

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

**FARMASÖTİK KREMLERDE
FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ YÖNTEMİYLE ANTRALİN VE
SALİSİLİK ASİT MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Evren GÜMÜŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

ANKARA
(NİSAN 2009)

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

**FARMASÖTİK KREMLERDE
FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ YÖNTEMİYLE ANTRALİN VE
SALİSİLİK ASİT MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Evren GÜMÜŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2006-28 no. lu proje
ile desteklenmiştir

ANKARA

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

Tez Savunma Tarihi: 25/05/2009



Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi



Doç. Dr. Nusret ERTAŞ
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	V
Tablolar	VI
Teşekkür	VII
I.GİRİŞ VE AMAÇ	1
II.GENEL BİLGİLER	2
II.1. Psoriasis (Sedef Hastalığı)	2
II.1.1. Psoriasis Tedavisi	3
II.2.Deri Hastalıkları Tedavisinde Kullanılan İlaçların Sınıflandırılması	4
II.2.1.Kortikosteroidler (Glukokortikoidler) (Topikal Dermatolojik)	4
II.2.2. Antihistaminikler (Topikal Dermatolojik)	4
II.2.3.Lokal Anestezikler ve Antipruritikler (Topikal Dermatolojik)	4
II.2.4. Antipsöriyatik İlaçlar	4
II.2.4.1.Antipsöriyatik İlaçlar (Topikal Dermatolojik)	4
II.2.4.2.Antipsöriyatik İlaçlar (Sistemik Dermatolojik)	5
II.2.5.Astrenjan Ajanlar (Topikal Dermatolojik)	5
II.2.6.Güneş Işığına Karşı Koruyucu İlaçlar (Topikal Dermatolojik)	5
II.2.7.Antiinfektif İlaçlar (Topikal Dermatolojik)	5
II.2.7.1.Antiseptik ve Dezenfektanlar (Topikal Dermatolojik)	5
II.2.7.2.Antibiyotikler	6
II.2.7.3.Antiviral İlaçlar (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.4.Diğer Antiinfektifler (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.5.Sülfonamidler (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.6.Ektoparazitisidler	6
II.2.7.7.Antifungaller	6
II.2.7.7.1.Topikal Kullanılan Antifungaller (Topikal Dermatolojik)	6

II.2.7.7.2. Sistemik Kullanılan Antifungaller	6
II.2.7.8. Antineoplastik İlaçlar (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.9. Pigmentasyon Ajanları (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.10. Hidrotik, Emoliyan ve Koruyucu Preparatlar (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.11.Enzimler (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.12.İmmünoşüpresifler (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.13.İmmünostimülanlar (Topikal Dermatolojik)	6
II.2.7.14. Akne Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	6
II.3. Antralin	7
II.3.1. Kimyasal Yapısı	7
II.3.2. Fiziksel Özellikleri	7
II.3.3. Farmakolojik Özellikleri	8
II.3.4. Analiz Yöntemleri	9
II.4. Salisilik asit	10
II.4.1. Kimyasal Yapısı	10
II.4.2. Fiziksel Özellikleri	10
II.4.3. Farmakolojik Özellikleri	11
II.4.4. Analiz Yöntemleri	12
II.5. Kullanılan Farmasötik Preparat	12
II.5.1. Farmakolojik Özellikleri	12
II.6.Yarı Katı Farmasötik Preparatlar	13
II.6.1.Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar	13
II.6.1.1.Kremler	15
II.7. Kullanılan Yöntemler	16
II.7.1. Moleküler Lüminesans Spektrometri	16
II.7. 1.1. Floresans ve Fosforesans	18
II.7.1.1.1. Floresans ve Fosforesans Oluşturan Uyarılmış Haller	19
II.7.1.1.2.Sönüm İşlemleri	21
II.7.1.1.3.Floresans ve Fosforesansı Etkileyen Değişkenler	22
II.7.1.1.4.Emisyon ve Uyarma Spektrumları	24

II.7.1.2.Floresans ve Fosforesans Spektrofotometreleri	25
II.7.1.3. Senkronize Floresans Spektrometri	26
III. MATERYAL VE YÖNTEM	32
III.1. Kullanılan Kimyasallar	32
III.2. Kullanılan Cihazlar	32
III.3. Kullanılan Farmasötik Preparat	32
III.4. Kremlerde Senkronize Floresans Spektrofotometrisi Yöntemiyle Antralin ve Salisilik Asit Miktar Tayini	33
III. 4. 1. Antralin Miktar Tayini	33
III. 4. 1. 1. Antralin Kalibrasyon Doğrusu için Kullanılan Çözeltiler	33
III.4.1.2. Krem Numunelerinde Antralin Miktar Tayini	33
III. 4. 2. Salisilik Asit Miktar Tayini	34
III. 4. 2. 1. Salisilik Asit Kalibrasyon Doğrusu için Kullanılan Çözeltiler	34
III.4.2.2. Krem Numunelerinde Salisilik Asit Miktar Tayini	34
III.5. Geri Kazanım Çalışmaları	35
III.5.1. Kremlerde Antralin Geri Kazanımı	35
III.5.2. Kremlerde Salisilik Asit Geri Kazanımı	35
IV. BULGULAR	36
IV.1. Antralin ve Salisilik Asidin Floresans Spektrumları	36
IV.2. Çalışma Dalga Boylarının Seçimi	36
IV.3. Kremlerde Sekronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Antralin ve Salisilik Asit Miktar Tayini Sonuçları	38
IV.4. Geri Kazanım Çalışması Sonuçları	41
V. SONUÇ ve TARTIŞMA	42
VI.ÖZET	44
VII.SUMMARY	45
VIII.KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER

Sayfa No.

Şekil 1. Fotolüminesans Bir Sistem için Kısmi Enerji Diyagramı	21
Şekil 2. Fenantren için Spektrumlar	24
Şekil 3. Bir Spektroflorometrenin Bileşenleri	25
Şekil 4. Sekronize Taramanın Bant Daralması Üzerine Etkisinin Şematik Gösterimi	28
Şekil 5. Senkronize Taramanın Spektral Basitleştirme Etkisi	29
Şekil 6.a) Naftalen, Fenantren, Antrasen, Perilen ve Tetrasen Karışımının Klasik Floresans Spektrumu b)Aynı Karışımın Senkronize Floresans Spektrumu	30
Şekil 7. Metanolde Hazırlanmış Antralin ve Salisilik Asit Çözeltilerinin Uyarma ve Emisyon Spektrumları	36
Şekil 8. (a) Antralin (b) Salisilik Asidin Senkronize Floresans Spektrumları ($\lambda\Delta=140$ nm)	37
Şekil 9. (a) Antralin (b) Salisilik Asidin Senkronize Floresans Spektrumları ($\lambda\Delta=110$ nm)	37
Şekil 10. Antralin Tayininde Kullanılan Kalibrasyon Doğrusu	38
Şekil 11. Salisilik Asit Tayininde Kullanılan Kalibrasyon Doğrusu	38

TABLÖLAR

	<u>Sayfa No.</u>
Tablo 1. Senkronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Elde Edilen Analitik Parametreler	40
Tablo 2. Kremlerde Senkronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Antralin Miktar Tayini Sonuçları	41
Tablo 3. Kremlerde Senkronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Salisilik asit Miktar Tayini Sonuçları	41
Tablo 4. Kremlerde Antralin Geri Kazanım Sonuçları	42
Tablo 5. Kremlerde Salisilik Asit Geri Kazanım Sonuçları	42

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına yön veren, tezimin her aşamasında yanımda olan değerli hocam Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER'e,

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

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

Çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, zamanını ve desteğini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. H. Eda ŞATANA, Sayın Dr. Şebnem YILMAZ ve Sayın Arş. Gör. Sezen YARIMKAYA'ya ve Analitik Kimya Anabilim Dalı Sekreteri Sayın Cennet GÜVENCİ'ye,

Her türlü destek ve dostluklarından dolayı tüm Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine.

Beni her konuda destekleyen, hayatta en değerli varlığım olan aileme saygı, sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Antralin (Ditranol), antipsöriatik etkili bir ilaç etken maddesidir. Antralin ve salisilik asidi birlikte içeren farmasötik krem preparatları, topikal olarak psöriazis tedavisinde kullanılmaktadır.

Çalışmanın amacı, Antralin ve salisilik asidi birlikte içeren kremlerde etken maddelerin miktar tayinleri için rutin analizlerde kullanılabilecek hızlı, kolay ve duyarlı bir analiz yöntemi geliştirilmesidir. Hedef, önerilen analiz yöntemi ile Antralin ve Salisilik asidin bir arada bulunduğu farmasötik kremlerde etken maddelerin herhangi bir ayırma işlemine tabi tutulmadan aynı anda miktar tayinlerinin yapılabilmesini sağlamaktır.

Bu çalışma kapsamında ikili karışım halinde bulunan Antralin ve Salisilik asidin aynı anda miktar tayinleri için yapılacak analizlerde senkronize floresans spektroskopisi yöntemi temel alınmıştır. Geliştirilen yöntemin Antralin ve Salisilik asidi birlikte içeren kremlerde etken maddelerin miktar tayinleri amacıyla kullanılması amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. Psoriasis (Sedef Hastalığı)

Psoriasis çeşitli klinik biçimlerde ortaya çıkabilen, yineleyici, kronik bir deri hastalığıdır. Deri lezyonlarının çok tipik olması nedeniyle tanı koymak oldukça kolaydır. Lezyonlar klasik olarak eritroskuamozdur; bu hem vasküler yapıların (eritem) hem de epidermisin (skuam) etkilendiği gösterir. Morfolojik olarak çok değişik biçimlerde görülür. Psoriasis vulgaris en sık rastlanan tipidir.

Psoriasis prevalansı, farklı toplumlarda ve coğrafik bölgelerde değişiklik gösterir. Değişik çalışmalar psoriasis sıklığının %1-2 oranında olduğunu göstermektedir. Çocuklarda rastlanma sıklığı %1,1 olarak bulunmuştur. Erkek ve kadınlarda eşit sıklıktadır. Tüm yaş gruplarında görülebilmesine karşın başlama yaşı genellikle üçüncü onyıldır. Erken başlangıç (kırk yaş altı) Tip I psoriasis adını alır ve daha şiddetli hastalığı belirtir. Tip I psoriasisde aile öyküsü varlığı olasılığı daha fazladır. Tip II psoriasisde (kırk yaş üstü) hastalığın seyri ve prognozu daha iyidir. Hastalığın genetik geçişli olduğunu gösterir pek çok çalışma olmasına karşın bu geçişin nasıl olduğu kesin olarak bilinmemektedir.

Psoriasis multifaktöriyal bir hastalıktır. Araştırmalara karşın günümüzde henüz nedeni bilinmeyen hastalıklar arasındaki yerini korumaktadır. Hastalık genetik yatkınlığı olan kişilerde çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Psoriasisın oluşumundaki temel patoloji, keratinositlerin hiperproliferasyonu ve inflamasyondur. Normalde 26-28 gün olan epidermal yenilenme süreci kısalmıştır. İmmün sistem hücreleri olan T lenfositler ve keratinositler arasındaki etkileşim psoriasis patogenezinde rol oynamaktadır.

Psoriatik lezyonlarda artan CD4T hücreleri psoriatik lezyonların ortaya çıkışında ve kalıcılığında rol oynayan sitokinler salarlar. Aktivite T lenfositlerden salınan bu sitokinler keratinosit proliferasyonuna ve endotel hücrelerinden adezyon moleküllerinin salınımını stimüle eden sitokinlerin sentezine yol açar. Ayrıca keratinositler de değişik sitokinler salgılayarak psoriasis sürecinin sürmesinde rol oynarlar.

Psoriatik lezyonların ortaya çıkışını provoke eden dış etkenlere tetikleyici faktörler denir. Bunlar: Travma; Epiderminin zedelenmesine yol açan çeşitli mekanik, fiziksel ve kimyasal travmalar lezyonsuz deri bölgelerinde psoriatik lezyonların ortaya çıkmasına neden olur. Buna "Köbner Fenomeni" denilir. Akut streptokokal enfeksiyonlar, bazı ilaçlar (lityum, beta adrenejik blokörler), emosyonel stresler hastalığı başlatabilir ya da alevlendirebilir. Bunların yanısıra endokrin etkenler, hipokalsemi ve diyalizin, ayrıca hastaların az bir kısmında güneş ışınlarının lezyonlarda artışa yol açtığı bilinmektedir^(1,2,3,4).

II.1.1. Psoriasis Tedavisi

Tedaviye başlamadan önce hasta, psikiyatrik yönden desteklenmelidir. Tedavide amaç hastalığı sınırlı deri lezyonları düzeyinde tutmak, uzun süreli ve en çok etkiyi sağlamaktır.

Topikal Tedavi: Deride kuruluk hastalığın yaygın formlarında istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle nemlendiriciler kullanılmalıdır. Lezyonların yüzeyindeki kepeklerin kaldırılması, daha sonra uygulanacak tedavilerin etkisini arttıracığından, tedavinin başlangıcında bu amaçla salisilik asit, laktik asit ve üre (%10) kullanılabilir.

Antralin: Antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkisi vardır. Kronik plak ve gutat psoriaziste iyi bir seçenektir. Klasik antralin tedavisi düşük konsantrasyonla (%0,5-0,1) başlar ve %5 konsantrasyona

çıkılınca dek her hafta artırılır ve lezyonlar düzelinceye dek sürdürülür. Deriyi ve giysileri kahverengine boyamasının yanı sıra iritan reaksiyonlara neden olabilir.

Vitamin D3 ve analogları: Keratinosit proliferasyonunu baskımlarken terminal diferansiyasyonunu artırır. Piyasada kalsipotriol olarak bulunan vit D3 analoğu plak tipi psoriaziste günde bir ya da iki kez olarak iki ay kullanılabilir.

Tazaroten: Bir retinoid türevidir. Başlıca psoriatik plaklarda skuamı, plak kalınlığını ve eritemi belirgin olarak azaltır.

Topikal kortikosteroidler: Topikal tedavide en etkin ve en çok kullanılan ilaçlardır. Etkinin arttırabilmesi amacıyla yerel steroidler salisilik asit ve üre ile birlikte kullanılabilir.

Fotokemoterapi: Güneş ışınlarının sedef hastalığı üzerindeki olumlu etkisi uzun yıllardan beri bilinmektedir. PUVA tedavisi sistemik psoralen (ışığa duyarlandırıcı) ile UVA'nın birlikte uygulanmasıdır. UVA enerjisi ile psoralenler DNA ile çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini ve mitozu baskılar^(1,2,3,4).

II.2.Deri Hastalıkları Tedavisinde Kullanılan İlaçların Sınıflandırılması

II.2.1.Kortikosteroidler (Glukokortikoidler) (Topikal Dermatolojik)

II.2.2. Antihistaminikler (Topikal Dermatolojik)

II.2.3.Lokal Anestezikler ve Antipruritikler (Topikal Dermatolojik)

II.2.4. Antipsöriyatik İlaçlar

II.2.4.1.Antipsöriyatik İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

Amonyaklı Cıva

Antralin

Huşağacı katran yağı

Kalsipotrien
Katran
Katran ve katran yağları
Kömür katranı
Metoksalen

II.2.4.2.Antipsöriyatik İlaçlar (Sistemik Dermatolojik)

Alefasept
Asitretin
Efaluzumab
Etreinat
İkatibant
Metoksalen
Metotreksat
Metotreksat Sodyum
Siklosporin

II.2.5.Astrenjan Ajanlar (Topikal Dermatolojik)

II.2.6.Güneş Işığına Karşı Koruyucu İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.Antiinfektif İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.1.Antiseptik ve Dezenfektanlar (Topikal Dermatolojik)

Kinolin Türevleri
Biguanidler ve Amidinler
Kuvaterner Amonyum Bileşikleri
Fenol ve Türevleri
Nitrofuran Türevleri
İyotlu İlaçlar
Cıvalı Bileşikler
Diğer Antiseptik ve Dezenfektanlar

II.2.7.2.Antibiyotikler (Topikal Dermatolojik)

Tetrasiklinler (Topikal Dermatolojik)

Diğer Antibiyotikler (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.3.Antiviral İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.4.Diğer Antiinfektifler (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.5.Sülfonamidler (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.6.Ektoparazitisidler

II.2.7.7.Antifungaller

II.2.7.7.1.Topikal Kullanılan Antifungaller (Topikal Dermatolojik)

Antibiyotikler

İmidazol ve Triazol Türevleri

Topikal Olarak Kullanılan Diğer Antifungaller

II.2.7.7.2. Sistemik Kullanılan Antifungaller

II.2.7.8. Antineoplastik İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.9. Pigmentasyon Ajanları (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.10. Hidrotik, Emoliyon ve Koruyucu Preparatlar (Topikal Dermatolojik)

Emoliyonlar ve Yağ Banyolan (Topikal Dermatolojik)

Deride Bariyer Oluşturan Preparatlar

Üre Preparatları

II.2.7.11.Enzimler (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.12.İmmünoşüpresifler (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.13.İmmünoştimülanlar (Topikal Dermatolojik)

II.2.7.14. Akne Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Anti-Akne İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

Retinoidler (Topikal Antiakne)

Kükürtlü İlaçlar

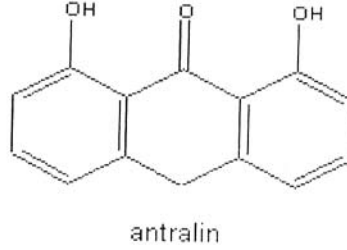
Peroksitler (Topikal Antiakne)

Antiinfektifler (Topikal Antiakne)⁵

II.3. Antralin

II.3.1. Kimyasal Yapısı

1,8 dihidroksiantron,
1,8-dihidroksi-9(10H)-anthrasenon,
1,8,9-antratriol, 1,8-dihidroksi-9-antron,
1,8-dihidroksiantrase-9(10H)-on,
1,8 dihydroxyanthranol



$C_{14}H_{10}O_3$

MA= 226.2 g/mol

II.3.2. Fiziksel Özellikleri

Sarıdan turuncuya veya sarımsı kahverengine değişen renkte, kokusuz veya çok hafif kokulu, mikrokristal yapıda bir tozdur. İngiliz farmakopesi (BP)'ye göre çözünürlükleri: Pratik olarak suda çözünmez; asetonunda az çözünür; metilen klorürde çözünür; seyreltik alkali hidroksitlerinde çözünür. Sudaki süspansiyonundan elde edilen filtrat turnusole karşı nötr reaksiyon verir. Antralin güçlü bir iritandır. Gözden ve cildin hassas bölgelerine (yüz, genital organlar, açık yaralar ve mukuza membranları) temasından sakınılmalıdır. Antranilin 8-15°C arasında ve hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır^{5,6,7,8}.

II.3.3. Farmakolojik Özellikleri

Antralin topikal olarak kullanılan antipsoriyatik bir ilaçtır. Sessiz veya kronik olarak seyreden psoriyazisin tedavisinde kullanılır. Ayrıca alopesi tedavisinde de kullanılır. Etkisini epidermisin mitotik hızını azaltarak gösterir. Yaptığı tahrişe ve buna bağlı ağrı nedeni ile yüz, genital organlar, gözler, açık yaralar veya mukoza membranlarına uygulanmamalıdır. İlacın hasta olmayan bölgelere zarar vermesini önlemek için koruyucu flaster ve benzerleri kullanılmalıdır. İlaç tekstil ürünlerini, cilt veya saç boyayabilir⁵.

Etki Mekanizması: Antralin etkisini epidermisin mitotik hızını azaltarak gösterir.

Doz: Psoriyazis tedavisi: Yetişkinler: Konvansiyonel tedavi: %0.1 - %1'lik pomatları günde bir kez veya 8-12 saat arayla günde 2 kez etkilenen alana sürülür. Diğer bir uygulamada ise %0.1 - %1'lik kremi etkilenen alana günde bir kez sürülür. Tercihen gece uygulanmalıdır. Kısa süreli antralin tedavisi: %0.1'lik kremi etkilenen alana 10-30 dakika süreyle uygulanır ve bu sürenin sonunda yıkanarak uzaklaştırılır⁵.

Kontrindikasyonları: Renal yetmezlik, Antralin akut veya aktif inflamasyon gösteren renal disfonksiyonda kontrendikedir⁵.

Yan Etkileri: Cilt tahrişi, Ciltte renklenme, Tırnakta lekelenme

Farmakopelerde Kayıtlı Preparatları

BP 2005 Dithranol Cream

BP 2005 Dithranol Ointment

BP 2005 Dithranol Paste

USP 29 Anthralin Cream

USP 29 Anthralin Ointment

Türkiye'deki Müstahzarları

Psoraks Krem, 30g tüp/kutu(kombine)

Psoraks forte krem, 30g tüp/kutu (kombine)⁵

II.3.4. Analiz Yöntemleri

Burton ve arkadaşları, dermatolojik ürünlerdeki antralin tayini için bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi uygulamışlardır. Çalışmada katı haldeki antralinin ve antralin çözeltilerinin degradasyonunu etkileyen faktörler tartışılmıştır. Degradasyon ürünlerinin ultraviyole spektrumları çalışmada yer almaktadır. Yöntem tüm parametreleriyle optimize edilmiş ve spesifik, kesin ve doğru olduğu gösterilmiştir⁹.

Cheach ve arkadaşları, Antralin (ditranol) ve bozunma ürünlerinin tayinleri için normal faz ve ters faz sıvı kromatografi teknikleri uygulamışlardır¹⁰.

Caron ve arkadaşları, merhemlerde antralin tayini için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir¹⁰. Önerilen yöntemle çeşitli merhemlerde antralin derişimi tayin edilmiş ve sonuçlar USP yöntemiyle kıyaslanmıştır. Bazı merhem preparatlarında belirtilen miktarlarla ölçülen miktarlar arasında fark gözlenmiştir¹¹.

Schaltegger ve arkadaşları, antipsoriatik etkili antralin (ditranol) ve türevlerinin stabilitesi ile ilgili çalışmalar yapmışlar ve kalitatif bir sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir¹².

Ferlan ve arkadaşları, Dimetil sülfoksitli ortamda nitroksit radikalleriyle ditranol reaksiyonuna dayalı bir bir yüksek performanslı sıvı kromatografik çalışma gerçekleştirmişlerdir¹³.

BP 2005, kremlerde antralin tayini için bir yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemi önermiştir. Yöntemde 25 cmx4,6 mm boyutlarında kolonda, 5 µm tanecik boyutlu sabit faz (Örneğin Lichrosorb Si 60), 1 hacim glasiyel asetik asit, 5 hacim dikloro metan ve 82 hacim n-hekzandan oluşan mobil faz (2 mL/dakika hızında) ve 354 nm. de

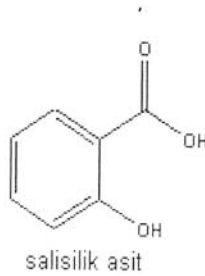
UV dedeksiyonla antralin tayini gerçekleştirilmektedir⁷. USP 29'da kremlerde antralin tayini için aynı yöntem önerilmekte, internal standart olarak o-nitroanilin kullanılmaktadır⁸.

Beiraghi ve arkadaşları, eser miktarlardaki Berilyum tayini için antralin ile (1,8 dihidroksi antron) ile kompleks oluşumuna dayanan bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişler ve antralini yeni bir reaktif olarak kullanmışlardır. Berilyum tayini için deneysel koşullar, pH dan reaktif derişiminden ve süreden etkilenmektedir ve tüm bu parametreler optimize edilmiştir. Optimum deneysel koşullarda, 545 nm. de kompleksin molar absorptiviti değeri $0,47 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ dir. Bazı anyon ve kationların girişim etkileri incelenmiş ve EDTA girişim yapıcı iyonları maskeleyici ajan olarak kullanılmıştır¹⁴.

II.4. Salisilik asit

II.4.1. Kimyasal Yapısı

2-Hidroksibenzoik asit



$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$

MA= 138.1 g/mol

II.4.2. Fiziksel Özellikleri

Salisilik asit beyaz veya renksiz iğnemsı kristaller veya beyaz tüysü kristal yapılı bir tozdur. Sentetik şekli beyaz ve kokusuzdur. Doğal metil salisilattan hazırlandığında açık sarı veya uçuk pembe renktedir ve

hafif nane kokusu vardır. Bir birim salisilik asit 460 birim suda, 15 birim kaynar suda, 3 birim alkol ve eterde, 45 birim kloroformda çözünür.

Saklama Koşulları: Salisilik asit 30°C'nin altındaki oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır^{5,6,7,8}.

II.4.3. Farmakolojik Özellikleri

Salisilik asit keratolitik bir ilaçtır. Hiperkeratotik ve derinin pullanmasıyla belirgin kepek ve seboreik dermatit, iktiyoz, psoriyazis ve akne gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bu amaçla kullanılan solüsyon ve pomatları mevcuttur.

Etki Mekanizması: Salisilik asit deskuamasyonu hızlandırır. Hafif fungusid etki gösterir.

Farmakokinetik: Salisilik asit deriden hızla absorbe olur ve idrarla yavaş bir şekilde elimine edilir. Salisilik asitin geniş cilt yüzeylerine aşırı düzeyde uygulanmasına bağlı sistemik akut salisilat zehirlenmesi (salisilizm) meydana gelebilir. Bu tür yanlışı uygulamaya bağlı çocukların çoğunlukta olduğu ölümler bildirilmiştir. Topikal uygulamaya bağlı sistemik absorpsiyon riskini minimize etmek için salisilik asit uzun sürelerle ve yüksek konsantrasyonlarda kullanılmamalı ve geniş vücut yüzeylerine ya da enflamasyonlu veya açık deriye uygulanmasından kaçınılmalıdır¹.

İndikasyonları: Akne (acne vulgaris), ekzema, ihtiyozis, kepek, nasır, psoriyazis, Seboreik dermatit, Tinea barbae, Tinea capitis, Tinea cruris, Verruca vulgaris

Kontrindikasyonları: Cilt Aşınması

Farmakopelerde Kayıtlı Preparatları

BP 2005	Coal Tar and Salicylic Acid Ointment
BP 2005	Compound Benzoic Acid Ointment
BP 2005	Dithranol Paste

BP 2005	Salicylic Acid Collodion
BP 2005	Salicylic Acid Ointment
BP 2005	Zinc and Salicylic Acid Paste
BPC 1973	Salicylic Acid and Sulphur Ointment
USP 29	Benzoic and Salicylic Acids Ointment
USP 29	Salicylic Acid Collodion
USP 29	Salicylic Acid Gel
USP 29	Salicylic Acid Plaster
USP 29	Salicylic Acid Topical Foam
USP 29	Zinc Oxide and Salicylic Acid Paste ⁵

II.4.4. Analiz Yöntemleri

Çeşitli farmasötik formlarda, biyolojik sıvılarda ve diğer matrislerde salisilik asit tayinine ilişkin farklı yöntemlerle çok sayıda çalışma mevcuttur. BP 2005 ve USP 29 standart salisilik asit miktar tayini için 0,1 M NaOH ile titrasyona dayalı bir yöntem önermektedir. USP 29'da ise salisilik asit içeren jel, topical sabun ve kollodyonlarda tayin için sıvı kromatografik yöntemler önerilmektedir^{7,8}.

II.5. Kullanılan Farmasötik Preparat

Psoraks Krem

Antralin (Dithranol, Cignolin) %0,25

Salisilik asit %0.20

II.5.1. Farmakolojik Özellikleri

Psoraks Krem, kronik psoriasisin topikal tedavisinde kullanılır. Ciltteki ve saçlı bölgedeki sedef hastalığının spesifik ilacıdır. Sedef hastası olan kişilerin ciltlerine pürüzsüz ve düzgün bir görünüm kazandırır.

Farmakodinamik: Anthralin, psoriasis tedavisinde kullanılan Hidroksiantronların grubunda yer almaktadır. Terapötik etkisi serbest radikal oluşturmaları ile bağlantılıdır. Antralinin antipsoriatik aktivitesi tam olarak anlaşılamamasına rağmen in-vitro çalışmalar antimitotik etkisinin DNA sentezini önlemesinden kaynaklandığını göstermektedir. Salisilik asit topikal olarak cilde uygulandığında güçlü keratolitik ve hafif antiseptik etki gösteren bir ajandır. Düşük konsantrasyonlarda keratoplastik (anormal keratinizasyonun düzeltilmesi) etkilidir, yüksek konsantrasyonlarda keratolitik (cildin soyulmasını sağlar) etkilidir.

Antralinin potent iritan etkisi şahsın toleransına olduğu kadar içerikteki miktarına da bağlıdır. Bu nedenle %0.25 ve %0.50 Antralin içeren Psoraks Krem ve Psoraks Forte Krem üretilmiştir. Tedaviye %0.25'lik Psoraks Krem ile başlanıp en az bir hafta uygulandıktan sonra iritan etki oluşmuyorsa ve gerekirse %0.50'lik Psoraks Krem ile devam edilebilir.

Farmakokinetik: Antralin'in insanlarda topikal uygulamasından sonra sistemik absorpsiyonu saptanmamıştır. İn vitro çalışmalar Antralin'in hasar görmüş deriden 30 dakika içinde kolayca geçtiğini göstermektedir. Salisilik asit ciltten kolayca absorplanır ve yavaşça idrarla atılır.

Endikasyonları: Psoriasisin topikal tedavisinde endikedir.

Kontrendikasyonları: Akut psoriasiste ve bileşimindeki maddelere duyarlı olan hastalarda kullanılmamalıdır.

Yan etkiler / Advers etkiler: Tedavi edilen yaraların etrafındaki ciltte geçici tahrişler görülebilir. İlk tedavide fazla acı veya yaraların çoğalması görülürse tatbik süreleri azaltılıp krem kullanımı bırakılır. Saç ve tırnaklarda geçici renk bozuklukları ortaya çıkabilir⁵.

II.6.Yarı Katı Farmasötik Preparatlar

II.6.1.Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar

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

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

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

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

Jel şeklinde ve yarı preparatlar doğal ve sentetik zamklardan meydana gelen üç boyutlu polimer yapılı esas kütle içinde, katı veya sıvı bir fazın dağılımı ile oluşan yarı katı preparatlardır. Doğal zamklardan kitre zımkı, pektin, karragen, agar ve aljinik asit; sentetik ve yarı sentetik materyallerden de metil selüloz, hidroksi etil selüloz, karboksi metil selüloz ve Carbopoller ile hazırlanır. Esas kütle jelleştirme veya ergitme suretiyle

hazırlanır. Preparatları yarı katı hale getiren ikinci grup maddeler de içerisinde özelliklerine uygun şekilde ilave edilir.

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

II.6.1.1.Kremler

Bilinen kremler haricen yerel olarak deri üzerinde tedavi edici veya cildi güzelleştirmek amacıyla uygulanan ve genellikle su içinde yağ (yağ/su) sistemleridir, ancak yağ oranı merhemden daha azdır. Farmasötik Teknoloji yönünden kremler emülsiyon şeklindeki preparat grupları içinde de örneklendirilebilir. Yumuşak, kolay uygulanabilir kıvamdadır. Kozmetik alanda temizleyici ve koruyucu amaçla tercih edilen preparatlardır. Cildi güneş ışınlarından koruyan kremler, temizleyici kremler, el ayak kremi ve yüz kremi v.b. şeklinde gruplanır. Preparatın pH'sı belirleyici olmamakla beraber, deri pH'sına yakın, yani hafif asidiktir. Farmasötik kremler haricen kullanılmak üzere hazırlanmış emülsiyon şeklindeki preparatlardır, süspansiyon olanlar da vardır ve etken madde içerirler. Krem ifadesi emülsiyon şeklindeki taşıyıcılara özgü bir terimdir^{15,16,17}.

Krem sivağları

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

Krem sivağları başlıca üç gruba ayrılır:

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

Krem formülleri

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

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

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

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

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

Cildi temizlemek amacı ile kullanılan kremler genellikle stearat sabunlarını, trietanolamin sabunu şeklindeki emülsiyonları ve bir değerli metal sabunlarını emülgatör olarak içeren formüllerdir. Genel olarak yağ/su, bazen de su/yağ emüsyonları şeklinde hazırlanır^{15,16,17,18}.

II.7. Kullanılan Yöntemler

II.7.1. Moleküler Lüminesans Spektrometri

Moleküler floresans, fosforesans ve kemilüminesans gibi optik yöntemlerde analit molekülleri, emisyon spektrumları kalitatif veya kantitatif bilgiler sağlayan türleri vermek üzere, uyarılır. Bu yöntemler, *moleküler lüminesans* olarak isimlendirilir.

Floresans ve fosforesans, uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerdirler. Floresans, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun spininde bir değişiklik oluşturmaması ile fosforesanstan ayrılır. Bunun bir sonucu olarak, *floresans* hızlı sönümlenen ($<10^{-5}$ s) bir lüminesans olup, yarı ömrü kısadır. Buna karşılık *fosforesans* emisyonları ile ilişkili elektron spinindeki değişme, ışınlamanın bitmesinden sonra kolayca tespit edilebilir bir süre kadar, genellikle 10^{-4} s-10s, ışımanın sürmesine sebep olur. Her durumda, floresans veya fosforesans olarak fotolülüminesans emisyonu, onu uyarmak için kullanılan ışımanınkinden daha uzun dalga boyundadır.

Lüminesansın diğer bir tipi olan *kemilüminesans*, bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşan uyarılmış bir türün emisyon spektrumuna dayanır. Bazı durumlarda, uyarılmış tür, analit ve uygun bir reaktif arasındaki bir reaksiyonun ürünüdür. Bu durumda sonuç, analitin kendisinden çok, analitin veya reaktifin yükseltgenme ürününün karakteristik bir spektrumudur. Diğer durumlarda, analit kemilüminesans reaksiyonunda doğrudan yer almaz; bunun yerine, analitin bir kemilüminesans reaksiyonuna olan yavaşlatıcı veya katalitik etkisi analitik parametre olarak iş görür.

Fotolüminesans veya kemilüminesansın şiddetinin ölçümü, eser miktarlardaki önemli bazı inorganik veya organik türlerin kantitatif tayinini mümkün kılar.

Lüminesans yöntemlerinin en önemli özelliklerinden biri, absorpsiyon spektroskopisine kıyasla bir ila üç ondalık mertebesinde daha küçük gözlenebilme sınırları sağlayan duyarlılıklarıdır. Tipik gözlenebilme sınırları milyarda bir (ppb)mertebesinde-dir. Fotolüminesans yöntemlerin diğer bir üstünlüğü, geniş doğrusal deşişim aralığı olup, bu da

genellikle absorpsiyon yöntemleriyle karşılaşılanlardan daha büyüktür. Yüksek duyarlıkları nedeniyle, kantitatif lüminesans yöntemleri, sıklıkla numune matriksinden kaynaklanan ciddi girişim etkilerine maruz kalırlar. Bu sebepten, lüminesans ölçümleri genellikle çok iyi kromatografik ve elektroforez ayırma teknikleri ile birlikte kullanılır.

Genel olarak, lüminesans yöntemleri, kantitatif analizde absorpsiyon yöntemlerinden daha az uygulanır. Çünkü, ultraviyole/görünür ışını absorplayan türler, spektrumun bu bölgesinde ışının absorpsiyonu sonucu oluşan fotolüminesans gösterenlerden çok daha fazladır¹⁸.

II.7.1.1. Floresans ve Fosforesans

Floresans basit olduğu kadar karmaşık gaz, sıvı ve katı kimyasal sistemlerde de meydana gelir. Floresansın en basit tipi, seyreltik atomik buharların gösterdiği floresanstır. Örneğin, buhar halindeki sodyum atomlarının 3s elektronları, 589,6 ve 589,0 nm. dalga boylarındaki ışınların absorpsiyonu ile 3p enerji seviyesine uyarılabilir. 10^{-5} – 10^{-8} s sonra, elektronlar temel duruma geri döner ve her yöne doğru, aynı iki dalga boyunda ışın yayımı meydana gelir. Frekansta değişiklik olmaksızın absorplanan ışının yeniden yayılmasını kapsayan floresansın bu tipi *rezonans ışıması* veya *rezonans floresansı* olarak bilinir.

Birçok moleküler tür de, rezonans floresansı gösterir. Bununla beraber çok sık olarak, moleküler floresans (veya fosforesans) bantları rezonans çizgisinden daha uzun dalga boylarında merkezlenmiş olarak bulunur. Bu uzun dalga boylarına veya düşük enerjilere kayma, *stokes kayması* olarak ifade edilir.

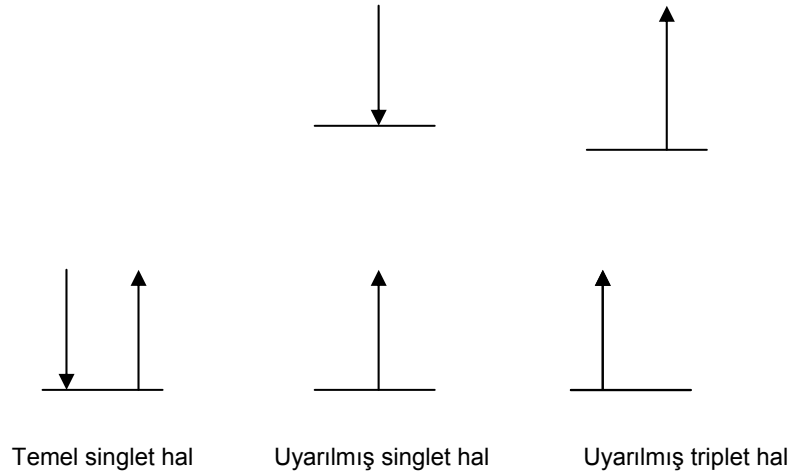
II.7.1.1.1. Floresans ve Fosforesans Oluşturan Uyarılmış Haller

Floresans ve fosforesans spektrumlarının karakteristikleri, basit moleküler orbital kavramı ile açıklanabilir.

Singlet/Triplet Uyarılmış Haller

Bütün elektron spinlerinin eşleşmiş olduğu bir moleküler elektronik hal, bir *singlet hal* olarak adlandırılır ve molekül bir manyetik alana maruz bırakıldığında elektronik enerji seviyelerinde hiçbir yarılma meydana gelmez. Diğer taraftan, bir serbest radikal için temel hal bir *dublet hal*dir. Çünkü, tek elektronun bir manyetik alan içinde, sisteme çok az farklı enerjilerde katkı yapan iki yönlenmeye sahip olduğu kabul edilebilir.

Bir molekülün bir çift elektronundan biri daha yüksek bir enerji seviyesine uyarılırsa ya bir singlet ya da bir triplet hal meydana gelir. Uyarılmış singlet halde uyarılmış elektronun spini hala temel haldeki elektron ile eşleşmiş durumda, bununla beraber, triplet halde, elektronun spinleri eşleşmemiş durumda ve böylece paralel durumdadırlar. Bu haller, oklar spin yönünü göstermek üzere aşağıdaki gibi gösterilebilir. Burada uyarılmış triplet halin, karşı gelen uyarılmış singlet halden daha düşük enerjili olması önemlidir.

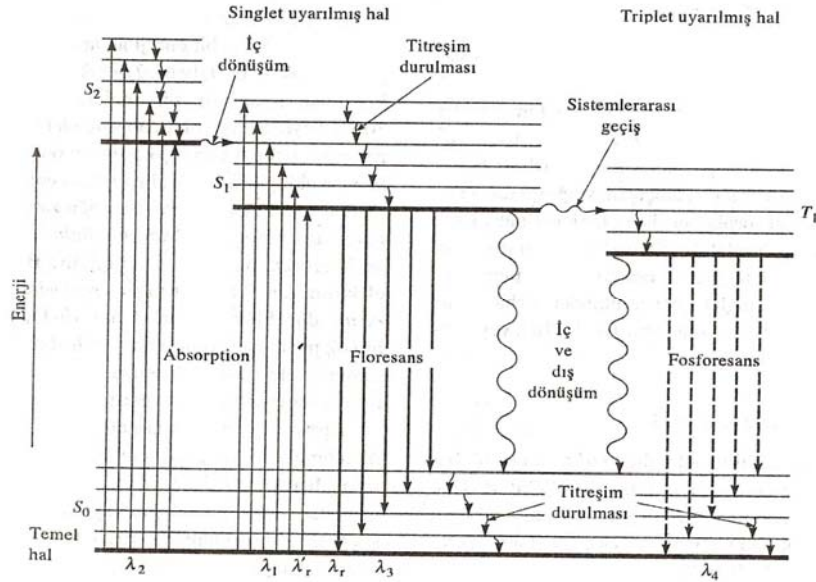


Uyarılmış triplet haldeki bir molekülün özellikleri, uyarılmış singlet halindeki önemli derecede farklıdır. Örneğin, bir molekül triplet halde paramanyetik iken, singlet halde diamanyetiktir. Bununla beraber, daha da önemlisi, elektronun halindeki bir değişmeyi de kapsayan, singlet/triplet geçişinin, karşı gelen singlet/singlet geçişine göre önemli derecede daha az mümkün olması gerçeğidir. Bunun sonucu olarak, bir uyarılmış triplet halinin ortalama ömrü 10^{-4} s'den birkaç saniyeye kadar uzayabilir. Bir uyarılmış singlet halin ortalama ömrü ise 10^{-5} – 10^{-8} s kadardır. Ayrıca, temel haldeki bir molekülün ışıyla, bir uyarılmış triplet hale uyarılması düşük bir olasılığa sahiptir ve bu işlem sonucu oluşan absorpsiyon piklerinin şiddeti, benzer şekilde singlet/singlet geçişine karşı gelenlerinkinden bir kaç kat ondalık mertebesi daha düşüktür. Bununla beraber, bazı moleküllerin, uyarılmış singlet halinden uyarılmış triplet haline geçebileceği görülür. Triplet halden temel hale dönüş, ışıma ile gerçekleştiğinde *fosforesans* olarak adlandırılır¹⁸.

Fotoluminesans Moleküller için Enerji-Seviyesi Diyagramları

Şekil 1, tipik bir fotoluminesans molekülünün kısmi bir enerji-seviyesi diyagramıdır. En alttaki koyu yatay çizgi, normal olarak singlet haldeki molekülün temel hal enerjisini göstermekle olup, S_0 ile gösterilmiştir. Oda sıcaklığında, bu hal, bir çözeltideki moleküllerin hemen hemen tamamının enerjisini gösterir. En üstteki koyu çizgiler, üç uyarılmış elektronik halin temel titreşim halleri için enerji seviyelerini göstermektedir. Soldaki iki çizgi, birinci (S_1) ve ikinci (S_2) elektronik singlet hallerini gösterir. Sağdaki tek çizgi (T_1) birinci elektronik triplet halinin enerjisini gösterir. Normal olarak, birinci uyarılmış triplet halin enerjisi, karşı gelen singlet halin enerjisinden daha düşüktür. Daha ince yatay çizgilerle gösterilen çok sayıda titreşim enerji seviyesi, dört elektronik halin her biri ile ilişkilidir.

Şekil 1’de görüldüğü gibi, bu molekülün uyarılması, biri yaklaşık λ_1 dalga boyunda ($S_0 \rightarrow S_1$) ve ikincisi de daha kısa dalga boyu, λ_2 ($S_0 \rightarrow S_2$) civarında merkezilenmiş iki ışın bandının absorpsiyonu ile meydana gelebilir. Uyarılma işlemi, molekülün çok sayıda uyarılmış titreşim halinden herhangi birine dönüşü ile sonuçlanır. Şekilde, triplet hale doğrudan uyarılma da gösterilmemiştir. Çünkü bu işlem, multiplisitede bir değişmeyi gerektirir ve bu geçişin olma olasılığı düşüktür (bu tip düşük olasılıklı bir geçişe *yasaklanmış* denir).



Şekil 1. Fotolüminesans Bir Sistem için Kısmi Enerji Diyagramı

II.7.1.1.2.Sönüm İşlemleri

Uyarılmış halden temel hale dönüş sürecinde gerçekleşen olaylar sönüm işlemleri olarak isimlendirilir. Uyarılmış bir molekül temel haline birkaç mekanik basamağın bir birleşimi yoluyla dönebilir. Şekil 1’de de düz düşey okların gösterdiği gibi, bu basamakların ikisi, ışıma veya fotonun yayımını içeren *floresans* ve *fosforesans*tır. Dalgalı oklarla

gösterilen diğer sönüm basamakları ışımasız olaylardır. Temel hale geçişte en tercih edilen yol uyarılmış halin ömrünü en az yapan yoldur. Bu yüzden, ışımasız geçişlere göre floresans ile sönüm kinetiği hızlı ise, bir emisyon gözlenir. Diğer tarafta eğer bir ışımasız yol daha büyük hız sabitine sahipse floresans ya yoktur ya da çok düşük şiddettedir. Uyarılmış haldeki molekül fazla enerjisini *titreşimsel durulma, iç dönüşüm, dış dönüşüm, sistemler arası geçiş, ayrışma, ön ayrışma* yoluyla kısmen veya tamamen kullanabilir.

II.7.1.1.3.Floresans ve Fosforesansı Etkileyen Değişkenler

Moleküler yapı ve kimyasal çevre, maddenin lüminesans yapıp yapmamasına ve lüminesans şiddetine etki eder.

Kuantum Verimi: Floresans veya fosforesans için kuantum verimi, basit olarak lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranıdır.

Floresansta Geçiş Tipleri: Bir molekülün ışığı absorplama yeteneği ne kadar yüksek olursa floresans emisyon şiddeti de orantılı olarak yüksek olur. $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin molar absorptivite katsayısı yaklaşık $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olup, bu moleküllerde gözlenen $\pi^* \rightarrow \pi$ floresansı da oldukça şiddetlidir. Heteroatom içeren bileşiklerde ise $n \rightarrow \pi^*$ geçişi söz konusudur ve bu geçişin molar absorptivite katsayısı yaklaşık $10^2\text{-}10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olduğundan bu moleküllerin yaptığı floresans şiddeti göreceli olarak düşüktür. Fakat $n \rightarrow \pi^*$ türü bir geçişten sonra oluşan sistemler arası geçiş olasılığı $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine kıyasla daha yüksektir. Bu nedenle heteroatom içeren bir molekülde sistemler arası geçiş olasılığı, dolayısıyla fosforesans oluşma ihtimali daha yüksektir.

Floresans ve Yapı: Molekölün düzlemsel ve rijit yapıda olması, konjugasyon ve halka sayısının artması, floresans verimini artırır. Halkalı bir yapıda elektron yoğunluğunu arttıran substitientler de floresans kuvantum verimini artırır. Ancak yapıya halojenlerin bağlanması, sistemler arası geçişi artırdığı için floresansı düşürür.

Sıcaklık ve Çözücü Etkileri: Birçok molekülde floresansın kuvantum verimi sıcaklık arttıkça azalır. Çünkü yüksek sıcaklıklarda çarpışma frekansının artması dış dönüşüm ile sönüm olasılığını artırır. Çözücü viskozitesindeki azalma da benzer şekilde dış dönüşümü artırır ve aynı sonuca götürür. Bir molekülün floresansı, ağır atomları içeren veya yapılarında bu atomları bulunduran çözücüler varlığında azalır. Bu etki, ağır atomların floresans yapan bileşiklerde süstitüent olarak bulunduğu durumdakine benzer şekilde triplet oluşum hızında artışa ve dolayısıyla floresansta bir azalmaya sebep olur. Çözeltiliye ağır iyon ilavesiyle floresans azalır, fosforesans artar.

pH'nın Etkisi: Bileşiğin pH'ya bağlı olarak iyonlaşmış veya iyonlaşmamış halde bulunması floresansı etkiler. Bu tip bileşiklerin emisyonundaki değişimler, rezonansın değişmesinden kaynaklanır.

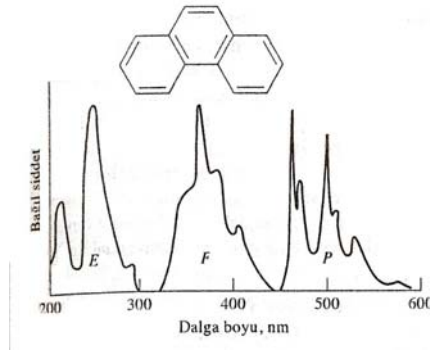
Çözünmüş Oksijenin Etkisi: Bir çözeltide, çözünmüş oksijenin varlığı, genellikle floresans şiddetini azaltır. Oksijenin paramanyetik özelliğinden dolayı sistemler arası geçiş ve triplet hal oluşumu artmakla birlikte fosforesans sinyali de azalır.

Derişimin Etkisi: Yüksek derişimde doğrusallıktan negatif yönde sapma iki nedene bağlıdır. Birincisi uyarılmış moleküller arası çarpışma sonucu

oluşan sönüm, diğeri ise emisyon dalga boyunun absorpsiyon piki ile örtüşmesi sonucu gerçekleşen öz absorpsiyondur.

II.7.1.1.4.Emisyon ve Uyarma Spektrumları

Şekil 2’de fenantren için üç tip fotolüminesans spektrumu görülmektedir. Bir uyarma spektrumu (Şekildeki E), uyarma dalga boyu değiştirilirken sabit bir dalga boyunda lüminesans şiddetinin ölçülmesiyle edilir. Floresans emisyonu oluşturmada birinci basamak, uyarılmış halde elde etmek için ışının absorpsiyonu olduğundan, bir uyarma spektrumu esasen aynı şartlar altında elde edilen bir absorpsiyon spektrumu ile aynıdır. Diğer taraftan, floresans ve fosforesans spektrumlarında (sırasıyla F ve P), dalga boyunun bir fonksiyonu olarak emisyon şiddeti kaydedilirken uyarma dalga boyu sabit tutulmaktadır¹⁸.

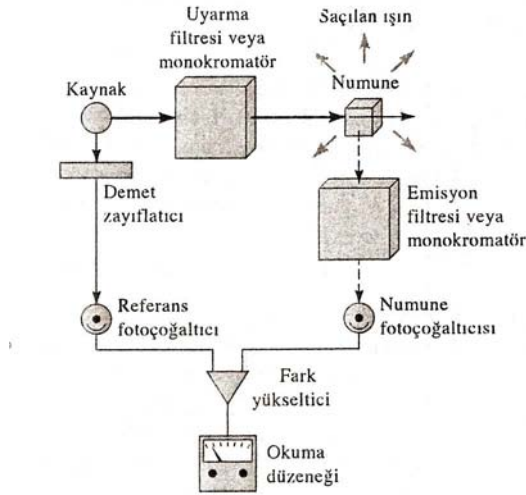


Şekil 2. Fenantren için Spektrumlar
E: Uyarma, F: Floresans, P:Fosforesans

Fotolüminesans genellikle uyarma dalga boyundan daha uzun dalga boylarında olur. Ayrıca, fosforesans bantları genellikle floresans bantlarından daha uzun dalga boylarında bulunur. Çünkü uyarılmış triplet hal, karşılık gelen singlet halden daha düşük enerjilidir. İkisi arasındaki dalga boyu farkı, triplet ve singlet haller arasındaki enerji farkının uygun bir ölçüsünü verir.

II.7.1.2.Floresans ve Fosforesans Spektrofotometreleri

UV ve görünür bölgede kullanılan bir ışık kaynağından gelen ışık, uyarma dalga boyu seçicisinden geçtikten sonra numuneye gönderilir. Numunenin emisyonu ışık kaynağına göre 90° lik açıdaki emisyon dalga boyu seçicisinden geçerek dedektöre ulaşır. Böylece kaynaktan gelerek transmit edilen ışığın dedektöre ulaşması engellenir. Şekil 3'de fotoluminesans işlemleri için kullanılan genel bir cihazın bileşenleri gösterilmektedir.



Şekil 3. Bir Spektrofluorometrenin Bileşenleri

Floresansın ölçüldüğü dalga boyu sabit tutulup uyarma dalga boyunun taranması ile elde edilen spektruma *uyarma spektrumu*, uyarma dalga boyu sabit tutulup emisyon dalga boyunun tarandığı spektruma *emisyon spektrumu* denir. Hem uyarma hem de emisyon dalga boyu seçicilerinin aralarında tanımlanmış bir dalga boyu farkı birlikte değiştirilerek elde edilen spektruma ise *senkronize floresans spektrumu* adı verilir^{18,19}.

II.7.1.3. Senkronize Floresans Spektrometri

Çok bileşenli karışımlarda, analitlerin emisyon spektrumlarının çakışması durumu, seçiciliğin azalması ve dolayısıyla her bir analite ilişkin kantitatif verilerin elde edilmesini güçleştirir. Floresans spektrometrinin çok sayıda avantajından biri de gelişmiş enstrümantasyon ve modifiye çoklu bileşen tayini teknikleriyle duyarlılığın ve seçiciliğin gelişimine imkan vermesidir. Karışımlar için önerilen bu yöntemler arasında **a) Senkronize lüminesans spektrometri**²⁰ ve **b) Türev lüminesans spektrometri**²¹ sayılabilir.

a) Senkronize Floresans Spektrometri

Senkronize eksitasyon lüminesansın kullanımı ilk olarak Lloyd²⁰ tarafından önerilmiştir. Yöntem daha sonra geliştirilmesine rağmen eksikleri vardır. Vo-Dinh²², tekniğin temelleri hakkında analiz yapmış ve kompleks bileşiklerdeki analitlerin spektral ölçümlerini mümkün kılan deneysel yollar önermiştir. Klasik floresans yönteminde numune tek bir eksitasyon dalga boyunda, λ_{ex} , uyarılır ve emisyon dalga boyu, λ_{em} , taranarak bir *emisyon spektrumu* oluşturulur. Benzer şekilde *eksitasyon spektrumu*, tek bir dalga boyunda emisyon sinyali kaydedilirken, eksitasyon dalga boyunun taranmasıyla elde edilir. Bir diğer seçenek, λ_{ex} ve λ_{em} eş zamanlı (senkronize) değiştirmektir. Bu teknik, senkronize floresans spektrometri olarak adlandırılır ve monokromatörlerin tarama hızlarına bağlı olarak farklı isimler alır.

I. Sabit Dalga Boyu Aralıklı Senkronize Floresans Spektrometri

Eğer her iki monokromatör arasındaki dalga boyu farkı ($\lambda_{em}-\lambda_{ex} = \Delta\lambda$) sabit tutularak tarama yapılıyorsa yöntem, *sabit dalga boyu aralıklı senkronize eksitasyon floresans spektroskopisi* olarak adlandırılır. Bu teknik, oldukça basittir ve tüm senkronize modları arasında en yaygın kullanılanıdır.

II. Sabit Enerji Aralıklı Senkronize Floresans Spektroskopisi

Spektrum taraması sırasında uyarma ve emisyon monokromotörleri arasındaki farkın enerji cinsinden sabit tutulduğu durumlarda, yöntem *sabit enerji aralıklı senkronize floresans spektroskopisi* olarak adlandırılır. Bu yöntem daha az kullanılmıştır²³.

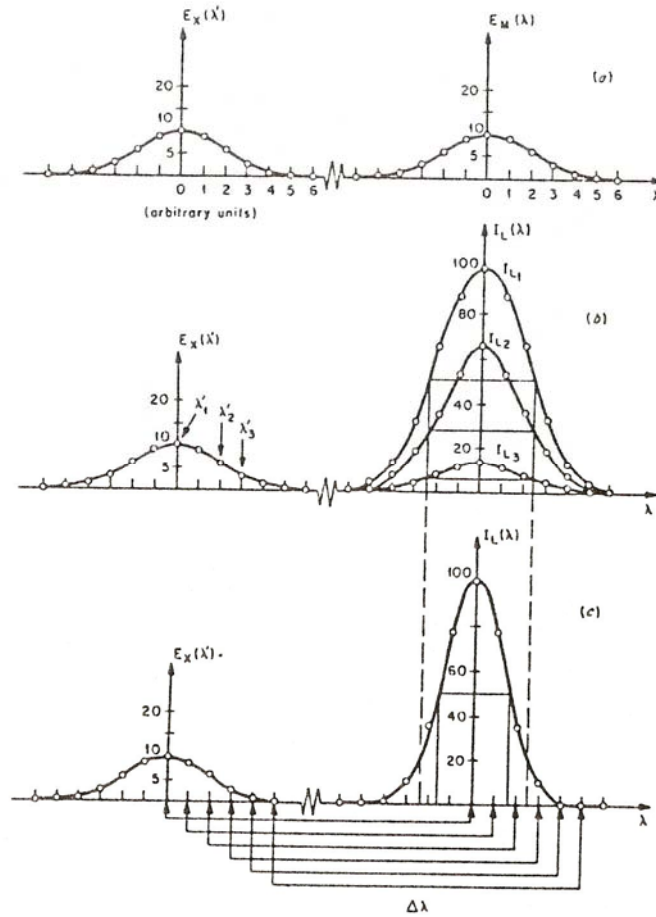
III. Açı Değişken Senkronize Tarama

Bu teknik, Kubic²⁴ ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Eksitasyon ve emisyon dalga boyları, eş zamanlı olarak fakat birbirinden bağımsız bir şekilde farklı hızlarda değiştirilebilir. Bu modda iki monokromotör arasındaki dalga boyu veya enerji farkı sabit değildir. Bu yaklaşım, *Açı Değişkenli Senkronize Eksitasyon Florimetri* olarak bilinir.

Senkronize olarak taranmış bir emisyon veya eksitasyon dalga boyu ile alınan senkronize sinyal, bir emisyon veya bir eksitasyon spektrumu olarak kabul edilir. Spektral dağılım, emisyon ve eksitasyon dalga boyları arasındaki farkın, $\Delta\lambda$, bir fonksiyonudur. Bir bileşen için maksimum floresans şiddeti, $\Delta\lambda$, absorpsiyon ve emisyon dalga boyları arasındaki farka karşılık geldiğinde elde edilir. Senkronize floresans spektroskopinin temel özellikleri aşağıdaki gibidir²²:

i. Daralmış spektral bantlar: Bu etki, temelde, iki eş zamanlı artan ve/veya azalan fonksiyonun toplamıdır. Şekil 4.a'da emisyon ve eksitasyon bantları gösterilmiştir. Şekil 4.b de görüldüğü gibi, aynı molekül monokromatik olarak sırasıyla λ_3 , λ_2 ve λ_1 de uyarılırsa, şiddet, eksitasyon şiddetiyle orantılı olarak artar, fakat bant genişliği değişmeden kalır. Ancak, Şekil 4.c de görüldüğü gibi, eğer emisyon, eksitasyon ve emisyon spektrumlarının maksimumuna eşit bir $\Delta\lambda$ ile senkronize olarak alınmışsa, sinyal daha dar bir pik olacak, fakat şiddeti sabit λ_{ex} inkiyle aynı olacaktır.

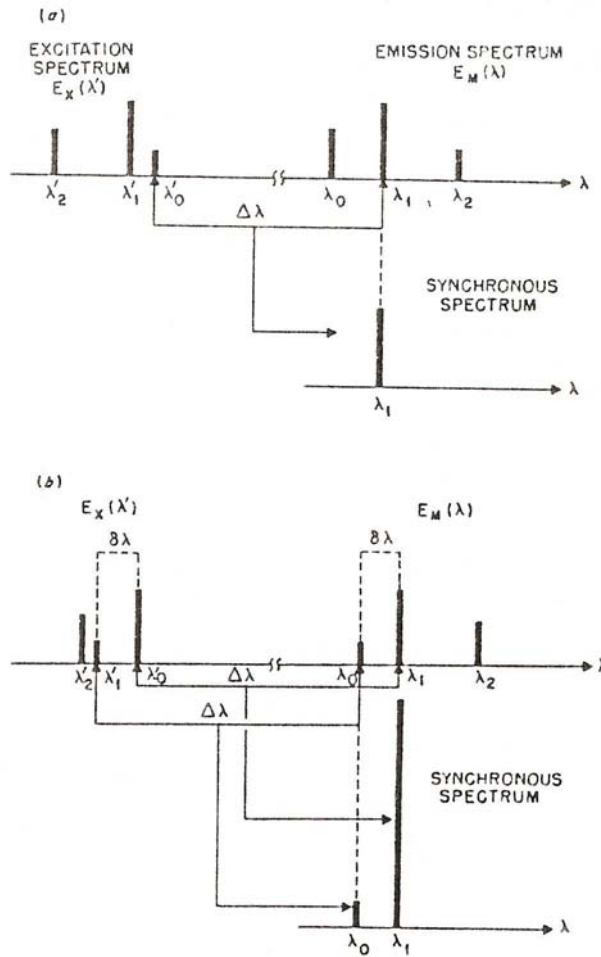
ii. Emisyon spektrumlarının basitleşmesi: Sabit bir λ_{ex} de gerçekleşen klasik spektrofotrimetride sadece aynı anda tüm emisyon bantlarının şiddetini artırmak mümkündür, oysa senkronize tekniği, uygun $\Delta\lambda$ değerlerinin kullanımıyla kuvvetli piklerin seçiciliğinin artmasına neden olur. Bu durum, Şekil.5.a da görülmektedir, burada $\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_0$, dalga boyu aralığı olarak kabul edilmiştir. Bu aralık sadece λ_0 daki absorpsiyon bandı ve λ_1 deki emisyon pikiyle eşleşmektedir. Şekil 5.b.de görüldüğü gibi, dalga boyu aralıklarının çeşitli kombinasyonları arasından uygun bir $\Delta\lambda$ değeri seçerek karışımdaki bir bileşenin spesifik analizi mümkündür.



Şekil 4. Senkronize Taramanın Bant Daralması Üzerine Etkisinin Şematik Gösterimi²².

a)Eksitasyon ve emisyon bantları b)Aynı molekülün $\lambda_3, \lambda_2, \lambda_1$ de monokromatik olarak uyarılmış halleri c)Eksitasyon ve emisyon spektrumlarının maksimumlarına eşit bir $\Delta\lambda$ ile senkronize olarak elde edilen emisyon

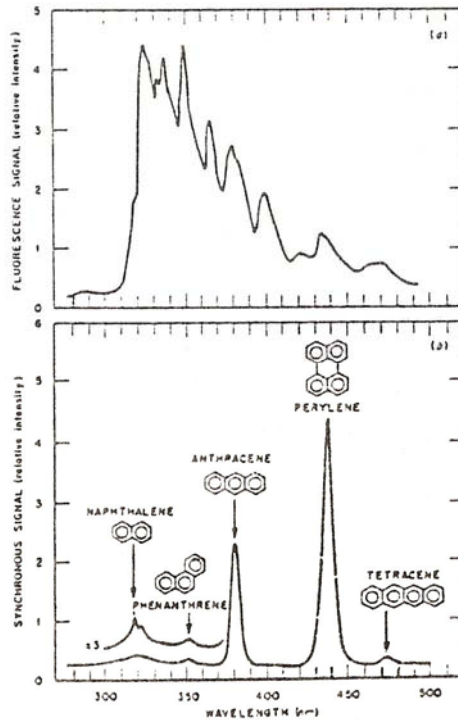
iii. Spektrumun basitleştirilmesi: Temel araştırmalar yapan araştırmacılar da dahil, spektrometri çalışanlar için emisyon spektrumunun ayrıntılı yapısının elde edilmesi önemlidir, çünkü bu spektrum analitin fiziksel özelliklerini yansıtır. Ancak, kantitatif çalışmalarda spektrumun tüm detayları önemli olmayabilir. Genellikle tayin için gerekli birkaç spektral band seçilir, bu da yeterlidir. Diğer spektrometrik detayların çoğu, genellikle dikkate alınmaz, onların varlığı toplam spektrumun karmaşık hale gelmesine neden olur (Şekil 5).



Şekil 5. Senkronize Taramanın Spektral Basitleştirme Etkisi²². a) Eğer sadece absorpsiyon ve emisyon bantlarıyla eşleşen tek bir $\Delta\lambda$ değeri seçmek ve kullanmak mümkün olursa, senkronize spektrum sadece tek bir bant olarak görünecektir. b) Emisyon ve eksitasyondaki iki veya (birçok çift) bandın eşit dalga boyu aralıkları gösterdikleri durum c) İki bandın emisyon ve eksitasyonlarından eşit dalga boyu aralıklarının görüldüğü durum

iv. Bir bileşenin floresansı, Rayleigh ve Raman saçılmasından etkileniyorsa, senkronize eksitasyon tekniği, klasik tekniklere oranla ölçümde bir gelişme sağlanmasına, eğer uygun $\Delta\lambda$ değerleri seçilebiliyorsa, izin verir²⁵. Raman saçılmasının minimizasyonu, aynı zamanda kesinliği artırır ve doğrusal dinamik aralığı genişletir, bu da daha iyi kalibrasyon doğruları ve düşük dedeksiyon limitleri ile sonuçlanır.

v. Seçicilik ve çok bileşenli analiz yaklaşımı: Klasik florimetride, karışımdaki her bir bileşeni seçici olarak uyarmak mümkündür, her biri bir spesifik bileşene en uygun olan farklı bir eksitasyon dalga boyu kullanılarak birçok ölçüm yapılabilir. Senkronize yöntemle de, aynı ölçümlerde daha kullanışlı veri elde etmek mümkündür ve ayrıca daha kısa ölçüm süresinde sonuç alınır. Klasik floresans spektrumu, bileşenlerin çok sayıda titreşimsel bantlarını gösterir, bunlar birkaç yüz nanometrelik büyük bir spektral aralığı kapsar (Şekil 6.a). Oysa, çoğu stokes kaymasına yakın, $\Delta\lambda=3$ nm olan bir senkronize spektrumda 10- 15 nm yarı pik genişliğinde tek bir band, 0-0 band pozisyonunda gözlenir (Şekil 6.b).



Şekil 6. a)Naftalen, Fenantren, Antrasen, Perilen ve Tetrasen Karışımının Klasik Floresans Spektrumu b)Aynı Karışımın Senkronize Floresans Spektrumu²²

Farmasötik formlarda ikili ve üçlü karışımlardaki bileşenlerin kantitatif tayinlerinde senkronize floresans spektrometrisinin kullanımına ilişkin çalışmalar çok sayıda değildir. Bu çalışmalara biyolojik matrikslerdeki ilaç etken maddesi ve metabolit tayinleri de eklenebilir.

Senkronize floresans yöntemiyle farmasötik preparatlarda temafloksazin²⁶, propranolol ve hidralazin²⁷, Warfarin ve bromadiolon²⁸, pridoksal ve pridoksamin²⁹, famotidin, flukonazol and ketokonazol³⁰, pridoksal, pridoksamin and pridoksik asit³¹, atenolol, propranolol, dipridamol and amilorid³², flufenamik, meklofenamik and mefenamik asitler³³, riboflavin and pridoksin³⁴, karvedilol and ampisilin sodyum³⁵, vitamin B-1, B-2, B-6³⁶, asetilsalisilik asit ve kafein³⁷, sinnarizin ve domperidon³⁸, sinnarizin ve nisergolin³⁹, metklopramid ve pridoksin⁴⁰, levodopa ve karbidopa⁴¹, naproksen and diflunisal⁴²; biyolojik matrikslerde ise asetil salisilik asit ve salisilik asit⁴³, diflunisal ve salisilik asit⁴⁴, naproksen ve desmetil metaboliti⁴⁵, 3 aspirin metaboliti⁴⁶, naproksen ve salisilik asit⁴⁷, naproksen and diflunisal⁴⁸ tayinleri yapılmıştır.

III. MATERYAL VE YÖNTEM

III.1. Kullanılan Kimyasallar

Antralin
Salisilik asit
Etanol (Riedel-de Haen)
Metanol (Riedel-de Haen)
Borik asit
Sodyum hidroksit

III.2. Kullanılan Cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu UV 160 A)
Spektroflorimetre (Varian Carry Eclipse)
Santrifüj (Nüve Fuge CN 090)
Hassas terazi (Shimadzu AW 320)
Ultrasonik Banyo (Bandelin Sonorex)

III.3. Kullanılan Farmasötik Preparat

Psoraks Krem, 30 g
(%0.25 Antralin, %0.20 Salisilik asit)

III.4. Kremlerde Senkronize Floresans Spektrofotometrisi Yöntemiyle Antralin ve Salisilik Asit Miktar Tayini

III. 4. 1. Antralin Miktar Tayini

III. 4. 1. 1. Antralin Kalibrasyon Doğrusu için Kullanılan Çözeltiler

12.4 mg standart Antralin hassas olarak tartıldı, metanolde çözülerek 50.0 ml ye tamamlandı. Böylece elde edilen 246 µg/ml'lik Antralin çözeltisinden 0.2; 0.30; 0.4; 0.5 ve 0.6 ml'lik çözeltiler alınarak metanolle 25.0'er ml. ye seyreltildi. Elde edilen 1.97, 2.95, 3.94; 4.92 ve 5.90 µg/ml'lik Antralin çözeltilerinin 200-600 nm dalga boyu aralığında senkronize floresans spektrumu alındı ve 386 nm.deki emisyon değerleri okunarak Antralin için kalibrasyon grafiği çizildi (Antralin için $\Delta\lambda=140$ nm, slit aralığı 10 nm).

III.4.1.2. Krem Numunelerinde Antralin Miktar Tayini

Antralin ve salisilik asit içeren kremden 0.1001 g hassas olarak tartıldı. Bu krem, bir beher içinde baget yardımıyla üzerine küçük hacimlerde metanol eklenerek karıştırıldı. Böylece daha az yoğun heterojen yapıya sahip bir karışım oluşturuldu ve 10 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Beher, metanolle yıkanarak çözelti balonjojeye aktarıldı ve 50.0 ml. ye metanolle tamamlanmadan önce 100 µl 0.1 M Borat tamponu (pH=10) eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı. Bu çözeltinin 200-600 nm dalga boyu aralığında senkronize floresans spektrumu alındı ve 386 nm.deki (Antralin için $\Delta\lambda=140$ nm, slit aralığı 10 nm) emisyon değerleri okunarak aynı koşullarda çizilen kalibrasyon doğrusu yardımıyla kremin içerdiği Antralin miktarı hesaplandı.

III. 4. 2. Salisilik Asit Miktar Tayini

III. 4. 2. 1. Salisilik Asit Kalibrasyon Doğrusu için Kullanılan Çözeltiler

40.0 mg Salisilik Asit hassas olarak tartıldı, metanolde çözülerek 100.0 ml ye tamamlandı. Bu çözeltiden 0.1 ml alınarak 25.0 ml.ye seyreltildi. Buradan 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 ve 0.5 ml.lik çözeltiler alınarak herbiri 10.0 ml ye metanol ile seyreltildi. Böylece elde edilen 0.016; 0.032; 0.048; 0.064 ve 0.080 µg/ml'lik Salisilik Asit çözeltilerinin 200-600 nm dalga boyu aralığında senkronize floresans spektrumu alındı ve 297 nm.deki emisyon değerleri okunarak Salisilik Asit için kalibrasyon grafiği çizildi (Salisilik Asit için $\Delta\lambda=110$ nm, slit aralığı 10 nm).

III.4.2.2. Krem Numunelerinde Salisilik Asit Miktar Tayini

Antralin ve salisilik asit içeren kremden 0.1001 g hassas olarak tartıldı. Bu krem, bir beher içinde baget yardımıyla üzerine küçük hacimlerde metanol eklenerek karıştırıldı. Böylece daha az yoğun heterojen yapıya sahip bir karışım oluşturuldu ve 10 dakika ultrasonik banyoda karıştırıldı. Beher, metanolle yıkanarak çözelti balonjojeye aktarıldı ve 50.0 ml. ye metanolle tamamlandı. Bu çözeltinin 0.2 ml. si 25.0 ml. ye seyreltildi ve 200-600 nm dalga boyu aralığında senkronize floresans spektrumu alınarak 297 nm.deki (Salisilik asit için $\Delta\lambda=110$ nm, slit aralığı 10 nm) emisyon değerleri okundu ve aynı koşullarda çizilen kalibrasyon doğrusu yardımıyla kremin içerdiği Salisilik asit miktarı hesaplandı.

III.5. Geri Kazanım Çalışmaları

III.5.1. Kremlerde Antralin Geri Kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 2.5 µg/ml Antralin içeren krem çözeltisi üzerine 1.5 µg/ml stok Antralin çözeltisi eklendi. pH'sı ayarlanan bu çözeltinin belirtilen koşullarda 386 nm deki emisyon değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon doğrusundan hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

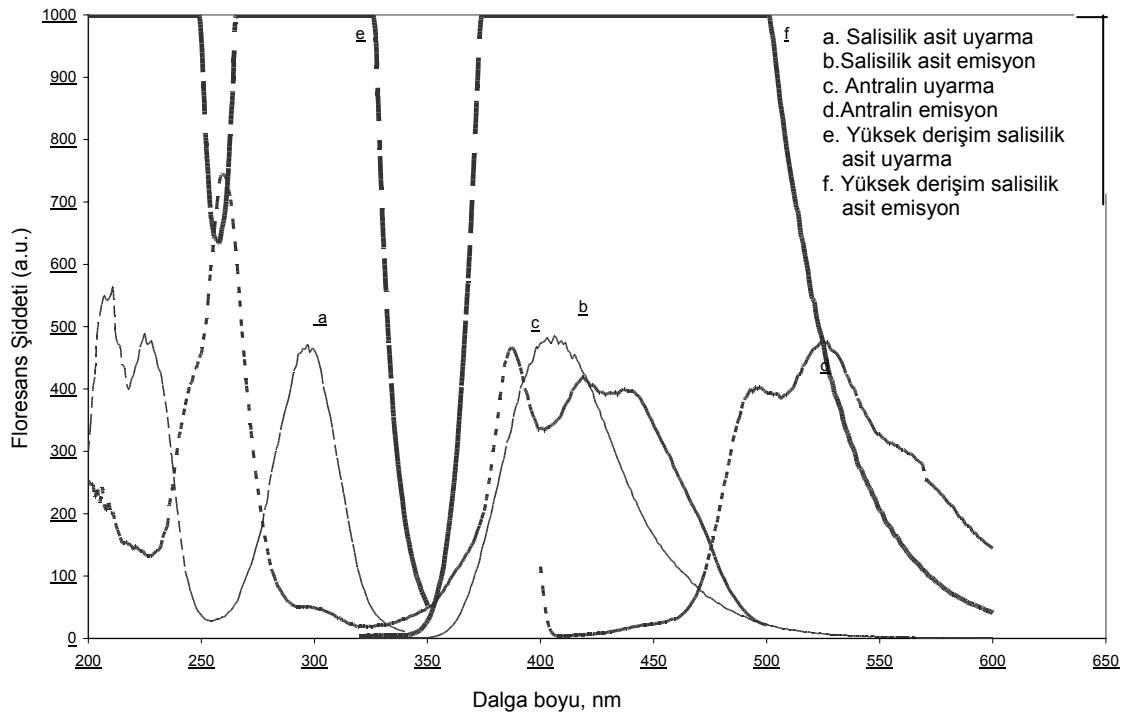
III.5.2. Kremlerde Salisilik Asit Geri Kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 0.02 µg/ml Salisilik asit içeren krem çözeltisi üzerine 0.015 µg/ml stok Salisilik asit çözeltisi eklendi. Elde edilen çözeltinin belirtilen koşullarda 297 nm deki emisyon değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon doğrusundan hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

IV. BULGULAR

IV.1. Antralin ve Salisilik Asidin Floresans Spektrumları

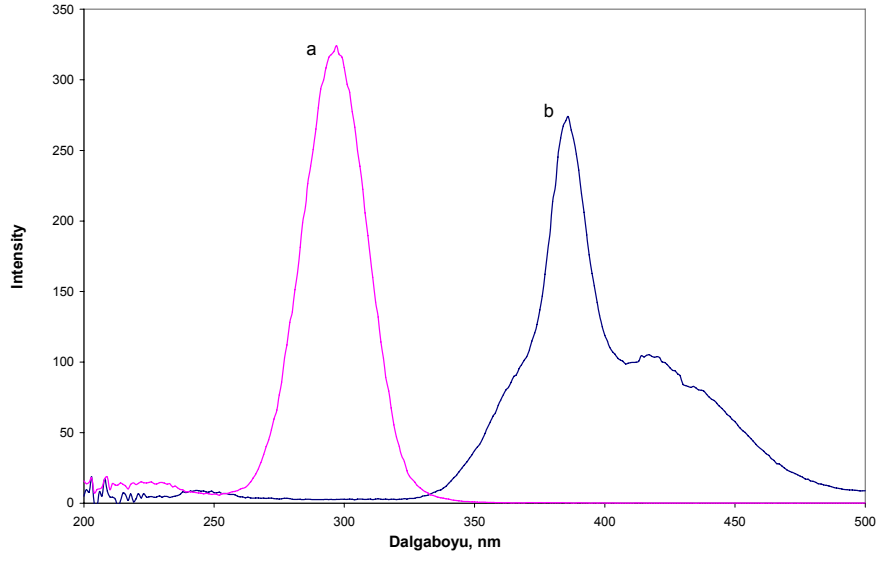
Metanolde hazırlanmış antralin ve salisilik asit çözeltilerinin uyarma ve emisyon spektrumları sırasıyla Şekil 7'de gösterilmiştir.



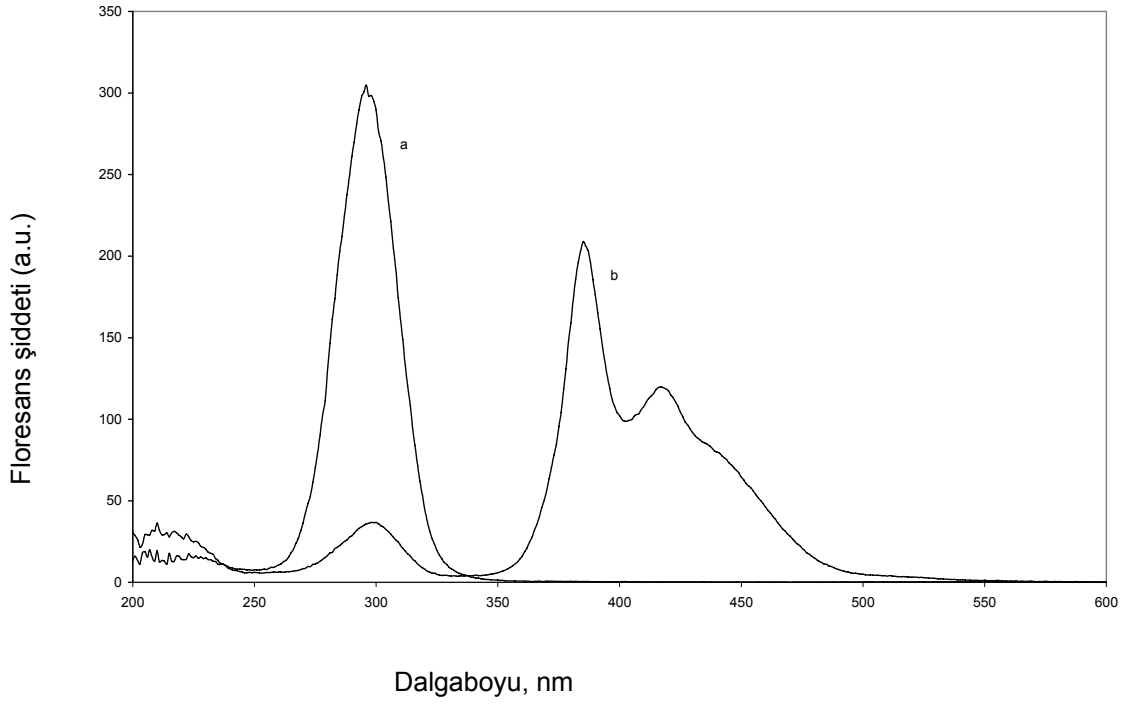
Şekil 7. Metanolde Hazırlanmış Antralin ve Salisilik Asit Çözeltilerinin Uyarma ve Emisyon Spektrumları $\lambda_{uyarma}=389$ nm (Antralin) $\lambda_{uyarma}=296$ nm (Salisilik Asit)

IV.2. Çalışma Dalga Boylarının Seçimi

Antralin çözeltisi ve Salisilik asit çözeltisinin 200-600 nm dalga boyu aralığında üst üste çekilmiş senkronize floresans spektrumları, Antralin tayininde kullanılan koşullar Şekil 8, ve Salisilik Asit tayininde kullanılan koşullar Şekil 9 da olmak üzere gösterilmiştir.



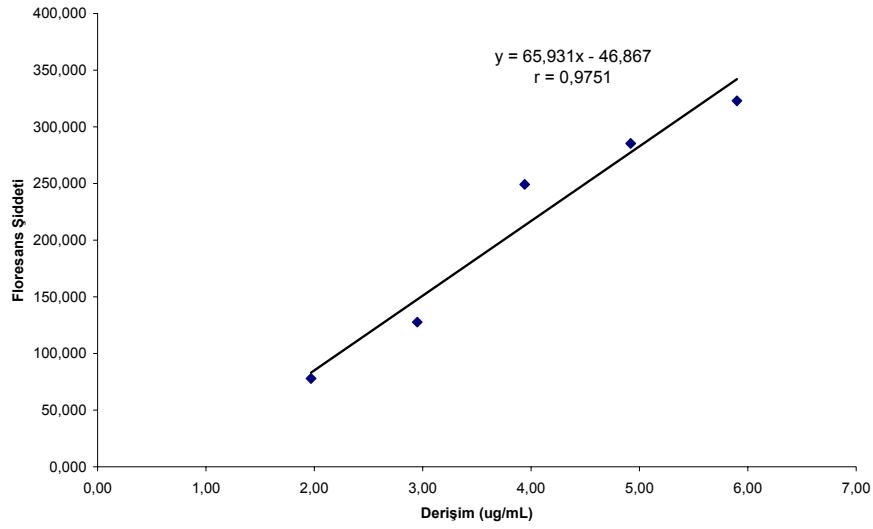
Şekil 8. Antralin Tayininde Kullanılan Senkronize Floresans Spektrumu, $\lambda\Delta=140$ nm
(a)Salisilik asit (b)Antralin



Şekil 9. Salisilik Asit Tayininde Kullanılan Senkronize Floresans Spektrumu, $\lambda\Delta=110$ nm
(a)Salisilik Asit (b)Antralin

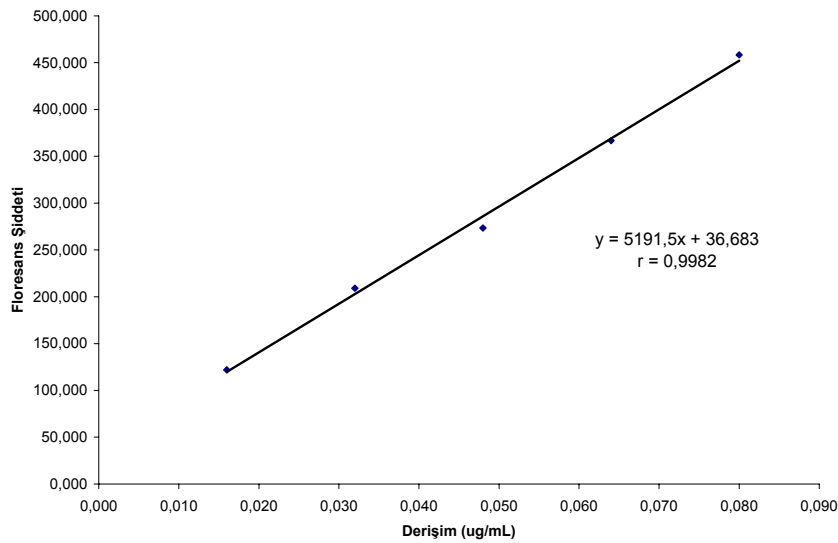
IV.3. Kremlerde Sekronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Antralin ve Salisilik Asit Miktar Tayini Sonuçları

Kremlerde Antralin miktar tayini için 386 nm. de ($\lambda\Delta=140$ nm) çizilen kalibrasyon doğrusu Şekil 10. da gösterilmiştir.



Şekil 10. Antralin Tayininde Kullanılan Kalibrasyon Doğrusu

Kremlerde salisilik asit miktar tayini için 297 nm. de ($\lambda\Delta=110$ nm) çizilen kalibrasyon doğrusu Şekil 11. de gösterilmiştir.



Şekil 11. Salisilik Asit Tayininde Kullanılan Kalibrasyon Doğrusu

Senkronize floresans spektrometrisi ile elde edilen analitik performans verileri Tablo 1.de görülmektedir.

Tablo 1. Senkronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Elde Edilen Analitik Parametreler

	Antralin (386 nm)	Salisilik asit (297 nm)					
Doğrusal çalışma aralığı(µg/ml)	1.97- 5.90	0.016-0.080					
Doğru Denklemi	y=65.931C-46.867	y=5191.5C+36.683					
Eğimin Standart Hatası	8.65	178,00					
Kesişimin Standart Hatası	36.11	16316,00					
Korelasyon katsayısı, r	0.9751	0.9982					
*LOD (µg/ml)	0.06	6.35x10 ⁻⁴					
**LOQ (µg/ml)	0.22	2.11x10 ⁻³					
GÜN İÇİ TEKRARLANABİLİRLİK							
Antralin				Salisilik asit			
KONS. µg/ml	GÜN 1	GÜN 2	GÜN 3	KONS. µg/ml	GÜN 1	GÜN 2	GÜN 3
1,97	77,94	77,23	77,43	0,016	121,81	120,99	122,21
	79,12	76,22	78,12		119,71	121,51	121,79
	76,23	74.38	75,42		121,44	122,61	121,52
X _{Ort}	77,76	77,61	76,99	X _{Ort}	120,99	121,71	121,82
SS	1,45	1,61	1,4	SS	1,1	0,82	0,34
BSS	1,86	2,07	1,8	BSS	0,91	0,67	0,28
GÜNLER ARASI TEKRARLANABİLİRLİK							
Antralin				Salisilik asit			
KONS. µg/ml	GÜN 1	GÜN 2	GÜN 3	KONS. µg/ml			
1,97	77,76	77,61	76,99	0,016	120,99	121,71	121,82
X _{Ort}	77,45			X _{Ort}	121,51		
SS	0,41			SS	0,44		
BSS	0,53			BSS	0,36		

*LOD: Yakalama alt sınırı (Limit of Detection) (S/N=3)

**LOQ: Tayin alt sınırı (Limit of Quantification) (S/N=10)

Kremlerde Senkronize Floresans Spektrometrisi yöntemiyle elde edilen Antralin ve Salisilik asit miktar tayini sonuçları, sırasıyla, Tablo 2 ve Tablo 3 de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kremlerde Senkronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Antralin Miktar Tayini Sonuçları

Numune No.	% Antralin	Belirtilen Miktar (%0.25)
1	0.24	$X_{Ort} = 0.25$ $SS = 7.07 \times 10^{-3}$ $\%BSS = 2.82$ $GA = 0.24 - 0.26$ $(p=0.05)$
2	0.25	
3	0.25	
4	0.26	
5	0.25	

Tablo 3. Kremlerde Senkronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Salisilik Asit Miktar Tayini Sonuçları

Numune No.	% Salisilik Asit	Belirtilen Miktar % 0.20
1	0.19	$X_{Ort} = 0.184$ $SS = 8.9 \times 10^{-3}$ $\%BSS = 4.80$ $GA=0.174 - 0.194$ $(p=0.05)$
2	0.17	
3	0.19	
4	0.18	
5	0.19	

IV.4. Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

Kremlerde senkronize floresans spektrometrisi yöntemiyle belirtilen koşullarda yapılan geri kazanım çalışmaları sonuçları Antralin için Tablo 4. de, Salisilik asit için Tablo 5. de gösterilmiştir.

Tablo 4. Kremlerde Antralin Geri Kazanım Sonuçları

Numune No.	% Antralin	
1	97.63	$X_{Ort} = 99.80$ $SS = 2.27$ $\%BSS = 2.27$ $GA = 96.98 - 102.60$ $(p=0.05)$
2	98.63	
3	101.72	
4	102.75	
5	98.27	

Tablo 5. Kremlerde Salisilik Asit Geri Kazanım Sonuçları

Numune No.	% Salisilik asit	
1	99.18	$X_{Ort} = 99.24$ $SS = 0.77$ $\%BSS = 0.078$ $GA = 98.28 - 100.20$ $(p=0.05)$
2	100.22	
3	98.39	
4	99.78	
5	98.61	

V. SONUÇ ve TARTIŞMA

Çalışmamızda, antipsoriyatik ilaç etken maddesi olan Antralin (ditranol) ile birlikte salisilik asit içeren farmasötik kremlerde antralin ve salisilik asitin aynı anda miktar tayini için duyarlı ve yüksek kesinlikte bir yöntem geliştirilmiştir. BP ve USP'de kremlerde antralin miktar tayini için UV dedeksiyona dayanan Yüksek Performanslı Sıvı kromatografik yöntemler önerilmiştir. Literatür taraması yapıldığında antralin miktar tayini çalışmalarının az sayıda ve kromatografik yöntemle sınırlı olduğu görülmektedir. Antralin ve salisilik asidin floresans özellikte olması nedeniyle çalışmamızda florimetrik yöntemle tayin planlanmıştır. Antralin ve salisilik asidi birlikte içeren krem formülasyonları %0.25 antralin ve %0.20 salisilik asit içermektedir. Kremdeki oran korunarak hazırlanan standart çözeltilerin uyarma ve emisyon spektrumları alınmış ve her iki etken maddenin aynı anda analizini imkansız kılacak şekilde emisyon spektrumlarının çakıştığı gözlenmiştir. Çalışmamızda bu nedenle senkronize floresans spektrometrisi yöntemi kullanılmıştır. Literatür taramalarında antralin için florimetrik yöntemin kullanıldığı bir çalışma mevcut değildir.

Tüm çalışma boyunca çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Ön çalışmalar sırasında farklı çözücüler denenmiş ve metanolik ortamın her iki analit için de uygun olduğuna karar verilmiştir. Çözücü seçiminde çözücülerin floresans sinyaline etkileri de önemlidir. Kremden antralin tayini için krem çözeltileriyle, kalibrasyon doğrusu çizilirken kullanılan antralin çözeltilerinin eşdeğer olmasını sağlamak amacıyla krem çözeltilerinin pH sı borat tampon çözeltisi kullanılarak 8'e ayarlanmıştır. Çalışmada analitlerden ve numune matriksinden kaynaklanan ve

floresansı etkileyen herhangi bir çözelti pH sı problemi olmadığı, ön deneylerle kontrol edilmiştir.

Senkronize spektrometri her iki monokromatörün aynı anda taramasına imkan verir, bu esnada sabit dalga boyu ($\Delta\lambda$), sabit frekans ($\Delta\nu$) geçerlidir veya uyarma ve emisyon dalga boyları aynı anda, ancak farklı hızlarda değiştirilebilir. Senkronize floresans yöntemlerin temel özellikleri şunlardır: 1)Dar spektral bantlar 2)Çoklu bileşenli analizlerde artan seçicilik 3) Uygun dalga boyu aralığı seçimiyle Rayleigh ve Raman saçılmalarının giderilmesinin mümkün olması.

Senkronize floresans spektrumları, 200-600 nm aralığında alınmış ve $\Delta\lambda$ değerleri, antralin için 140 nm ve salisilik asid için 110 nm ye ayarlanmıştır. Kantitatif tayinler, antralin için 386 nm ve salisilik asit için 297 nm. dalga boylarındaki emisyon şiddetleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon doğruları, antralin için 1.97- 5.90 µg/ml derişim aralığında ve salisilik asit için 0.016-0.080 µg/ml derişim aralığında doğrusaldır. Önerilen yöntem % 1.5 dan küçük BSS değerleri ile kesindir. Antralin ve salisilik asit için elde edilen LOD ve LOQ değerleri önerilen yöntemin duyarlılığını ve kantitatif tayin alt sınırının düşüklüğünü göstermektedir. Farmasötik kremde antralin ve salisilik asit bulguları etiketli miktarlarla uyumludur. Geri kazanım çalışmaları da önerilen yöntemin doğruluğunun bir göstergesidir. Ayrıca gün içi ve günler arası kesinlik değerleri, belirtilen koşullarda stabilitenin de bir göstergesidir.

Sonuçta önerilen yöntem, analiz öncesi zaman alıcı ekstraksiyon işlemleri gerektirmeyen, aynı anda ikili karışımındaki floresans özellikteki analitlerin tayinlerine imkan veren, duyarlı, seçici, ve tekrarlanabilir bir yöntemdir.

VI . ÖZET

Farmasötik Kremlerde Senkronize Floresans Spektrometrisi Yöntemiyle Antralin ve Salisilik Asit Miktar Tayini

Antralin (1,8-dihidroksi-9-antron), psoriasis'in topikal tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesidir. Bu çalışma farmasötik kremlerde antralin ve salisilik asidin zaman alıcı ön ayırma işlemi gerektirmeden senkronize floresans spektrometrisi yöntemiyle aynı anda tayinini kapsayan basit, hızlı ve duyarlı bir yöntem tanımlamaktadır. Çalışma sırasında çözücü olarak metanol kullanılmış ve krem numunelerinin pH sı borat tamponu kullanılarak 8.0 e ayarlanmıştır. Senkronize floresans spektrumları 200-600 nm aralığında alınmış ve $\Delta\lambda$ değerleri Antralin için 140 nm ve salisilik asit için 110 nm. ye ayarlanmıştır. Kantitatif tayinler antralin için 386 nm ve salisilik asit için 297 nm lerdeki emisyon şiddetleri ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Doğrusal kalibrasyon grafikleri, antralin için 1.97- 5.90 $\mu\text{g/ml}$ ve salisilik asit için 0.016-0.080 $\mu\text{g/ml}$ derişim aralığında çizilmiştir. Önerilen yöntem, % 1.5 dan az Bağıl Standart sapma değerleriyle kesindir. Antralin ve salisilik asit için sırasıyla bulunan LOD (S/N=3), 0.06 $\mu\text{g/ml}$, 6.35×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ ve LOQ (S/N=10), 0.22 $\mu\text{g/ml}$, 2.11×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ değerleri, yöntemin duyarlılığının göstergesidir.

Anahtar Kelimeler: Antralin, salisilik asit, senkronize floresans spektrometri, farmasötik kremler, kantitatif tayin, eş zamanlı analiz

VII. SUMMARY

Determination of Anthralin and Salicylic Acid in Cream Formulations by Synchronous Fluorescence Spectrometry

Anthralin (1,8-dihydroxy-9-anthrone) is an active compound drug for the topical treatment of psoriasis. This work describes a simple, rapid, selective, and sensitive synchronous fluorescence spectrometry for simultaneous determination of anthralin and salicylic acid in pharmaceutical creams without any time-consuming extraction steps prior to analysis. Throughout the study methanol was used as solvent and pH of the cream samples was adjusted to 8.0 using borate buffer. The synchronous fluorescence spectrum was obtained over the range of 200-600 nm and $\Delta\lambda$ values were 140 nm for anthralin and 110 nm for salicylic acid. Quantitative determinations were realized using the emission intensities at 386 nm for anthralin and 297 nm for salicylic acid. The linear calibration graphs were drawn over the ranges of 1.97- 5.90 $\mu\text{g/ml}$ for anthralin and 0.016-0.080 $\mu\text{g/ml}$ for salicylic acid. The proposed method were precise with RSD values, less than 1.5%. The obtained LOD (S/N=3), 0.06 $\mu\text{g/ml}$, 6.35×10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ and LOQ (S/N=10), 0.22 $\mu\text{g/ml}$, 2.11×10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ values for anthralin and salicylic acid, respectively, show sensitivity of the method.

Key words: Anthralin, salicylic acid, synchronous fluorescence spectrometry, pharmaceutical creams, quantitative determination, simultaneous analysis

VIII. KAYNAKLAR

- 1) Baker BS, Powles AV, Malkani AK. Altered Cell-mediated Immunity to Group A Haemolytic Streptococcal Antigens in Chronic Plaque Psoriasis. Br. J. Dermatol. 1991; 125: 38-42.
- 2) Barker JN. Pathogenesis of Psoriasis. J. Dermatol. 1998; 25(12): 778-81.
- 3) Christophers E, Mrowietz U. Psoriasis. Dermatology in General Medicine. 5th Ed. New York, Mc Graw- Hill. Inc, 1999.
- 4) Camp R.D.R. Ebling Textbook of Dermatology. 6th Ed. Vol 2. Blackwell Science Pub. 1998.
- 5) Rx Media Pharma. İnter Aktif İlaç Bilgi kaynağı. Üstünes L., Gemaş Yayıncılık; 2009.
- 6) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals, 12nd Ed., Merck and Co., Inc., Rahway, N.J., USA, 2001.
- 7) British Pharmacopeia, The Stationery Office, London, 2005.
- 8) The United States Pharmacopoeia 29, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2005.
- 9) Burton FW, Gadde RR. Analysis of Anthralin in Dermatological Products by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography. J Chromatogr. 1985; 328:317-24.
- 10) Cheach, ICL, Sitaram BR, Pappas A, Thi NL, Finnin BC, Reed BL. Normal-phase and Reversed-phase Liquid Chromatographic Techniques for the Determination of Dithranol and its Degradation Products. J. Chromatogr. 1989; 467 (2): 414-22.
- 11) Caron JC, Shroot B. High-pressure Liquid Chromatographic Determination of Anthralin in Ointments. J. Pharm. Sci. 1981; 70 (11): 1205-7.
- 12) Schaltegger, A, Bloch, U, Krebs, A. On the Stability of Some Antipsoriatic Active Anthralin (Dithranol) Derivatives. A Qualitative High Performance Liquid Chromatography Investigation. Dermatologica. 1982; 165 (4): 363-8.

- 13)** Ferlan A, Pecar S, Schara M. Dithranol Reaction with Nitroxide Radicals in DMSO, a HPLC Study. *Pharmazie*. 2003; 58(7): 475-9.
- 14)** Beiraghi A, Babaee S. Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Beryllium Using 1,8-dihydroxyanthrone as A New Chromogenic Reagent. *Journal of The Iranian Chemical Society*. 2007; 4(4): 459-66.
- 15)** Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü. *Farmasötik Teknoloji Laboratuvar Kitabı*. Ankara: Şafak Matbaacılık; 2007.
- 16)** Geçgil Ş. *Farmasötik Teknolojiye Başlangıç*. İstanbul: Cihan Matbaacılık; 1991.
- 17)** Martindale, The Extra Pharmacopoeia. 29th Ed. London: Pharmaceutical Press; 1989.
- 18)** Güven KC. *Tıbbi ve Kozmetik Formülleri*. 9. Baskı. İstanbul: Avcı Ofset; 1996.
- 18)** Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Enstrümantal Analiz*. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H, (Çev.) 1.Basım, Ankara: Bilim Yayıncılık; 1998.
- 19)** Valeur B. *Molecular Florescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH; 2001.
- 20)** Lloyd, J.B.F. Synchronized Excitation of Fluorescence Emission Spectra. *Nature. Physical Science*. 1971; 231(20): 64-65.
- 21)** O'Haver, T.C., Gren, G.L. Derivative Luminescence Spectrometry. *Anal. Chem*. 1974; 46(14): 2191-2196.
- 22)** Vo-Dinh, T. Multicomponent Analysis by Synchronous Luminescence Spectrometry. *Anal. Chem*. 1978, 50(3): 396-401.
- 23)** Inman, E.L. Jr., Winefordner, J.D. Constant Energy Synchronous Fluorescence for Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Mixtures. *Anal. Chem.*, 1982, 54(12), 2018-2022.
- 24)** Kubic, T.A. Kanabrocki, T., Dwyer, J., Paper Presented at the American Academy of Forensic Sciences, 32nd Annual Meeting, 1980.
- 25)** Lloyd JBF. The Nature and Evidential Value of the Luminescence of Automobile Engine Oils and Related Materials: Part III. Separated Luminescence. *J. of Forensic Sci. Soc*. 1971; 11(4): 235-253.

- 26) Farina A, Abballe F, Doldo A, et al. Spectrofluorimetric Assay of Temafloxacin in Pharmaceutical Formulations and in Serum. *Spectroscopy Letters*. 1991; 24(9): 1219-1228.
- 27) Delapena AM, Salinas F, Duran MS. Simultaneous Determination of Propranolol and Hydralazine by Derivative **Synchronous** Spectrofluorometry. *Analytica Chimica Acta*. 1991; 255(2): 317-323.
- 28) Panadero S, Gomezzens A, Perezbendito D. Simultaneous Determination of Warfarin and Bromadiolone by Derivative **Synchronous Fluorescence** Spectrometry. *Talanta*. 1993; 40(2):225-230.
- 29) Nevado JJB, Pulgarin JAM, Laguna MAG. Simultaneous Determination of Pyridoxal and Pyridoxamine by Different Spectrofluorometric Techniques. *Talanta*. 1995; 42(1): 129-36.
- 30) ElBayoumi A, ElShanawany AA, ElSadek ME, et al. **Synchronous** Spectrofluorimetric Determination of Famotidine, Fluconazole and Ketoconazole in Bulk Powder and in Pharmaceutical Dosage Forms *Spectroscopy Letters*. 1997; 30(1): 25-46.
- 31) Nevado JJB, Pulgarin JAM, Amador-Hernandez J, et al. Simultaneous Fluorimetric Determination of Pyridoxal, Pyridoxamine and Pyridoxic Acid by Partial Least Squares Using Non-linear Variable Angle **Synchronous** Spectra. *Analyst*. 1998; 123(3): 483-488.
- 32) Pulgarin JAM, Molina AA, Lopez PF. Simultaneous Determination of Atenolol, Propranolol, Dipyridamole and Amiloride by means of Non-linear Variable-angle **Synchronous Fluorescence** Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 1998; 370(1): 9-18.
- 33) Ruiz TP, Lozano CM, Tomas V, et al. Analysis of Binary Mixtures of Flufenamic, Meclofenamic and Mefenamic Acids by Derivative **Synchronous Fluorescence** Spectrometry. *Talanta*. 1998; 47(3): 537-45.
- 34) Garcia L, Blazquez S, San Andres MP, et al. Determination of Thiamine, Riboflavin and Pyridoxine in Pharmaceuticals by **Synchronous Fluorescence** Spectrometry in Organized Media. *Analytica Chimica Acta*. 2001; 434(2): 193-9.
- 35) Xiao Y, Wang HY, Han JA. Simultaneous Determination of Carvedilol and Ampicillin Sodium by **Synchronous** Fluorimetry. *Spectrochimica*

Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2005; 61(4): 567-73.

- 36)** Ni YN, Cai YJ. Simultaneous **Synchronous** Spectrofluorimetric Determination of Vitamin B-1, B-2 and B-6 by Parafac. Spectroscopy and Spectral Analysis. 2005; 25(10): 1641-4.
- 37)** Karim MM, Jeon CW, Lee HS, et al. Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulation by First Derivative **Synchronous** Fluorimetric Method. Journal of Fluorescence. 2006; 16(5): 713-21.
- 38)** Walash MI, Belal F, El-Enany N, et al. Second-derivative **Synchronous** Fluorometric Method for the Simultaneous Determination of Cinnarizine and Domperidone in Pharmaceutical Preparations. Application to Biological Fluids. Journal of Fluorescence. 2008; 18(1): 61-74.
- 39)** Walash MI, Belal F, El-Enany N, et al. Second- derivative **Synchronous Fluorescence** Spectroscopy for the Simultaneous Determination of Cinnarizine and Nicergoline in Pharmaceutical Preparations. Journal of AOAC International. 2008; 91(2): 349-59.
- 40)** El-Enany N. Second Derivative **Synchronous Fluorescence** Spectroscopy for the Simultaneous Determination of Metoclopramide and Pyridoxine in Syrup and Human Plasma. Journal of AOAC International. 2008; 91(3): 542-50.
- 41)** Kim WH, Karim MM, Lee SH. Simultaneous Determination of Levodopa and Carbidopa by **Synchronous Fluorescence** Spectrometry Using Double Scans. Analytica Chimica Acta. 2008; 619(1): 2-7.
- 42)** Maher HM. Simultaneous Determination of Naproxen and Diflunisal Using **Synchronous** Luminescence Spectrometry. Journal of Fluorescence. 2008; 18(5): 909-17.
- 43)** Konstantianos DG, Ioannou PC, Efstathiou CE. Simultaneous Determination of Acetylsalicylic and Salicylic Acids in Human Serum and Aspirin Formulations by 2nd Derivative **Synchronous Fluorescence** Spectrometry. Analyst. 1991; 116(4): 373-8.
- 44)** Konstantianos DG, Ioannou PC. Simultaneous Determination of Diflunisal and Salicylic-Acid in Human Serum by 2nd-derivative **Synchronous Fluorescence** Spectroscopy. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 1994; 1(4): 209-17.

- 45)** Konstantianos DG, Ioannou PC, Stratikos E. Simultaneous Determination of Naproxen and its Desmethyl Metabolite in Human Serum by 2nd Derivative **Synchronous Fluorescence** Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 1994; 290(1-2): 34-9.
- 46)** Damiani P, Ribone ME, Ibanez G, et al. Determination of 3 Aspirin Metabolites in Human Urine by Derivative **Synchronous** Spectrofluorometry. *Analyst*. 1995; 120(2): 443-5.
- 47)** Konstantianos DG, Ioannou PC. Second-derivative **Synchronous Fluorescence** Spectroscopy for the Simultaneous Determination of Naproxen and Salicylic Acid in Human Serum. *Analyst*. 1996; 121(7): 909-912.
- 48)** Perez-Ruiz T, Lozano CM, Tomas V, et al. Sensitive **Synchronous** Spectrofluorimetric Methods for the Determination of Naproxen and Diflunisal in Serum. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1998; 361(5): 492-495.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Evren

Soyadı : GÜMÜŞ

Doğum Tarih : 14. 1. 1981

Doğum yeri : Ankara-Beypazarı

Eğitim : Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(1999-2003)

Yabancı Dil : İngilizce