımının Engellenmesi	16
II.4.5. Flukonazol ile İlgili Genel Bilgiler	16
II.4.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikler	16
II.4.5.2. Farmakolojisi ve Farmakokinetiği	17
II.4.6. İtrakonazol ile İlgili Genel Bilgiler	21
II.4.6.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	21
II.4.6.2. Farmakolojisi ve Farmakokinetiği	21
I. ANALİTİK YÖNTEMLERLE İLGİLİ LİTERATURLER	23
. MATERYAL VE YÖNTEM	27
IV.1. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER	27
IV.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	27
IV.3. KULLANILAN REAKTİFLER	28

IV.3.1. Dragendorff Çözeltisi	28
IV.3.2. Gümüş Nitrat Çözeltisi (0.01 M)	28
IV.3.3. Potasyum iodoplatinat Çözeltisi	28
IV.4. KULLANILAN STANDART MADDELER	28
IV.5. INCE TABAKA KROMATOĞRAFISI (İ.T.K) ÇALIŞMALARI	29
IV.5.1. Nitel Çalışmalar	29
IV.5.2. İTK Yöntemi ile Saptanacak En Düşük Konsantrasyonun Bulunması	30
IV.5.3. Nicel Çalışmalar (Dansitometrik Çalışmalar)	30
IV.5.3.1. Flukonazol'Un Dansitometrik Yöntemle Maksimum Absorbsiyon Noktasının Saptanması	31
IV.5.3.2. Flukonazol Nicel Tayini İçin Regresyon Çalışmaları	31
IV.5.3.3. Numunelerin Hazırlanması	32
IV.5.3.3.1. Kapsül Numuneleri	32
IV.5.3.3.2. Şurup Numuneleri	32
IV.5.3.4. İtrakonazol'Un Maksimum Absorbsiyon Noktasının Saptanması	32
IV.5.3.5. İtrakonazol Nicel tayini İçin Regresyon Çalışmaları	33
IV.5.3.6. Numunelerin Hazırlanması	33
IV.6. YUKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFISI (Y.B.S.K) İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	33
IV.6.1. Nitel Çalışmalar	34
IV.6.2. Nicel Çalışmalar	35
IV.6.2.1. Flukonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları	35
IV.6.2.2. Numunelerin Hazırlanması	35

IV.6.2.2.1. Kapsül Numuneleri	35
IV.6.2.2.2. Intravenöz İnfüzyon Çözelti Numuneleri..	36
IV.6.2.2.3. Surup Numuneleri	36
IV.6.2.3. Itrakonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları	36
IV.6.2.4. Numunelerin Hazırlanması	37
IV.7. UV SAHADA YAPILAN NİCEL ÇALIŞMALAR	37
IV.7.1. Flukonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları	38
IV.7.1.1. 0.1 N HCl'de Yapılan Çalışmalar	38
IV.7.1.2. Metanolde Yapılan Çalışmalar	38
IV.7.2. Numunelerin Hazırlanması	38
IV.7.2.1. Kapsül Numuneleri	38
IV.7.2.2. Intravenöz İnfüzyon Çözelti Numuneleri ...	39
IV.7.3. Itrakonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları	39
IV.7.3.1. 0.1 N HCl'de Yapılan Çalışmalar	39
IV.7.3.2. Metanolde Yapılan Çalışmalar	40
IV.7.4. Numunelerin hazırlanması	40
IV.8. IR SPEKTROSKOPİSİ YÖNTEMİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR ...	41
IV.8.1. IR Spektroskopisi Yöntemi ile Flukonazol'Un Miktar Tayini Çalışmaları	44
IV.8.1.1. Standart Çözeltiler	44
IV.8.1.2. KBr Tabletlerinin Hazırlanması	44
IV.8.1.3. Numunelerin Hazırlanması	45
IV.9. SUSUZ ORTAMDA POTANSİYOMETRİK TİTRASYON YÖNTEMİ İLE FLUKONAZOL MİKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARI	45

IV.9.1. 0.1 N Perklorik Asit'in Hazırlanması	45
IV.9.2. Numunelerin Hazırlanması	45
V. BULGULAR	47
VI. TARTIŞMA VE SONUÇ	83
II. ÖZET	92
II. SUMMARY	95
IX. KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	102



SEKİLLERİN LİSTESİ

Sekil No

Sayfa No

- 1: Flukonazol'Un (İTK) dansitometrik yöntemle elde edilen UV spektrumu 48
- 2: Itrakonazol'Un (İTK) dansitometrik yöntemle elde edilen UV spektrumu 48
- 3: Triazol ve imidazol türevi antifungal ilaçların YBSK kromatogramları 49
- 4: YBSK Kromatogramları (Flukonazol Kapsül, Itrakonazol Kapsül) 50
- 5: YBSK Kromatogramları (Flukonazol Kapsül, IV İnfüzyon) 51
- 6: Flukonazol'Un 0.1 N HCl'de UV spektrumu 52
- 7: Itrakonazol'Un 0.1 N HCl'de UV spektrumu 52
- 8: Flukonazol'Un metanol'de UV spektrumu 53
- 9: Itrakonazol'Un metanol'de UV spektrumu 53
- 10: Flukonazol'Un IR spektrumu 54
- 11: Itrakonazol'Un IR spektrumu 54
- 12: Flukonazol'Un ve dehidrokolik asid'in (Int.St.) Üst Üste alınmış IR spektrumu 55
- 13: Itrakonazol'Un ve dehidrokolik asid'in (Int.St.) Üst Üste alınmış IR spektrumu 55
- 14: Flukonazol kapsül örneklerinde potansiyometrik yöntem ile elde edilen titrasyon eğrileri 56

TABLolarIN LİSTESİ

Tablo No

Sayfa No

- 1: Mantar infeksiyonları, infeksiyon etkenleri, görüldüğü organlar ve kullanılan ilaçlar 57
- 2: I.T.K.'da kullanılan hareketli faz sistemleri 58
- 3: İmidazol ve triazol türevi antifungal ilaçların İTK yöntemi ile saptanan Rfx100 değerleri 59
- 4: İmidazol ve triazol türevi antifungal ilaçların İTK yönteminde değişik reaktiflerle verdiği renkler 60
- 5: İTK yöntemi ile saptanan en düşük konsantrasyon düzeyleri 61
- 6: Flukonazol için dansitometrik yöntem ile elde edilen regresyon değerleri 62
- 7: İtrakonazol için dansitometrik yöntem ile elde edilen regresyon değerleri 62
- 8: Flukonazol kapsül örneklerinden dansitometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar 63
- 9: Flukonazol şurup örneklerinden dansitometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar 64
- 10: İtrakonazol kapsül örneklerinden dansitometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar 65
- 11: Flukonazol için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemi ile bulunan regresyon değerleri 66
- 12: İtrakonazol için YBSK yöntemi ile bulunan regresyon değerleri 66
- 13: Flukonazol kapsül örneklerinden YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar 67
- 14: Flukonazol intravenöz infüzyon çözelti örneklerinden YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar 68
- 15: Flukonazol şurup örneklerinden YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar 69

16: Itrakonazol kapsül örneklerinden YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar	70
17: Flukonazol'Un UV-spektroskopik yöntemle bulunan regresyon değerleri	71
18: Itrakonazol'Un UV-spektroskopik yöntemle bulunan regresyon değerleri	71
19: Flukonazol kapsül örneklerinden UV-Spektroskopik yöntem ile elde edilen sonuçlar	72
20: Flukonazol intravenöz infüzyon örneklerinden UV-Spektroskopik yöntem ile elde edilen sonuçlar ..	73
21: Itrakonazol kapsül örneklerinden UV-Spektroskopik yöntem ile elde edilen sonuçlar	74
22: IR spektroskopisi yöntemi ile flukonazol - dehidrokolik asid absorpsiyon ölçüm değerleri	75
23: Flukonazol'Un IR spektroskopisi yöntemi ile bulunan regresyon değerleri	76
24: Flukonazol Kapsül örneklerinden IR Spektroskopisi yöntemi ile elde edilen sonuçlar (675 cm^{-1})	77
25: Flukonazol Kapsül örneklerinden IR Spektroskopisi yöntemi ile elde edilen sonuçlar (960 cm^{-1})	78
26: Flukonazol kapsül örneklerinden Potansiyometrik titrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar	79
27: Uygulanan yöntemlerle elde edilen sonuçların istatistiksel verileri	80
28: Student-t (ortalamalar arası fark) testine göre yöntemlerin karşılaştırılması	81
29: Yöntemlerin duyarlılık açısından varyans analizi ile kıyaslanması	82

I. G I R I S V E A M A C

Bilindiği gibi ilaç birey ve toplum sağlığının sağlanması vazgeçilmez yeri olan bir sanayi UrUnUdur. Sağlık alanında yapılan her tUrlU yatırım, harcama ve insan guCu sonuçta kişinin mental ve fiziksel iyiliğini sağlamak amacı ile yapılmaktadır.

Bu amacın gerçekleştirilmesinde son ve en önemli aşama ilaçtır. Bu nedenle ilacın belirli bir kalite guvence-sine sahip olması gerekmektedir. Tedaviye sunulan ilaçların taşması gerekli kalite normlarının sağlanması, birinci dere-ce Ureticisinin sorumluluğuyla olmakla birlikte, kamu oto-ritesinde bu guvenceyi garanti altına almak ve devamlı-lığını sağlamak gibi önemli bir gurevi vardır.

Farmasötik Kimyanın kapsamı içinde ilaç analizle-rinin önemli yeri vardır. Ilacın molekUler tasarımı, fonksi-yonel grup-reseptör ilişkileri, yapısal modifikasyon ile ilaçların etki, yan etki, toksisite ve bazı fiziksel özelliklerinin azaltılması veya artırılması ve sentezinin yanı sıra etken maddelerin ve değişik farmasötik biçimde tedaviye sunulan ilaçların nitel ve nicel tayinlerini yaparak onların kalite normlarına uygunluğuunu saptamak, böylece kalite guvencesinin sağlanmasına yardımcı olmakta Farmasötik Kimyanın önemli bir uğraşı alanıdır.

Bilindiği gibi farmakopeler ilaçların fiziksel kimyasal ve biyolojik özelliklerini ve taşımaları gereken kalite kriterlerini içeren resmi nitelikte kitaplardır. Gelişmiş ülkelerin farmakopeleri her beş senede bir yenilenmekte, ara yıllarda ise ek (supleman) yayınlanmaktadır. Ülkemizde halen yürürlükte olan ve ondokuz yıl önce ıkarılan 1974 Türk Farmakopesinin gerek içerdiği monografiler gerekse önerdiği yöntemler açısından mevcut gelişmeleri karşılaması mümkün değildir. Bu nedenle tedaviye yeni giren pek çok ilacın kantitatif değerlerdirilmesinde kullanılmak için analiz yöntemleri geliştirilmektedir.

Çalışmamıza konu olan flukonazol ve itrakonazol hiç bir farmakopede yer almamaktadır. Yaptığımız literatür incelemelerinde de anılan etken maddeleri içeren müstahzarlarla ilgili nicel çalışmalara rastlanmamıştır. Bu görüş ve tespitlerin ışığı altında son yıllarda sistemik mantar infeksiyonlarında ve özellikle vaginal kandidiazisde önemli bir tedavi alternatifini oluşturan N-substitue triazol grubu antifungal ilaçlardan flukonazol ve itrakonazolun nitel ve nicel değerlendirmelerini yaparak bu konu ile ilgilenen kişi ve kuruluşlara yardımcı olmak çalışmamızın amacını teşkil etmiştir.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. MANTARLAR

Mantarlar klorofil taşımayan basit yapılı organizmalardır. Bugüne kadar yaklaşık 110.000'den fazla mantar izole edilmiştir. Klorofil içermedikleri için alglerden, çok hücreli ve büyük olmaları nedeni ile bakterilerden farklıdır. Mantar hücresi çok basit olarak bir çekirdek ve hücre muhtevasını çevreleyen bir membrandan oluşur. Bu membran kitin veya selülozdan meydana gelmiştir. Mantarlar yaşamları için gerekli enerjiyi, bakteriler gibi organik maddelerin biyotransformasyonu ile sağlarlar. Mantarlar eşeyli (seksüel) veya eşeysiz (aseksüel) tarzda çoğalırlar¹⁻⁵. Mantarların büyük bir çoğunluğu bitki ve hayvanlarda doğal olarak bulunur ve hastalık oluşturmazlar. Mevcut mantar türlerinden pek azı insanlar için patojen bulunmuştur.

Human patojen dediğimiz insanlarda ve hayvanlarda hastalık yapan mantarların yanı sıra pek çok mantar türü insan yaşamına pek çok yönü ile olumlu katkıda bulunur. Peynir mayalanmasında, bazı organik asitlerin elde edilmesinde (formik,asetik, gallik,laktik asit), gliserol,mannitol gibi maddelerin ve bakterisid, fungusid amaçla kullanılan antibiyotiklerin elde edilmesinde mantarlar gerek hareket maddesi gerekse proses hızlandırıcısı olarak yararlandığımız mikroorganizmalardır^{2,3}.

II.2. MANTAR HASTALIKLARINDA INFEKSIYON TIPLERİ

Mantarlar insanlarda iki farklı biçimde infeksiyon oluşturlar.

II.2.1. Mikozis: Mantarın kendisinin oluşturduğu infeksiyonlar (Dermatomikozis, Blastomikozis Histoplasmozis v.b.).

II.2.2. Mikotoksikozis: Mantarın salgıladığı toksinlerle oluşan infeksiyonlar (Aflatoksikozis v.b.).

İnsanlarda hastalık yapan mantar infeksiyonları çoğunlukla mikozis tipi biçimdedir. Genelde mikozisler iki grupta incelenir.

II.2.1.1. Lokal Mantar Infeksiyonları

Dermatofitik ve mukokutanöz mantar infeksiyonları biçiminde gözlenirler.

II.2.1.1.1. Dermatofitik Mantar Infeksiyonları

Dermatofitik mantar infeksiyonları çok sık görülür ve daha ziyade cilt, saç, kıl ve tırnak yatağında yerleşir. Cildin stratum corneum'unu tutar. Epidermofiton, trikofiton ve değişik mikosporium türleri tarafından oluşturulurlar. Genelde lokal etkili antifungal ilaçlara cevap verirler. İlaçlara karşı belirli bir rezistans oluşması ve infeksiyon etkeninin tırnak yatağı, kıl ve saç diplerine yerleşmesi durumunda tedaviye sistemik etkili ilaçların katılması gerekir^{3,4}.

II.2.1.1.2. Mukokütanoz Mantar Enfeksiyonları

Daha ziyade immün sistemi yeterli olmayan ve nötroopenik hastalarda, uzun süre geniş spektrumlu antibiyotik ve glukokortikoid tedavi gören kişilerde sıklıkla görülür. Bu tür mikozların büyük bir kısmının oluşumunda kandida türleri rol oynar. Bu mantar türleri özellikle vücudun nemli kalma olasılığı fazla olan bölgelerini seçerler (parmak araları, kasık, ağız boşluğu, anüs ve vulvovaginal bölge). Özellikle immün yetmezliği olan hastalarda (AIDS'lilerde) en sık görülen tipi orofarengenal kandidiazisdir. Seyrekte olsa kronik mukokütanoz kandidiazis biçiminde gözlenir. Bu tipi ilaçla tedaviye en az cevap veren biçimdir¹⁻⁴.

II.2.1.2. Sistemik Mantar Enfeksiyonları

Bu tip enfeksiyonlar yerleşme alanına göre derin ve ciltaltı enfeksiyonları olarak iki grupta incelenebilir. Çoğunlukla immün yetersizliği olan kişilerde gözlenir. Derin sistemik mikozlar arasında sıklıkla rastlananları blastomikozis, kandidiazis, aspergillozis, histoplazmozis, koksidioidomikozis, kriptokokozis tipleridir. Hipodermik enfeksiyonlar arasında ise en sık görülenleri sporotrikozis, kromikozisdir. Sistemik mantar enfeksiyonları dalak, akciğer, beyin zarı, eklem gibi organlarda görülürler. Bu enfeksiyonlar blüme neden olabilir. Mantar enfeksiyonlarının tipleri, etkenleri enfeksiyonun görüldüğü organlar ve potent olarak kullanılan ilaçlar Tablo-1'de topluca verilmiştir³.

II.3. MANTAR VE BAKTERİ İNFEKSİYONLARININ KARSILAŞTIRILMASI

Mantar infeksiyonları bazı genel özellikleri ile bakteri infeksiyonlarından farklılık gösterirler. Bunların başlıcaları şunlardır.

Semptomların azalması ve tam iyilik hali bazen aylar sürer. İnfeksiyonun tekrarlama şansı bakteri infeksiyonlarına göre daha yüksektir. Cilt ve mukozanın yüzeysel infeksiyonları ilaçla tedaviye olumlu yanıt verirler. Fakat derin sistemik infeksiyonlarda mikozun cinsine göre ilaçla tedavinin şansı farklı ve sınırlıdır. Sistemik vakalarda kullanılan ilaçların toksisiteleri bakteri infeksiyonlarında kullanılanlardan daha yüksektir. Bunun nedeni mantar hücrelerinin, bakteri hücresinin aksine memeli hücreleri gibi ökaryotik olmalarıdır. Dolayısı ile kullanılan ilaçların mantar ve memeli hücreler arasındaki seçiciliği düşüktür. Bu durum ise dozlamayı ve kullanma süresini kısıtlar¹⁻⁴.

II.4. MANTAR İNFEKSİYONLARINDA KULLANILAN İLAÇLAR

II.4.1. Antifungal Tedavide Kullanılan Antibiyotikler

Lokal ve sistemik mantar infeksiyonlarında kullanılırlar. Antibakteriyel etkileri çok zayıf veya hiç yoktur. Doğrudan antifungal etki gösterirler. İçinde en çok kullanılanları amfoterisin B-sülfat, griseofulvin, nistatin ve nata-misindir.

II.4.1.1. Amfoterisin-B Sülfat

Streptomyces nodosus'dan izole edilmiştir. Heptaen yapısındadır. Yapısındaki aminometil pentoz grubundan dola-

yı bazik özellik gösterir. Antifungal etkisini mantar hücre membranında bulunan sterol yapısının sentezini bozarak yapar. Amfoterisin B-sülfatın antibakteriyel etki göstermemesi bakteri hücre membranında sterol yapısının bulunmaması ile açıklanmaktadır. Intravenöz kullanılan tek antifungal antibiyotiktir. Bunun yanı sıra % 3'lük krem ve losyonları cilt ve mukoza infeksiyonlarında kullanılır. Özellikle flusitosin ile kombine biçimde derin cilt infeksiyonlarında etkilidir^{1-7.8.12.}

II.4.1.2. Griseofulvin

Penicillium griseofulvum'dan izole edilmiştir. Dermatofit mantarların yaptığı yüzeysel infeksiyonlara karşı kullanılır. Özellikle saçlı deri, sakal, kıl ve tırnak yatağını tutan el ve ayak parmak aralarında gözüken dermatofitozlara etkilidir. *Candida* türlerine etkisi zayıftır. Oral yoldan kullanılır. Mide barsak kanalından absorbe edilir. En yüksek plazma düzeyine 6 saat sonra ulaşılır. İlacın biyoyararlanımı açısından partikül büyüklüğü önem taşır. Tedavide partikül büyüklüğü 1-5 mikron olan griseofulvin kullanılır. Tedavi uzun sürer. Etkin sonuç 4-6 ay kullanımdan sonra elde edilir. Yan etki olarak gastrointestinal bozukluklar, alerjik dermatit, kemik iliği depresyonu ve işitme kaybı yapabilir. Barbituratlarla kullanıldığında absorpsiyonun azaldığı bildirilmiştir. Mikrozomal enzim induksiyonu yaptığı için oral antikoagulan ilaçların etkisini azaltır. Deney hayvanlarında teratojenik etki gözlemlendiğinden hamilelikte kullanılmamalıdır^{1-4.8.9.}

II.4.1.3. Nistatin

Streptomyces noursei'den izole edilmiştir. Tetraen yapısındadır. Maya mantarlarına karşı etkilidir. Kandida infeksiyonlarında başarı ile kullanılır. Cilt ve vulvovaginal kandidiazis'de g/100000 U.I g/500000 U.I nistatin içeren pomat ve vaginal tabletler kullanılır. Gastrointestinal absorpsiyonu çok azdır. Ağız ve özofagus kandidiazisde ml/500000 UI içeren damla ve suspansiyonları ağız boşluğunda tutularak kullanılır¹⁻⁴.

II.4.1.4. Natamisin (Pimarisin)

Streptomyces natalensis'den izole edilmiştir. Tetraen yapısında olup amfoterik özellik gösterir. *Aspergillus*, *kriptokokus*, *histoplazma* ve *kandida* türlerinin oluşturduğu mikozislere karşı kullanılır. Sodyum tuzunun absorpsiyonu iyi olduğu için enterik tablet halinde oral yoldan kullanılır. Bunun dışında pomat ve vaginal tablet biçimde lokal uygulaması vardır¹⁻⁴.

II.4.2. Lokal Kullanılan Antifungal İlaçlar

II.4.2.1. Uzun Zincirli Karboksilli Asitler

Propionik asit ve tek sayılı karbon atomu taşıyan uzun zincirli yağ asitleri (kaprilik, undesilenik) fungustatik etki gösterirler. Bu asitlerin kendileri gibi bazı tuzlarında (Na^+ , Zn^{+2} , K^+) etkilidirler. Genelde serbest yağ asitlerinin hoşla gitmiyen kokularından dolayı serbest yağ asidi ve tuz karışımları kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanı undesilenik asit ve çinko tuzunun karışımlarıdır. %5-

10 konsantrasyonlarda solusyon, pomat ve pudra biçiminde kullanılır^{1-4,10}.

II.4.2.2. Salisilik Asit Türevleri

Salisilik asidin önemli keratolitik etkisi vardır. Özellikle türevleri hiperkeratolik dermatofitozlarda kullanılır. Buklosamid, salisilanilid, dibromosalisil bu amaçla kullanılan salisilik asit türevleridir¹⁻⁴.

II.4.2.3. Tiokarbamik Asit Türevleri

Elementer kükürdün bilinen skabiasis etkisi kükürt içeren pek çok organik bileşiğin sentezlenmesine ve antifungal olarak denenmesine neden olmuştur. Bunlardan pek çoğu etki azlığı ve yüksek toksisiteleri nedeni ile kullanılmamıştır. Bu grup içinde sadece tolnaftat dermatofitlere olan etkisi ile dikkat çekmiştir. Pomat, losyon, pudra formları kullanılmaktadır¹⁻⁴.

II.4.2.4. İyod

İyod % 1 ve % 2'lik alkolik çözeltileri özellikle tinea pedis'de kullanılır. Enfeksiyonun başında uygulanırsa iyileşme oranı yüksektir. % 10'luk povidon-iyod kompleksi içeren vaginal tabletler vaginal kandidiazisde kullanılır^{1,2}.

II.4.2.5. Halprogin

% 1'lik pomat ve solusyonları yüzeysel kandidiazis, tinea ve pityriasis versikolor'da kullanılır. Göze temas ettirilmemelidir².

II.4.2.6. Naftifin

% 1'lik pomat ve solusyonları kullanılır. Mantar hücresinde skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek sterol yapımını engeller. Antifungal etki bu biçimde oluşur^{1.2}. Bunun dışında, bazı 8-hidroksikinolin türevleri, kuaterner amonyum bileşikleri, jansiyan viyole, bazik fuksin, metil yeşili, tiobendazol, benzoik asit gibi değişik kimyasal yapıda maddelerin lokal uygulamaları için hazırlanmış preparatları fungostatik amaçla kullanılır^{3.4}.

II.4.3. Sistemik Kullanılan Antifungal İlaçlar

II.4.3.1. Potasyum İyodür

Sporotrichum schenki'nin oluşturduğu yaygın ve lokalize sporotrikozis olgularına karşı kullanılan bir ilaçtır. Doymuş çözeltileri halinde kullanılır. Tedavinin biçimine göre günlük doz 9-12 g kadar artırılır. Uzun süre kullanılmasında kronik iyot zehirlenmesi söz konusudur⁴.

II.4.3.2. Flusitosin (5-florositosin)

Floropiridin türevi olup sistemik mantar infeksiyonlarında oral yoldan sıklıkla kullanılır. Kriptokokus, aspergillus ve kandida türlerinin oluşturduğu infeksiyonlarda ve özellikle kromoblastomikosis'e karşı kullanılır. Amfoterisin-B sulfat'a göre antifungal ve toksik etkisi daha düşüktür. Kolay resistans gelişir. Flusitosin mantar hücresinde bulunan sitosin deaminaz yardımı ile deaminasyona uğrayarak 5-florourasil'e dönüşür. Oluşan bu madde daha sonra 5-florouridilik aside çevrilir. Bu metabolit RNA molekülüne katıla-

rak onun yapı ve fonksiyonunu bozar. Kısmende 5-florodeoksi-uridilik aside dönüşerek timidilat sentetaz enzimini inhibe eder. Sonuçta mantar hücresinin DNA sentezi bozulur. Flusitosin gastrointestinal kanaldan oldukça iyi absorbe olur. Serebrospinal sıvıya yüksek konsantrasyonda geçer. Buradaki konsantrasyonu plazma konsantrasyonunun % 50-65'ne eşittir. Büyük bir kısmı böbrek yolu ile atılır. En önemli yan etkisi deaminasyon ürünü olan 5-florourasil'e bağlı olarak kemik iliği depresyonu yapmasıdır. Kan-beyin bariyerini kolay aştığı ve kısa sürede yüksek konsantrasyona ulaştığından kriptokok menenjitlerde kullanılır. Amfoterisin-B sulfat ile kombine kullanıldığında etki artar, rezistans oluşumu azalır^{2,3,7,11,12}.

II.4.3.3. İmidazol Türevleri

Geniş spektrumlu antifungal ilaçlardır. Cilt ve mukozadaki infeksiyonlarda ve mukokütanöz kandidiasis tedavisinde sıklıkla kullanılırlar. Özellikle sistemik infeksiyonlarda toksisitelerinin azlığından dolayı Amfoterisin-B sulfata tercih edilirler. Etkilerini mantar hücrelerinin sitoplazma membranında bulunan ergosterol'un sentezini, 14-metillanosterol'un desmetil-dihidrolanosterol'e dönüşümü basamağında inhibe ederek gösterirler. Diğer bir etki mekanizmasında hücre membranının geçirgenliğini ve transport fonksiyonunu bozmalarıdır. Bu grup içinde yer alan klotrimazol, mikonazol, izokonazol, tiokonazol, oksikonazol butokonazol gibi etken maddeler çeşitli dermatofitozlara karşı pomat, krem, losyon formlarında lokal olarak kullanılır.

Ketokonazol bu grubun oral yoldan kullanılan ve imidazol halkası taşıyan tek bileşigidir. Mikonazol intramusküler yolla da kullanılır. Ketokonazol ve mikonazol'un bu kullanımlarının dışında pomat pudra ve vaginal tablet biçiminde kullanımları vardır^{2-4,13-16}.

II.4.3.4. Triazol Türevleri

Tedaviye en son giren antifungal ilaçlardır. Antifungal spektrumları imidazol türevlerine benzer. Etki mekanizmaları aynıdır. N-substitue triazol türevleride ergosterol sentezini 14-metillanosterol'un desmetildihidro-lanosterol'e dönüşümü basamağında inhibe ederek etki gösterirler. N-substitue triazol türevlerinin sistemik infeksiyonlarda kullanılan imidazol türevlerine göre önemli üstünlükleri vardır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir.

a- Yavaş metabolize oldukları için etki süreleri ve doz intervalleri daha uzundur.

b- İnsan hücresinde mevcut sterol sentezi üzerine daha az etkilidirler. Bu nedenle direk toksik etkileri daha zayıftır.

c- Imidazol türevlerinin kullanımı ile organizmada meydana gelen endokrin bozukluklar, N-substitue triazol yapısındaki antifungal ilaçlarda gözlenmez veya az gözlenir.

II.4.4. Antifungal İlaçların Etki Mekanizmaları^{3,4,8,17-19,22}

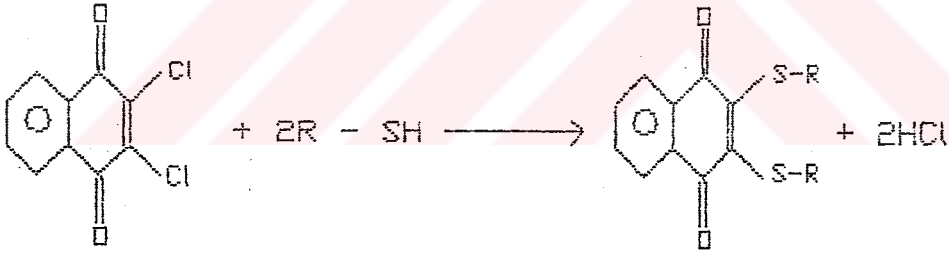
Farklı kimyasal yapı gösteren pekçok etken madde farklı mekanizmalarla antifungal etki gösterirler.

II.4.4.1. Keratolitik Etki

Salisilik ve triasetin (asetik asitin prodrug'u) gibi karboksilik asitler hastalıklı cildin keratin tabakasını aşındırarak antifungal ilacın daha iyi penetre olmasını sağlar.

II.4.4.2. Protein denaturasyonu

Fungusid ilaçlardan bazıları etkilerini mantar hücresinde yaşamsal fonksiyonları olan bazı maddelerin yapısında bulunan gruplarla reaksiyona girerek gösterirler. Örneğin, tiol, amino, karboksil, hidroksil grupları gibi. Bazı fungusidler bu etkileşmeyi kovalent bağlarla oluştururlar. Bu etkiyi uzatan bir faktördür. Bu tip etki daha çok halojenofor ve fenollerde gözlenir.

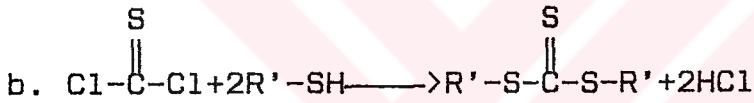
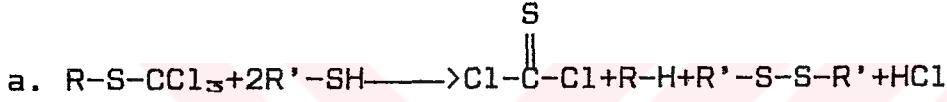


Fenollerin muhtemelen etkilerini hücre duvarında yer alan protein moleküllerindeki asidik OH grubu ile reaksiyona girerek proteinin çöktürülmesi biçiminde gerçekleştirdikleri düşünülmektedir.

II.4.4.3. Enzim İnhibisyonu

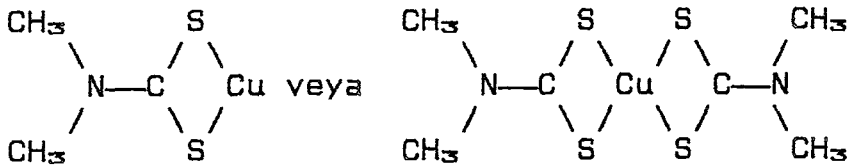
Bazı halojenoforlar, bazı fenolik maddeler, sulfonamidler ve tiokarbamatlar enzim inhibisyonu ile etki gösterirler.

$R-S-CCl_3$ genel formülü ile gösterilebilecek halojenofor bir yapı, tiol grubu ile iki aşamada reaksiyona girer. İlk aşamada oluşan tiofosgen, ikinci aşamada tekrar tiol grubu ile reaksiyona girer. Bu ise tiol grubu içeren ve mantarın yaşamı için önemli olan coenzim-A, aminoasit gibi yapıların inaktivasyonuna neden olur.

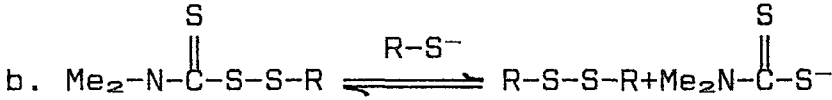
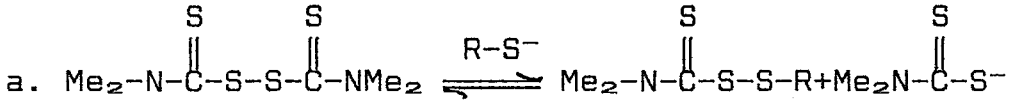


Sulfonamidler fungustatik etkilerini, aynı bakteriostatik etkilerinde olduğu gibi dihidropteroat sentetaz enzimini inhibe ederek folik asit oluşumunu önleyerek yaparlar.

Tiokarbamatlar metal içeren bazı enzimleri inhibe ederler ve mantar hücre duvarında bulunan metal atomları ile aşağıda gösterilen katyonik kompleksleri oluştururlar.



Tiokarbamatlar ayrıca sulfidril grubu taşıyan enzim ve coenzimlerle reaksiyona girip hücre metabolizmasını durdurarak etki gösterirler.



II.4.4.4. Mitozis'in İnhibe Edilmesi

Griseofulvin fungal mitozisi engelleyerek aktivite gösterir. Griseofulvin intraselluler mikrotubuler proteine bağlanarak hücre bölünmesini ve dolayısı ile hücre çoğalmasını önler.

II.4.4.5. Hücre Membranının Değiştirilmesi

Yapısında ergosterol ve önemli sterol komponentler bulunan mantar hücre membranı özellikle imidazol, triazol, polien antibiyotiklere ve organometalik bileşiklere karşı çok duyarlı ve savunmasızdır.

Antifungal etki mantar hücre sitoplazma membranında ergosterol sentezinin engellenmesi ile gözlenir. Polien antibiyotikler hücre zarının geçirgenliğini bozarak mantar hücresinin yaşamı için gerekli potasyum, inorganik fosfatlar, aminoasitler, fosfat esterleri gibi maddelerin transportunu engellerler.

II.4.4.6. Nukleik Asid ve Protein Yapımının Engellenmesi

Akridin yapısındaki maddeler nukleik asidin bazik çiftleri arasına girerek nukleik asid sentezini engellerler.

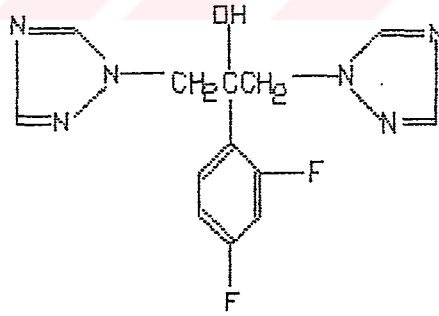
Flusitosin mantar hücresi içinde önce bir pirimidin antimetaboliti olan 5-fluorourasile dönüşür. Bu metabolik antagonist daha sonra ribonukleik asid ile beraber nukleik asit ve protein sentezini inhibe eder.

Çalışmamızın konusu olan N-substitue triazol grubu üyelerinden flukonazol ve itrakonazol ile ilgili geniş bilgiler aşağıda verilmiştir.

II.4.5. Flukonazol ile ilgili Genel Bilgiler

II.4.5.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

Flukonazol; 2-(2,4difluorophenyl)-1,3-bis-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-propanole.



$C_{13}H_{12}N_6OF_2$

M.A: 306.3

Beyaz, kristal görümlü tozdur. Metanol ve asetonunda kolay, etanol, 0.1 N HCl ve suda zor, heksan da çok zor çözünür. Heptan-etilasetattan kristallendirilen flukonazol

zoluñ erime noktası 138-140°C olup metanoldeki çözeltisi 260 nm'de maksimum absorpsiyon verir.

II.4.5.2. Farmakolojisi ve Farmakokinetiği

Flukonazol özellikle vaginal kandidiazis tedavisinde tek dozda oral yoldan etki sağlayan fungusid bir ilaçtır. Karşılaştırmalı çalışmalarda yanma ve kaşıntı gibi vaginal semptomları topikal ilaçlardan daha çabuk giderdiği gösterilmiştir. Flukonazol insan ve bakteri hücrelerini etkilemeden selektif olarak mantar hücrelerini hedef alır. Bu nedenle normal bakteriyel florayı bozmaz.

Kandidiazis, sosyo-ekonomik yönden gelişmemiş topluluklardaki yaygınlığı kadar gelişmiş ülkelerde de sıklıkla gözlenen bir hastalıktır. Sağlıklı kadınların % 25-50'sinde kandida türlerinin (özellikle albicans) herhangi bir belirti göstermeksizin kolonize olduğu gösterilmiştir. Kandidiazis olgusunun oluşumunda mantar birincil etken olmakla beraber bu oluşumu etkileyen bazı kişisel parametrelerden bahsetmek gerekmektedir. Bunlar;

- a. Antibiyotik kullanımı ile vaginanın normal bakteri florasının değişmesi,
- b. Immunosupresif ilaçların kullanımına bağlı olarak immun sistemin baskılanması,
- c. Hamilelik dönemi (endojen hormon düzeyinde değişiklik),
- d. Kanda glukoz seviyesinin yükselmesi,
- e. Menstruasyon dönemi öncesi glikojen seviyesinin yükselmesi,

- f. Östrojen seviyesine etkileri bilinen oral kontraseptiflerin kullanılması,
- g. Rahim içi araçların vaginal dokuda oluşturduğu travmalar,
- h. Mantar Uremesini kolaylaştıracak sıcak ve nemli bir ortam sağlayan dar giysiler, sentetik iç çamaşırları.

Kandiazis'in en önemli mahsurlarından biride sık sık tekrarlayabilmesidir.

NUkseden vaginal kandiaziste olayın açıklaması için değişik görüşler ileri sürülmekle beraber en fazla ilgi gören görüş rezervuar teorisidir. Bu teoriye göre gastro-intestinal kanalda yer alan kandidalar perianal bölgede kolonize olmakta, dolayısı ile vaginanın kolonizasyonuna ve vaginanın tekrar reenfeksiyonuna neden olmaktadır. Bu teoriyi destekleyen bulgu ise nükslü kandiazisi olan kadınların dışkı muayenelerinde tüm kadınlarda kandida tesbit edilmiş olmasıdır. Bu nedenle kandiazis tedavisinde ekstrasvaginal kandida kaynağının ortadan kaldırılması ve bunun ancak sistemik etki gösterecek bir ilaçla sağlanması gerekmektedir. Flukonazol ve itrakonazol antifungal aktivitesini sitokrom p-450 aracılığı ile lanosterol C-14 demetilaz enzimini inhibe ederek gösterir. Bu engelleme mantarın yaşamı için mutlak gerekli olan ergosterolün sentez edilmemesine neden olur.

N-substitue triazoller memelilerde adrenal kortikosteroidlerin, kolesterolün, androjen ve östrojenlerin sentezlenmesinde rolü olan ve bu etkilerini sitokrom p-450 aracılığı ile yapan enzimlerde kayda değer bir etki yapmaz-

lar. Hayvanlar Uzerinde yapılan calışmalar, N-substitutue tri-azollerin sitokrom p-450'ye bağımlı enzimler Uzerindeki inhibisyon etkisinin imidazol türevlerinin (özellikle keto-konazol) etkisine nazaran 20-200 defa daha az olduğunu gös-termiştir.

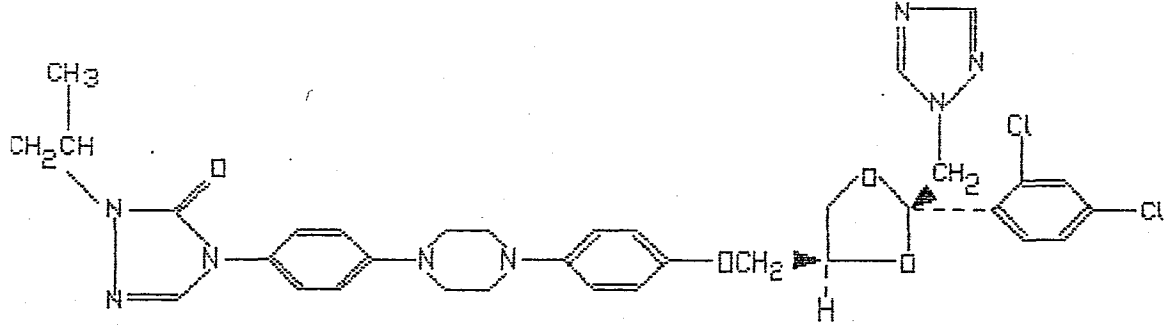
Memeli hücrelerinde sterol sentezinin inhibisyonu için gerekli flukonazol ve itrakonazol dozu tedavide kulla-nılan dozun çok üstündedir. Halbuki bu doz imidazol türev-lerinde oldukça düşüktür. Flukonazol ve itrakonazol'un bu özelliklerinden dolayı endokrin bozukluklara yol açma olası-lığı ketokonazol'e göre oldukça zayıftır. N-substitutue tri-azoller oral kontraseptiflerin bileşiminde yeralan etinil-östradiol ve levonorgesteril ile etkileşmeye girmez. Bu tip ilaçların etkinliğini azaltmaz. N-substitutue triazoller orga-nizmadaki bazı metabolik parametreleri etkilemezler. Yapılan calışmalarda oral glukoz tolerans testi, adrenal uyarı testi, lipid düzeyi tayini, östradiol, testesteron ve diğer hormon düzeyi tayini, tiroid fonksiyon testinin flukonazol kullanı-mından etkilenmediği gösterilmiştir. Oral yoldan kullanılan flukonazol'un hemen tamamı hızla absorbe olur. En yüksek plazma konsantrasyonu 4 saat sonra gerçekişir. Plazma yarı ömrü 25 saat olarak saptanmıştır. Yarı ömrünün uzun olması flukonazol'un tek doz tedavi imkanını sağlayan önemli bir özelliğidir. Flukonazol'un doku konsantrasyonu, plazma kon-santrasyonunun % 70-100 arasında olusmaktadır. Bu durum etken maddenin oldukça iyi bir doku penetrasyonu olduğunu göster-mektedir.

Flukonazol'Un farmakokinetiği fare, sıçan, köpek ve insanda incelenmiştir. IV ve oral yoldan verilen flukonazol'Un değişik türlerde farklı plazma seviyeleri gözlenmiştir. Bu değerler farede 0.7 mcg/ml, sıçanda 0.6 mcg/ml, köpekte 1.1 mcg/ml ve insanda 1.4 mcg/ml olarak bulunmuştur. Flukonazol'Un IV kullanımının farelerde tüm dokularda, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde eşit dağılım gösterdiği saptanmıştır. Plazma proteinlerine bağlanması tüm türlerde düşük bir oranda gerçekleşmektedir (% 11-12). Yarılanma süresi türlere göre farklılık göstermiştir. Farede 4.8, sıçanda 4, köpekte 14, insanda 22 saat olarak ölçülmüştür. Flukonazol'Un % 80'i değişmeden idrar ve feçesle atılmaktadır. İlacın başlıca eliminasyon yolu böbreklerdir. Flukonazol'Un sahip olduğu bu farmakokinetik profil,imidazol grubu antifungal ilaçlara nazaran oldukça farklılık göstermekte ve flukonazol'e etki ve uygulama kolaylığı açısından önemli üstünlükler sağlamaktadır.

Flukonazol sistemik mantar infeksiyonlarında kullanılan amfoterisin B sulfat, flusitosin ve ketokonazol'e nazaran daha az toksiktir. Bunun yanında hepatotoksik potansiyeli olduğu bildirilmiştir. Deney hayvanlarında yüksek dozda verildiğinde karaciğerde harabiyet yaptığı gösterilmiştir. En sık gözlenen yan etkileri bulantı, karın ağrısı, baş ağrısı ve dispepsidir^{1-4,20-27}.

II.4.6. Itrakonazol ile İlgili Genel Bilgiler

II.4.6.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



(±)-cis-4-[4-[4-[4-[[2-(2,4dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4 triazol-ylmethyl)-1,3 dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]-1-piperazinyl]phenyl]-2,4-dihydro-2-(1-meth yl propyl)-3H-1,2,4 triazol-3 on.

Itrakonazole

$C_{35}H_{38}Cl_2N_6O_4$
M.A.: 705.6

Beyaz, açık sarı renkli tozdur. Kloroform ve diklorometanda oldukça iyi çözünür. N-N-dimetilformamid ve tetrahidrofuran da zor çözünür. Metanol, etanol ve suda çok az çözünür. Toluenden kristallendirilen itrakonazol'un erime noktası 155.2°C'dir. 2-propanoldeki çözeltisi 263 nm'de maksimum absorpsiyon verir.

II.4.6.2. Farmakolojisi ve Farmakokinetiği

Itrakonazol özellikle trichophyton, microsporum, epidermophyton, aspergillus ve kandida'nın değişik suşlarının oluşturduğu infeksiyonlarda kullanılan triazol yapısında

yeni bir antifungal maddedir. Kimyasal yapı ve etki spektrumu bakımından ketokonazol'e benzer. Etki mekanizması diğer imidazol ve triazol türevleri gibi sitokrom P-450 aracılığı ile lanosterol C-14 demetilaz enzimini inhibe ederek ergosterol oluşumunu önlemek biçiminde olur. Oral yoldan alındığında absorpsiyon hızı alınan besinlerle ilgilidir. Biyoyararlılık açısından en uygun kullanımı yemeklerden sonra tok karnına alınması biçimindedir. 100 mg'lık tek dozun alınmından 3-4 saat sonra en yüksek plazma düzeyine (150 mg/ml) ulaşır. En önemli özelliği başta deri olmak üzere keratinli dokulardaki yoğunluğudur. Doku yoğunluğu plazma yoğunluğunun 5 katı kadardır. Günde 200 mg ile yapılan 3 günlük tedavide, tedavi kesildikten sonra vagina dokusundaki yoğunluğu 2 gün daha terapötik dozun üstünde kalır.

Itrakonazol karaciğerde metabolize olur. Dolayısı ile geçmişinde karaciğer hastalığı olan kimselerde dikkatle kullanılmalıdır.

Rifampisin ve fenitoin, itrakonazolün serum düzeyini düşürdüğünden beraber kullanılmamalıdır. H₂ reseptör blokerleri ve antiasitlerde itrakonazolün absorpsiyonunu azaltabilen ilaçlar olacağından birlikte kullanılmamalıdır. Yan etki olarak gastrointestinal bozukluklar yapar. Uzun süre kullanıldığında libido kaybı ve impotens olusturabilir^{14,24-27}.

III. ANALİTİK YÖNTEMLERLE İLGİLİ LİTERATÜRLER

Yapılan literatür değerlendirmesinde N-substitue triazol türevi olan flukonazol ve itrakonazol ile ilgili yapılmış az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Anılan etken maddeler tedaviye 1987 yılında (Ülkemizde 1990'da ruhsatlandırılmıştır) giren yeni ilaçlardır. Mevcut farmakopelerde her iki maddeninde monografisi yoktur. Literatürde flukonazol ve itrakonazol müstahzarlarının miktar tayinleri ile ilgili yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Saptanan çalışmalar her iki etken maddenin değişik biyolojik sıvılarda (kan, idrar, tükürük, serebrospinal sıvı) ve bazı dokularda (tırnak yatağı, vulvovaginal mukoza) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve gaz-sıvı kromatografisi yöntemleri ile yapılan çalışmalar biçiminde yoğunlaşmaktadır. Bu bölümde kısaca yazılan çalışmalardan bahsedilecektir.

Kim ve ark.²⁸ SpherisorbS-5 C8 kolon ve Asetonitril-pH:7 Temed tampon (1:3) ile hazırlanan mobil fazda flukonazolün plazma düzeyi tayini yapmışlardır. Lineer konsantrasyon aralığı 0.3-10 mcg/ml olup geri kazanım ortalaması % 89 olarak bulunmuştur.

Harris ve ark.²⁹ megabor kapiller kolon ve azot seçici dedektör kullanarak, plazma, serum, dilue idrar, beyin-omurilik sıvısında flukonazol miktar tayini yapmışlardır. Saptanan en küçük miktar 0.2 mcg/ml olup lineerite 0.2-200 mcg/ml'dir. Geri kazanım ortalaması % 86-93 arasındadır.

Hosotsubo ve ark.³⁰ flukonazolün dikloro analogunu internal standart olarak kullanarak flukonazolün serum düzeyini HPLC ile saptamışlardır. Sabit faz olarak AM-312 ODS (5 µm), hareketli faz olarak asetonitrilin sudaki % 15'lik çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmada bağıl standart sapma 5-50 mcg/ml arasında % 1.1'den, 1 mcg/ml'de ise % 3.9'dan küçük bulunmuştur. Geri kazanım ortalaması % 91-101 arasındadır.

Berridge ve ark.³¹ kemirici hayvanlar için hazırlanan diyet preparatlarında HPLC yöntemi ile flukonazol tayini yapmışlardır. Sabit faz olarak Hypersil MOS (5 µm) hareketli faz % 20 metanol içeren su kullanılmıştır. Çalışmanın doğrusalılığı 4-20 mcg/ml arasında olup geri kazanım ortalaması % 95.8'dir. Bağıl standart sapma altı çalışma için % 4.4 bulunmuştur.

Warnock ve ark.³² HPLC ve mikrobiyolojik yöntemlerle serumda itrakonazol tayini yapmışlar iki yöntemi duyarlılık açısından karşılaştırmışlardır. Agar diffüzyon yöntemi ile yapılan mikrobiyolojik çalışmalar bağıl standart sapma olarak HPLC yönteminden daha duyarlı sonuçlar vermiştir.

Babhair³³ internal standart olarak ketokonazol kullanarak HPLC yöntemi ile plazmada itrakonazol düzeyi tayini yapmıştır. Kolon olarak Radial-Pak C₁₈ (10 cmx8 mm), hareketli faz olarak (metanol-su-anhidrasetikasit) (80:20:1) kullanılmıştır. Saptanan en küçük değer ml/10 mcg'dır. Bağıl

standart sapma % 12 olup geri kazanım ortalaması % 97-98.8 dir.

Woestenborghs ve ark.³⁴ plazma ve homojenize edilmiş hayvan dokularında HPLC ile itrakonazol tayini yapmışlardır. Ekstraksiyon solventi olarak Heptan-iso amil-alkol (197:3), kolon olarak RSİL C₁₈ (5 µm) hareketli faz olarak asetonitrilin sudaki % 60'lık çözeltisi kullanılmıştır. Çalışmanın bağıl standart sapması % 0.3-13.5 arasındadır.

Allenmark ve ark.³⁵ fluorosans dedektör kullanarak serumda itrakonazol tayini yapmışlardır. Kolon olarak MPLC RP-18 Spheri-5 (10 cmx4.6 mm) hareketli faz olarak asetonitrilin sudaki % 60 çözeltisi ve 10 mM trietilamin karışımı kullanılmış, ölçümler 365 nm'de yapılmıştır. Saptanan en düşük konsantrasyon 4 mcg/ml olup, geri kazanım ortalaması % 95-100 olarak bulunmuştur.

Wood ve ark.³⁶ insan plazma ve idrarında gaz-sıvı kromatografisi yöntemi ile flukonazol tayini yapmışlardır. Kolon 1 m x 2 mm boyutlarda olup destek faz Chromosorb G NAW (80-100 mesh) kullanılmış ve SE-52 ile kaplanmıştır. Hareketli faz argon-metan (19:1) karışımı olup detektör olarak (FID) tipi kullanılmıştır. Ölçülen en düşük konsantrasyon 0.1 mcg/ml olup geri kazanım ortalaması plazmada % 100±5.3 idrarda % 100.6±3.8 olarak saptanmıştır.

Badcock ve ark.³⁷ reversed phase HPLC ile tırnak yatağında itrakonazol miktar tayini yapmışlardır. Itrakonazol tırnak yatağından asetonitril ile ekstre edilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril-diethylamin ve su karışımı kullanılmıştır. Ölçümler 261 nm de yapılmış, ölçülen en düşük konsantrasyon 0.1 pmol/mg olarak saptanmıştır. Geri kazanım ortalaması % 92-94 bulunmuştur.

Rommel ve ark.³⁸ leukemik hasta plazmasında small-bore sıvı kromatografisi yöntemi ile itrakonazol miktar tayini yapmışlardır. Kolon içeriği spherisorb ODS 2 olup hareketli faz sulu asetonitril çözeltisidir. Ölçümler 263 nm'de yapılmıştır. Ölçülen en düşük konsantrasyon ml/10 mcg olup geri kazanım ortalaması % 93.4 olarak bulunmuştur.

Rex ve ark.³⁹ flukonazol'un HPLC ve mikrobiyolojik yöntemle miktar tayinlerini yapmışlar, plazma, serum, beyin-omurilik sıvısında yapılan tayinlerde uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Ölçülen limit konsantrasyon HPLC yönteminde 0.1 mcg/ml, mikrobiyolojik yöntemde 2 mcg/ml olarak saptanmıştır. Araştırmacılar yöntemin uygulama kolaylığı, duyarlılığı, az miktarda örneğe ihtiyaç göstermesi ve düşük ekipman maliyeti nedeni ile mikrobiyolojik yöntemin rutin klinik örneklerin analizlerinde tercih edilmesinin uygun olacağını belirtmişlerdir.

IV. M A T E R Y A L V E Y Ü N T E M

IV.1. KULLANILAN ARAC VE GERECLER

- UV Spektrofotometresi (Shimadzu UV-160 kaydedicili)
- IR Spektrofotometresi (Shimadzu IR-435)
- Dansitometre (Shimadzu CS-980, DR-2 kaydedici)
- Yüksek basınçlı Sıvı Kromatografisi (Shimadzu LC-6A pompa, SPD-6AV dedektör, SCL-6A system controller, C-R3A integratör)
- Potansiyometre (Tacussel Type EPL-3)
- Terazî (0.1 mg duyarlıkta, Sartorius)
- Manyetik karıştırıcı (Labınco)
- UV Lambası (254 nm - 366 nm)
- Erime noktası tayin cihazı (Elektrothermal 9200)
- Çeşitli cam malzeme (Balonjoje, pipet, Camag İTK tankı, mezür, beher, v.s)

IV.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasal maddeler, ince tabaka kromatografisinde yararlanılan solvanlar, reaktiflerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Merck markalı olup, analitik saflıktadır. IR çalışmalarında kullanılan KBr Uvasol-Merck, dehidrokolik asit Sigma kökenlidir.

IV.3. KULLANILAN REAKTİFLER

IV.3.1. Dragendorff Çözeltisi

A: 0.85 g bazik bizmut subnitrat, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karışımında çözöldü.

B: 8 g potasyum iyodür 20 ml suda çözöldü.

Stok Çözelti: Eşit hacim A ve B karıştırıldı.

Sprey: 1 ml stok çözelti, 2 ml asetik asit ve 10 ml su karıştırıldı.

IV.3.2. Gümüş Nitrat Çözeltisi (0.01 M)

1.7 g AgNO_3 1000 ml distile suda çözöldü.

IV.3.3. Potasyum iodoplatinat Çözeltisi

Stok A: 600 mg heksakloroplatinik asit 10 ml N HCl'de çözöldü.

Stok B: 10 g potasyum iyodür 100 ml distile suda çözöldü.

Karışım: 5 ml stok A ve 45 ml stok B karıştırılarak 150 ml'ye distile su ile dilue edildi. (Hergün taze hazırlandı.)

IV.4. KULLANILAN STANDART MADDELER

Çalışmalarda kullanılan standart maddelerden flukonazol Pfizer ilaçları A.Ş., itrakonazol Eczacıbaşı ilaçları A.Ş.'den sağlanmıştır. Standart maddelerin erime noktaları saptanmış IR spektrumları alınmış ve değişik solvent sistemlerinde I.T.K. değeriendirmeleri yapılmıştır.

Nitel çalışmalarda kullanılan diğer antifungal ilaçların standartlarından klotrimazol, bifonazol ve isokonazol Birleşik Alman İlaçları A.Ş., mikonazol ve ketokonazol Eczacıbaşı İlaçları A.Ş., oksikonazol Roche Müstahzarları San.A.Ş., tiokonazol Pfizer İlaçları A.Ş.'den sağlanmıştır.

Flukonazol ve itrakonazol içeren farklı seri numaralı piyasa örnekleri Ankara'daki değişik eczanelerden sağlanmıştır. Çalışmalarımızda piyasa örnekleri olarak flukonazol kapsül 150 mg, flukonazol intravenöz infüzyon çözeltisi 200 mg/100 ml, flukonazol sirup 750 mg/150 ml ve itrakonazol mikropellet kapsül 100 mg kullanılmıştır.

IV.5. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (İ.T.K) ÇALIŞMALARI

IV.5.1. Nitel Çalışmalar

Bu çalışmada flukonazol ve itrakonazol'un imidazol halkası içeren diğer antifungal ilaçların yanısıra İTK yöntemi ile nitel değerlendirilmeleri yapıldı.

21 değişik kompozisyonda solvent sistemi denenerek en uygun developman koşullarının saptanması amaçlandı. Sabit faz olarak Kieselgel 60F₂₅₄ Merck hazır plaklar kullanıldı. Flukonazol, itrakonazol ve imidazol halkası içeren diğer antifungal maddelerin kloroform-metanol (1:1) karışımında hazırlanan çözeltilerinden ayrı ayrı 10'ar µl tatbik edildi. Develope edildi. Elde edilen kromatogramlar önce UV lambası (254, 366 nm) altında sonra farklı reaktifler püskürtülerek oda ısısında ve 100°C etüvde 15 dakika tutularak gözlemlendi.

Çalışmalarda kullanılan hareketli faz sistemleri Tablo-2'de, bulunan Rfx 100 değerleri ve Reaktiflerle elde edilen sonuçlar sıra ile Tablo-3-4'de gösterildi.

IV.5.2. İTK Yöntemi ile Saptanacak En Düşük Konsantrasyonun Bulunması

Bu çalışmada flukonazol ve itrakonazol'un UV lambası altında ve reaktif püskürtülerek gözlenmesi mümkün olabilen en düşük konsantrasyonunun saptanması amaçlanmıştır. Flukoanzol %80 oranında biotransformasyona uğramadan idrarla atıldığından idrar örneklerinde muhtemel bir semikantitatif değerlendirme yapabilmek düşüncesi ile böyle bir ön çalışma yapıldı.

Flukonazol ve itrakonazol'un kloroform:metanol (1:1) de uygun konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinden 5'er µl damlatıldı. Böylece plak üzerine sıra ile 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.2 ve 0.1 mcg etken madde tatbik edildi. Plak S-3 solvent sisteminde developpe edildi. Elde edilen kromatogramlar UV lambası altında, gümüş nitrat ve iyodoplatinat reaktifi püskürtülerek ayrı ayrı değerlendirildi. Bulunan sonuçlar Tablo-5'de gösterildi.

IV.5.3. Nicel çalışmalar (Dansitometrik Çalışmalar)

İnce tabaka kromatografisi ilaçların bozunma ürünlerinin saptanmasında, içerik tekdüzeliği testlerinde ve etken maddelerin miktar tayinlerinde nicel amaçla kullanılabilen kolay, hızlı ve tekrarlanabilirliği olan bir yöntemdir. Plağa etken madde, etken madde karışımları manuel veya

otomatik aplikatörle nokta veya çizgi biçiminde tatbik edilip uygun bir solvent sisteminde sürüklenerek farklı Rf değerlerinde ayrılmaları sağlanır. Kromatogramdaki lekeler dansitometrede taranarak maddelerin absorbsiyon şiddetleri ölçülür. Dansitometrik çalışmalarda transmisyon, reflektans modunda tarama yapılabildiği gibi floresans tarama yapmak olanağıda vardır. Bu çalışmalarda dalga boylarına karşı absorbsiyon şiddetleri ölçülerek maddeye özgü spektrum elde edildiği gibi, maksimum dalga boyunda her lekenin absorbsiyon şiddeti pik alanı veya pik yüksekliği olarak da ölçülebilir^{40,41}.

IV.5.3.1. Flukonazol'Un Dansitometrik Yöntemle Maksimum Absorbsiyon Noktasının Saptanması

Flukonazol'Un kloroform:metanol (1:1) de ml/3 mg lık çözeltisi hazırlandı. Plaga 5 µl tatbik edildi. S-3 solvan sisteminde developpe edilip oda sıcaklığında bekletildi. Rf değeri saptandı. Dansitometrede 200-370 nm'ler arasında taranarak spektrumu alındı ve λ_{max} 261 nm olarak saptandı. Elde edilen spektrum Sekil-1'de gösterildi.

IV.5.3.2. Flukonazol Nicel Tayini İçin Regresyon Çalışmaları

Flukonazol'Un kloroform:metanol (1:1) de hazırlanan çözeltisinden hareketle ml'sinde 1,2,3,4 ve 5 mg etken madde taşıyan dilue çözeltileri hazırlandı. Plaga 2 cm aralıklarla herbirinden 5 µl tatbik edilip işleme IV.5.3.1.'deki gibi devam edilirdi. Plak dansitometreye yerleştirilip 261

nm'de lekelerle ait pik alanları ölçülerek regresyon denklemi oluşturuldu. Alınan sonuçlar Tablo-6'da gösterildi.

IV.5.3.3. Numunelerin Hazırlanması

IV.5.3.3.1. Kapsül Numuneleri

10 adet kapsül içeriği tartılarak ortalama kapsül içeriği tespit edildi. Homojen hale getirilen toz karışımından 150 mg flukonazol'e eşdeğer miktar duyarlı olarak tartıldı, 40 ml kloroform:metanol (1:1) ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 10 dakika tutuldu, süzülde. 50 ml'ye aynı çözelti ile tamamlandı. İşleme IV.5.3.2.'deki gibi devam edildi. Alınan sonuçlar Tablo-8'de gösterildi.

IV.5.3.3.2. Şurup Numuneleri

10 mg flukonazol'e eşdeğer şurup numunesi 5 ml'ye kloroform:metanol (1:1) ile tamamlandı. İşleme IV.5.3.2.'deki gibi devam edildi. Hareketli faz sistemi olarak S-5 kullanıldı. Alınan sonuçlar Tablo-9'da gösterildi.

IV.5.3.4. Itrakonazol'Un Maksimum Absorbsiyon Noktasının Saptanması

Itrakonazol'Un metanol:metilenklorür(1:1)'de ml'de 600 mcg'lık çözeltisi hazırlandı. Plağa 5 µl tatbik edildi. S-5 solvan sisteminde develope edilip oda sıcaklığında bekletildi. Rf değeri saptandı. Dansitometrede 200-370 nm'ler arasında taranarak spektrumu alındı. λ_{max} 260 nm olarak saptandı. Elde edilen spektrum Sekil-2'de gösterildi.

IV.5.3.5. Itrakonazol Nicel tayini İcin Regresyon Çalışmaları

Itrakonazol'un metanol:metilenklorür (1:1) de hazırlanan stok çözeltisinden hareketle, ml'sinde 0.2, 0.4, 0.6,0.8 ve 1 mg etken madde taşıyan dilue çözeltileri hazırlandı. Plaga 2 cm aralıklarla herbirinden 5 µl tatbik edilip işleme IV.5.3.4.'deki gibi devam edildi. Plak dansitometreye yerleştirilip 260 nm'de lekelerle ait pik alanları ölçülerek regresyon denklemi oluşturuldu. Alınan sonuçlar Tablo-7'de gösterildi.

IV.5.3.6. Numunelerin Hazırlanması

10 adet kapsul içeriği (mikropelletler) tartılarak ortalama kapsul içeriği tesbit edildi. 100 mg itrakonazol'e eşdeğer miktarda mikropellet duyarlı olarak tartıldı. 40 ml metanol:metilenklorür (1:1) ilave edilerek manyetik karıştırıcıda hafifçe ısıtılarak 30 dakika tutuldu, süzülde. 50 ml'ye aynı çözelti ile tamamlandı. Bundan 10 ml alınarak 50 ml'ye dilue edildi. İşleme IV.5.3.5.'deki gibi devam edildi. Alınan sonuçlar Tablo-10'da gösterildi.

IV.6. YUKSEK BASINCLİ SIVI KROMATOĞRAFİSİ (Y.B.S.K) İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada flukonazol ve itrakonazol'un yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle farklı çalışma koşulları deneyerek nitel ve nicel değerlendirmeleri için en uygun koşulların saptanması amaçlandı.

IV.6.1. Nitel Çalışmalar

Yapılan bu çalışmada, flukonazol ve itrakonazol'un nitel değerlendirilmesi için en uygun alıkonma zamanları (retention time) saptandı. Ayrıca bu maddelerin imidazol halkası taşıyan bir grup antifungal ilaç ile birlikte aynı çalışma koşullarında verdikleri farklı alıkonma sürelerinin tespitine çalışıldı.

Yapılan nitel ve nicel değerlendirmelerde aşağıda bildirilen kolon sistemi, hareketli faz sistemi ve çalışma koşulları uygulandı.

- Kolon: Hypersil BDS C₁₈ 5 μ (250 mm x 4.6 mm)
- Hareketli faz: Su:asetonitril:diethylamin (40:60:0.05)
Hareketli faz nucleopore vakum filtrasyon aletinden Millipore 0.45 mikrometre gözenekli filtreler kullanılarak süzülde, gazından kurtarıldı.
- Dedektör: UV 261 nm
- Akış hızı: 2 ml/dakika

Flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, oksikonazol nitrat, tiokonazol, klotrimazol ve mikonazol nitrat'ın hareketli faz içinde 0.4 mg/ml konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Ayrı ayrı herbirinden 20 μ l enjekte edildi. her madde için uygun alıkonma zamanı saptandı.

Flukonazol, itrakonazol ve yukarıda bildirilen imidazol türevi antifungal ilaçların ml/0.4 mg stok çözeltilerinden uygun miktarlar alınarak karıştırıldı. Bu karı-

sımdan 20 µl enjekte edildi. Yedi tane antifungal maddenin aynı çalışma koşullarında verdikleri alıkonma süreleri saptandı. Elde edilen kromatogramlar ve alıkonma süreleri Sekil-3'de verildi.

IV.6.2. Nicel Çalışmalar

IV.6.2.1. Flukonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları

Stok flukonazol çözeltisi: 250 mg flukonazol 50 ml hareketli fazda çözöldü.

Stok Internal Standart çözeltisi: 200 mg ketokonazol 50 ml hareketli fazda çözöldü.

Stok flukonazol çözeltisinden sıra ile 1,2,3,4 ve 5 ml alındı. 100 ml'lik balonjojelere aktarıldı. Her balonjojeye 1'er ml stok internal standart çözeltisi ilave edildi. Balonjojeler hareketli faz ile hacimlerine tamamlandı.

Akış hızı:1 ml/dakika, Duyarlılık:8 Att'e ayarlandı. Alet dengeye geldikten sonra hazırlanan çözeltilerin herbirinden 100 µl enjekte edildi. Elde edilen piklerin alanları integratörle ölçöldü. Etken madde pik alanının internal madde pik alanına oranları kullanılarak regresyon denklemi oluşturuldu. Bulunan sonuçlar Tablo-11'de gösterildi.

IV.6.2.2. Numunelerin hazırlanması

IV.6.2.2.1. Kapsöl Numuneleri

10 adet kapsöl içeriği duyarlı biçimde tartılarak ortalama kapsöl içeriği ağırlığı saptandı. Homojen hale

getirilmiş toz karışımından 100 mg flukonazol'e eşdeğer miktar tartıldı. 15 ml hareketli faz ilave edilerek 15 dakika manyetik karıştırıcıda tutuldu. Süzüldü. 25 ml'ye hareketli faz ile tamamlandı. Bu çözeltinin 5 ml'si 100 ml'lik balonjojeye aktarıldı. 1 ml stok internal standart çözeltisi ilave edildi. 100 ml'ye hareketli faz ile tamamlandı.

IV.6.2.2.2. Intravenöz İnfüzyon Çözelti Numuneleri

20 mg flukonazol'e eşdeğer numune çözeltisi 100 ml'lik balonjojeye aktarıldı. 1 ml stok internal standart çözeltisi ilave edilerek hacim hareketli faz ile 100 ml'ye tamamlandı.

IV.6.2.2.3. Surup Numuneleri

15 mg flukonazol'e eşdeğer numune çözeltisi 100 ml'lik balonjojeye aktarıldı. 1 ml stok internal standart çözeltisi ilave edilerek hacim hareketli faz ile 100 ml'ye tamamlandı.

Numunelerin tümü için işleme IV.6.2.1.'deki gibi devam edildi. Elde edilen kromatogramlar Şekil-4 ve 5'de, sonuçlar Tablo 13-14-15'de gösterilmiştir.

IV.6.2.3. Itrakonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları

Stok itrakonazol çözeltisi: 15 mg itrakonazol 100 ml hareketli fazda çözülde.

Stok Internal Standart çözeltisi: 40 mg ketokonazol 50 ml hareketli fazda çözülde.

Stok itrakonazol cözeltisinden sıra ile 1,2,3,4 ve 5 ml alındı ve 50 ml'lik balonjojelere aktarıldı. Her balonjojeye 1'er ml stok internal standart cözeltisi ilave edildi. Hacimler hareketli fazla 50 ml'ye tamamlandı. Akış hızı 2 ml/dakika. Duyarlılık: 7 Att'e ayarlandı. Alet dengeye geldikten sonra hazırlanan cözeltilerin herbirinden 100 µl enjekte edildi. Elde edilen pik alanları integratörle ölçüldü. Etken madde pik alanının internal madde pik alanına oranları kullanılarak regresyon denklemi oluşturuldu. Bulunan sonuçlar Tablo-12'de gösterildi.

IV.6.2.4. Numunelerin hazırlanması

10 adet kapsül içeriği (mikropelletler) duyarlı biçimde tartıldı. Ortalama kapsül içerik ağırlığı tespit edildi. 100 mg itrakonazol'e eşdeğer mikropellet duyarlı olarak tartıldı. 40 ml hareketli faz içinde hafifçe ısıtılarak manyetik karıştırıcıda 30 dakika tutuldu ve süzülde. Süzuntu 50 ml'ye hareketli faz ile tamamlandı. Bu cözeltiden 4 ml alındı 50 ml'ye tamamlandı. Bunun 3 ml'si 50 ml'lik balonjojeye aktarıldı. 1 ml stok internal standart cözeltisi ilave edildi. 50 ml'ye hareketli faz ile tamamlandı. İşleme IV.6.2.3.'deki gibi devam edildi. Elde edilen kromatogram Şekil-4'de, sonuçlar Tablo-16'da gösterildi.

IV.7. UV SAHADA YAPILAN NİCEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada flukonazol ve itrakonazol'un metanol ve 0.1 N HCl'de UV sahada miktar tayinleri yapılmıştır. Önce her iki maddenin metanol ve 0.1 N HCl'de spektrumları alın-

rak maksimum absorpsiyon noktaları saptanmıştır (Şekil 6-7-8-9). Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin absorbanans değerlerinden yararlanılarak her iki etken madde için ayrı ayrı regresyon denklemleri oluşturulmuştur.

IV.7.1. Flukonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları

IV.7.1.1. 0.1 N HCl'de Yapılan Çalışmalar

Stok Çözelti: 500 mg flukonazol 100 ml 0.1 N HCl de çözülde.

Stok çözeltiden sıra ile 1,2,3,4 ve 5 ml alındı. 100 ml'lik balonjojelere aktarıldı. 0.1 N HCl ile 100 ml'ye tamamlandı. 260 nm'de absorbanansları ölçüldü. Molar absorbtivite değeri (ϵ) bulundu. Regresyon denklemi oluşturuldu.

IV.7.1.2. Metanolde Yapılan Çalışmalar

Stok çözelti: 250 mg flukonazol 100 ml metanolde çözülde.

Stok çözeltiden sıra ile 1,2,3,4 ve 5 ml alındı. 50 ml'lik balonjojelere aktarıldı. Metanol ile 50 ml'ye tamamlandı. 260 nm'de absorbanansları ölçüldü. Molar absorbtivite değeri (ϵ) bulundu. Regresyon denklemi oluşturuldu.

Flukonazol'Un 0.1 N HCl ve metanolde yapılan regresyon çalışmalarının sonuçları Tablo-17'de verildi.

IV.7.2. Numunelerin Hazırlanması

IV.7.2.1. Kapsül Numuneleri

10 adet kapsül içeriği duyarlı biçimde tartıldı. Kapsül içeriğinin ortalama ağırlığı saptandı. Homojen toz

karışımından 50 mg flukonazol'e eşdeğer miktar tartıldı. 150 ml 0.1 N HCl ile manyetik karıştırıcıda 15 dakika karıştırıldı. Süzüldü. Süzuntu 250 ml'ye 0.1 N HCl ile tamamlandı.

Aynı toz karışımından 20 mg flukonazol'e eşdeğer kapsül tozu tartıldı. 60 ml metanol ile manyetik karıştırıcıda 10 dakika karıştırıldı. Süzüldü. Süzuntu 100 ml'ye metanol ile tamamlandı.

Hazırlanan numune çözeltilerinin ayrı ayrı 0.1 N HCl ve metanol'e karşı 260 nm'de absorbanları ölçüldü. Regresyon denkleminde yararlanılarak nicel tayini yapıldı. Bulunan sonuçlar Tablo-19'da gösterildi.

IV.7.2.2. İntravenöz İnfüzyon Çözelti Numuneleri

5 ml intravenöz çözelti 0.1 N HCl ile 50 ml'ye tamamlandı. 5 ml intravenöz çözelti metanol ile 50 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan numune çözeltilerinin ayrı ayrı 0.1 N HCl ve metanole karşı 260 nm'de absorbanları ölçüldü. Regresyon denkleminde yararlanılarak nicel tayini yapıldı. Bulunan sonuçlar Tablo-20'de gösterildi.

IV.7.3. İtrakonazol Miktar Tayini İçin Regresyon Çalışmaları

IV.7.3.1. 0.1 N HCl'de Yapılan Çalışmalar

Stok çözelti: 20 mg itrakonazol 100 ml metanolde çözülür.

Stok çözeltiden sıra ile 2,3,4,5 ve 6 ml alındı. 50 ml'lik balonjojelere aktarıldı. 0.1 N HCl ile 50 ml'ye

tamamlandı. 254 nm'de absorbanları ölçüldü. Molar absorbtivite değeri (ϵ) bulundu. Regresyon denklemi oluşturuldu.

IV.7.3.2. Metanolde Yapılan Çalışmalar

Stok çözelti: 20 mg itrakonazol 100 ml metanolde çözöldü.

Stok çözeltiden sıra ile 1,2,3,4 ve 5 ml alındı. 50 ml'lik balonjojelere aktarıldı. Metanol ile 50 ml'ye tamamlandı. 261 nm'de absorbanları ölçüldü. Molar absorbtivite değeri (ϵ) bulundu. Regresyon denklemi oluşturuldu.

0.1 N HCl ve metanolde yapılan itrakonazol çalışmalarının sonuçları Tablo-18'de verildi.

IV.7.4. Numunelerin hazırlanması

10 adet kapsöl içeriğı (mikropelletler) duyarlı biçimde tartıldı. Kapsöl içeriğinin ortalama ağırlığı saptandı.

Stok çözelti: 20 mg itrakonazol'e eşdeğer mikropelletler tartıldı. 40 ml metanol ile manyetik karıştırıcıda hafif ısı uygulanarak 30 dakika karıştırıldı. Süzöldü ve metanol ile 50 ml'ye tamamlandı.

Stok çözeltiden 1 ml alınarak metanol ile 50 ml'ye tamamlandı. 261 nm'de metanole karşı absorbanı ölçöldü.

Stok çözeltiden 2 ml alınarak 0.1 N HCl ile 50 ml'ye tamamlandı. 254 nm'de 0.1 N HCl'e karşı absorbanı ölçöldü.

Regresyon denklemlerinden yararlanılarak nicel tayinleri yapıldı. Bulunan sonuçlar Tablo-21'de gösterildi.

IV.8. IR SPEKTROSKOPİSİ YÖNTEMİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

IR spektroskopisi maddenin IR ışınlarını absorblaması esasına dayanan bir yöntemdir. Bir maddenin IR ışınlarını absorblaması için molekül içi titreşim enerjisinin IR ışınının enerjisi düzeyinde olması gerekir. Elektromanyetik skalada IR ışınları 100-300 000 nm arasında yer almakla birlikte özellikle nicel ve nitel çalışmalarda 2500-25000 nm ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) bölgesi kullanılır. IR spektroskopisi bir maddenin kimyasal yapısının aydınlatılması, maddede oluşan yapısal değişikliklerin saptanması, maddenin saflık kontrolü, izomer ve polimorf yapılarının tesbiti gibi nitel uygulamaların yanı sıra nicel amaçlarla da kullanılmaktadır. IR spektroskopisi ile yapılan nicel değerlendirmelerde UV-Visible spektroskopisinde olduğu gibi Beer-Lambert yasası geçerlidir. Maddenin konsantrasyonu ile karakteristik dalga boyunda saptanan pikin yüzde transmitans değer farkı arasındaki doğrusal ilişki nicel çalışmaların esasını teşkil eder.

Yapılan nicel çalışmalarda potasyum bromür tablet tekniği kullanılmıştır.

Flukonazol ve itrakonazol'un $4000-400\text{ cm}^{-1}$ arası spektrumu alınmış ve nicel tayinde kullanılacak karakteristik pikler saptanmıştır (Şekil 10-11). Internal standart olarak dehidrokolik asit'den yararlanılmıştır. Bu maddenin internal standart olarak seçilmesinin nedeni flukonazol'un

bu çalışma için yararlanılan 960 cm^{-1} ve 675 cm^{-1} dalga sayısında dehidrokolik asidin absorpsiyonunun olmayışı, bunun yanısıra flukonazol'un absorpsiyonunun olmadığı 1700 cm^{-1} 'de ise dehidrokolik asid'e ait bir absorpsiyon pikinin bulunmasıdır. Flukonazol'de saptanan bu özellik itrakonazol'de geçerli değildir. Çünkü itrakonazol ve dehidrokolik asidin üstüste alınan IR spektrumunda, dehidrokolik asid'in itrakonazol için uygun bir internal standart olamayacağı gözlenmiştir. 1700 cm^{-1} 'de itrakonazol'e ait absorpsiyon piki vardır (Şekil 12-13).

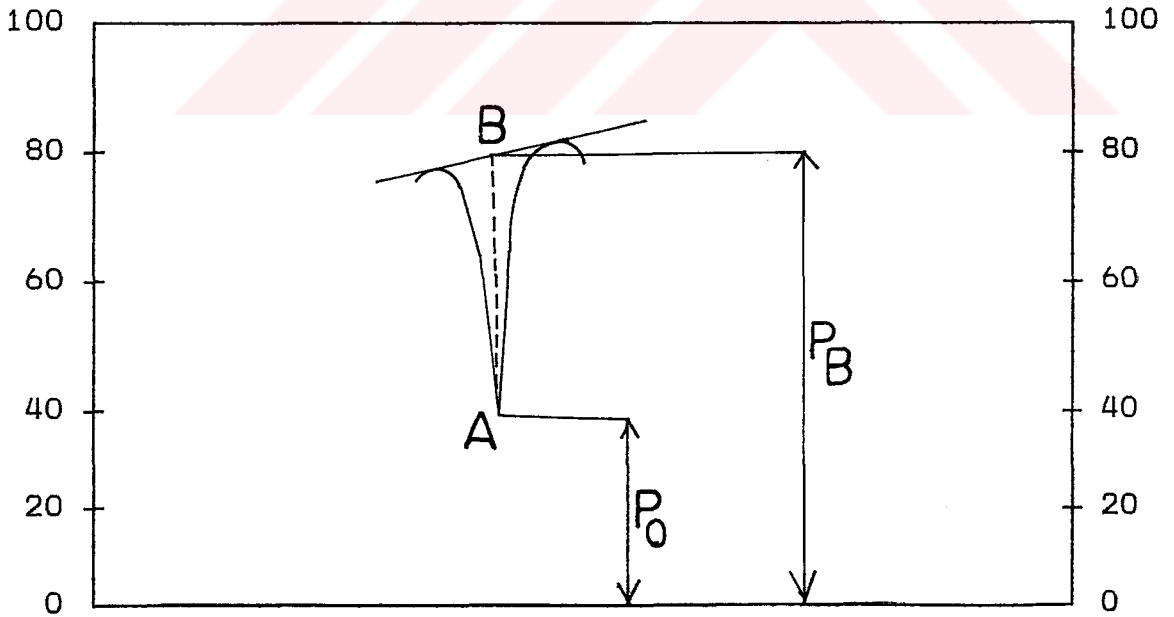
IR spektroskopisi ile yapılan nicel çalışmalarda tablet tozunun hazırlanması, basılması ve spektrum alınması sırasında oluşabilecek hata kaynaklarını ortadan kaldırmak veya standardize etmek için internal standart kullanmak gerekmektedir. Regresyon denklemleri ve numune çalışmalarında X değerleri olarak etken madde konsantrasyonunun internal standart konsantrasyonuna oranı kullanılırken, Y değerleri olarak etken madde pikinden elde edilen % transmitans farkının internal standart % transmitans farkına oranı kullanılmıştır.

Özellikle 100-150 mg civarında tabletlerle çalışıldığında 1-5 mg civarında etken maddeyi tartmak ve KBr içinde homojen bir biçimde dağıtmak oldukça güç olduğundan nicel uygulamalarda aşağıdaki biçimde çalışılmıştır.

Etken madde ve internal standart'ın kloroform içinde stok çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilerden iste-

nilen konsantrasyonu sağlayacak miktarları pipetle porselen krezeler içinde duyarlı bir biçimde tartılmış KBr üzerine ilave edilmiştir. Çözücü bir ısıtıcı üzerinde azot gazı ile uçurulup kalan toz homojen bir toz karışımı elde edinceye kadar karıştırılmış ve disk kalınlığının aynı olmasını sağlamak amacı ile aynı ağırlıkta tabletler basılmasına özen gösterilmiştir.

IR spektroskopisinde elde edilen piklerin transmittans değerleri base-line tekniği ile hesaplanmıştır. Bu teknikte seçilen pikin başlangıç ve bitiş noktaları bir teğetle birleştirilip pikin uç noktasından bu teğete bir dik doğru çizilmiştir. Kesişim noktası P_B 'dir P_0 ve P_B 'nin % transmittans değerlerinin logaritmaları bulunmuş ve $\log P_B - \log P_0$ farkı absorbans olarak kullanılmıştır.



$$\text{Absorbans} = \log \frac{P_B}{P_0} = \log P_B - \log P_0$$

IV.8.1. IR Spektroskopisi Yöntemi ile Flukonazol'Un Miktar Tayini Çalışmaları

IV.8.1.1. Standart Çözeltiler

Flukonazol Çözeltisi (A): 100 mg flukonazol 50 ml kloroformda çözülür.

Internal Çözelti (B): 100 mg dehidrokolik asit 100 ml kloroformda çözülür.

IV.8.1.2. KBr Tabletlerinin Hazırlanması

Bes ayrı porselen kapsül içine 0.1 mg duyarlıkta 500 mg KBr ayrı ayrı tartıldı. KBr tozları üzerine aşağıdaki biçimde A ve B çözeltisi ilave edildi.

1. Standart karışım: 500 mg KBr + 1 ml A + 1 ml B çözeltisi
2. " " : 500 mg KBr + 2 ml A + 1 ml B "
3. " " : 500 mg KBr + 3 ml A + 1 ml B "
4. " " : 500 mg KBr + 3.5 ml A + 1 ml B "
5. " " : 500 mg KBr + 4 ml A + 1 ml B "

Kloroform, bir ısıtıcıda azot gazı yardımı ile ortamdan uzaklaştırıldı. KBr ve etken madde içeren toz agat havaneli ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Etüvde 105°de 15 dakika tutuldu. Tekrar karıştırıldı. Desikatörde soğutuldu. Bu toz karışımından aynı ağırlıkta tabletler basıldı. 4000-400 cm^{-1} de spektrumları alındı. 1700 cm^{-1} (internal standart) 960 ve 675 cm^{-1} (flukonazol) piklerinin P_B ve P_O değerleri ve bunların logaritma farkları alınarak

absorbansları saptandı. Regresyon denklemi çalışmalarında X değerleri olarak etken madde konsantrasyonunun internal standart konsantrasyonuna, Y değerleri olarak etken madde absorbansının internal standart absorbansına oranları kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 22-23'de verildi.

IV.8.1.3. Numunelerin Hazırlanması

10 kapsül içeriği duyarlı olarak tartıldı. Kapsül içeriğinin ortamala ağırlığı bulundu. Homojen bir toz karışımı elde edilinceye kadar karıştırıldı. 50 mg flukonazole eşdeğer toz tartıldı. 15 ml kloroform ile manyetik karıştırıcıda 15 dakika tutuldu. Süzüldü. Süzuntu 25 ml'ye kloroform ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2 ml, internal standart çözeltisinden 1 ml, duyarlı bir biçimde tartılan 500 mg KBr üzerine ilave edildi. İşlemlere IV.8.1.2.'deki gibi devam edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo-24-25'de verildi.

Kapsül formunun dışında flukonazol içeren şurup ve infüzyon çözelti preparatlarının IR spektroskopisi yöntemi ile nicel tayinlerinin yapılması mümkün olmamıştır. Çünkü bu formlar sulu çözelti halindedir. Bundan dolayı gerek KBr tablet tekniği gerekse NaCl hücre tekniği ile çalışmanın olanağı yoktur.

IV.9. SUSUZ ORTAMDA POTANSİYOMETRİK TITRASYON YÖNTEMİ İLE FLUKONAZOL MİKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARI

IV.9.1. 0.1 N Perklorik Asit'in Hazırlanması

8.2 ml % 70'lik perklorik asit 900 ml glasiyal asetik asitle karıştırıldı. Üzerine 32 ml anhidr asetik asit

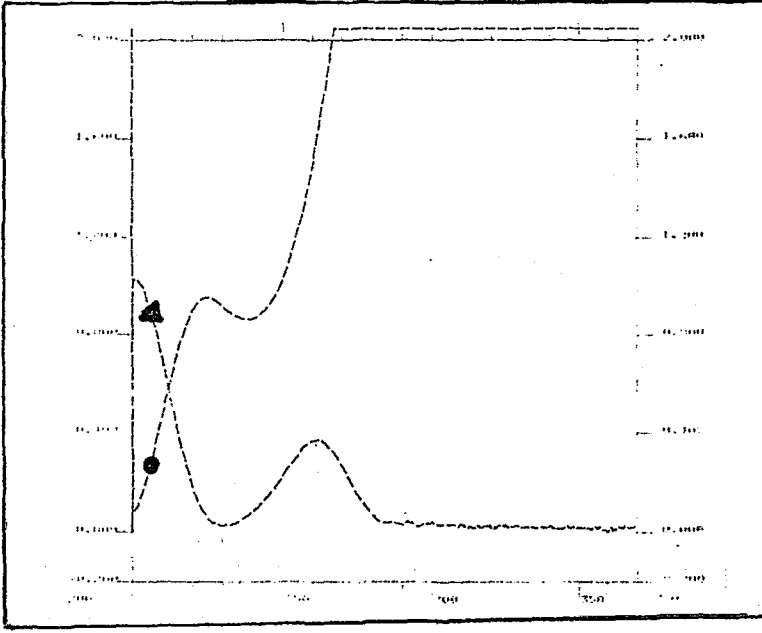
ilave edildi. Karıştırıldı. Glasiyal asetik asitle 1000 ml ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. Hazırlanan çözeltinin normalitesi primer standart potasyum hidrojen ftalat ile indikatör olarak kristal viole kullanılarak ayarlandı.

IV.9.2. Numunelerin Hazırlanması

10 kapsül içeriği tartıldı. Kapsül içeriği ortalama ağırlığı bulundu. Homojen hale getirilmiş toz karışımından 150 mg flukonazole eşdeğer toz duyarlı olarak tartıldı. Bir behere aktarıldı. 100 ml glasiyal asetik asit ilave edildi. manyetik karıştırıcı üzerinde 0.1050 N perklorik asitle potansiyometrik titrasyon cihazı kullanılarak titre edildi. Elektrot olarak cam-kalomel çifti kullanıldı. Dönüm noktası titrasyon eğrisi çizilerek ve ayrıca diferansiyel ölçümle en yüksek ΔE değeri bulunarak tesbit edildi. Potansiyometrik titrasyon eğrileri Şekil-14'de, bulunan sonuçlar Tablo-26'da gösterildi.

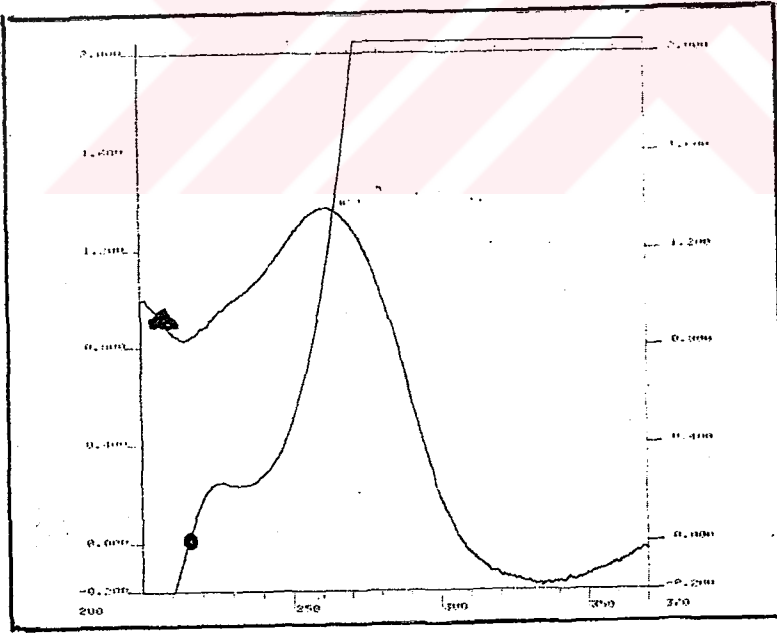
V. B U L G U L A R





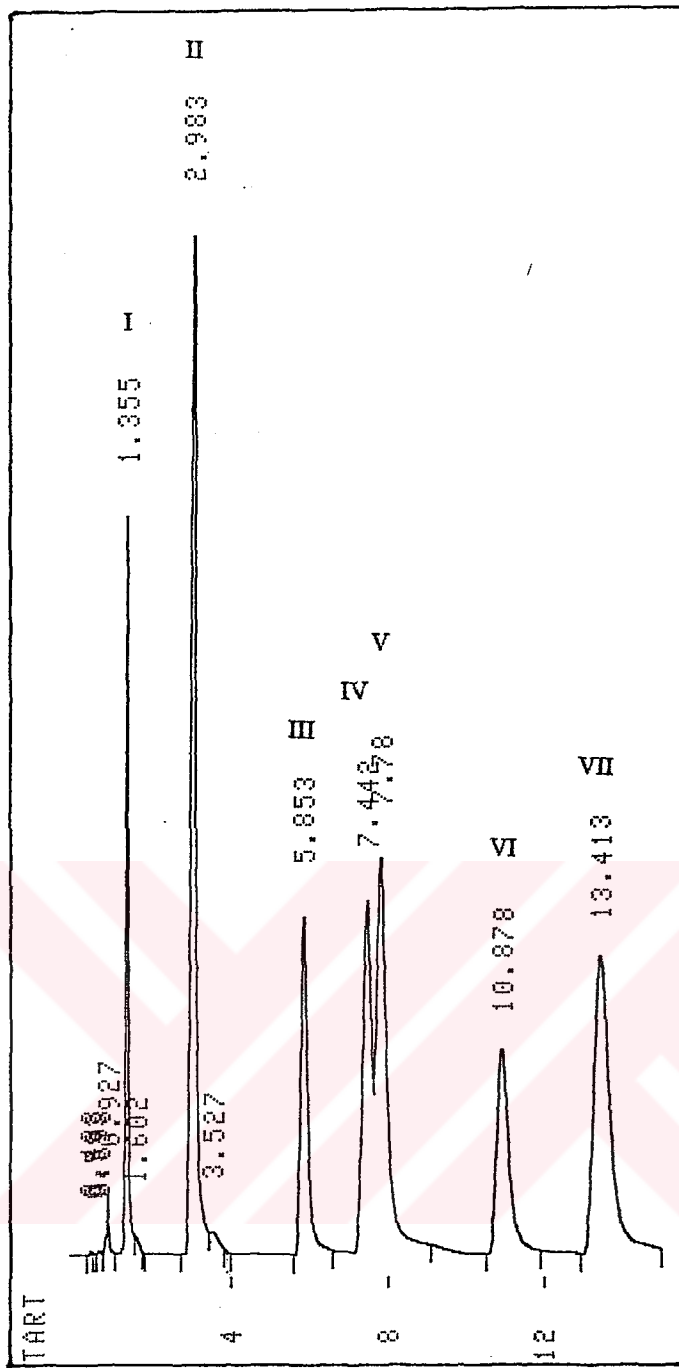
Sekil-1: Flukonazol'Un (ITK) dansitometrik yöntemle elde edilen UV spektrumu

- Silikajel'e ait spektrum.
- ▲ Flukonazol'a ait spektrum ($\lambda_{\max}$ 261 nm)



Sekil-2: Itrakonazol'Un (ITK) dansitometrik yöntemle elde edilen UV spektrumu

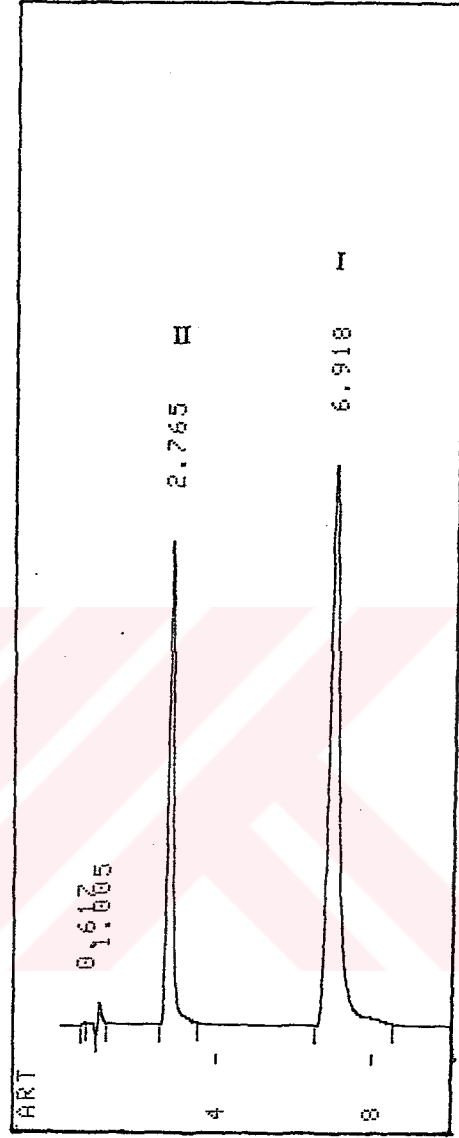
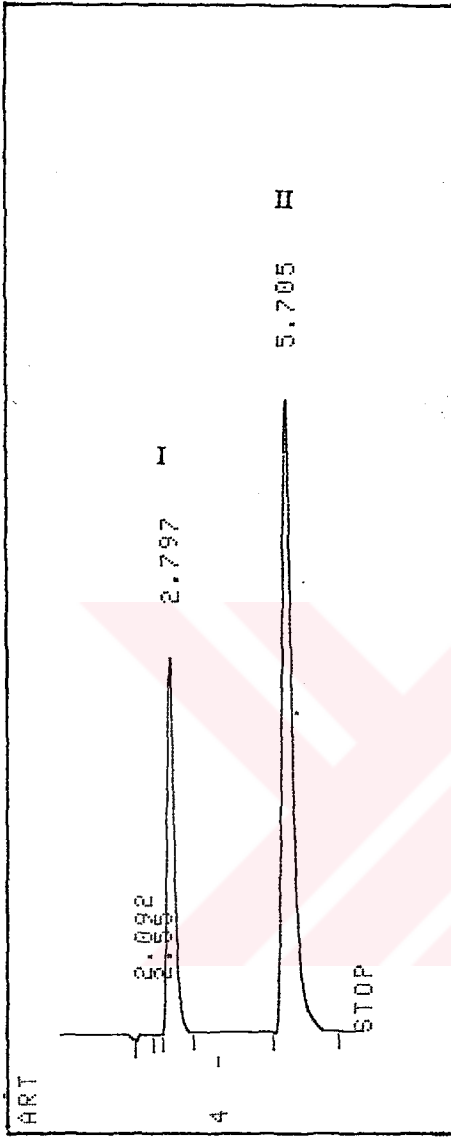
- Silikajel'e ait spektrum.
- ▲ Itrakonazol'e ait spektrum ($\lambda_{\max}$ 260 nm)



Sekil-3: Triazol ve imidazol türevi antifungal ilaçların YBSK kromatogramları

Alıkonma süreleri

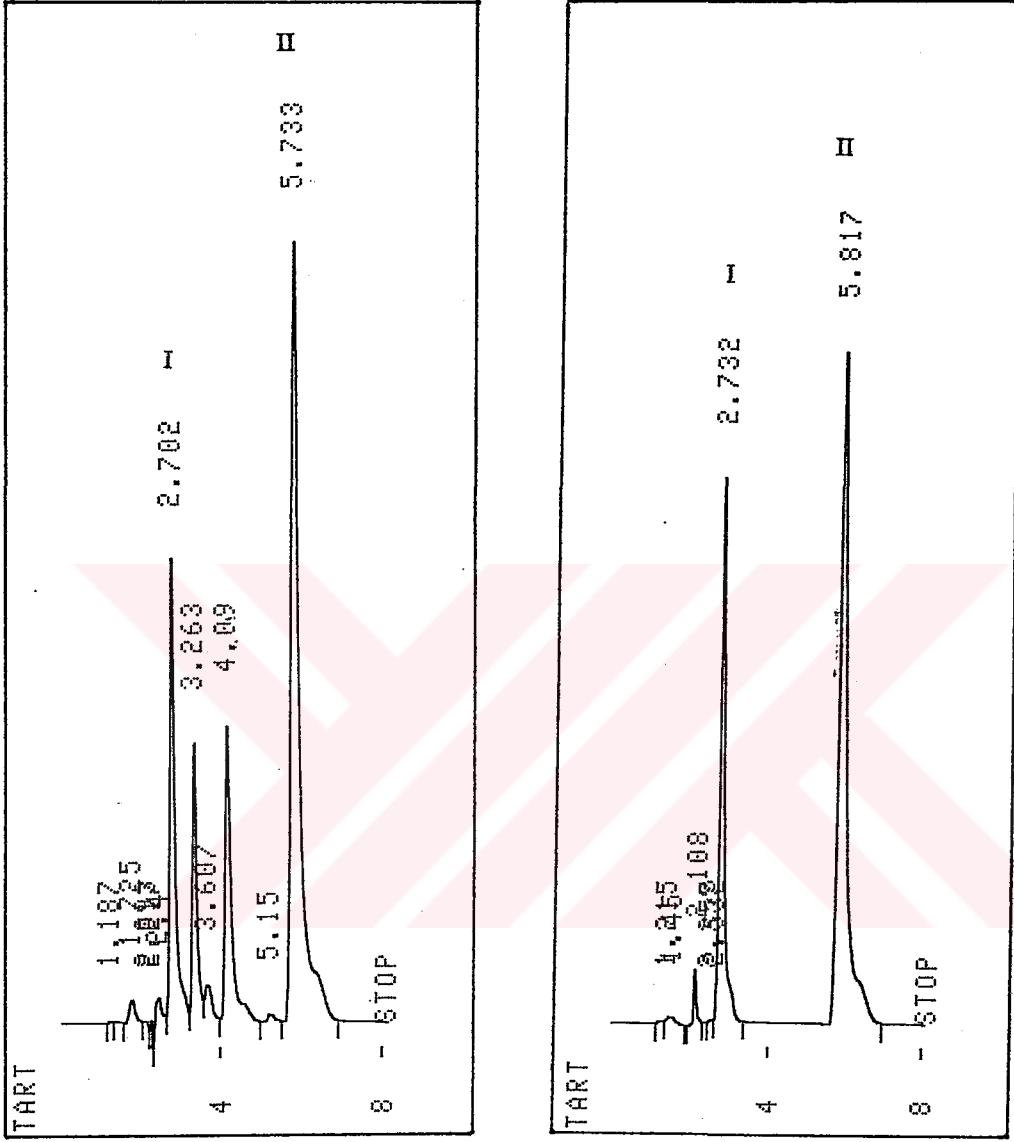
I- Flukonazol	1.35
II- Ketokonazol	2.98
III- Klotrimazol	5.85
IV- Itrakonazol	7.44
V- Tiokonazol	7.78
VI- Oksikonazol	10.88
VII- Mikonazol	13.41



- Flukonazol Kapsul
(I) Flukonazol 2.7
(II) Internal Standart 5.7

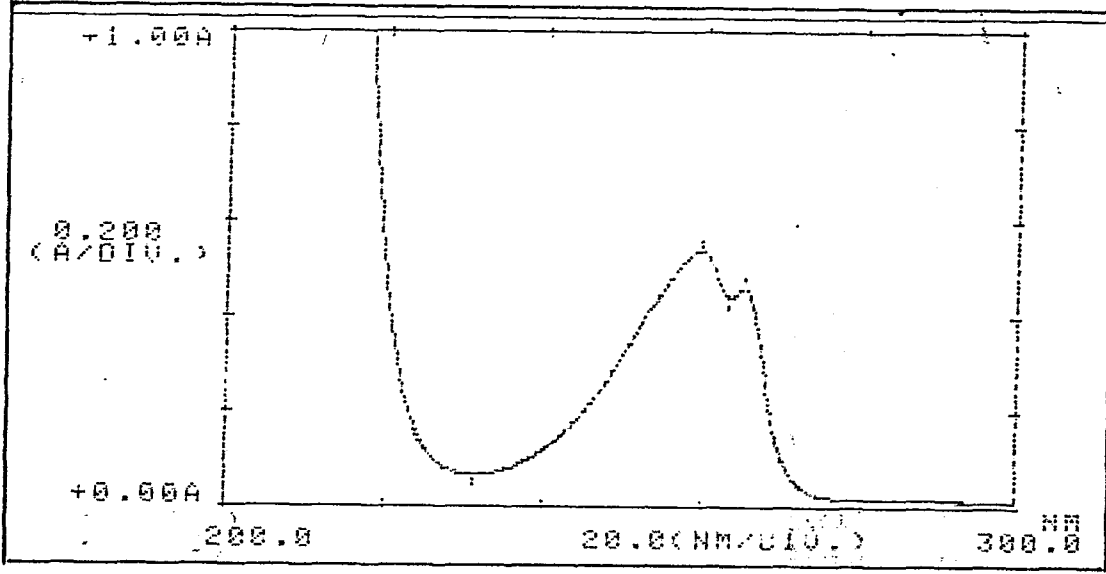
- Itrakonazol Kapsul
(I) Itrakonazol 7.0
(II) Internal Standart 2.7

Sekil-4: YBSK Kromatogramları

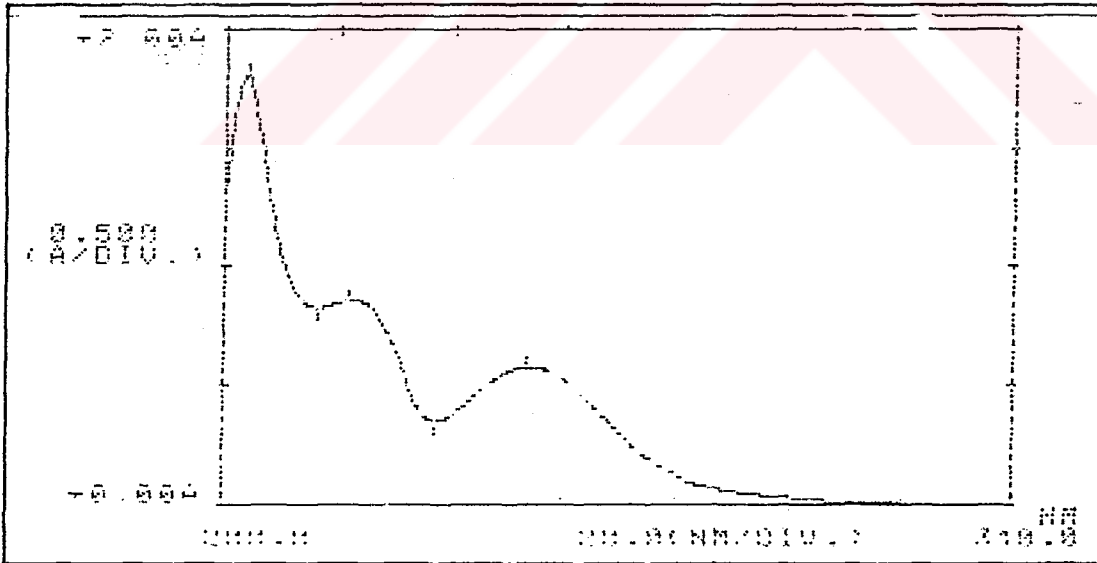


- Flukonazol Surup - Flukonazol IV infüzyon
(I) Flukonazol 2.7 (II) Internal Standart 5.7

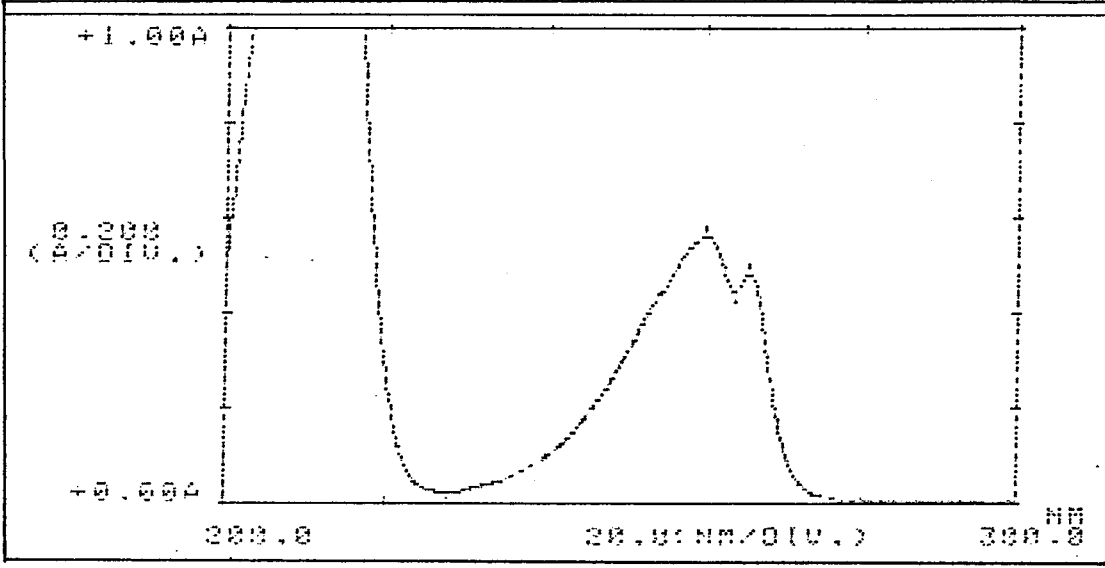
Sekil-5: YBSK Kromatogramları



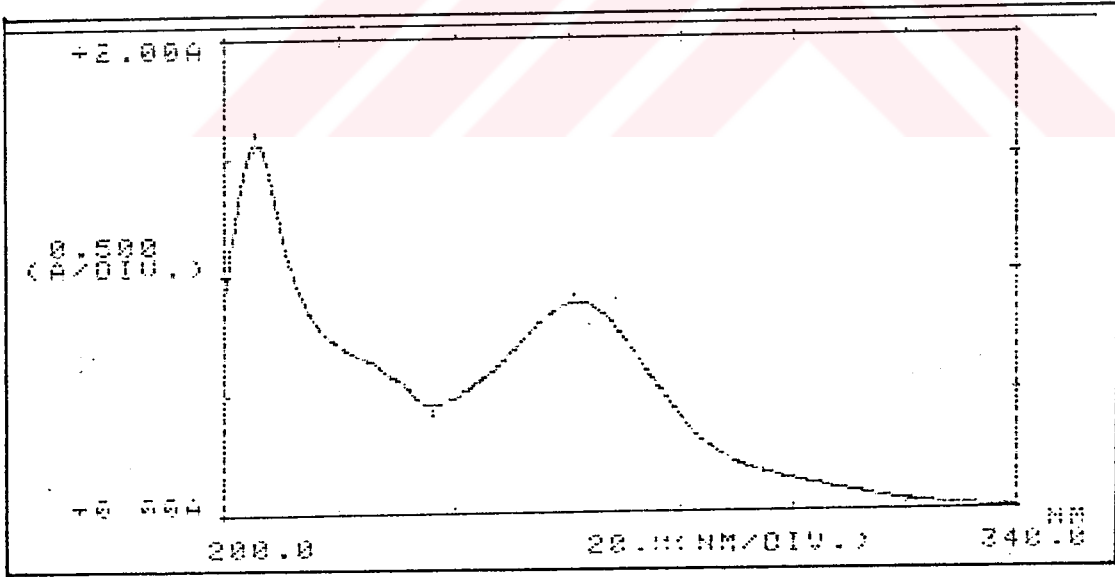
Sekil-6: Flukonazol'un 0.1 N HCl'de UV spektrumu
(λ_{max} = 260 ve 265 nm)



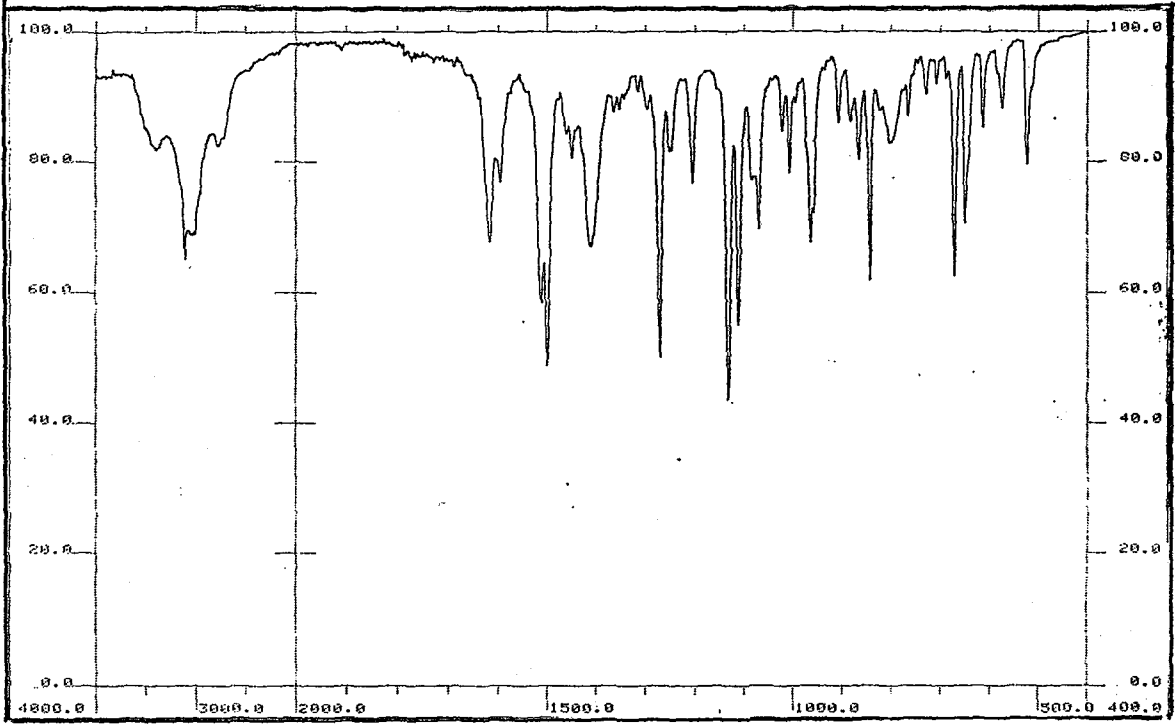
Sekil-7: Itrakonazol'un 0.1 N HCl'de UV spektrumu
(λ_{max} = 221 ve 254 nm)



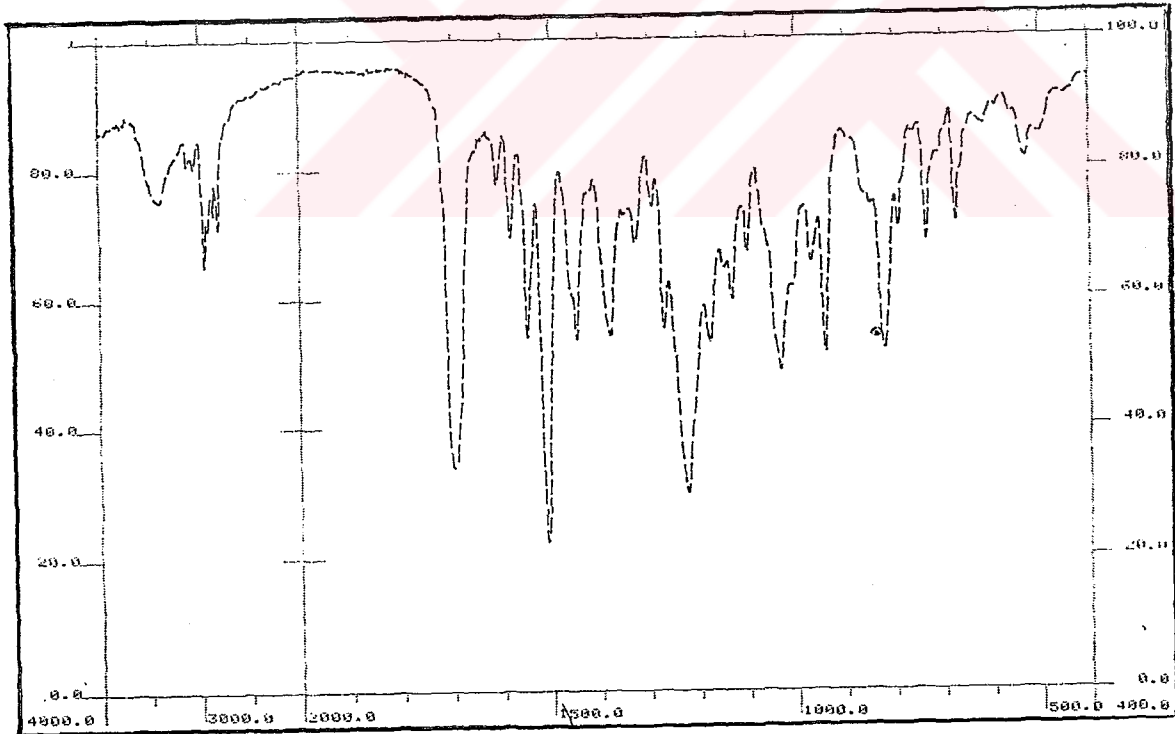
Sekil-8: Flukonazol'Un metanol'de UV spektrumu
($\lambda_{\text{max}} = 260$ ve 265 nm)



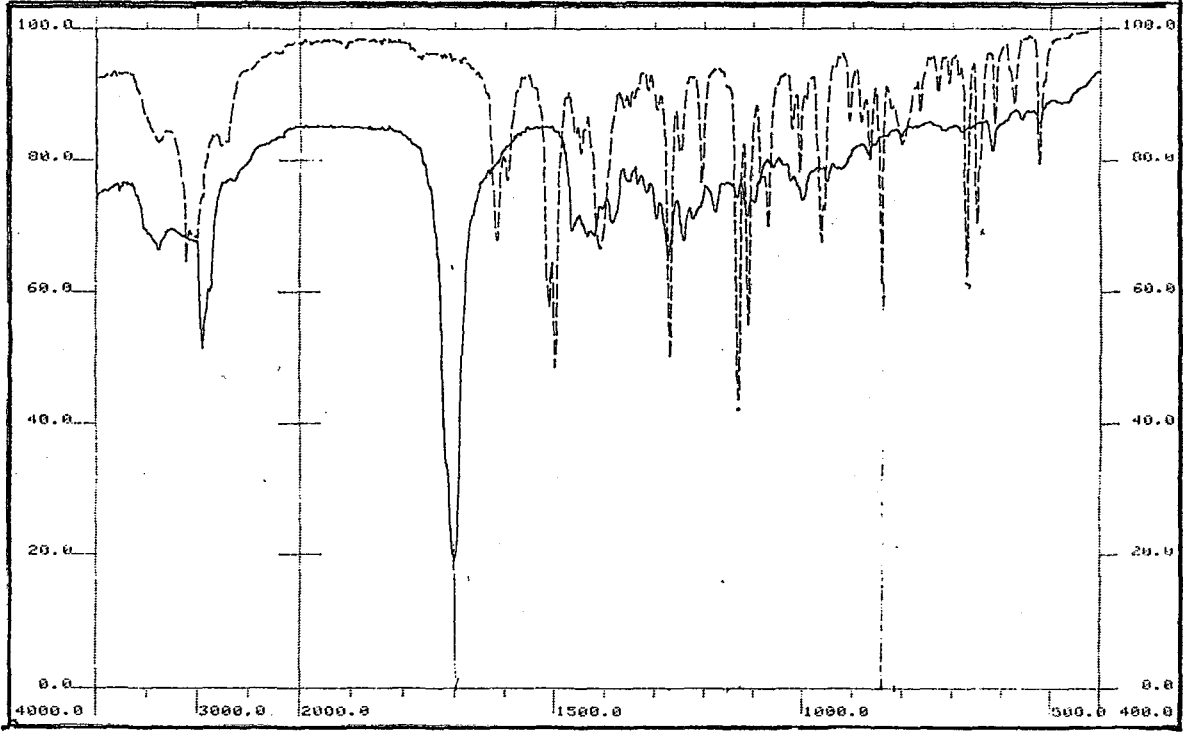
Sekil-9: Itrakonazol'Un metanol'de UV spektrumu
($\lambda_{\text{max}} = 261$ nm)



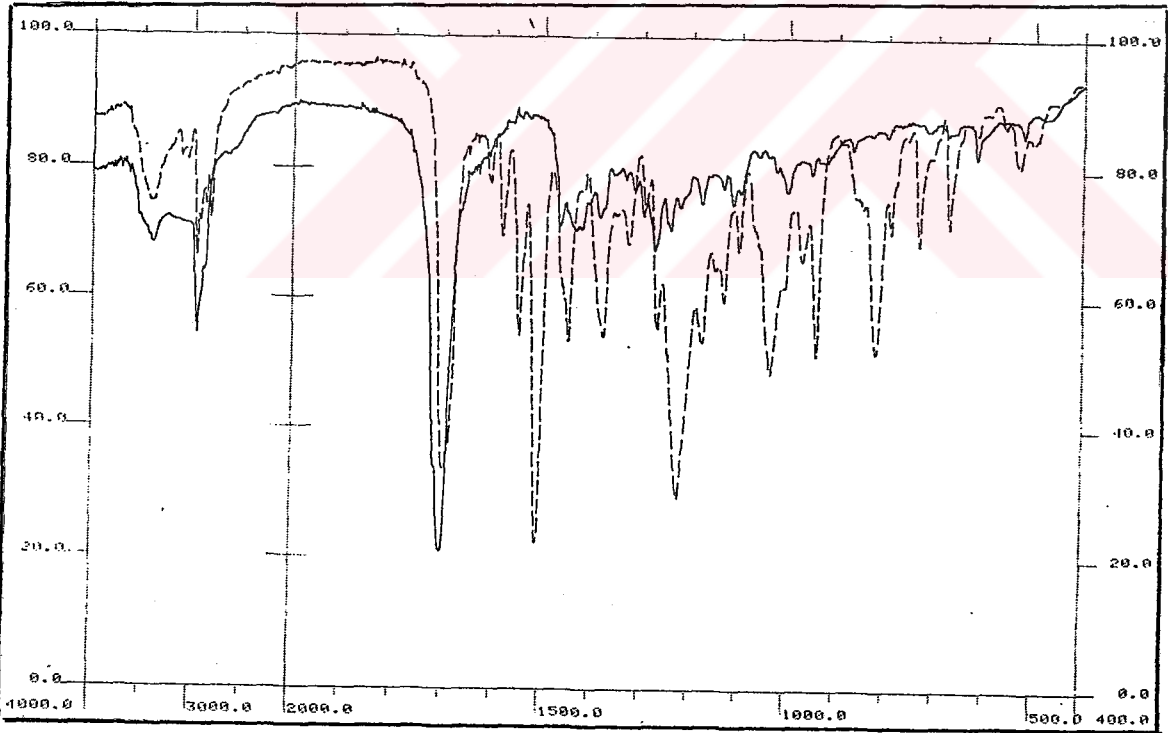
Sekil-10: Flukonazol'Un IR spektrumu



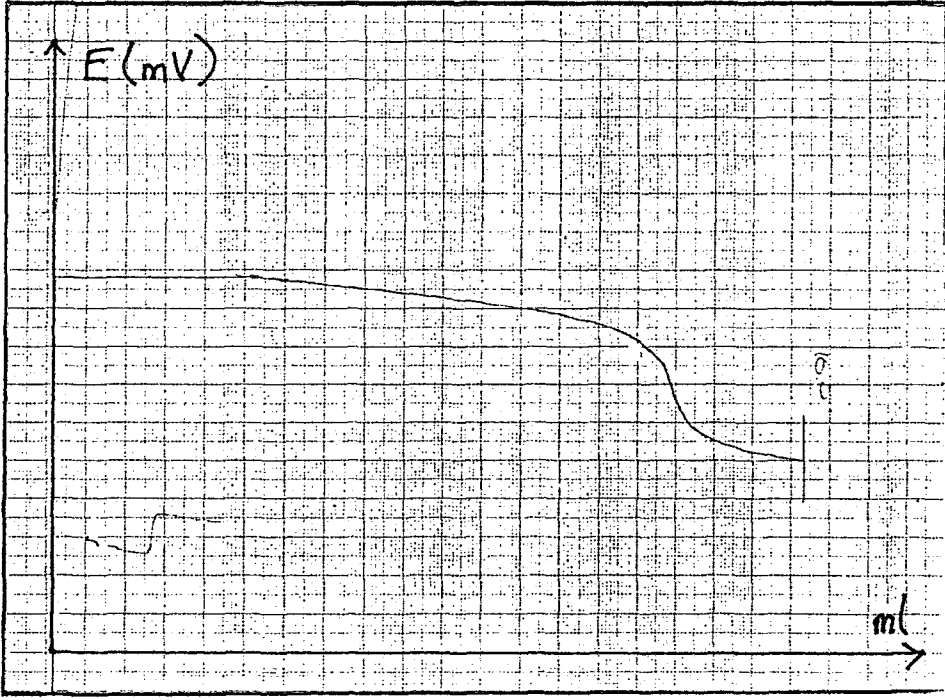
Sekil-11: Itrakonazol'Un IR spektrumu



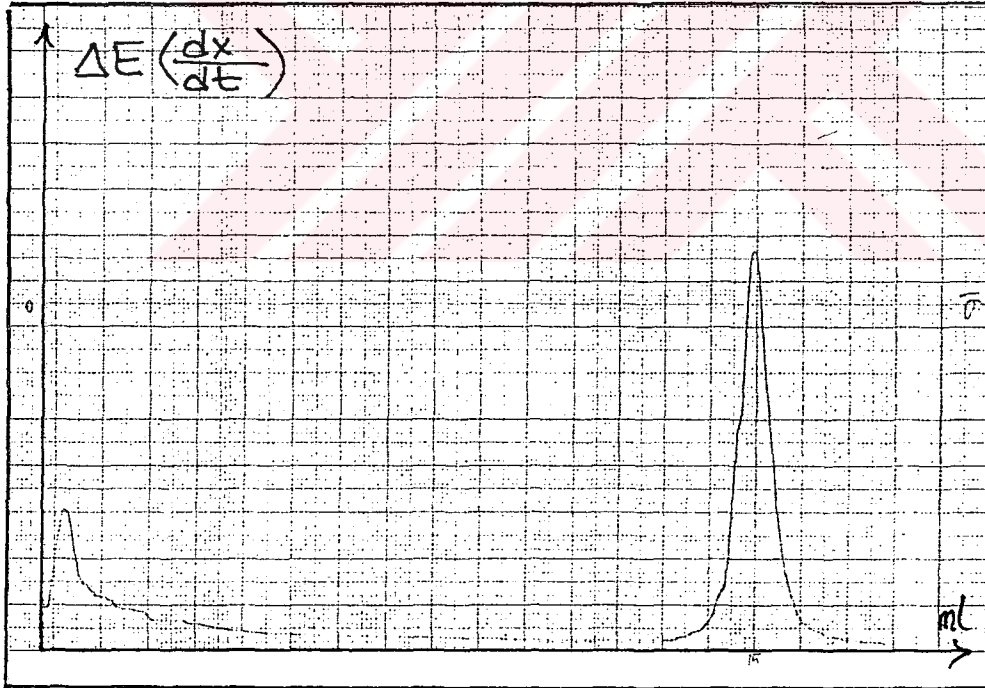
Sekil-12: Flukonazol'Un ve dehidrokolik asid'in (Int.St.)
Ust Uste alınmiş IR spektrumu
—— Dehidrokolik asid -----Flukonazol



Sekil-13: Itrakonazol'Un ve dehidrokolik asid'in (Int.St.)
Ust Uste alınmiş IR spektrumu
—— Dehidrokolik asid -----Itrakonazol



Normal titrasyon eğrisi



Diferansiyel titrasyon eğrisi

Sekil-14: Flukonazol kapsül örneklerinde potansiyometrik yöntem ile elde edilen titrasyon eğrileri

Tablo-1: Mantar enfeksiyonları, enfeksiyon etkenleri, görüldüğü organlar ve kullanılan ilaçlar

İNFEKSİYON	İNFEKSİYON ETKENİ	İNFEKSİYONUN GÖRÜLDÜĞÜ ORGAN	POTENT OLARA KULLANILAN ANTİFUNGAL İLAC
A- NONSİSTEMİK ENFEKSİYONLAR (LOKAL) a- Dermatofitozis	Epidermofiton Mikrosporyum ve Trikofiton türleri	Deri, saç, tırnaklar	Tolnaftat, griseofulvin, klotrimazol, mikonazol, haloprogin, ketokonazol
B- SİSTEMİK ENFEKSİYONLAR a- Aspergillozis b- Blastomikozis c- Kandyazis	Aspergillus türleri Blastomicesdermatidis Kandida türleri, özellikle K.albicans	Dış kulak, göz, akciğer Deri, kemik, testis Solunum yolları,gastrointes- tinal sistem, vagina, deri	Amfoterisin B+5-florositosin Amfoterisin B+ketonazol, Nistatin,klotrimazol,mikonazol ketokonazol, amfoterisin B+ 5-florositosin, flukonazol itrakonazol
d- Koksidioidomikozis	Koksidioides immitis	Akciğer,deri,eklem,beyin zarı	Amfoterisin B, ketonazol
e- Kriptokokozis	Kriptokokus neoformans	Akciğer, beyin zarı	Amfoterisin B+5-florositosin
f- Histoplasmozis	Histoplasma kapsulatum	Akciğer, dalak, karaciğer, lenf nodulleri, böbrek üstü	Amfoterisin B, ketonazol
g- Parakoksidioidomikozis	Parakoksidioides brasiliensis	Deri,burun mukozası, akciğer, lenf nodulleri, karaciğer, böbrek üstü	Amfoterisin B, ketonazol
h- Sporotrikozis	Sporotriks shenkii	Deri, eklem, akciğer	Potasyum iyodür,amfoterisin B

Tablo - 2: İ.T.K.'da kullanılan hareketli faz sistemleri

- 31 - n-Hexan:Kloroform:Metanol:kons.NH₃ (60:30:10:1)
- 32 - Toluen:Etilasetat:Dietilamin (60:30:10)
- 33 - Kloroform:Metanol:Asetikasit (80:10:2)
- 34 - Metilizobutilketon:Asetikasit:Su (40:20:20)
- 35 - Kloroform:Metanol:kons.NH₃ (80:20:1)
- 36 - n-Hexan:Etilasetat:Metanol:Asetikasit:Su (42:40:15:1:2)
- 37 - Etilasetat:İzopropanol:Amonyak (72:28:12)
- 38 - Diklormetan:Metanol:kons.NH₃ (80:20:1)
- 39 - Diklormetan (100)
- 310 - Amonyak ile doyurulmuş diizopropileter
- 311 - Amonyak ile doyurulmuş dietileter
- 312 - Klorform:Metanol:kons.NH₃ (80:10:2)
- 313 - n-Hexan:Etilasetat:Metanol:Su:kons.NH₃ (42:40:15:2:1)
- 314 - n-Hexan:Kloroform:Metanol:(60:30:10)
- 315 - Diklormetan:Etilasetat:Formikasit:Etanol:Su (45:40:10:5:1)
- 316 - Toluen:İzopropranol: 2N NH₃/metanol (70:25:2)
- 317 - Kloroform:Siklohexan:Dietilamin (60:30:10)
- 318 - Benzen:Metanol:Aseton:Asetikasit (70:20:5:5)
- 319 - Kloroform:Dietileter:Metanol:%17 NH₃ (45:45:12:3.75)
- 320 - Metanol:kons.NH₃ (100:1.5)
- 321 - Benzen:Dietileter:Asetikasit:Metanol: (60:30:9:0.5)

Tablo - 3: İmidazol ve triazol türevi antifungal ilaçların İTK yöntemi ile saptanan Rfx100 değerleri

Solvan Sist. Rfx100	Tiokonazol	Ketokonazol	İsokonazol	Bifonazol	Flukonazol	Oksikonazol nitrat	Klotrimazol	Mikonazol nitrat	Itrakonazol
S1	61	20	61	58	5	60	68	64	47
S2	60	31	65	63	0	64	72	67	65
S3	72	66	73	80	59	83	85	82	90
S4	75	47	77	79	64	84	82	81	93
S5	52	25	52	52	27	58	59	59	57
S6	90	89	90	90	66	90	90	91	90
S7	93	87	93	92	63	93	93	94	95
S8	93	89	93	93	72	94	93	93	97
S9	Hepsi Startta								
S10	4	0	7	8	0	5	19	5	0
S11	29	0	39	36	0	34	55	34	6
S12	94	90	92	92	56	92	92	92	95
S13	72	38	74	67	32	73	72	77	56
S14	52	36	49	48	19	45	56	46	38
S15	45	0	58	61	24	63	65	60	44
S16	66	39	69	69	22	70	72	69	67
S17	80	57	80	76	1	79	85	83	86
S18	78	68	77	78	61	79	80	78	83
S19	93	77	92	91	32	92	93	93	95
S20	85	83	85	84	75	85	83	86	89
S21	3	0	5	10	4	13	30	8	24

Tablo - 4: İmiazol ve triazol türevi antifungal ilaçların İTK yönteminde değişik reaktiflerle verdiği renkler

	Tiokonazol	Ketokonazol	Isokonazol	Bifonazol	Flukonazol	Oksikonazol nitrat	Klotrimazol	Mikonazol nitrat	Itrakonazol
UV 254 nm	Koyu leke	Koyu leke	Koyu leke	Koyu leke	Koyu leke	Koyu leke	Koyu leke	Koyu leke	Koyu leke
366 nm	--	--	--	--	--	--	--	--	Pembe leke
Dragendorff	Turuncu	Turuncu	Turuncu	Turuncu	--	Turuncu	Turuncu	Turuncu	Sarı
İyodo-Platinat	Mavi	Mor	Mavi	Bordo-Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Mavi	Kahverengi

Tablo - 5: İTK yöntemi ile saptanan en düşük konsantrasyon düzeyleri

	Flukonazol	Itrakonazol
UV - lamba	~ 4-5 mcg	0.5 mcg
AgNO ₃ çözeltisi	~ 4-5 mcg	~ 2 mcg
Potasyum iodoplatinat çözeltisi	~ 1 mcg (oldukça hafif)	0.5 mcg

Tablo - 6: Flukonazol için dansitometrik yöntem ile elde edilen regresyon değerleri

	Kapsül örnekleri için	Şurup örnekleri için
$y = a x + b$	$y=1761.78 x + 5922.5$	$y=2214.5 x - 2496.1$
r	0.9985	0.9954
r^2	0.9970	0.9907

Tablo - 7: Itrakozazol için dansitometrik yöntem ile elde edilen regresyon değerleri

$y = a x + b$	$y=27282.4 x + 7527.3$
r	0.9949
r^2	0.9897

Tablo - 8: Flukonazol kapsül örneklerinden dansitometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar

	150 mg/kapsül	%
	144.6	96.4
	142.6	95.1
	140.1	93.4
	142.2	94.8
	146.4	97.6
$\bar{X}$	143.2	
S	2.40	
% Bağıl St.Sap.	% 1.68	
Güven Aralığı p= 0.05	140.2 - 146.2	

Tablo - 9: Flukonazol surup örneklerinden dansitometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar

	750 mg/150 ml	%
	710.5	94.7
	736.4	98.2
	726.4	96.9
	745.7	99.4
	765.7	102.1
$\bar{X}$	737.0	
S	20.72	
% Bağlı St.Sap.	% 2.81	
Güven Aralığı p= 0.05	711.2 - 762.7	

Tablo - 10: Itrakonazol kapsül örneklerinden dansitometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar

	100 mg/kapsül	%
	104.1	104.1
	99.8	99.8
	96.0	96.0
	103.2	103.2
	97.9	97.9
$\bar{X}$	100.2	
S	3.43	
% Bağlı St.Sap.	% 3.42	
Güven Aralığı p= 0.05	95.9 - 104.5	

Tablo - 11: Flukonazol için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemi ile bulunan regresyon değerleri

$y = a x + b$	$y=0.1685 X + 0.0068$
r	0.9997
r^2	0.9994

Tablo - 12: Itrakonazol için (YBSK) yöntemi ile bulunan regresyon değerleri

$y = a x + b$	$y=3.6492 X + 0.0426$
r	0.9996
r^2	0.9992

Tablo - 13: Flukonazol kapsül örneklerinden YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar

	150 mg/kapsül	%
	151.0	100.7
	148.6	99.1
	151.0	100.7
	147.9	98.6
	148.1	98.8
$\bar{X}$	149.3	
S	1.55	
% Bağlı St.Sap.	% 1.04	
Güven Aralığı p= 0.05	147.4 - 151.3	

Tablo - 14: Flukonazol intravenöz İnfüzyon çözelti örneklerinden YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar

	200 mg/100 ml	%
	201.7	100.9
	199.1	99.5
	199.7	99.8
	202.5	101.2
	203.6	101.8
$\bar{X}$	201.3	
S	1.88	
% Bağlı St.Sap.	% 0.93	
Güven Aralığı p= 0.05	199.0 - 203.7	

Tablo - 15: Flukonazol surup örneklerinden YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar

	750 mg/150 ml	%
	744.5	99.3
	733.0	97.7
	740.5	98.7
	734.8	98.0
	728.2	97.1
$\bar{X}$	736.2	
S	6.40	
% Bağlı St.Sap.	% 0.87	
Güven Aralığı p= 0.05	728.2 - 744.2	

Tablo - 16: Itrakonazol kapsül örneklerinden
YBSK yöntemi ile elde edilen sonuçlar

	100 mg/kapsül	%
	98.5	98.5
	98.5	98.5
	97.2	97.2
	99.2	99.2
	98.1	98.1
$\bar{X}$	98.3	
S	0.73	
% Bağıl St.Sap.	% 0.74	
Güven Aralığı p= 0.05	97.4 - 99.2	

Tablo - 17: Flukonazol'un UV-spektroskopik yöntemle bulunan regresyon değerleri

	0.1 N HCl	MeOH
$y = a x + b$	$y=2.082 X + 0.0049$	$y=2.148 X + 0.0222$
r	0.9999	0.9996
r^2	0.9998	0.9992
A_{λ}^1 (%1,1 cm)	21.2	23.6
ϵ	649.4	722.9

Tablo - 18: Itrakonazol'un UV-spektroskopik yöntemle bulunan regresyon değerleri

	0.1 N HCl	MeOH
$y = a x + b$	$y=32.175 X + 0.0056$	$y=43.850 X + 0.0154$
r	0.9999	0.9997
r^2	0.9998	0.9995
A_{λ}^1 (%1,1 cm)	326	458
ϵ	23004	32318

Tablo - 19: Flukonazol kapsül örneklerinden
UV-Spektroskopik yöntem ile elde
edilen sonuçlar

	0.1 N HCl		Metanol	
	150 mg/kapsül	%	150 mg/kapsül	%
	147.1	98.1	150.6	100.4
	148.1	98.8	149.4	99.6
	147.3	98.2	149.9	100.0
	148.6	99.1	147.7	98.5
	150.7	100.5	148.9	99.2
$\bar{X}$	148.4		149.3	
S	1.45		1.11	
% Bağıl St.Sap.	% 0.98		% 0.74	
Güven Aralığı p= 0.05	146.6 - 150.2		147.9 - 150.7	

Tablo - 20: Flukonazol intravenöz infüzyon örneklerinden UV-Spektroskopik yöntem ile elde edilen sonuçlar

	0.1 N HCl		Metanol	
	200 mg/100 ml	%	200 mg/100 ml	%
	204.2	102.1	205.4	102.7
	203.4	101.7	202.5	101.2
	202.8	101.4	204.9	102.5
	201.7	100.9	204.1	102.1
	205.5	102.7	201.2	100.6
$\bar{X}$	203.5		203.6	
S	1.42		1.74	
Bağıl St.Sap.	% 0.70		% 0.85	
Güven Aralığı p= 0.05	201.7 - 205.3		201.5 - 205.8	

Tablo - 21: Itrakonazol kapsül örneklerinden UV-Spektroskopik yöntem ile elde edilen sonuçlar

	0.1 N HCl		Metanol	
	100 mg/kapsül	%	100 mg/kapsül	%
	100.3	100.3	101.8	101.8
	101.3	101.3	101.1	101.1
	99.5	99.5	100.5	100.5
	100.5	100.5	100.2	100.2
	101.5	101.5	99.7	99.7
$\bar{X}$	100.6		100.7	
S	0.79		0.83	
% Bağıl St.Sap.	% 0.78		% 0.83	
Güven Aralığı p= 0.05	99.6 - 101.6		99.6 - 101.7	

Tablo - 22: IR spektroskopisi yöntemi ile flukonazol - dehidrokolik asid absorbans ölçüm değerleri

ST	Tablet Ağırlığı (mg)	Flukonazol					Dehidrokolik asit (internal Standart)		
		Konsan-trasyon	960 cm^{-1}		675 cm^{-1}		Konsan-trasyon	1700 cm^{-1}	
			P_B-P_0	$\log P_B/P_0$	P_B-P_0	$\log P_B/P_0$		P_B-P_0	$\log P_B/P_0$
ST ₁	123.5	0.492	90.5-59.8	0.1799	87.1-61	0.157	0.2455	89-34.7	0.4093
ST ₂	122.8	0.9726	89-39.8	0.3494	86.4-42	0.3133	0.234	89.8-33.5	0.4283
ST ₃	121.2	1.434	84-24.2	0.5405	81.8-23.8	0.5362	0.239	82.5-31.2	0.4220
ST ₄	124	1.708	83.9-21	0.6015	82.8-20.1	0.6150	0.244	79-29.3	0.4308
ST ₅	116.7	1.794	84.6-18.7	0.655	82.6-16.6	0.6966	0.224	80.5-29.8	0.4310

Tablo - 23: Flukonazol'un IR spektroskopisi yöntemi ile bulunan regresyon değerleri

ST	$X = C_F / C_D$	$Y = \frac{A_F}{A_D}$	
		960 cm^{-1}	675 cm^{-1}
ST ₁	2.004	0.4395	0.3780
ST ₂	4.002	0.8158	0.7315
ST ₃	6.000	1.280	1.2706
ST ₄	7.000	1.3962	1.4276
ST ₅	8.000	1.5120	1.6162
$y = a x + b$		$y = 0.1829 x + 0.084$	$y = 0.213 x - 0.066$
r		0.9982	0.9966
r^2		0.9964	0.9932

C_F = Tabletteki flukonazol konsantrasyonu

C_D = Tabletteki dehidrokolik asid konsantrasyonu

A_F = Flukonazol log P_B/P_0 değeri

A_D = Dehidrokolik asid log P_B/P_0 değeri

Tablo - 24: Flukonazol Kapsül Örneklerinden IR Spektroskopisi yöntemi ile elde edilen sonuçlar (675 cm^{-1})

NUMUNE	Tablet Ağırlığı (mg)	Tabletteki Konsan-trasyon	$P_B - P_0$		$\log P_B / P_0$		Bulunan Değer (mg)	Bulunan Değer (%)
			1700 cm^{-1}	675 cm^{-1}	1700 cm^{-1}	675 cm^{-1}		
Fluko-nazol 150 mg kapsül	128.2	0.510	89.2-37.9	87.1-64.6	0.372	0.130	146.2	97.5
	124	0.494	88.7-38.0	88.5-64.4	0.368	0.136	153.7	102.5
	125.6	0.500	89.0-37.3	88.2-65.2	0.377	0.130	144.6	96.4
	125.4	0.499	88.5-37.1	89.0-65.6	0.378	0.131	145.2	96.8
	126.5	0.503	89.1-37.3	89.5-66.4	0.378	0.129	144.0	96.0
$\bar{X}$							146.7	
S							3.97	
% Bağıl St.Sap.							% 2.70	
Güven Aralığı $p=0.05$							141.8 - 151.7	

Tablo - 25: Flukonazol Kapsül Örneklerinden IR Spektroskopisi yöntemi ile elde edilen sonuçlar (960 cm^{-1})

NUMUNE	Tablet Ağırlığı (mg)	Tabletteki Konsan-trasyon	$P_B - P_0$		$\log P_B / P_0$		Bulunan Değer (mg)	Bulunan Değer (%)
			1700 cm^{-1}	960 cm^{-1}	1700 cm^{-1}	960 cm^{-1}		
Fluko-nazol 150 mg kapsül	128.2	0.510	89.2-37.9	90.5-61.7	0.372	0.166	148.5	99.0
	124	0.494	88.7-38.0	89.7-60.8	0.368	0.1682	153.0	102.0
	125.6	0.500	89.0-37.3	89.5-61.5	0.377	0.163	142.8	95.2
	125.4	0.499	88.5-37.1	88.7-60.6	0.378	0.165	144.4	96.3
	126.5	0.503	89.1-37.3	89.0-61.3	0.378	0.161	140.2	93.5
$\bar{X}$							145.8	
S							5.04	
% Bağıl St.Sap.							% 3.46	
Güven Aralığı p=0.05							139.5 - 152.0	

Tablo - 26: Flukonazol kapsül örneklerinden
Potansiyometrik titrasyon yöntemiyle
elde edilen sonuçlar

	150 mg/kapsül	%
	152.3	101.5
	151.7	101.1
	150.9	100.6
	152.8	101.9
	152.0	101.3
$\bar{X}$	151.9	
S	0.72	
% Bağlı St.Sap.	% 0.47	
Güven Aralığı p= 0.05	151.1 - 152.8	

Tablo - 27: Uygulanan yöntemlerle elde edilen sonuçların istatistiksel verileri

Preparat		Densitometri	Y.B.S.K.	UV Spektrofotometri		IR Spektrofotometri		Susuz ortamda Titrasyon
				0.1 N HCl	MeOH	675 cm ⁻¹	960 cm ⁻¹	
Flukonazol Kapsül 150 mg/kapsül	a	143.2	149.3	148.4	149.3	146.7	145.8	151.9
	b	% 1.68	% 1.04	% 0.98	% 0.74	% 2.70	% 3.46	% 0.47
	c	140.2 - 146.2	147.4 - 151.3	146.6 - 150.2	147.9 - 150.7	141.8 - 151.7	139.5 - 152.0	151.1 - 152.8
Flukonazol Şurup 750 mg/150 ml		737.0	736.2					
		% 2.81	% 0.87	--	--	--	--	--
		711.2 - 762.7	728.2 - 744.2					
Flukonazol IV infüzyon çözeltisi 200 mg/100 ml		--	201.3	203.5	203.6			
			% 0.93	% 0.70	% 0.85	--	--	--
			199.0 - 203.7	201.7 - 205.3	201.5 - 205.8			
Itrakonazol Kapsül 100 mg/kapsül		100.2	98.3	100.6	100.7			
		% 3.42	% 0.74	% 0.78	% 0.83	--	--	--
		95.9 - 104.5	97.4 - 99.2	99.6 - 101.6	99.6 - 101.7			

a : Aritmetik ortalama ($\bar{X}$)

b : Yüzde bağıl standart sapma (Varyasyon katsayısı)

c : p=0.05 Güven aralığı

Tablo-28: Student-t (ortalamlar arası fark) testine göre yöntemlerin karşılaştırılması

(10-2=8 serbestlik derecesinde $p=0.05$ olasılık düzeyine göre tablo t değeri 2.31)

Flukonazol Kapsül			
Dans - YBSK	$t = 3.88 >$	2.31	Anlamlı
Dans - UV 0.1 N HCl	$t = 3.32 >$	"	"
Dans - UV MeOH	$t = 3.85 >$	"	"
Dans - IR 675 cm^{-1}	$t = 2.38 >$	"	"
Dans - IR 960 cm^{-1}	$t = 1.83 <$	"	Anlamsız
Dans - Potan.tit.	$t = 5.37 >$	"	Anlamlı
YBSK - UV 0.1 N HCl	$t = 0.55 <$	"	Anlamsız
YBSK - UV MeOH	$t = 0.02 <$	"	"
YBSK - IR 675 cm^{-1}	$t = 1.49 <$	"	"
YBSK - IR 960 cm^{-1}	$t = 2.05 <$	"	"
YBSK - Potan.tit.	$t = 1.49 <$	"	"
UV 0.1 N HCl - UV MeOH	$t = 0.52 <$	"	"
UV 0.1 N HCl - IR 675 cm^{-1}	$t = 0.94 <$	"	"
UV 0.1 N HCl - IR 960 cm^{-1}	$t = 1.49 <$	"	"
UV 0.1 N HCl - Potan.tit.	$t = 2.05 <$	"	"
UV MeOH - IR 675 cm^{-1}	$t = 1.47 <$	"	"
UV MeOH - IR 960 cm^{-1}	$t = 2.02 <$	"	"
UV MeOH - Potan.tit.	$t = 1.52 <$	"	"
IR 675 cm^{-1} - IR 960 cm^{-1}	$t = 0.55 <$	"	"
IR 675 cm^{-1} - Potan.tit.	$t = 2.99 >$	"	Anlamlı
IR 960 cm^{-1} - Potan.tit.	$t = 3.54 >$	"	"
Flukonazol IV Infuzyon			
YBSK - UV 0.1 N HCl	$t = 2.04 <$	2.31	Anlamsız
YBSK - UV MeOH	$t = 2.13 <$	"	"
UV 0.1 N HCl - UV MeOH	$t = 0.09 <$	"	"
Flukonazol Şurup			
Dans - YBSK	$t = 0.07 <$	2.31	Anlamsız
Itrakonazol Kapsül			
Dans - YBSK	$t = 1.62 <$	2.31	Anlamsız
Dans - UV 0.1 N HCl	$t = 0.34 <$	"	"
Dans - UV MeOH	$t = 0.37 <$	"	"
YBSK - UV 0.1 N HCl	$t = 1.97 <$	"	"
YBSK - UV MeOH	$t = 2.00 <$	"	"
UV 0.1 N HCl UV MeOH	$t = 0.03 <$	"	"

Tablo-29: Yöntemlerin duyarlılık açısından varyans analizi ile kıyaslanması

		F değerleri	
		Bulunan	Tablo
Parasetamol Kapsül	Dansitometri-IR 675 cm^{-1} -IR 960 cm^{-1}	1.078 < 3.78	Fark yok
	YBSK-UV MeOH-UV 0.1 N HCl	0.761 < 19.41	Fark yok
	YBSK-IR 675 cm^{-1} -IR 960 cm^{-1}	1.170 < 3.88	Fark yok
	YBSK-Potansi.titras.	11.652 > 5.32	Fark var
	UV MeOH-UV 0.1 N HCl-IR 675 cm^{-1} -IR 960 cm^{-1}	1.125 < 3.25	Fark yok
	YBSK-UV MeOH-UV 0.1 N HCl-Potans.titras.	7.543 > 3.24	Fark var
	Dansitometri-YBSK-IR 675 cm^{-1} -IR 960 cm^{-1}	2.61 < 3.24	Fark yok
Parasetamol IV Infüzyon	YBSK-UV MeOH-UV 0.1 N HCl	2.92 < 3.88	Fark yok
Parasetamol Şurup	Dansitometri-YBSK	0.002 < 238.9	Fark yok
Parasetamol Kapsül	Dansitometri-YBSK-UV MeOH-UV 0.1 N HCl	1.81 < 3.24	Fark yok

VI. T A R T I S M A V E S O N U C

Bu çalışmada substitue triazol yapısı içeren antifungal ilaçların nitel ve nicel saptamalarında yararlanılacak duyarlı, hızlı ve kolay uygulanabilir bazı yöntemlerin geliştirilmesi ve bu yöntemlerin duyarlılık açısından karşılaştırılması yapılmıştır. Triazol halkası içeren antifungal ilaçlar mantar infeksiyonlarında tedaviye en son katılan ve özellikle sistemik infeksiyonlarda etkili olan ilaçlardır. Ülkemizde halen bu grup ilaçlardan flukonazol ve itraconazol ruhsatlandırılmış olup değişik farmasötik biçimde piyasaya sunulmuştur.

Çalışmamızda flukonazol içeren kapsül, şurup ve intravenöz infüzyon çözeltisi ile itraconazol içeren mikropellet kapsüller kullanılmıştır.

Yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmalarında, flukonazol ve itraconazol'un halen Ülkemizde tedavide kullanılan lokal ve sistemik etkili imidazol türevi diğer antifungal ilaçların yanısıra nitel tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için 21 değişik solvent sistemi denenmiş ve sabit faz olarak Silica gel 60_{F254} standart hazır plaklar kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramların incelenmesinde flukonazol ve itraconazol'un asit karakterli hareketli faz sistemlerinde (S3, S4, S6, S18) fronta yakın yerlere sürüklen-

dikleri gözlenmiştir. Flukonazol bazik karakterli sistemlerde (S1, S2, S17) daha düşük Rf değerleri vermektedir. S7 sistemi bazik özellikte olmasına rağmen elde edilen sonucun (Rf:0.63) sistemin polaritesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Hareketli faz sistemlerinin polaritesi arttıkça flukonazol ve itrakonazol'un Rf değerleri yükselmektedir (S4,S6,S8,S20). Hareketli faz sistemlerinin polaritesi azaldıkça her iki etken maddenin Rf değerleri düşmektedir (S2, S11, S17, S21). 21 değişik kromatogramın incelenmesinde flukonazol'un tüm hareketli faz sistemlerinde imidazol türevi diğer antifungal ilaçlardan daha düşük Rf değerleri verdiği gözlenmiştir. Flukonazol yine denenen tüm sistemlerde itrakonazol'den düşük Rf değerleri vermiştir. S1, S3, S5, S7,S12, S13, S16, S19 sistemleri flukonazol'u diğer imidazol türevi antifungal ilaçlardan ayıran hareketli faz sistemleri olarak saptanmıştır. S3, S4, S5, S6, S13, S16 sistemleri flukonazol ve itrakonazol'un birbirinden iyi ayrıldığı hareketli faz sistemleri olarak gözlenmiştir.

Elde edilen kromatogramlar UV lambası (254 ve 366 nm) altında incelenmiş, ayrıca gümüş nitrat, potasyum iodo-platinat ve dragendorff reaktifleri püskürtülerek oluşan renkler incelenmiştir. UV 254 nm'de tüm maddeler koyu lekeler halinde gözlenmiştir. 366 nm'de ise sadece itrakonazol pembe bir renk vermiş, diğerlerinde hiçbir renk tesbit edilememiştir. Dragendorff reaktifi flukonazol ile renk vermezken diğer antifungal ilaçlarla turuncu, itrakonazol ile sarı

renk oluşturmıştır. Tüm maddeler gümüş nitrat reaktifi ile açık gri zemin üzerinde beyaz lekeler vermiştir. 110°C etüvde tutulan plaklarda bütün maddelere ait lekelerde esmerleşmeler oluşurken flukonazol lekesi beyaz olarak kalmıştır. Potasyum iodoplatinat çözeltisi ise daha seçici bir özellik göstermiştir. Bu reaktif ile mikonazol, isokonazol ve tio-konazol mavi, ketokonazol mor, flukonazol, itrakonazol, oksikonazol ve bifonazol kahverengi renk vermiştir.

ITK yöntemiyle yapılan diğer bir çalışmada, flukonazol ve itrakonazol'un bu yöntemle saptanması mümkün olabilecek en düşük konsantrasyonunun tesbiti işlemidir. Bilindiği gibi flukonazol %80 oranında metabolize olmadan idrara geçen bir antifungal ilaçtır. Bu çalışma idrar örneklerinde yapılacak semikantitatif değerlendirmelerde ITK yönteminin ne ölçüde kullanılabileceğinin saptanması amacı ile yapılmış ve tesbit edilebilecek en küçük konsantrasyonun miktarını belirlemek amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada flukonazol ve itrakonazol'un 0.1-10 mcg aralığındaki miktarları plağa uygulanmış ve developpe edilmiştir. Plaklar UV 254 nm, gümüş nitrat ve potasyum iodoplatinat reaktifi püskürtülerek incelenmiştir. Flukonazol'un UV 254 nm lamba altında ve gümüş nitrat çözeltisi püskürtülerek 5 mcg konsantrasyon civarında saptanabileceği, iodoplatinat çözeltisi ile bu tesbitin 1 mcg ölçüsüne inebileceği gözlenmiştir. Itrakonazol da ise UV 254 nm lamba altında ve iodoplatinat çözeltisi püskürtülerek 0.5

mcg konsantrasyonda leke gözlemek mümkün olmaktadır. Gümüş nitrat ile bu tesbit 2 mcg civarında bulunmuştur.

Ayrıca ITK yöntemi ile nicel değerlendirmeler yapılmış, bunun için dansitometrik yöntemden yararlanılmıştır. Plak üzerine değişik konsantrasyonlarda aynı hacimde tatbik edilen flukonazol ve itrakonazol uygun bir sistemde developpe edildikten sonra reflektans modunda tarama yapılarak 261 nm'deki absorbands siddetleri pik alanı olarak ölçülmüştür. Bulunan değerlerden yararlanılarak her iki madde için regresyon denklemleri oluşturulmuştur. Aynı konsantrasyondaki çözeltilerin değişik plaklara tatbiklerinde saptanan pik alanlarında farklılıklar tesbit edildiğinden, standart ve numune çalışmalarının aynı plakta yapılmasının en uygun sonuçları verdiği gözlenmiştir. Plaga tatbik işleminin otomatik aplikasyon yerine manuel olarak yapılmasının elde edilecek sonuçların duyarlılığını olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir. Bağlı standart sapma flukonazol için % 1.68-2.81, itrakonazol için % 3.42 bulunmuştur.

Çalışmalarımızda nitel ve nicel tayinler için yararlandığımız diğer bir kromatografi yönteminde yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir.

Nitel çalışmalarda flukonazol ve itrakonazol'un yanısıra halen ülkemizde yaygın olarak kullanılan beş adet imidazol türevi antifungal ilacın alıkonma zamanları saptanmıştır. Seçilen kolon, hareketli faz ve geliştirilen çalışma

koşulları ile flukonazol, itrakonazol, ketokonazol, oksikonazol, tiokonazol, klotrimazol ve mikonazol'u birbirinden ayırmak mümkün olmuştur. Denenen etken maddelerden sadece itrakonazol ve tiokonazol'un pikleri birbirine oldukça yakındır. Diğerleri için elde edilen alıkonma zamanları tatmin edici düzeydedir (Şekil-3).

Nicel çalışmalarda internal standart yöntemi kullanılarak piyasa örneklerinde miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. Her iki etken madde için internal standart olarak ketokonazol kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan etken madde ve internal standart karışımından oluşan standart çözeltilerin kromatogramları değerlendirilmiş, etken madde ve internal standart pik alanları oranı kullanılarak her iki madde için ayrı regresyon denklemleri oluşturulmuştur. Uygulanan YBSK yöntemi ile flukonazol içeren kapsül, IV infüzyon ve sirup örnekleri ile itrakonazol içeren mikropellet kapsüllerin nicel tayinleri yapılmıştır. Bağlı standart sapma flukonazol için %0.87-1.04, itrakonazol için %0.74 olarak bulunmuştur.

UV spektrofotometresi yöntemi ile yapılan miktar tayini çalışmalarında her iki etken madde için hazırlanan ve konsantrasyonları Beer-Lambert yasasının geçerli olduğu sınırlar içinde kalan bir dizi standart çözeltinin absorban değerlerinden yararlanılmış ve her madde için ayrı ayrı regresyon denklemleri oluşturulmuştur. Bu yöntemde her defasında yeni bir referans çözeltisi hazırlamaya gerek yok-

tur. Dolayısı ile çok defa oldukça pahalı olan çözücülerin daha az harcanması söz konusudur. Bu yöntem her zaman grafik yöntemi ile elde edilen (konsantrasyon-absorbans doğrusu ile) sonuçlardan daha duyarlı sonuçlar vermektedir.

Çalışmalarda metanol ve 0.1 N HCl çözücü olarak kullanılmıştır. Ölçümlerde flukonazol için metanol ve 0.1 N HCl'de 260 nm'deki, itrakonazol için metanolde 261 nm, 0.1 N HCl'de 254 nm'deki absorbans değerlerinden yararlanılmıştır. Flukonazol'un 0.1 N HCl ve metanolde 260 nm'de saptanan molar absorbtivite değerleri sıra ile $\epsilon=649$ ve 723 bulunmuştur. Bu nedenle numune çalışmalarında konsantrasyon aralığı ml'de 50-400 mcg olarak seçilmiştir. Itrakonazol'un ise 0.1 N HCl 254 nm'de ve metanol 261 nm'de saptanan molar absorbtivite değerleri sıra ile $\epsilon=23000$ ve 32300 bulunmuştur. Numune çalışmalarında buna bağlı olarak konsantrasyon aralığı ml'de 5-25 mcg arasında seçilmiştir. Bağlı standart sapma değerleri flukonazol ve itrakonazol için sırasıyla %0.70-0.98, %0.78-0.83 sınırları arasında bulunmuştur.

Miktar tayini çalışmalarında kullanılan diğer bir spektrofotometrik yöntemde IR spektroskopisidir. Bu çalışmada Beer-Lambert yasasından yararlanılarak etken madde konsantrasyonu ile flukonazol'un 675 ve 960 cm^{-1} 'deki karakteristik piklerin absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki esas alınmıştır. Çalışmalarda dehidrokolik asit internal standart olarak kullanılmıştır. Dehidrokolik asitin 675 ve 960 cm^{-1} 'de herhangi bir absorbsiyon piki yoktur. Bunun yanısıra fluko-

5.

nazol'un absorpsiyon pikinin olmadığı 1700 cm^{-1} 'de ise dehidrokolik asidin karbonil grubuna ait kuvvetli bir absorpsiyon piki vardır. Baska bir deyişle 1700 cm^{-1} 'de flukonazol dehidrokolik asiti, 675 ve 960 cm^{-1} 'de dehidrokolik asit flukonazol'u interfere etmemektedir (Şekil-12). Itrakonazol'de ise böyle bir özellik söz konusu değildir. Çünkü her iki etken maddenin 1700 cm^{-1} 'deki pikleri çakışmaktadır. Bu nedenle itrakonazol'un IR spektroskopisi yöntemi ile miktar tayini yapılamamıştır.

Nicel çalışmalarda KBr tablet tekniği kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonda etken madde ve internal standart içeren birdizi tablet numunesi hazırlanmış ve bu tabletlerin alınan spektrumunda 1700 , 960 ve 675 cm^{-1} 'deki piklerin $\log P_B/P_0$ değerleri bulunmuştur. Regresyon denklemlerinin oluşumunda X değerleri olarak flukonazol, dehidrokolik asit konsantrasyon oranı; Y değerleri olarak flukonazol, dehidrokolik asit $\log P_B/P_0$ oranı kullanılmıştır. Her iki dalga boyununda elde edilen regresyon denklemlerinde uygun korelasyon değerleri bulunmuştur. Bağlı standart sapma $\%2.7-3.4$ olarak saptanmıştır.

Flukonazol içeren şurup ve IV infüzyon çözeltisinde çözücü su olduğu için KBr tablet tekniği ile miktar tayini yapmak mümkün olmamıştır.

Flukonazol kapsüllerde susuz ortamda potansiyometrik titrasyon yöntemi yardımı ile nicel tayinler yapılmış-

tır. Bu çalışmada zayıf bazların kuvvetli asitler içinde kuvvetli bazlar gibi hareket ederek asitlerle titre edilebilme özelliğinden yararlanılmıştır. Yapılan çalışmalarda potansiyometrik titrasyon cihazı kullanılmış elde edilen titrasyon eğrileri değerlendirilerek ekivalen nokta bulunmuştur. Bu eğrilerde harcanan HClO_4 miktarı apsiste, ölçülen gerilim farkı (E, milivolt) veya gerilim farkı değerinin türev değerleri (ΔE) ordinatta gösterilmiştir.

Flukonazol şurup ve IV infüzyon çözeltisinde çözülür olarak su kullanıldığından bu yöntem uygulanamamıştır. Flukonazol kapsül için bağıl standart sapma % 0.47 olarak saptanmıştır. Itrakonazol içeren mikropelletlerde potansiyometrik titrasyon yönteminin yanısıra kristal viole yardımı ile perklorik asit titrasyonu yapılmış uygun ve kabul edilebilir sonuçlar elde edilmemiştir.

Ayrıca analiz sonuçlarının istatistiksel yönden irdelenmesi yapılmıştır. Bulunan sonuçlar student-t testi ve varyans analizine tabi tutulmuştur. Student testinde bulunan t değeri % 95 olasılık düzeyinde, 8 serbestlik derecesinde tablodan bulunan değerle karşılaştırılmıştır (Tablo-28). Hesaplanan değer tablo değerinden küçük olması, karşılaştırılan iki yöntemin bulunan ortalama değerleri arasındaki farkın anlamlı olmadığını (önemsiz) ortaya koymuştur. Varyans analizinde iki veya daha fazla yöntemin duyarlılık açısından karşılaştırılması yapılmış ve bunun için bilgisayar programından yararlanılmıştır. Sonuçlardan hesapla

bulunan F değerleri tablodaki F değeri ile karşılaştırılmıştır. Bulunan değerin tablo değerinden küçük oluşu yöntemler arasındaki standart sapmaların anlamlı olmadığını ( nemsiz) göstermiştir(Tablo-29).

Elde edilen bulgulara göre flukonazol ve itrakonazol'un değişik farmasötik formlarına uygulanan yöntemlerin doğrusallık ve duyarlılık açısından çok belirgin farklılıkları yoktur. Uygulanan tüm yöntemlerde $p=0.05$ güven aralığında bulunan değerler farmakopelerin benzer nitelikteki ilaçlar için kabul ettiği sınırlar içinde kalmaktadır. Bu durum uygulanan tüm yöntemlerde gözlenmekle birlikte uygulama kolaylığı ve değişik farmasötik formlardaki ilaçlara tatbik etme avantajı açısından UV spektroskopisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemlerinin diğerlerine tercih edilebileceği düşünülmektedir.

VII. Ö Z E T

Flukonazol ve itrakonazol içeren değişik farmasötik biçimdeki ilaçlar sistemik mantar infeksiyonlarında ve özellikle kandidiazis'de etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Tedaviye yeni sunulan bu ilaçlar henüz hiçbir farmakopede yer almamaktadır.

Yapılan literatür incelemelerinde anılan etken maddelerin farmasötik preparatlarında kantitatif amaçla yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu amaçla flukonazol ve itrakonazol'un ülkemizde ruhsatlandırılmış piyasa örneklerinde nitel ve nicel çalışmalar yapılması düşünülmüştür.

Nitel tayinlerde İTK ve YBSK yöntemlerinden yararlanılmıştır. İTK çalışmalarında denenen 21 değişik solvent sisteminde flukonazol ve itrakonazol'un yanısıra imidazol halkası taşıyan diğer antifungal ilaçların Rf_{x100} değerleri bulunmuştur. Kullanılan solvent sistemlerinde flukonazol ve itrakonazol'un diğer antifungal ilaçların yanında nitel değerlendirmesine imkan verecek uygun Rf değerleri bulunmuştur.

Ayrıca İTK yöntemi ile en düşük etken madde miktarını saptama çalışmaları yapılmıştır.

YBSK yönteminde önerilen kolon, hareketli faz ve çalışma koşullarında yedi değişik antifungal ilaç için uygun alıkonma zamanları (retention time) elde edilmiştir.

Nicel tayinlerde dansitometri, YBSK, UV ve IR spektroskopisi ile susuz ortamda potansiyometrik titrasyon yöntemleri kullanılmıştır.

Dansitometrik çalışmalarda plak üzerine tatbik edilen farklı konsantrasyonlardaki standart maddelerin 261 nm'deki absorpsiyon değerlerinden yararlanılmıştır. Oluşturulan regresyon denklemleri flukonazol ve itrakonazol preparatlarının kantitatif tayininde kullanılmıştır.

YBSK yöntemi ile yapılan kantitatif çalışmalarda internal standart olarak ketokonazol kullanılmıştır. Etkin madde/internal standart oranları ve etkin madde/internal standart pik alanı oranları kullanılarak regresyon denklemleri oluşturulmuş ve bunlardan yararlanılarak preparatların kantitatif tayinleri yapılmıştır.

UV spektroskopisi yönteminde her iki etkin maddenin 0.1 N HCl ve MeOH'de saptanan λ_{max} noktasındaki absorpsiyon değerlerinden yararlanılmıştır. Oluşturulan regresyon denklemleri kantitatif tayinlerde kullanılmıştır.

IR spektroskopisi yönteminde KBr tablet tekniği uygulanmıştır. Flukonazol için 675 cm^{-1} ve 960 cm^{-1} 'deki karakteristik piklerden yararlanılmıştır. Internal standart

olarak dehidrokolik asit kullanılmıştır. Regresyon denklemlerinin oluşturulması ve kantitatif çalışmalarda, etken madde ve internal standart'ın $\log P_b/P_o$ değerlerinin oranları kullanılmıştır. Dehidrokolik asit itrakonazol için uygun bir internal standart olmadığından bu yöntem itrakonazol'e uygulanamamıştır.

Susuz ortamda yapılan potansiyometrik titrasyon yönteminde, dnm noktası titrasyon eğrisinden yararlanılarak ve en yüksek gerilim farkı trevini (ΔE) bularak saptanmıştır. Uygulanan yöntemlerin kendi aralarında duyarlılık açısından istatistiksel irdelenmesi yapılmıştır.

VIII. S U M M A R Y

Drugs containing fluconazole and itraconazole and having different pharmaceutical forms are effectively used in systemic fungal infections and particularly in candidiasis. The drugs which have been recently introduced into treatment are not, at present, included in any pharmacopeia. Examination of current literature available revealed that there are not any quantitative studies conducted on the pharmaceutical preparations of the above mentioned substances. Therefore, it was considered to carry out qualitative and quantitative studies on the samples of fluconazole and itraconazole in our country.

TLC and HPLC have been employed for qualitative analysis. 21 different solvent systems were used in TLC studies and $R_{f \times 100}$ values of other antifungal agents carrying imidazole ring as well as of fluconazole and itraconazole have been found. In the solvent systems used, appropriate R_f values which enable qualitative assessments of fluconazole and itraconazole, along with other antifungal drugs were found. Furthermore, the studies were conducted to determine the lowest drug concentration by TLC.

Appropriate retention times for seven different antifungal agents have been obtained on suggested column, mobile phase and other conditions by HPLC.

Densitometer, HPLC, UV and IR spectroscopy and non aqueous potentiometric titration have been employed in quantitative analysis.

During densitometric studies, the absorbance values of standard substances at 261 nm in different concentrations applied on plate have been used. Regression equations formed have been used in quantitative analysis on fluconazole and itraconazole preparations.

In quantitative studies carried out with HPLC, ketoconazole was used as internal standard. By using active substance/internal standard ratios and active substance/internal standard peak area ratios, regression equations were formed and quantitative analysis of the preparations were carried out by using these equations.

The absorbance values of both active substances at λ_{max} determined in 0.1 N HCl and MeOH have been employed in UV spectroscopy method. Regression equations formed have been used in quantitative studies.

KBr tablet technique was applied in IR spectroscopic method. Characteristic peaks at 675 cm^{-1} and 960 cm^{-1} have been used for fluconazole. Dehydrocholic acid was used as internal standard. During the formation of regression equations and quantitative studies, the ratios of $\log P_{\text{B}}/P_{\text{O}}$ values of active substance and internal standard have been employed. As dehydrocholic acid is not a suitable

internal standard for itraconazole, this method has not been used for itraconazole.

In nonaqueous potentiometric titration, the end-point has been determined by using the titration and first derivative curve.

All these methods were compared statisticly in terms of sensitivity.



IX. K A Y N A K L A R

- 1- GOODMAN GILMAN,A., The Pharmacological Basic of Therapeutics 8.Edition. Chapter:50 1165-1181 Pergamon Press, New York (1990).
- 2- KOROLKOVAS,A., Essential of Medicinal Chemistry A Wiley-Interscience Publication, New York, 680-699 (1988).
- 3- FOYE,W.O., Principles of Medicinal Chemistry Chapter:35 731-738, Lea-Febiger/Philadelphia-London, (1989).
- 4- KAYAALP,S.P., Rasyonel Tedavi Yönünden Farmakoloji, 5.Baskı Cilt:I Konu:30, 806-835, Feryal Matbaacılık, Ankara (1991).
- 5- ARDA,M.,Mikoloji (Genel ve Özel) A.U.Vet.Fak.,Yayınları, No:366 A.U.Basımevi, Ankara (1980).
- 6- BINDSCHADLER,D.D., BENNETT,J.E., A Pharmacologic guide to the clinical use of amphotericin B. J.Inject Dis. 120, 427-436 (1969).
- 7- BENNETT,J.E., ve ark., A Comparison of amphotericin B. alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. N. Eng. J. Med., 301, 126-131 (1979).
- 8- GULL,K., TRINCI,A.P.J., Griseofulvin inhibits fungal mitosis, Nature. 244, 292-294 (1973).
- 9- AOYAGI,N., OGATA,H., KANIWA,N., Bioavailability of griseofulvin from tablets in humans and the correlation with its dissolution rate. J.Pharma.Sci., 71, 1165-1169 (1982).
- 10- SMITH,E.B., POWELL,R.F.,GRAHAM,J.L., Topical undecylenic acid in tinea pedis a newlook. Int.J.Dermatol., 16, 52-56 (1977).
- 11- MEDORF,G., BRAJTBURG,J., KORAGRASHI,G., BOLARD,J.,Anti-fungal agents useful in the therapy of sistemic fungal infection.Annu.Rev.Pharmacol.Toxico.,23, 303-330 (1983).
- 12- SMEGO,R.A, PERFECT,J.R., DURACK,D.T., Combined therapy with amphotericin B and 5-fluorocytosine for candida meningitis. Rev.Inject.Dis., 6, 791-801 (1984).
- 13- RITTER,W., PATZSCHKE,K., KRAUSE,U., Pharmacokinetic fundamentals of vaginal treatment with clotrimazole Chemotherapy 28(1), 37-42 (1982).

- 14- KRAUSE,U., Results of a single-dose treatment of vaginal mycoses with 500 mg canesten vaginal tablets. Chemoterapy, 28(1), 99-105 (1982).
- 15- KJAELDGGAARD,A., Comparison of terconazole and clotrimazole vaginal tablets in the treatment of vulvovaginal candidiasis. Pharmatherapeutica, 4, 525-531 (1986).
- 16- DANESHMEND,T.K., WARNOCK,D.W., Clinical Pharmacokinetics of ketoconazole. Clin.Pharmacokine. 14, 13-34 (1988).
- 17- HEEL,R.C., BROGDEN,R.N., PAKES,G.E., ve ark., Miconazole a preliminary review of its therapeutics efficacy in systemic fungal infections. Drugs, 19, 7-30 (1980).
- 18- HAMILTON-MILLER,J.M.T., Fungal sterols and the mode of action of polyene antibiotics. Adv.Appl.Microbio. 17, 109-134 (1974).
- 19- LOOSE,D.S., KAN,P.B., HIRST,M.A., MARCUS,R.A,FELDMAN,D., Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P₄₅₀-dependent enzymes. J.Clin. Invest. 71, 1495-1499 (1983).
- 20- STERN,J.J., HARTMAN,B.J., SHARKEY,P., Oral fluconazole therapy for patients with acquired immunodeficiency syndrome. Am.J.Med., 297, 178-179 (1988).
- 21- SUGAR,A.M., SAUNDERS,C., Oral fluconazole as supressive therapy of disseminated cryptococcosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Am.J.Med. 85, 481-489 (1988).
- 22- MILES,M.R., OLSEN,L., ROGERS,A., Recurrent vaginal candidiasis: The importance of an intestinal resevoir. J.A.M.A. 238, 1836-1837 (1977).
- 23- TUCKER,R.M., WILLIAMS,P.L., ARATHOON,R.G., LEVINE,B.E., HARSTEIN,A.I., Pharmacokinetics of fluconazole in cerebrospinal fluid and serum in human coccidioidal meningitis. Antimicrob. Agents. Chemother. 32, 369-373 (1988).
- 24- HARDIN,T.C., GRAYBILL,J.R.,FETCHICK,R.,WOESTENBORGHs,R., ve ark. Pharmacokinetics of itraconazole following oral administration to normal volunteers. Antimicrob. Agents. Chemother. 32, 1310-1313.
- 25- HUMPREY,M.J., JEVONS,S., TARBIT,M.H., Pharmacokinetic evaluation of UK-49858 a metabolically stable triazole antifungal drug in animals and humans. Antimicrob. Agents. Chemother. 28(5), 648-653 (1985).

- 26- KOWALSKY,S.F., DIXON,D.M., Fluconazole: A new antifungal agent. Clin.Pharm., 10(3), 179-194 (1991).
- 27- SAAG,M.S.,DISMUKES,W.E.,Azole antifungal agents:Emphasis on new triazoles. Antimicrob.Agents.Chemother. 32(1), 1-8 (1988).
- 28- KIM,E.J., LEE,H.S., ZEE,O.P., LEE,S.T., Sensitive and simplified HPLC analysis for the determination of fluconazole in human plasme. Arch.Pharmacol.Res., 11(3), 250-252 (1988).
- 29- HARRIS,S.C., WALLACE,J.E., FOULDS,G., RINALDI,M.G., Assay of fluconazole by megabore capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-selective detection. Antimicrob.Agents.Chemother. 33(5), 714-716 (1989).
- 30- HOSOTSUBO,K.K., HOSOTSUBO,H., NISHIJIMA,M.K., OKADA,T., TAENAKA,N., YOSHIYA,I., Rapid determination of serum levels of a new antifungal agent, fluconazole by HPLC. J.Chromatog. Biomed.Appl., 94(1), 223-228 (1990).
- 31- BERRIDGE,J.C., BROAD,L.A., Determination of fluconazole in rodent diet using solid-phase extraction and HPLC. Pharm.Biomed.Anal. 5(5), 523-526 (1987).
- 32- WARNOCK,D.W., TURNER,A., BURKE,J., Comparison of high-performance liquid-chromatographic and microbiological methods for determination of itraconazole. J.Antimicrob. Chemother. 21(1), 93-100 (1988).
- 33- BABHAIR,S.A., High-performance liquid chromatography assay of itraconazol in human plasma. J.Liq.Chromatog., 11(15), 3261-3269 (1988).
- 34- WOESTENBORGHS,R., LORREYNE,W.,HEYKANTS,J.,Determination of itraconazole in plasma and animal tissues by HPLC. J.Chromatogr.Biomed.Appl., 57, 332-337 (1987).
- 35- ALLENMARK,S., EDEBO,A., LINDGREN,K., Determination of itraconazole in serum with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. J.Chromatogr. Biomed.Appl., 97, 203-206 (1990).
- 36- WOOD,P.R., TARBIT,M.H., Gas chromatographic method for the determination of fluconazole, a novel antifungal agent, in human plasma and urine. J.Chromatogr.Biomed. Appl., 56, 179-186 (1986).
- 37- BADCOCK,N.R., DAVIES,A., Assay of itraconazole in nail clippings by reversed phase HPLC. Ann.Clin.Biochem., 27(5), 506-508 (1990).

- 38- REMMEL,R.P., DOMBROVSKIS,D., CANAFAX,D.M., Assay of itraconazole in leukemic patient plasma by reversed-phase small-bore liquid chromatography. J.Chromatogr., 432, 388-394 (1988).
- 39- REX,J.H., HANSON,L.H.,AMANTEA,M.A.,STEVENS,D.A.,BENNETT, J.E., Standardization of a fluconazole bioassay and correlation of results with those obtained by HPLC. Antimicrob.Agents.Chemother. 35(5), 846-850 (1991).
- 40- STAHL,E., Thin Layer Chromatography, Chapter-H 2nd Edition, 133-151. Springer-Verlag New York (1969).
- 41- TOUCHSTONE,J.C., DOBBINS,M.F., Practice of Thin Layer Chromatography Chapter-9, 235-271, A Wiley-Interscience Publ. New York (1978).



DZGEÇMİS

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden 1976 yılında mezun oldum. 1977-1978 yılları arasında T.C.Emekli Sandığında eczacı olarak çalıştım. 1978 yılında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı İlaç Kozmetik ve Araştırma Müdürlüğünde göreve başladım. Bugüne kadar bu müdürlüğün değişik laboratuvarlarında görev yaptım. 1983 yılında organize edilen GMP kursunu tamamlayıp bu tarihten itibaren Sağlık Bakanlığının ilaç sanayinde yaptığı denetimlerde teknik eleman olarak görev almaktayım. Halen Geniş Hacimli Parenteral Solusyonları Laboratuvarı sorumlusu olarak aynı kurumda çalışmaya devam etmekteyim.

TRIAZOL HALKASI İCEREN ANTİFUNGAL İLAQLARDA MİKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARI

Ecz.Fatmagül SELÇUK

Tez Yönteicisi:Doç.Dr.Okan ATAY

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, (1993)

Ö Z E T

Flukonazol ve itrakonazol içeren değişik farmasötik biçimdeki ilaçlar sistemik mantar infeksiyonlarında ve özellikle kandidiazis'de etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Tedaviye yeni sunulan bu ilaçlar henüz hiçbir farmakopede yer almamaktadır.

Yapılan literatür incelemelerinde anılan etken maddelerin farmasötik preparatlarında kantitatif amaçla yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu amaçla flukonazol ve itrakonazol'un ülkemizde ruhsatlandırılmış piyasa örneklerinde nitel ve nicel çalışmalar yapılması düşünülmüştür.

Nitel tayinlerde İTK ve YBSK yöntemlerinden yararlanılmıştır. İTK çalışmalarında denenen 21 değişik solvent sisteminde flukonazol ve itrakonazol'un yanısıra imidazol halkası taşıyan diğer antifungal ilaçların Rfx100 değerleri bulunmuştur. Kullanılan solvent sistemlerinde flukonazol ve itrakonazol'un diğer antifungal ilaçların yanında nitel değerlendirmesine imkan verecek uygun Rf değerleri bulunmuştur.

Ayrıca İTK yöntemi ile en düşük etken madde miktarını saptama çalışmaları yapılmıştır.

YBSK yönteminde önerilen kolon, hareketli faz ve çalışma koşullarında yedi değişik antifungal ilaç için uygun alıkonma zamanları (retention time) elde edilmiştir.

Nicel tayinlerde dansitometri, YBSK, UV ve IR spektroskopisi ile susuz ortamda potansiyometrik titrasyon yöntemleri kullanılmıştır.

Dansitometrik çalışmalarda plak üzerine tatbik edilen farklı konsantrasyonlardaki standart maddelerin 261 nm'deki absorptans değerlerinden yararlanılmıştır.Oluşturulan regresyon denklemleri flukonazol ve itrakonazol preparatlarının kantitatif tayininde kullanılmıştır.

YBSK yöntemi ile yapılan kantitatif çalışmalarda internal standart olarak ketokonazol kullanılmıştır. Etken madde/internal standart oranları ve etken madde/internal standart pik alanı oranları kullanılarak regresyon denklemleri oluşturulmuş ve bunlardan yararlanılarak preparatların kantitatif tayinleri yapılmıştır.

UV spektroskopisi yönteminde her iki etken maddenin 0.1 N HCl ve MeOH'de saptanan λ_{max} noktasındaki absorptans değerlerinden yararlanılmıştır. Oluşturulan regresyon denklemleri kantitatif tayinlerde kullanılmıştır.

IR spektroskopisi yönteminde KBr tablet tekniği uygulanmıştır. Flukonazol için 675 cm^{-1} ve 960 cm^{-1} 'deki karakteristik piklerden yararlanılmıştır. Internal standart olarak dehidrokolik asit kullanılmıştır. Regresyon denklemlerinin oluşturulması ve kantitatif çalışmalarda, etken madde ve internal standart'ın $\log P_B/P_0$ değerlerinin oranları kullanılmıştır.Dehidrokolik asit itrakonazol için uygun bir internal standart olmadığından bu yöntem itrakonazol'e uygulanamamıştır.

Susuz ortamda yapılan potansiyometrik titrasyon yönteminde, dönüm noktası titrasyon eğrisinden yararlanılarak ve en yüksek gerilim farkı türevini (ΔE) bularak saptanmıştır. Uygulanan yöntemlerin kendi aralarında duyarlılık açısından istatistiksel irdelenmesi yapılmıştır.

THE QUANTITATIVE STUDIES ON THE ANTIFUNGAL DRUGS CONTAINING TRIAZOLE RING

Ecz.Fatmagül SELÇUK

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Okan ATAY

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, (1993)

SUMMARY

Drugs containing fluconazole and itraconazole and having different pharmaceutical forms are effectively used in systemic fungal infections and particularly in candidiasis. The drugs which have been recently introduced into treatment are not, at present, included in any pharmacopeia. Examination of current literature available revealed that there are not any quantitative studies conducted on the pharmaceutical preparations of the above mentioned substances. Therefore, it was considered to carry out qualitative and quantitative studies on the samples of fluconazole and itraconazole in our country.

TLC and HPLC have been employed for qualitative analysis. 21 different solvent systems were used in TLC studies and $R_f \times 100$ values of other antifungal agents carrying imidazole ring as well as of fluconazole and itraconazole have been found. In the solvent systems used, appropriate R_f values which enable qualitative assessments of fluconazole and itraconazole, along with other antifungal drugs were found. Furthermore, the studies were conducted to determine the lowest drug concentration by TLC.

Appropriate retention times for seven different antifungal agents have been obtained on suggested column, mobile phase and other conditions by HPLC.

Densitometer, HPLC, UV and IR spectroscopy and non aqueous potentiometric titration have been employed in quantitative analysis.

During densitometric studies, the absorbance values of standard substances at 261 nm in different concentrations applied on plate have been used. Regression equations formed have been used in quantitative analysis on fluconazole and itraconazole preparations.

In quantitative studies carried out with HPLC, ketoconazole was used as internal standard. By using active substance/internal standard ratios and active substance/ internal standard peak area ratios, regression equations were formed and quantitative analysis of the preparations were carried out by using these equations.

The absorbance values of both active substances at λ_{max} determined in 0.1 N HCl and MeOH have been employed in UV spectroscopy method. Regression equations formed have been used in quantitative studies.

KBr tablet technique was applied in IR spectroscopic method. Characteristic peaks at 675 cm^{-1} and 960 cm^{-1} have been used for fluconazole. Dehydrocholic acid was used as internal standard. During the formation of regression equations and quantitative studies, the ratios of $\log P_a/P_o$ values of active substance and internal standard have been employed. As dehydrocholic acid is not a suitable internal standard for itraconazole, this method has not been used for itraconazole.

In nonaqueous potentiometric titration, the end-point has been determined by using the titration and first derivative curve.

All these methods were compared statistically in terms of sensitivity.