

17 3749

**TİOKONAZOL'ÜN SÜREKLİ AKIŞ  
İNJEKSİYON ANALİZİ,  
UV-SPEKTROFOTOMETRİK  
VE TİTRİMETRİK YÖNTEMLER İLE  
MİKTAR TAYİNİ**

**TUBA AKYILDIZ**  
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Analitik Kimya Anabilim Dalı  
Ocak-2004

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Tuba AKYILDIZ'ın "TİOKONAZOL'ÜN SÜREKLİ AKIŞ İNJEKSİYON ANALİZİ, UV-SPEKTROFOTOMETRİK VE TİTRİMETRİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ" başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi ...12.02.2004... tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye ( Tez Danışmanı )	: Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR	
Üye	: Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA	
Üye	: Yard. Doç. Dr. Erol AÇIKKALP	
Üye	: .....	
Üye	: .....	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
 ..21.01.2004... tarih ve ..03/1... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TİOKONAZOL'ÜN SÜREKLİ AKIŞ İNJEKSİYON ANALİZİ, UV-SPEKTROFOTOMETRİK VE TİTRİMETRİK YÖNTEMLER İLE MİKTAR TAYİNİ

TUBA AKYILDIZ

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR

2004

Tiokonazol, imidazol sınıfı bileşiklerin bir üyesi olup, antifungal etkiye sahip bir ilaçtır.

Bu çalışmada tiokonazol'ün UV spektrofotometrik, potansiyometrik, kondüktometrik ve sürekli akış injeksiyon analizi (FIA) yöntemleri ile miktar tayinlerinin yapılabilirliği araştırılmıştır. Standart tiokonazol ile çalışıldığında UV spektrofotometrik, FIA, potansiyometrik ve fazla miktarlarda tiokonazol için kondüktometrik yöntemin uygulanabilir yöntemler olduğu bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemler preparatlara uygulanmış, preparatlardaki tiokonazol miktarı, kondüktometrik titrasyonun uygulanabilmesi için yeterli olmadığından bu yöntemin preparatlardaki tiokonazol tayini için uygun bir yöntem olmadığı saptanmıştır. Diğer yöntemlerden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve preparatlardaki tiokonazol tayini için kullanışlı ve uygun yöntemler olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tiokonazol, Sürekli Akış İnjeksiyon Analizi, UV-Spektrofotometri, Potansiyometri, Kondüktometri, Miktar Tayini.

## SUMMARY

Master of Science Thesis

### THE DETERMINATION OF TIOCONAZOLE BY FLOW INJECTION ANALYSIS, UV-SPECTROPHOTOMETRIC, TITRIMETRIC METHODS

TUBA AKYILDIZ

University of Anadolu, Institute of Health Sciences  
Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR

2004

Tioconazole is a member of the imidazole class compounds and is a medicine that has antifungal effect.

The ability of quantity determination of tioconazole with UV-spectrophotometric, potentiometric, conductometric and FIA methods was researched in this study. It was founded that UV spectrophotometric, FIA and potentiometric methods are feasible for the determination on the condition being worked with standart tioconazole. However the conductometric method is suitable for the tioconazole which is in excess amount. The methods which were developed were practiced to the factory made pharmaceutical. Because the amount of tioconazole in the pharmaceuticals wasn't sufficient for the conductometric titration to be practiced, it was stabilized that this method wasn't suitable for the determination of tioconazole in the pharmaceutical preparations.

The results which were handed from other methods were evaluated and it was founded that were useful and suitable methods for the determination of tioconazole in the pharmaceutical dosage forms.

**Keywords:** Tioconazole, Flow Injection Analysis, UV-Spectrophotometry, Potentiometriy, Conductometry, Determination.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince değerli fikirleri ve hoşgörüsüyle beni destekleyen ve yönlendiren danışmanım ve çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR'a;

Çalışmalarımın her aşamasında sonsuz sabır ve özveriyle bana yardımcı olan Eczacılık Fakültesi analitik kimya anabilim dalı Arş. Gör. Kevser KIRCALI'ya;

Eczacılık Fakültesi analitik kimya anabilim dalı Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA'ya;

Araştırmalarım sırasında beni destekleyen ve yardımcı olan arkadaşım Zekiye SÖNMEZ'e, aile dostumuz Mualla SERTOĞLU'na, dayım İsmail KAYALIOĞLU'na, anneme ve babama;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<u>Sayfa</u>	
ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Tiokonazol ile İlgili Genel Bilgi.....	2
2.2. Tiokonazol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.3. Tiokonazol ile İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	4
3. DENEYSEL BÖLÜM .....	7
3.1. Kimyasal Maddeler.....	7
3.2. Aletler.....	7
3.3. Uygulanan Yöntemlerde Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	7
3.3.1. UV Spektrofotometrik Yöntem.....	7
3.3.2. Titrimetrik Yöntemler.....	8
3.3.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi (Flow İnjeksiyon Analiz Yöntemi, FIA).....	8
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	9
4.1. Tiokonazol'ün UV Spektral Karakteristiklerinin İncelenmesi.....	9
4.2. Tiokonazol'ün Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyonu...	10
4.3. Tiokonazol'ün FIA ile İncelenmesi.....	13
4.4. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasotik Preparatlara Uygulanışı.....	16

4.4.1.UV Spektrofotometrik Yöntem ile Farmasotik Preparatlardaki Tiokonazol Tayini.....	16
4.4.2. Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemi ile Farmasotik Preparatlardaki Tiokonazol Tayini.....	17
4.4.3.FIA yöntemi ile Farmasotik Preparatlardaki Tiokonazol Tayini.....	19
4.5.Yöntemlerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	19
KAYNAKLAR.....	22
ÖZGEÇMİŞ.....	23

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

2.2.1. Tiokonazol'ün molekül yapısı	3
4.1.1. Tiokonazol'ün UV spektrumu ( $3 \times 10^{-5}$ M derişimde, metanolde)	9
4.1.2. Tiokonazol'ün UV kalibrasyon grafiği ( $1 \times 10^{-5}$ M- $5 \times 10^{-5}$ M derişim aralığı)	10
4.2.1. Tiokonazol'e ait kondüktometrik titrasyon eğrisi	11
4.2.2. Tiokonazol'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi	12
4.3.1. $1 \times 10^{-5}$ - $5 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki tiokonazol çözeltilerinin FIA sinyalleri	13
4.3.2. FIA dedektör yanıtlarının tekrar edilebilirliği ( $3 \times 10^{-5}$ M tiokonazol çözeltisi için)	14
4.4.2.a. Tablete ait potansiyometrik titrasyon eğrisi	17
4.4.2.b. Merheme ait kondüktometrik titrasyon eğrisi	18



## ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1.FIA ile günler arası kalibrasyon sonuçlarına göre pik alanları	15
4.2.FIA ile gün içi ve günler arası kalibrasyon eğrilerinin karakteristikleri	15
4.3.Tiokonazol'ün tabletteki miktar tayini sonuçları	20
4.4.Tiokonazol'ün merhemdeki miktar tayini sonuçları	21

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiokonazol, imidazol sınıfı bileşiklerin bir üyesi olup duyarlı mantarların (dermatofit ve mayaların) sebep olduğu ve *Candida*'ya bağlı deri enfeksiyonlarında ayrıca duyarlı gram-pozitif bakterilerle komplike olmuş durumlarda etkilidir.

%1'lik pudra, %1'lik merhem ve 100 mg'lık tablet formları bulunmakla birlikte son yıllarda merhem olarak kullanımı yaygındır.

Tiokonazol'un tayini için geliştirilen çok fazla yöntem bulunmamaktadır. Literatürlerde genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) kullanılarak yapılan çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmada tiokonazol'un tayini için literatürlerde yer almayan sürekli akış enjeksiyon analizi (Flow Enjeksiyon Analiz yöntemi, FIA), UV spektrofotometrik ve titrimetrik yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemlerin farmasotik preparatlara (tablet ve merhem) uygulanabilirliği araştırılmıştır. Uygulanan yöntemler istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.



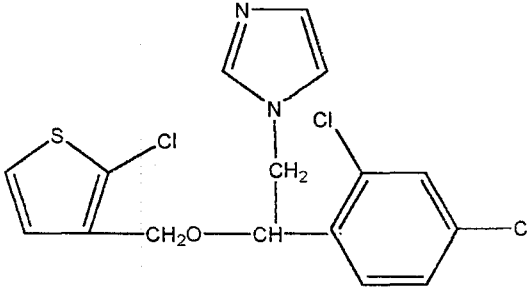
enfeksiyonlarında kullanıldığında, %28 (a/a)'lık bir çözeltinin güncel uygulamaları 6 ya da 12 ay sürebilir [2] .

Yan etkiler olarak yanma, kaşınma ve erythemayı içeren lokal reaksiyonlar rapor edilmiştir [1].

*Candida albicanslar* 'ı yok etmek ve onların gücünü engellemek için klinik tedavide beş imidazolün (klotrimazol, ekonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazol) kullanılabilirliği karşılaştırılmıştır. Hastalardan alınan örneklerle çalışıldığında tiokonazol'un diğer ilaçlara göre daha aktif olduğu gözlenmiştir [3].

## 2.2. Tiokonazol'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bir imidazol türevi olan tiokonazol, 1-[ 2- [ ( 2- klor- 3 thienyl ) metoksi ] 2- ( 2,4 - diklorfenil ) etil ] - 1H - imidazol olarak adlandırılır. Kapalı formülü  $C_{16}H_{13}Cl_3N_2OS$ 'dir. Molekül ağırlığı 387.7'dir. Molekülün yapısı Şekil 2.2.1'de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.2.1. Tiokonazol'un molekül yapısı

Tiokonazol beyaz, kristal yapılu katı bir maddedir. Bazik karakterlidir.  $pK_a=6.5$ 'dir [4]. Çözünürlüğü incelendiğinde suda çok az çözünürlüğe sahiptir. Buna karşılık metanol, etanol ve kloroformda daha kolay çözünmektedir [5]. Işık ve hava geçirmez kaplarda saklanmalıdır [6].

### 2.3. Tiokonazole ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Dean ve ark.[2] kemirgen besinlerindeki 4 antifungalı (flukonazol, tiokonazol, heksakonazol ve UK- 47.265) tayin etmek için bir kantitatif metod olarak süperkritik sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Kromatografik çalışmalarda, siyano bağlanmış bir silika kolon, 210 nm'de UV dedeksion ve hareketli faz olarak süperkritik karbondioksit ile modifiye edilmiş metanol kullanmışlardır. Modifiyerin konsantrasyonunun, sıcaklığının ve kolon basıncının antifungalların alıkonma zamanlarının üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yöntemin kemirgen besinlerindeki antifungal analizi için uygun bir metod olduğu vurgulanmaktadır.

Tiokonazol, %100 CO<sub>2</sub> kullanılmasına rağmen iyi bir şekilde elde edilememiş, aşırı geniş pikler elde edilmiştir. Modifer derişimin artırılması da pik şeklini düzeltmemiştir. Bu yüzden polar bir katkı maddesi olarak trietilamin kullanılmıştır. 0.25 ml trietilamin ve 50 ml metanol içeren bir hareketli faz kullanıldığında tiokonazol'un alıkonma zamanı azalmış ve pik şekilleri de önemli ölçüde iyileşmiştir.

Ferguson ve ark.[4] β-siklodekstrin yardımı ile tiokonazol enantiomerlerinin ayırımı için kiral CE (kapiler elektroforez) çalışmaları yapmışlardır. Bu çalışmalarında organik modifiyerlerin etkilerini araştırmışlardır. Asetonitrili kullanarak %0-15(v/v) aralığında organik modifiyer derişimindeki artışın, bağlanma sabitinin değerinde metanole göre iki kat düşüşe sebep olduğunu bulmuşlardır. Su-organik çözücü karışımında CE ve sıvı kromatografisi sonuçları arasında gözlenen ve hesaplanan ilişkiler arasında uyumlu sonuçlara ulaşmışlar ve CE'nin kullanılabileceğini önermişlerdir.

Wright ve ark.[7] tiokonazol ve onun potansiyel safsızlıkları için yüksek performanslı sıvı kromatografik analizin geliştirilmesini araştırmışlardır. İlk olarak ayırım koşullarının belirlenmesi üzerinde çalışmışlardır. Tiokonazol için bir isokratik HPLC ayrılmasını ve onun potansiyel safsızlıklarını geliştirmek için istatistik karışım dizaynı tekniklerden yararlanmışlardır. Azaltılmış tabaka yüksekliği, asimetrik pik ve kromatogramların sorgusu için uygun kalite

ölçütlerini kullanarak, en iyi kolon yeterliliği üreten değişkenleri ve en büyük seçiciliği saptamışlardır.

Wright ve ark.[8] yaptıkları diğer bir çalışmada potansiyel safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin tayini için yüksek basıçlı bir sıvı kromatografisi geliştirmişlerdir. Bu amaçla tiokonazol ve birbirleriyle ilgili 1-{ 2-[ 3-thienyl ) metoksi]-2-( 2,4 diklorfenil ) etil } imidazol (A) ve 1-{ 2-[(2,5 – dikloro- 3-thienyl ) metoksi ] – ( 2,4 diklorfenil etil ) imidazol (B) bileşimleri için UV-görünebilir spektrumlarını değerlendirmişlerdir. 1-{ 2-[(2,5 – dikloro- 3-thienyl ) metoksi ] – ( 2,4 diklorfenil etil ) imidazol (B) ve 1- { 2- [ ( 5-bromo – 2-kloro 3-thienyl ) metoksi ] – 2 – ( 2,4 – diklorfenil ) etil } imidazol (C) spektrumlarının önemli bir şekilde özdeş olduğunu bulmuşlar ve bu yüzden sadece bir spektrumu tiokonazol'ünkiyle karşılaştırmışlardır. Spektrumlar arasındaki farklılıkları, B'nin absorpsiyonu ile aynı dalga boyundaki tiokonazol'ün oranlarını hesaplayarak belirlemişlerdir.

Bu şekilde en uygun dalga boyunu 260 nm olarak saptamışlar ve kromatografik ayırmaları bu dalga boyunda gerçekleştirmişlerdir. Hareketli faz olarak; 1-oktan sülfonik asit (0.025 M), metanol, asetonitril (70:30), pH=4 trietilamin fosfat içeren tampon (0.05 M) kullanarak, 12 dakika içerisinde iyi bir ayırmanın olabildiğini belirtmektedirler.

Berridge ve ark.[9] farmasotik formüllerde tiokonazol'ü yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemle tayin etmişlerdir. 225 nm'de dedektör, mobil faz olarak MeOH-0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( 85:15 ) ve 5  $\mu\text{m}$  Hypersil ODS kolonu kullanılarak HPLC ile farmasotiklerde (vajinal tablet, kremler, jelatin kapsüller ve merhemler) tiokonazol'ü tayin etmişlerdir. Katkı maddelerinden ya da çözücülerden önemli bir girişim gözlenmemiştir. 0.02-0.6 mg/ml sınırları arasında doğrusal ilişkiler elde etmişlerdir. Geri kazanımı %0.8–1.7'lik relatif standart sapma ile %98–103 olarak bulmuşlardır. Ayrıca yöntemin tekrarlanabilirliğinin de çok iyi olduğunu belirtmektedirler.

Berridge [10] tiokonazol'ün analizinde bir grafit karbon kolon ile yüksek performanslı sıvı kromatografiyi kullanmıştır.

Tiokonazol ve kirlilikleri, çok büyük bir grafit karbon kolon ile hareketli faz olarak %1  $\text{NH}_4\text{OH}$  içeren THF- $\text{H}_2\text{O}$  kullanılarak ve 220 nm'de yüksek

performanslı sıvı kromatografisi ile saptamıştır. Bu yöntemin son derece tekrar edilebilir, seçici ve duyarlı olduğunu belirtmektedir.

Kublin ve ark.[11] yaptıkları çalışmada aktif maddelerin yanında bulunan ürünleri analiz etmek için gaz kromatografisinin koşullarını saptamışlardır.

Bunun için bir alev iyonlaşma dedektörü ve 2 m sütun camı ile donatılmış bir gaz kromatograf Philips Unicom PU 4550 ve %10 UCW-98 Chromosorb WAW (80-100 mesh)'le denklenmiş 0.4 cm'lik iç çaplı kolon kullanmışlardır. Standart çözeltileri (%1 metanolik), metronidazol, tiokonazol, ekonazol, isokonazol nitrat, ketokonazol, bifonazol, klotrimazol, klormidazol ve mikonazol kullanılarak hazırlamışlar ve her bir çözeltinin 3  $\mu$ l'sini kolona injekte etmişlerdir. Optimize edilen koşullarda alıkoyma zamanlarını metronidazol için 0.64 dak.; klormidazol için 2.03 dak.; tiokonazol için 5.77 dak; ekonazol nitrat için 6.37 dak.; bifonazol için 7.03 dak ; isokonazol nitrat için 7.85 dak. ve mikonazol için 8.25 dak. olarak bulmuşlardır.

Özoi- Tuncel [12] tiokonazol içeren pudra ve vajinal supozitivar şeklinde hazırlanan farmasötik preparatların farklı sıcaklıklardaki stabilitelerini araştırmıştır. Oda sıcaklığında pudra için 703 gün, vajinal supozitivarlarda ise formülasyona bağlı olarak 165-670 gün içerisinde %10 tiokonazol kaybı olduğunu gözlemlemiştir.

Gagliardi ve ark. [13] şampuan ve losyon gibi kozmetik formülasyonlarda aralarında tiokonazol'un de bulunduğu çeşitli imidazol türevi antimikotiklerin HPLC ile tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Mobil faz olarak asetonitril:10<sup>-3</sup> M NaClO<sub>4</sub> (pH:3) (15:85 v/v), kullanıldığında, 220 nm'de bileşikler saptamışlardır. Tiokonazol için geliş zamanının 54.1  $\pm$  0.6 dakikada ve saptama sınırının da 0.5 ng düzeyinde olduğu belirtilmektedir.

### **3. DENEYSEL BÖLÜM:**

#### **3.1. Kimyasal Maddeler**

Standart madde olarak kullanılan tiokonazol Pfizer ilaçları Ltd. Şti. (İstanbul-Türkiye)'den sağlanmıştır. Sertifikalarda %99 saflıkta olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır. Tiokonazol içeren farmasotik preparatlar ise yerel eczanelerden sağlanmıştır. Tiokonazol'un çeşitli derişimlerdeki çözeltilerinin hazırlanması süresinde HPLC kalitede metanol kullanılmıştır. Potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyonlarda kullanılan HCl çözeltisinin ayarlanması sırasında ise  $\text{NaHCO}_3$ 'dan yararlanılmıştır. Seyreltmeler için kullanılan bidistile su, laboratuvarında tarafımızdan hazırlanmıştır. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

#### **3.2. Aletler**

Potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon işlemi WTW Sen-Tix 97 T marka pH elektrodu ve WTW Tetracon marka kondüktometrik elektrot ile kombine edilmiş WTW Multiline marka P4-Universal model pH metre-kondüktometre ile yapılmıştır. Spektroskopik çalışmalarda UV- 2401 PC, UV-VIS Recording Spektrofotometre, FIA ile yapılan çalışmalarda ise SPD-10A UV dedektör (Shimadzu) , (Shimadzu) LC-6A Liquid Cromatograph, (Shimadzu) C-R7A Chromotopac marka yazıcı kullanılmıştır.

Çözeltilerin içindeki çözünmüş gazları uzaklaştırmak için B-220 model ultrasonik banyo kullanılmıştır.

#### **3.3. Uygulanan Yöntemlerde Standart Çözeltilerin Hazırlanması**

##### **3.3.1. UV Spektrofotometrik Yöntem**

UV yönteminde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler için, 19.4 mg tiokonazol alınıp 50 ml metanolde çözülerek  $1 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltisi



hazırlanmıştır.  $1 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltilerden 10 ml alınıp metanolle 100 ml'ye tamamlanarak  $1 \times 10^{-4}$  M'lık çözeltisi hazırlanmıştır.

Bu stok çözeltilerden hareketle uygun seyreltmeler yapılarak  $1 \times 10^{-5}$  M -  $5 \times 10^{-5}$  M aralığında bir seri çözelti hazırlanmıştır.

### 3.3.2. Titrimerik Yöntemler

Potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon işlemi uygulanmadan önce titrant olarak kullanılacak olan HCl çözeltisinin ayarlanmasında primer standart olarak  $\text{NaHCO}_3$  kullanılmıştır. 5'er kez yapılan potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyonlar sonucunda HCl derişimi ortalama 0.0991 N olarak hesaplanmıştır. Standart madde çözeltisi ise 195.7 mg tiokonazol tartılıp 40 ml metanolde çözülmüş ve üzerine 30 ml su ilave edilerek hazırlanmıştır.

### 3.3.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi (Flow İnjeksiyon Analiz Yöntemi, FIA)

FIA yönteminde kullanılmak üzere asetat ve fosfat tamponları hazırlanmıştır. 1 M asetat tamponu için;  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'dan 68 g tartılıp su ile 500 ml'ye tamamlanmış ve pH 2-6 aralığında çözeltileri hazırlanmıştır. 1 M fosfat tamponu için;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 'den 87g tartılıp 500 ml'ye su ile tamamlanmıştır. pH 7-12 aralığında çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerden 100 ml alınıp derişik HCl ya da doygun NaOH çözeltisi ilavesiyle pH'lar istenilen değere ayarlanmıştır.

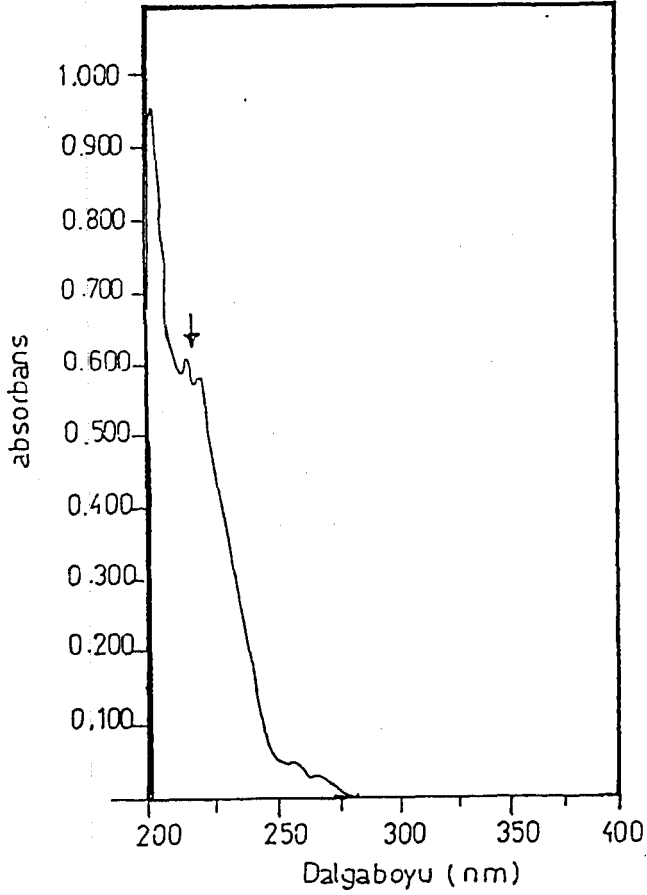
FIA yöntemi için hazırlanan standart çözeltilerde 21.3 mg tiokonazol alınıp metanolle 50 ml'ye seyreltilmiştir. Hazırlanan çözeltilerden 10 ml alınıp metanolle 100 ml'ye seyreltilmiş ve  $1 \times 10^{-4}$  M'lık çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden hareketle uygun seyreltmeler yapılarak  $1 \times 10^{-5}$  M -  $5 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında bir seri çözelti hazırlanmıştır.

Taşıyıcı faz olarak %10'luk metanol kullanılmıştır.

## 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

### 4.1.Tiokonazol'ün UV Spektral Karakteristiklerinin İncelenmesi

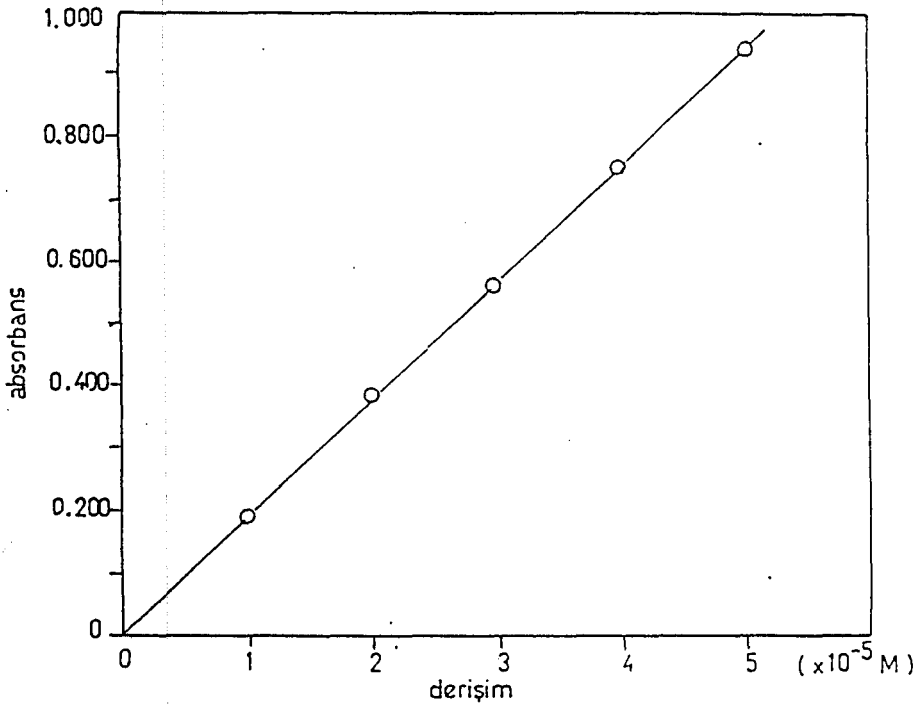
Standart tiokonazol'ün UV spektrofotometrik yöntemle incelenmesi amacıyla  $3 \times 10^{-5}$  M derişimde metanol içerisinde spektrumları alınmıştır. Ölçüm koşulları bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi ayarlanmıştır.



Şekil 4.1.1: Tiokonazol'ün UV Spektrumu ( $3 \times 10^{-5}$  M derişimde, metanolde)

Şekil 4.1.1.de görüldüğü gibi 204 nm'de oldukça belirgin bir pik, 219 nm'de ise 204 nm dalga boyunda gözlenen dalga boyundan daha düşük değerde ancak daha belirgin bir pik elde edilmiştir. 204 nm dalga boyunda yapılan kalibrasyon sonucunda okunan absorbans değerleri, derişimlere karşı grafiğe geçirildiğinde iyi

bir kalibrasyon grafiği elde edilememiştir. 204 nm'deki pik metanolden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle 219 nm dalga boyunda yapılan kalibrasyon sonucunda okunan absorbans değerleri derişime karşı grafiğe geğirildiğinde şekil 4.1.2'deki gibi bir kalibrasyon grafiği elde edilmiş ve  $A=18402,9 X + 0,024$  denklemine uyan doğrusallık elde edilmiştir.



şekil 4.1.2: Tiokonazol'un UV kalibrasyon grafiği  
( $1 \times 10^{-5}$  M- $5 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında)

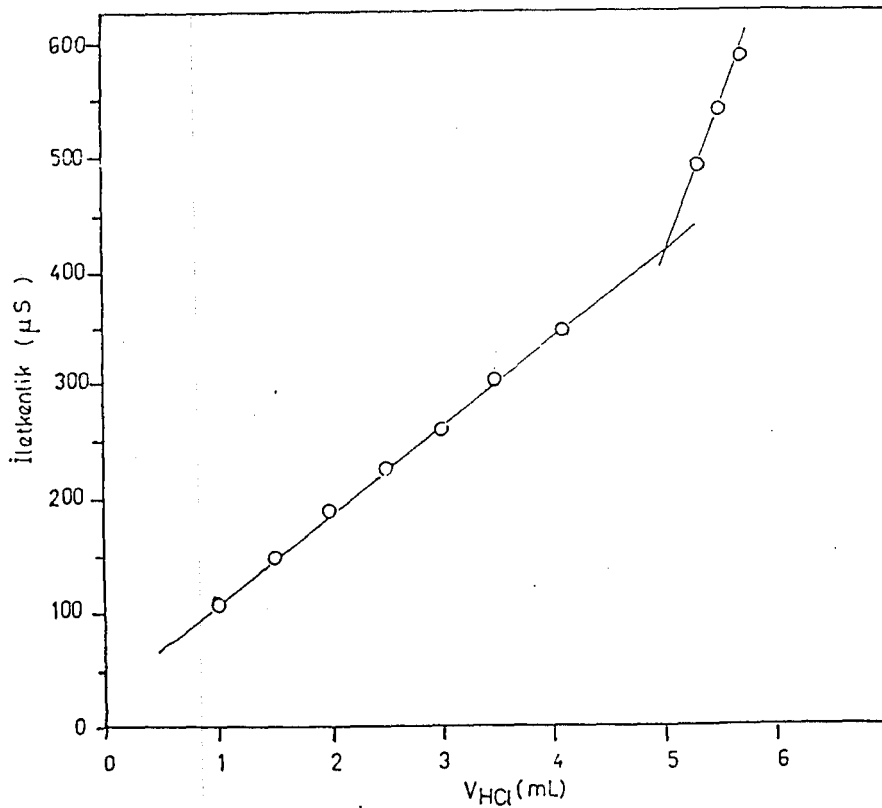
Tiokonazol'un UV spektrofotometrik yontemle tayini için 219 nm dalga boyunda gozlenen pikin analitik açıdan değerlendirilebilir olduğu, belirtilen derişim aralığında duyarlı tayinlerin yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

#### 4.2. Tiokonazol'un Potansiyometrik ve Konduktometrik Titrasyonu

Tiokonazol'un sudaki cozunurluğu cok azdır. Kaynaklarda tiokonazol'un metanolde cok daha iyi cozunduğu belirtilmektedir (5). Bu yuzden tiokonazol

metanolde çözülmüştür.

Bu koşullar altında tiokonazol'un potansiyometrik ve kondüktometrik olarak titre edilebilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla bölüm 3.3.2'de belirtilen koşullarda standart tiokonazol çözeltisi analize hazırlanmıştır. pH metrenin ve kondüktometrenin kalibre edilmesinden sonra hem pH ölçüm elektrodu hem de iletkenlik hücresi birlikte titrasyon kabına batırılarak her iki sinyal birlikte okunmuştur. Böylece aynı koşullarda yapılmış bu iki titrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçların birbirleriyle karşılaştırılabilmelerinin kolay olacağı düşünülmüş, aynı zamanda madde miktarı, alkol yüzdesi, çözelti hacmi, ortam sıcaklığı gibi hem pH'ı hem de iletkenliği etkileyebilecek parametrelerin sabit tutulup, her iki yöntemin birbirini doğrulaması amaçlanmıştır.

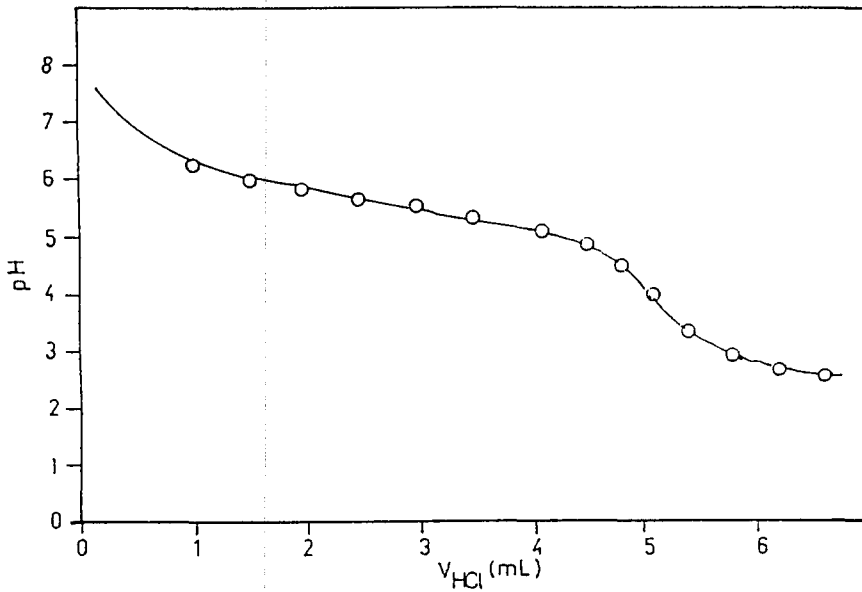


Şekil 4.2.1: Tiokonazol'e ait kondüktometrik titrasyon eğrisi

Analize hazırlanan tiokonazol çözeltisi,  $\text{NaHCO}_3$  ile ayarlanmış 0.0991N HCl ile titre edilmiştir. Titrasyon süresince eklenen asit hacmine karşı hem pH hem de iletkenlik değerleri aynı anda kaydedilmiştir. Kondüktometrik yöntemin

değerlendirilebilmesi içinde titrasyon sürecinde okunan iletkenlik değerleri üzerinde hacim düzeltmesi yapıldıktan sonra, eklenen asit hacmine karşı grafiğe geçirilmiş ve Şekil 4.2.1'deki gibi bir grafik elde edilmiştir.

Potansiyometrik yöntem için, eklenen asit hacmine karşı pH değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.2.2'de görülen sigmoid biçimli tipik bir titrasyon eğrisi elde edilmiştir. Dönüm noktası I. ve II. türevleri yardımıyla hesaplanmıştır. Kondüktometrik titrasyonlar için farklı eğimli iki doğrunun kesiştikleri noktadaki dönüm noktası değeri, Şekil 4.2.2'de görüldüğü gibi potansiyometrik titrasyon ile elde edilen dönüm noktasına çok yakındır.



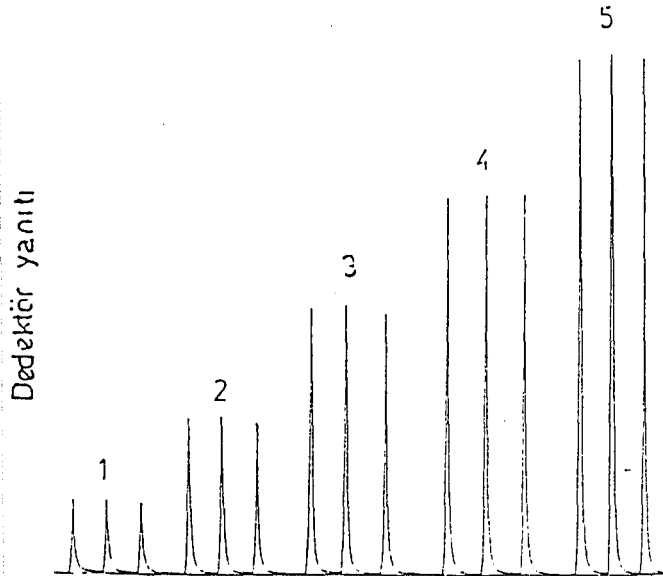
Şekil 4.2.2: Tiokonazol'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi

Bu şekilde yapılan potansiyometrik titrasyonlarda 195.7 mg dolayında tiokonazol miktarı ve 0.099N dolayında HCl çözeltisi kullanılarak %101 değerinde, aynı koşullarda gerçekleştirilmiş kondüktometrik yöntemde, dönüm noktalarının beklenen değere yakın bir değer olması nedeniyle %97 olarak bulunmuştur. Bu bulgulara dayanarak tiokonazol tayininde, potansiyometrik ve kondüktometrik yöntemin sınırlı koşullarda uygun bir yöntem olduğu söylenebilir.

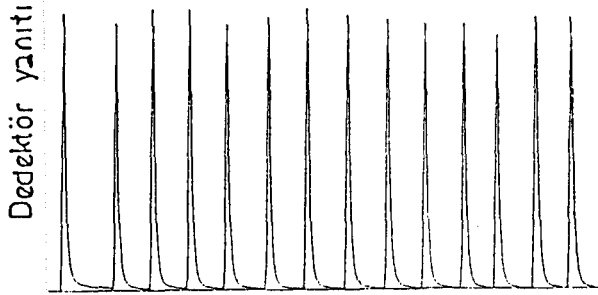
### 4.3. Tiokonazol'un FIA ile İncelenmesi

Analitik kimya da optimum koşulların oluşturulması sürecinde, göz önünde bulundurulması gereken koşullar vardır. Bütün bu uygunlukların bir araya getirildiği analitik ve aletsel parametrelerin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmaya öncelikle belirli bir pH değerinde çalışılmak üzere tampon çözeltiler hazırlanarak başlanılmıştır. pH 2-6 değerleri arasında bölüm 3.3.3'de belirtildiği gibi asetat tamponu ve pH 7-12 değerleri arasında fosfat tamponu hazırlanmıştır. Çeşitli pH'larda tampon çözelti ve belirli derişimlerdeki metanol çözeltisi tiokonazol çözeltilerine ilave edilerek  $1 \times 10^{-5}$  M -  $5 \times 10^{-5}$  M derişim aralığında çözeltiler hazırlanmıştır. Ancak hazırlanan bu çözeltilere FIA yöntemi uygulandığında elde edilen piklerin değerlendirmeler açısından iyi sonuçlar vermediği gözlenmiştir. Bu nedenle bölüm 3.3.3'de belirtilen şekilde tampon çözelti kullanılmadan çalışıldığında  $1 \times 10^{-5}$  M -  $5 \times 10^{-5}$  M derişim aralığındaki çözeltiler 219 nm dalga boyunda üçer kez enjekte edildiğinde Şekil 4.3.1'de gösterildiği gibi tekrar edilebilirlik açısından çok iyi morfolojilere sahip pikler elde edilmiştir.



Şekil 4.3.1:  $1 \times 10^{-5}$  M -  $5 \times 10^{-5}$  M derişim aralığındaki tiokonazol çözeltilerinin FIA sinyalleri



Şekil 4.3.2: FIA dedektör yanıtlarının tekrar edilebilirliği ( $3 \times 10^{-5}$  M tiokonazol çözeltisi için)

$3 \times 10^{-5}$  M derişimdeki çözelti üç gün boyunca sekizer kez enjekte edilmiştir. Elde edilen piklere göre Şekil 4.3.2'de görüldüğü gibi optimize edilen çalışma koşullarında tekrar edilebilirlik açısından iyi sonuçlar elde edilmiştir. Üç gün boyunca elde edilen pik alanları Çizelge 4.1'de topluca verilmiştir. Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi relatif standart sapmaların çok küçük olması tekrar edilebilirliğin oldukça iyi olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir.

Aynı şekilde gün içi ve günler arası kalibrasyon eğrilerinin karakteristikleri de Çizelge 4.2'de verilmektedir. Çizelge 4.2'deki değerler incelendiğinde farklı günlerde elde edilen kalibrasyon eğrilerinin son derece iyi bir korelasyona sahip olduğu ve sapmaların çok küçük olduğu görülmektedir. Bu da yöntemin validasyonu için önemli bir kriterdir.

Çizelge 4.1. FIA ile günler arası tekrar edilebilirlik sonuçlarına göre pik alanları

Deney No	1. Gün	2. Gün	3. Gün
1	389903	388657	401236
2	389178	394561	400963
3	388150	391587	389654
4	399320	402689	395127
5	401189	400243	402531
6	400739	387542	401402
7	388387	401258	394276
8	391265	389341	387899
<b>X<sub>ort</sub></b>	<b>393516.4</b>	<b>394484.8</b>	<b>396636.0</b>
<b>Standart sapma</b>	<b>5815.90</b>	<b>6133.86</b>	<b>5735.59</b>
<b>Bağıl standart sapma</b>	<b>1.48</b>	<b>1.56</b>	<b>1.45</b>
<b>Güven aralığı ( p= 0,05 )</b>	<b>4852.700</b>	<b>5118.000</b>	<b>4785.700</b>

Çizelge 4.2. FIA ile gün içi ve günler arası kalibrasyon eğrilerinin karakteristikleri

Parametreler	Gün içi Kalibrasyon	Günler Arası Kalibrasyon
<b>Eğim±Standart sapma</b>	$1.284 \times 10^{10} \pm 5687$	$1.29 \times 10^{10} \pm 8575$
<b>Kesim</b>	98.2	-232
<b>Korelasyon katsayısı</b>	0.9998	0.9998
<b>Eğim ±Güven aralığı</b>	$1.284 \times 10^{10} \pm 5687$	$1.29 \times 10^{10} \pm 8575$



#### 4.4.Geliştirilen Yöntemlerin Farmasotik Preparatlara Uygulanışı

Çalışmaların bu bölümünde yerel eczanelerden sağlanan preparatlar kullanılmıştır. Tabletlerde 100 mg, merhemde %1 oranında tiokonazol olduğu belirtilmektedir.

Farmakopelerde önerilen genel işlemlere göre, 100 mg aktif madde içeren on adet tablet tam olarak tartılıp, bir tabletin ortalama ağırlığı hesaplandıktan sonra şişelerde saklanmıştır ve tayinlerde bu toz edilmiş örnekler kullanılmıştır. Merhem şeklindeki preparatlar ise doğrudan tartılmıştır.

##### 4.4.1. UV Spektrofotometrik Yöntem ile Preparatlardaki Tiokonazol Tayini

UV Spektrofotometrik yöntem ile çalışılmak üzere tablet çözeltisini hazırlamak için yaklaşık 100 mg kadar tiokonazol içeren tablet tozu tartılarak 100 ml metanolde çözülerek süzme işleminden sonra 5600 rpm. devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltinin derişimi  $2.58 \times 10^{-3}$  M olarak hesaplanmıştır. Bu stok çözelti ile uygun seyreltmeler yapılarak  $3 \times 10^{-5}$  M'lık çözelti hazırlanmıştır.

Merhem çözeltisini hazırlamak için %1 aktif madde içeren merhemden 2.2238 g tartılmıştır (2.2238 g merhemde 22.238 mg aktif madde bulunmaktadır). Merhem 50 ml metanolde çözülerek  $1.145 \times 10^{-3}$  M'lık çözelti hazırlanmıştır.  $1.145 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltilerden hareketle uygun seyreltmeler yapılarak  $3 \times 10^{-5}$  M'lık çözelti hazırlanmıştır.

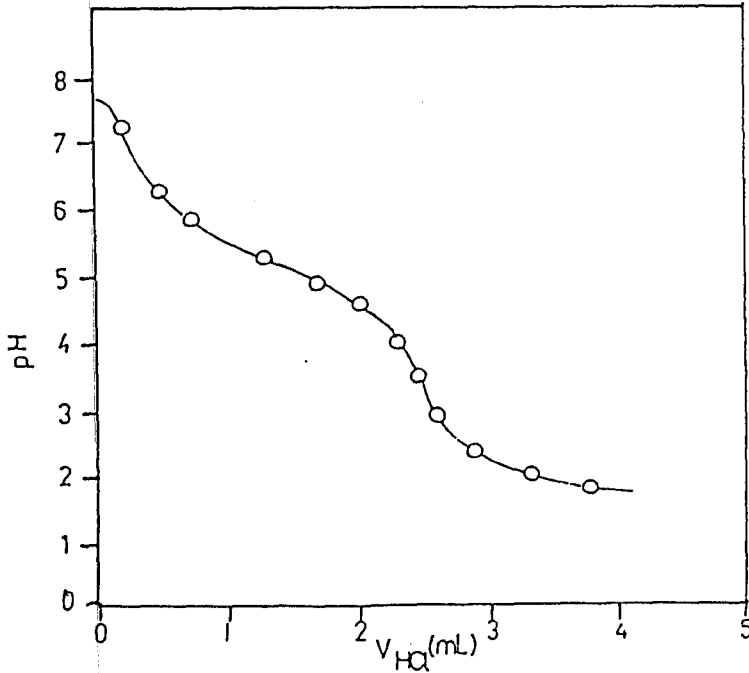
Hazırlanan tablet ve merhem çözeltileri ile sekizer kez UV ile ölçümler alınmış, ölçümlerde orijinal absorbans spektrum verileri kullanılmıştır. Okunan absorbans değerlerinden hareketle bölüm 4.1.'de verilen kalibrasyon denklemi kullanılarak preparatlar içerisindeki tiokonazol'un yüzde miktarları hesaplanmıştır. Tabletler için elde edilen değerler Çizelge 4.3'de, merhem için elde edilen değerler ise Çizelge 4.4'de verilmektedir.

#### 4.4.2. Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemi ile Preparatlardaki Tiokonazol Tayini

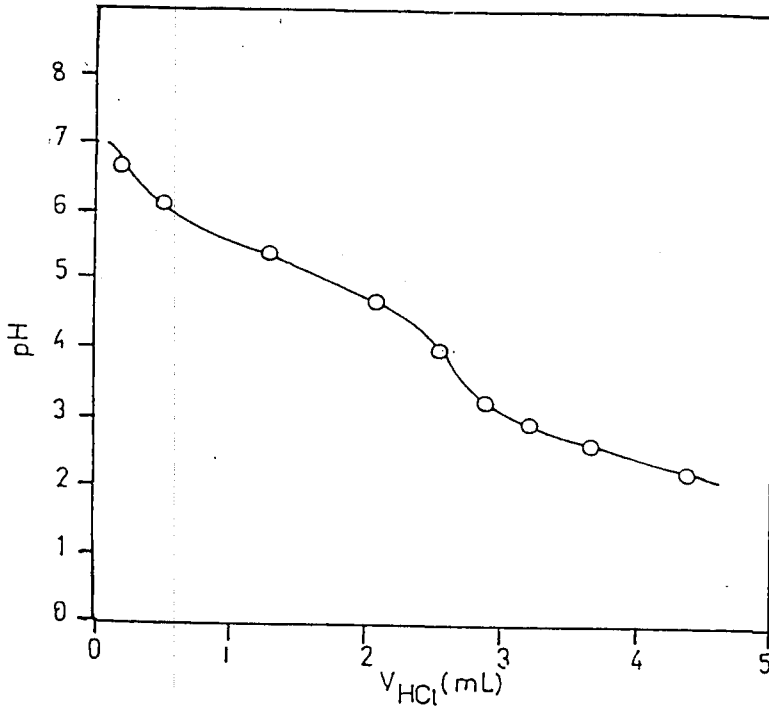
Potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyonda kullanılmak üzere tablet çözeltisini hazırlamak için yaklaşık 100 mg tiokonazol'e karşılık gelecek miktarda tablet tozu tartılarak 70 ml metanol ve üzerine 30 ml su ilave edilerek çözüldü.

Merhem çözeltisi için de 10.1g merhem 100 ml metanolde çözülerek hazırlandı.

Bölüm 4.2'de belirtilen standart tiokonazol çözeltisine uygulanan koşullar altında tablet ve merhem çözeltilerine potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin güvenilirliğini ölçmek açısından titrasyonlar sekizer kez tekrarlanmıştır. Bölüm 4.2'de belirtildiği şekilde potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Potansiyometrik yöntem için, eklenen asit hacmine karşı pH değeri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.4.2.a'da tablete ait, Şekil 4.4.2.b'de merheme ait sigmoid biçimli tipik titrasyon eğrileri elde edilmiştir. Tablete ve merheme ait dönüm noktaları ayrı ayrı her iki eğrinin I. ve II. türevleri yardımıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4.4.2.a) Tablete ait potansiyometrik titrasyon eğrisi



Şekil 4.4.2.b) Merheme ait potansiyometrik titrasyon eğrisi

Kondüktometrik titrasyonlar için farklı eğimli iki doğrunun kesiştikleri nokta tam olarak belirememiştir. Bazı deneylerde ise bu iki doğru parçası birbirine paralel ya da birbirinin uzantısıymış gibi sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum merhem ve tablette bulunan tiokonazol miktarının, standart çözelti ile çalışıldığında kullanılan tiokonazol miktarından daha az olmasından kaynaklanmaktadır.

Potansiyometrik titrasyon sonucunda Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre tablet için %99-%100 arasında, merhem için %98-%100 arasında değişen sonuçlar elde edilebilmektedir. Ancak aynı koşullarda gerçekleştirilen kondüktometrik yöntemde, dönüm noktalarının güçlükle saptanabilmesi yüzünden her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar farklı bulunmaktadır. Bu bulguların ışığı altında, preparatlardaki tiokonazol tayininde, potansiyometrik titrasyonun sınırlı koşullar altında uygun olmasına karşın, kondüktometrik yöntemin bu amaç için uygun olmadığı söylenebilir.

#### 4.4.3. FIA Yöntemi ile Preparatlardaki Tiokonazol Tayini

FIA yöntemi ile çalışılmak üzere tablet çözeltisini hazırlamak için bölüm 4.4.1'de UV spektrofotometrik yöntem ile tablette tiokonazol tayini için yapılan tartım ve seyreltme işlemleri yapılmış ve  $3 \times 10^{-5}$  M'lık çözelti hazırlanmıştır.

Merhem çözeltisini hazırlamak için %1 aktif madde içeren merhemden 2.23 g tartılmıştır. (2.23 g merhemde 22.3 mg aktif madde bulunmaktadır). Merhem 50 ml metanolde çözülerek  $1.15 \times 10^{-3}$  M'lık çözelti hazırlanmıştır.  $1.15 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltiden, uygun seyreltmelerle  $3 \times 10^{-5}$  M'lık çözelti hazırlanmıştır.  $3 \times 10^{-5}$  M derişimindeki tablet ve merhem çözeltileri sekizer kez enjekte edilmiştir. Standart çözelti ile yapılan tekrar edilebilirlik testinde elde edilen pik alanları ile, tablet ve merhem çözeltileri ile çalışıldığında elde edilen pik alanları oranlanarak yüzde değerleri hesaplanmış ve bu değerler Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilmiştir.

#### 4.4.4. Yöntemlerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Farmakopelerde tiokonazol için HPLC yöntemi önerilmektedir. Çalışmalarımızda UV spektrofotometrik yöntem bir karşılaştırma yöntemi olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 incelendiğinde, potansiyometrik ve FIA yöntemlerinden elde edilen tüm sonuçların UV spektrofotometrik yöntem sonuçları ile uyum içerisinde oldukları görülmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler de bunu kanıtlar niteliktedir.

İstatistiksel değerlendirmeler, tek yönlü,  $\alpha = 0.05$  önem ve %95 olasılık düzeyinde yapılmıştır.  $n-1=7$  serbestlik derecesine göre, istatistiksel tablolarda, F testi için 3.79, t testi için 2.36 kritik değerleri verilmektedir. Her iki test için de hesaplanmış olan değerler, bu kritik değerlerden düşük çıkmıştır. Bu da potansiyometrik ve FIA yöntemleriyle elde edilen sonuçlar ile UV spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasındaki farkın anlamsız olduğunu açıklamaktadır.

Sonuç olarak; çalışmalarımızda geliştirilen ve uygulanan potansiyometrik, FIA ve UV spektrofotometrik yöntemlerin, farmasötik preparatlar içerisindeki tiokonazol tayini için kullanışlı ve geçerli yöntemler olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.3. Tiokonazol'un tabletteki miktar tayini sonuçları

Deney No	%	%	%
	TİOKONAZOL (FIA)	TİOKONAZOL (POT.)	TİOKONAZOL (UV.)
1	101.13	99.87	100.37
2	98.10	98.81	97.90
3	100.53	99.04	100.41
4	99.10	98.20	98.90
5	97.82	98.45	98.30
6	98.06	100.34	99.10
7	97.82	98.55	97.53
8	98.79	99.50	98.50
n	n=8	n=8	n=8
X <sub>ort</sub>	98.92	99.10	98.88
Standart sapma	1.274	0.748	1.061
Bağıl standart sapma	1.29	0.75	1.07
Güven aralığı	0.21	0.12	0.18
F-test	1.622	0.559	F 0.05=3.79(tablo)
t-test	0.094	0.828	t 0.05=2.36(tablo)

Çizelge 4.4. Tiokonazol'ün merhemdeki miktar tayini sonuçları

Deney No	% TİOKONAZOL (FIA)	% TİOKONAZOL (POT.)	% TİOKONAZOL (UV.)
1	101.25	99.67	97.96
2	98.92	98.51	98.42
3	97.62	99.26	98.80
4	99.75	98.18	97.90
5	97.57	97.75	98.50
6	98.21	100.14	99.10
7	98.92	97.82	97.44
8	100.43	99.34	98.23
<b>n</b>	<b>n=8</b>	<b>n=8</b>	<b>n=8</b>
<b>X<sub>ort</sub></b>	<b>98.08</b>	<b>98.88</b>	<b>98.88</b>
<b>Standart sapma</b>	<b>1.320</b>	<b>0.835</b>	<b>1.061</b>
<b>Bağlı standart sapma</b>	<b>1.330</b>	<b>0.840</b>	<b>1.070</b>
<b>Güven aralığı</b>	<b>0.220</b>	<b>0.140</b>	<b>0.180</b>
<b>F-test</b>	<b>1.743</b>	<b>0.697</b>	<b>F<sub>0,05</sub>=3.79(tablo)</b>
<b>t-test</b>	<b>1.693</b>	<b>2.333</b>	<b>t<sub>0,05</sub>=2.36(tablo)</b>

## KAYNAKLAR

1. KAYAALP, O. , *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 9.Baskı Cilt 1 (Ankara), S.(294-296), **2000**
2. DEAN, J.R; FOWLİS, I.A.; HİTCHEN, S.M.; KHUNDKER, S.; LUDKİN, E.; NOMAND, F. *J. AOAC Int.* 80 (1), 7-13, **1997**
3. LEFLER, E. STEVENS, D.A. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 25 (4), 450-4, **1984**
4. FERGUSON, P.D.; GOODAL, D.M.; LORAN, J.S. *J. Chromatography A.*, 745, 25-35, **1996**
5. *USP XXII Official Monographs*, 1379-1380 ,**1990**
6. *Martindale / The Extra Pharmacopoeia*, Thirtieth Edition Edited by JAMES E.F.R, 332 ,**1993**
7. WRIGHT, A.G.; FELL, A.F.; BERRIDGE, J.C. *J. Chromatogr.* 464 (1), 27-38, **1989**
8. WRIGHT, A.G. , BERRIDGE, J.C.; FELL, A.F. *Analyst (London)*, 114 (1), 53-6, **1989**
9. BERRIDGE, J.C.; LAST, P.E.; PLATT, R.V. *J.Pharm. Biomed. Anal.* 3 (4), 391-4, **1985**
10. BERRIDGE, J.C. *J. Chromatogr.*, 449 (1), 317-21, **1988**
11. KUBLİN, E.; T. KANIEWSKA. *Chem. Anal.* 41 (1), 19-25 (78-84), **1986**
12. ÖZOL-TUNCEL, T. *Acta Pharm. Turc.* XXIX, 71-80, **1987**
13. GAGLIARDI, L.; ORSI, D.D.; CHIMENTI, P.; PORRA, R.; TONELLİ, D. *Analytical Sciences*, 19, 1195-1197, **2003**