# VORİKONAZOL ETKEN MADDESİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

**Samira SAMADZADEH**

**Eczacılık Analitik KimyaAna Bilim Dalı**

**Tez Danışmanı**
**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi-2024**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

# VORİKONAZOL ETKEN MADDESİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA MİKTAR TAYİNİ İÇİN ANALİTİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

**Samira SAMADZADEH**

**Eczacılık Analitik Kimya Ana Bilim Dalı**
**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**
**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**ERZURUM**
**2024**

# İÇİNDEKİLER

**İÇİNDEKİLER** ..... **I**

**TEŞEKKÜR** ..... **VI**

**ÖZET** ..... **VII**

**ABSTRACT** ..... **VIII**

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **IX**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **XII**

**TABLOLAR DİZİNİ** ..... **XIII**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**2. GENEL BİLGİLER** ..... **2**

2.1. Mantar Hastalıkları ..... 2

2.2. Mantar Enfeksiyonları ..... 2

2.3.Antifungal İlaçlar ..... 4

2.4. Vorikonazol (VCN) ..... 7

2.4.1.Vorikonazol'un Kullanım Şekli ve Maksimum Doz Sınırları ..... 10

2.4.2.Vorikonazol'un Kimyasal Yapısı ..... 11

2.4.3.Vorikonazol'un Farmakodinamik Özellikleri ..... 12

2.4.4.Vorikonazol'un Farmakokinetik Özellikleri ..... 13

2.4.5.Vorikonazol'un Klinikte Kullanımı ..... 14

2.4.6.Vorikonazol'un Özel Kullanım Uyarıları ve Önlemleri ..... 15

2.4.7.Vorikonazol'un Toksisitesi ..... 16

2.4.8. Vorikonazol'un Gebelikte Kullanımı ..... 18

2.4.9. Vorikonazol'un İçeren Eşdeğer Müstahzarlar ..... 19

2.5. Spektrofotometre ..... 19

2.5.1. Elektromanyetik Işınlar ..... 20
2.5.1.1. Radyo Dalgası Bölgesi ..... 20
2.5.1.2. Mikro Dalga Bölgesi ..... 21
2.5.1.3. Kızılötesi Işın Bölgesi ..... 21
2.5.1.4. Görünür Işık Bölgesi ..... 22
2.5.1.5. Ultraviole Işık Bölgesi ..... 22
2.5.1.6. X Işınlar Bölgesi ..... 23
2.5.1.7. Gama Işınlar Bölgesi ..... 23
2.5.2. Spektroskopik Yöntemler ..... 24
2.5.3. Işın'nın Absorpsiyonu ..... 24
2.5.4. UV-Görünür Bölge Geçişler ..... 26
2.5.4.1. π, σ ve n Orbitalleri Arasındaki Geçişler ..... 26
2.5.5. UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi ..... 28
2.5.5.1. Işın Kaynağı ..... 28
2.5.5.2. Dalga Boyu Seçici ..... 29
2.5.5.3. Numune Kabı ..... 29
2.5.5.4. Dedektörler ..... 30
2.5.5.5. Okuyucu ..... 31
2.5.6. UV-Görünür Bölge Cihaz Çeşitleri ..... 31
2.6. Kromatografi ..... 32
2.6.1. Kromatografinin Yöntemleri ..... 34
2.6.1.1. Gaz Kromatografisi ..... 34
2.6.1.2. Sıvı Kromatografisi ..... 34
2.6.2. Ayırma Mekanizmalarına Göre Kromatografi Sınıflandırması ..... 35
2.6.2.1. Prtisyon Kromatografisi ..... 35

2.6.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi ..... 35
2.6.2.3. İyon Değişim Kromatografisi ..... 36
2.6.2.4. Boyut Hariç Tutma Kromatografisi ..... 36
2.7. HPLC ..... 37
2.7.1. Çözücü Rezervuarları ..... 37
2.7.2. Pompalar ..... 37
2.7.3. Enjektör ..... 38
2.7.4. Kolon ..... 39
2.7.5. Dedektör ..... 40
2.7.6. Veri Toplama ve İşleme Sistemi ..... 41
2.8. HPLC 'de Temel Parametreler ..... 41
2.8.1. Alıkonma Zamanı ..... 41
2.8.2. Kapasite Faktörü ..... 42
2.8.3. Seçicilik ve Ayırma Faktörü ..... 43
2.8.4. Kolon Etkinliği ..... 44
2.8.5. Kolon'un Ayırma Gücü ..... 45
2.8.6. Hareketli Faz Bileşimi'nin Ayırma Etkisi ..... 45
2.8.7.Teorik Plaka Sayısı ..... 46
2.8.8. Kuyruklanma ve Pik Simetri Faktörü ..... 47
2.9.Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri ..... 47
2.9.1. Yöntem Geliştirme ..... 47
2.9.2. Analitik Yöntem Validasyonu ..... 47
2.9.2.1. Doğruluk ..... 49
2.9.2.2. Kesinlilik ..... 50
2.9.2.3. Kararlılık ..... 51

2.9.2.4. Doğrusallık ..... 51
2.9.2.5. Belirleyicilik/Seçicilik ..... 52
2.9.2.6. Duyarlılık Limiti ..... 53
2.9.2.7. Geri Kazanım ..... 54
2.9.2.8. Çözelti Stabilitesi. ..... 54
2.9.2.9. Sağlamlık/Dayanıklık ..... 55
2.10.Vorikonazol ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Litaratür Çalışmaları . 56
**3. MATERYAL VE METOT ..... 60**
3.1.Yöntemlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler ..... 60
3.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazı ..... 60
3.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı ..... 61
3.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Çalışma Şartları ..... 61
3.5. Tablet Çözeltilerin Hazırlanması ..... 62
**4.BULGULAR ..... 63**
4.1. UV Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi ..... 63
4.1.1. Standart Çalışma, Kalite Kontrol ve Stok Çözeltilerin Hazırlanması ..... 63
4.1.2. Spektrofotometri Yönteminin Validasyonu (Geçerlilik Testleri) ..... 64
4.1.2.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı ..... 64
4.1.2.2. Doğruluk ve Kesinlilik ..... 65
4.1.2.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ) ..... 66
4.1.2.4. Analitik Geri Kazanım ..... 67
4.1.2.5. Tablet Çözeltilerinde Vorikanozol Analizi ..... 67
4.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi HPLC Yöntemi ..... 68
4.2.1. Standart Çalışma, kalite kontrol,Stok ve İnternal Standart Çözeltilerin Hazırlanmaları ..... 68

4.2.2. HPLC Çalışmalarda Yöntem Geliştirme ..... 69
4.2.3. HPLC Yönteminin Validasyonu (Geçerlilik Testleri) ..... 69
4.2.3.1.Özgünlük (Belirleyicilik) ..... 70
4.2.3.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı ..... 70
4.2.3.3. Doğruluk ve Kesinlilik ..... 71
4.2.3.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) ..... 73
4.2.3.5. Analitik Geri Kazanım ..... 73
4.2.3.6. Tablet Çözeltilerinde Vorikonazol Analizi ..... 74
**5. TARTIŞMA ..... 76**
**6. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 80**
**KAYNAKLAR ..... 81**
**EKLER ..... 90**
**EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu ..... 90**
**EK-2. Etik Kurul Onay Formu ..... 91**
**EK-3. Tez Adı Değişikliği Bildirim Formu ..... 92**

# TEŞEKKÜR

Tezli Yüksek Lisans eğitimim boyunca ve tez danışmanım olarak tez çalışma esnasında bana elinden gelen tüm desteği sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na

Yüksek Lisans Tezim için hiçbir desteği esirgemeyen Prof. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU ve Prof. Dr. Alptuğ ATİLA'ya

Tez aşaması boyunca tüm bilgisi ve yardımseverliğiyle karşılaştığım her zorlukta yanımda olan değerli Arş. Gör. Büşra YÜKSEL'e ve Yüksek Lisans tez hayatımın ilk gününden itibaren her anımda yanımda olan ve tez çalışmamda bana çeşitli konularda yardım eden Arş. Gör. Burak BAYRAK'a ve Ecz. Gökbay UÇAR'a

Çalışmalarım süresince, göstermiş oldukları büyük sabır ve özveriyle bana destek olan ailem ve eşime

şükranlarımı sunarım.

**Samira SAMADZADEH**

# ÖZET


## Vorikonazol Etken Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyonu

**Amaç:** Bu çalışmanın temel amacı, Vorikonazol etken maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için UV-Gör. Bölge Spektrofotometre ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemlerinin geliştirilmesi ve validasyonlarının yapılmasıdır.

**Materyal ve Metot:** Yöntemlerin çalışma parametreleri olarak UV-Gör. Bölge Spektrofotometre yönteminde çözücü olarak asetonitril ve 255 nm dalga boyu, HPLC yönteminde ise asetonitril-su-metanol (50/45/5, h/h/h)'den oluşan hareketli faz, C18 kolonu, 1.0 mL/dk akış hızı ve 255 nm dalga boyu seçildi. Her iki yöntem ICH kılavuzuna uygun olarak doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı (LOD), miktar tayin sınırı (LOQ) ve analitik geri kazanım gibi parametreler çalışılarak yöntemlerin validasyonu yapıldı.

**Bulgular:** UV-Gör. Bölge Spektrofotometre yönteminin 5-60 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu, LOD ve LOQ değerlerininde sırasıyla 1.0 µg/mL ve 5.0 µg/mL olduğu gözlemlendi. Güniçi ve günler arası doğruluk (%BH) ve kesinlik (%BSS) değerlerinin sırasıyla %0.08 ve %0.29'dan küçük olduğu belirlendi. HPLC yönteminin 1-80 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu, LOD ve LOQ değerlerinin ise sırasıyla 0.2 µg/mL ve 1.0 µg/mL olduğu belirlendi. HPLC yönteminin güniçi ve günler arası kesinlik (%BSS) ve doğruluk (%BH) değerlerinin sırasıyla %0.09 ve %0.93'den küçük olduğu tespit edildi. Her iki yöntemin analitik geri kazanım değeri ortalama olarak %100.73 olarak gözlendi. Son olaraka farmasötik preparat Vorent Tablet içerisinde vorikonazol miktar tayini için her iki yöntem başarıyla uygulandı.

**Sonuç:** Bu çalışmada UV-Gör. Bölge Spektrofotometri ve HPLC yöntemleri geliştirilip valide edildi ve farmasötik preparatlarda uygulanabilir olduğu gösterildi. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında her iki yöntemin ilaç endüstrisi ve kalite kontrol laboratuvarlarında başarı ile uygulanabileceği düşünülmektedir.



**Anahtar Kelimeler:** Farmasötik preapart, HPLC, Spektrofotometri, UV-Gör. bölge, Vorikonazol

# ABSTRACT

## Development and Validation of Analytical Methods for Quantification of the Active Ingredient Voriconazole in Pharmaceutical Preparations

**Aim:** The main purpose of this study is to use UV-Visor for the quantification of the active ingredient voriconazole in pharmaceutical preparations. The development and validation of Zone Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods.

**Material and Method:** UV-Vis. as working parameters of the methods. In the Zone Spectrophotometry method, acetonitrile and 255 nm wavelength are used as solvents, and in the HPLC method, the mobile phase consisting of acetonitrile-water-methanol (50/45/5, v/v/v) is used, C18 column, 1.0 mL/min flow rate and 255 nm. nm wavelength was chosen. Both methods were validated in accordance with the ICH guideline by studying parameters such as linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and analytical recovery.

**Results:** UV-Vis. It was observed that the Zone Spectrophotometer method was linear in the concentration range of 5-60 μg/mL, and LOD and LOQ values were 1.0 μg/mL and 5.0 μg/mL, respectively. Intraday and interday accuracy (%BH) and precision (%BSS) values were determined to be less than 0.08% and 0.29%, respectively. It was determined that the HPLC method was linear in the concentration range of 1-80 μg/mL, and LOD and LOQ values were 0.2 μg/mL and 1.0 μg/mL, respectively. It was determined that the intraday and interday precision (%BSS) and accuracy (%BH) values of the HPLC method were less than 0.09% and 0.93%, respectively. The average analytical recovery value of both methods was observed as 100.73%. Finally, both methods were successfully applied for the quantification of voriconazole in the pharmaceutical preparation Vorent Tablet.

**Conclusion:** In this study, UV-Vis. Area Spectrophotometry and HPLC methods have been developed and validated and shown to be applicable in pharmaceutical preparations. In light of the data obtained from the study, it is thought that both methods can be successfully applied in the pharmaceutical industry and quality control laboratories.



**Key words:** HPLC, Pharmaceutical preparation, Spectrophotometry, UV-Vis., Voriconazole

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**µg** : Mikrogram

**µL** : Mikrolitre

**ɒ** : Seçicilik faktörü

**ABD** : Amerika birleşik devletleri

**AIDS** : Edinilmiş bağşıklık eksikliği sendromu

**BSS** : Bağıl standart sapma

**CNS** : Merkezi sinir sistemi

**DEPB** : Dupont endüstriyel polimerler bölümü

**dk** : Dakika

**DNA** : Deoksiribo nükleik asit

**EKG** : Elektro kardiyo garafi

**EMEA** : European medicines agency

**F** : Hacimsel akış hızı

**FDA** : ABD gıda ve ilaç kurumug

**GC** : Gaz kromatografisi

**H** : Hidrojen

**HIV** : İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü

**HPLC** : Yüksek performans sıvı kromatografi

**ICH** : Uluslararası uyumlaştırma konferansı

**ICHQ2** : Analitik prosedürün validasiyonu

**IFI** : Uluslararası kuru temizleme ve çamaşırhane enistitüsü

**IR** : Infrared

**IUPAC** : Uluslararası kimya birliği

**IV** : İntravenöz

**İn-vitro** : Canlı bir hücrenin veya organizmanın dışında yapılan deney

**İn-vivo** : Canlı hücrelerde veya organizmaların içinde gerçekleştirilen deney

**K** : Durgun/ hareketli fazdaki madde konsantrasyonlarının dağılım

**k'** : Kapasite faktörü

**LC** : Sıvı kromatografisi

**LOD** : Gözlenebilme sınırı

**LOQ** : Miktar tayin alt sınırı

**MA** : Molekül ağırlığı

**mL** : Mililitre

**mm** : Milimetre

**N** : Kolonun kuramsal tabaka sayısı (teorik plaka sayısı)

**nm** : Nano metre

**$OH^-$** : Hidroksil

**PCR** : Polimeraz zincirleme reaksiyonu

**PDT** : Fotodinamik terapi

**pH** : Asit-baz ölçeği

**popPK** : Popülasyon farmako kinetiks

**QT** : Miktarsal sıkılaştırma

**R** : Ayırma faktörü

**$R^2$** : Korelasyon katsayısı

**RNA** : Ribo nükleik asit

**RT** : Alıkonma Zamanı

**S/N** : Sinyal/gürültü oranı

**T** : Pik kuyruklanma faktörü

**TDM** : Zaman bölmeli çoğullama

| | | |
|---|---|---|
| **to** | **:** | Kolon içinde tutulması sağlamayan bileşiğin alıkonma süresi |
| **tr** | **:** | Bileşiğin alıkonma süresi |
| **UV** | **:** | Ultraviyole |
| **V.D.W** | **:** | Van der waals |
| **VCN** | **:** | Vorikonazol |
| **Vm** | **:** | Kolon içindeki hareketli fazın hacmi |
| **Vs** | **:** | Kolon içindeki durgun fazın hacmi |
| **WHO** | **:** | Dünya sağlık örgütü |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil No** **Sayfa No**

**Şekil 2.1.** Vorikonazol'un kimyasal yapısı ..... 12

**Şekil 2.2.** Bir organik molekül için enerji-düzey diyagramı ..... 26

**Şekil 2.3.** Elektronlar arasındaki muhtemel geçişler ..... 27

**Şekil 2.4.** Spektrofotometre cihazının görseli ..... 31

**Şekil 2.5.** Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ..... 37

**Şekil 3.1.** a) Bilgisayae, b) Sepektrofotometri cihazı, c) Küvet ..... 60

**Şekil 3.2.** a) HPLC cihazı, b) Sabit faz (kolon), c) Vial ..... 61

**Şekil 3.3.** Vorikonazol (VORENT) tablet çalışması ..... 62

**Şekil 4.1.** 5-60 µg/ml konsantrasyon aralığında standart çalışma çözeltilerinin spektrumu pikler ..... 63

**Şekil 4.2.** Uv- görünür bölge spektrofotometri yönteminin kalibrasiyon eğrisi ..... 64

**Şekil 4.3.** Vorikonazol Kalite kotrol Çözeltilerinin Spektrumları ..... 65

**Şekil 4.4.** Tablet çözeltilerinin spektrumları ..... 68

**Şekil 4.5.** HPLC çalışması için 1-80 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan çözeltilerin viallerdeki görünümü ..... 69

**Şekil 4.6.** 332 µg/mL parasetamol (IS) içeren 1, 2.5, 5, 15, 25, 35, 50, 70 ve 80 µg/mL konsantrasyonlarda vorikonazol standart çalışma çözeltilarinin HPLC kromatogramı ..... 70

**Şekil 4.7.** HPLC yöntemi ile elde edilen ortalama kalibrasyon eğrisi ..... 71

**Şekil 4.8.** Kalite kontrol çözeltilerinin HPLC kromatogramı ..... 72

**Şekil 4.9.** 10, 30 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda Vorent Tablet (200mg) çözeltilerinin kromatogramı ..... 75

# TABLOLAR DİZİNİ

**Tablo No** **Sayfa No**

**Tablo 2.1.** Vorikonazolun uygulama sıklığı ve süresi..... 19

**Tablo 2.2.** Vorikonazol içeren eşdeğer müstahzarlar..... 19

**Tablo 3.1.** UV-Görünür bölge spektrofotometre yöntem şartları ..... 61

**Tablo 3.2.** HPLC yöntem şartları ..... 62

**Tablo 4.1.** UV-görünür spektrofotometri yöntemi ile vorikonazol standart çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin statistiksel analiz değerleri ..... 64

**Tablo 4.2.** UV-görünür spektrofotometri yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlilik değerleri ..... 66

**Tablo 4.3.** farmasötik preparatlarda vorikonazolun analitik geri kazanım değerleri (n=3) ..... 67

**Tablo 4.4.** Vorikonazol hplc yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz verileri ..... 71

**Tablo 4.5.** HPLC yönteminin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri .... 73

**Tablo 4.6.** Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik kazanım değerleri **.....** 74

# 1. GİRİŞ

Mantarların neden olduğu enfeksiyonlara mantar enfeksiyonları ve mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan ilaçlara ise antifungal ilaçlar denir. Mantarlar toprak, bitki, su ve hava dahil çevrenin her yerinde bulunabilen mikroorganizmalardır. Birçok mantar türü zararsız ve hatta faydalı olsa da bazıları insanlarda enfeksiyonlara neden olabilir. Antifungal ilaçlar, fungal hücrelerin çoğalmasını ve yayılmasını engelleyerek mantarların ölmesine neden olur ve böylece mantar hücrelerinin hücre zarını etkileyerek onların hayatta kalmasını engelleyen bir etki mekanizması kullanmasından kaynaklanır.

Vorikonazol, bir antifungal ilaçtır ve ciddi mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu yüksek lisans tezinin amacı, mantar enfeksiyon tedavisinde kullanılan vorikonazol etken maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için UV-Gör. Bölge Spektrofotometre ve HPLC yöntemlerinin geliştirilip validasyonlarının yapılması, bu yöntemlerin uygulanabilir olduğunu göstermek için Eczanelerde satılan vorikonazol etken maddesini içeren farmasötik preparatlarda vorikonazol miktar analizini gerçekleştirmektir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2. 1. Mantar Hastalıkları

Mantar hastalıkları insan vücudunun çeşitli kısımlarını etkileyebilmektedir. Spesifik mantar ve enfeksiyon bölgesine bağlı olarak semptomlar hafif ve şiddetli arasında değişebilir. Mantar hastalıklarının yaygın belirtileri: cilte kızarıklık, kaşıntı, pullanma, kabarcıklar ve çatlama şeklinde, tırnaklarda: renk değişikliği, kalınlaşma ve kırılganlık belirtileri solunum yolunda: öksürük, göğüs ağrısı, nefes darlığı, ateş, mukoza zarlarında: beyaz lekeler, ağrı, akıntı ve sistemik semptomlar olarak ateş, yorgunluk, kilo kaybı, organa özgü semptomlar şeklinde kendini gösterir (Firacative, 2020).

Mantarlar genellikle saç, cilt, tırnak veya mukozal yüzeylerde yüzeysel enfeksiyonlara ve alerjiler gibi diğer rahatsızlıklara yol açarlar. Ancak, teşhis edilip uygun şekilde tedavi edilmezlerse, iç organlarda ilerleyici ve ölümcül olabilen invaziv enfeksiyonlara da neden olabilmektedirler (Firacative, 2020).

Mantar hastalıkları, genellikle kronik seyir gösterip konakçıyı yavaş yavaş öldürmeleriyle çoğu bakteriyel hastalıktan ayrılırlar. Bu hastalıklar, tedaviye daha dirençli olup, pek çok invaziv mikozun aylarca veya daha uzun süre tedavi edilmesi gerekebilir. Bakteriyel ve viral hastalıklardan farklı olarak, invaziv insan mantar enfeksiyonları nadiren bulaşıcıdır, bu da halk sağlığı otoritelerinin sürveyans konusundaki ilgisinin azalmasına neden olmuştur (Casadevall, 2018).

## 2.2. Mantar Enfeksiyonları

Mantar enfeksiyonları, insanlık tarihinde oldukça eski bir geçmişe sahiptir. Tıp literatüründe mantar enfeksiyonlarına dair ilk belgelenmiş kayıtlar eski Mısır ve Mezopotamya medeniyetlerine dayanmaktadır. Antik Mısır papirüslerinde, mantar enfeksiyonlarına karşı bitkisel ve doğal tedavi yöntemlerine dair bazı bilgiler

bulunmaktadır. Orta çağ'da ve Rönesans döneminde, mantar enfeksiyonlarına dair daha detaylı gözlemler yapılmıştır. Özellikle Candida ve Aspergillus gibi mantar türlerine karşı hastalıkların belirtileri ve tedavileri hakkında bilgiler bu dönemde kaydedilmiştir. Modern tıp, mantar enfeksiyonları hakkında daha ayrıntılı bilgilerin edinilmesiyle birlikte, bu enfeksiyonları daha etkili bir şekilde teşhis etme ve tedavi etme yeteneğine sahip olmuştur. Mikoloji (mantar bilimi), bu tür enfeksiyonlarla ilgilenen bir bilim dalı olarak gelişmiştir. Günümüzde, mantar enfeksiyonları dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış kişiler, organ nakli veya kemoterapi gibi immünsüpresif tedaviler alan hastalar, mantar enfeksiyonlarına daha yatkındır. Bu nedenle, modern tıp' ta mantar enfeksiyonlarının teşhisi, tedavisi ve önlenmesi için sürekli olarak çalışmalar yürütülmektedir.

İnvaziv mantar enfeksiyonu yeterince tanınmayan ve yeni ortaya çıkan bir küresel sağlık tehdididir. Son zamanlarda, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), mantar enfeksiyonlarına ve antifungal dirence karşı küresel tepkiyi güçlendirmek için araştırmalara ve halk sağlığı müdahalelerine rehberlik edecek, sağlığı tehdit eden mantarların ilk listesini yayınladı. Şu anda antifungal ilaçlar, enfekte hastaların prognozunu iyileştirmede yalnızca kısmi başarı göstermektedir ve bu, mantar türleri arasında ilaç direncinin hızlı gelişimi ile daha da artmaktadır (Loh ve ark., 2023).

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının (IFI'ler) küresel yükü, çeşitli hastalıklardan acı çeken, bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların daha fazla olması nedeniyle son yıllarda bir artış göstermiştir. Mantar enfeksiyonunun başlangıç evrelerinde agresif bir şekilde kontrol altına alınmasında erken ve doğru tanının rolü hayati hale gelir ve böylece yaşamı tehdit eden bir durumun gelişmesi önlenir. Klinik mikolojinin değişen talepleri ile birlikte mantar teşhisi alanı gelişti ve geleneksel mikroskopi ve kültürleme yöntemlerinden daha gelişmiş, kültüre dayalı olmayan araçlara doğru uzun bir yol kat

etti. Yeni PCR testleri, T2 Candida, mikroakışkan çip teknolojisi, yeni nesil dizileme, yeni nesil biyosensörler, nanoteknoloji tabanlı araçlar, yapay zekâ tabanlı modeller gibi daha güçlü yaklaşımların ortaya çıkmasıyla birlikte mantar teşhisinin yüzü sürekli olarak daha iyiye doğru değişiyor (Fang ve ark., 2023).

### 2.3. Antifungal İlaçlar

Antifungal ilaçlar, yüzeysel deri enfeksiyonlarından yaşamı tehdit eden sistemik hastalıklara kadar uzanan mantar enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ancak etkili ve güvenli tedaviyi sağlamak için uygun tanı, antifungal ajan seçimi ve yan etkilerin izlenmesi önemlidir. Ayrıca mantar direnciyle mücadele ve yeni antifungal tedavilerin geliştirilmesi çabaları da önemli araştırma alanları olmaya devam ediyor. Antifungal ilaçlar etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve etki spektrumlarına göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmada Polienler, Azoller, Ekinokandinler, Allilaminler ve Pirimidin Analogları yer almaktadırlar. Polienlerin örnekleri arasında amfoterisin B ve nistatin bulunur. Bu ilaçlar mantar hücre zarlarının bir bileşeni olan ergosterol'e bağlanarak zarın bozulmasına ve hücre ölümüne neden olur.

Flukonazol, itrakonazol ve ketokonazol gibi azol antifungalleri, mantar hücrelerinde ergosterol sentezi için gerekli olan lanosterol 14-alfa-demetilaz enzimini inhibe eder. Ergosterol olmadan mantar hücre zarları dengesizleşir. Bu sınıf kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin gibi ilaçları içerir. Ekinokandinler, mantar hücre duvarının bir bileşeni olan β-(1,3)-D-glukan sentezini inhibe ederek hücre duvarı bozulmasına ve hücre ölümüne yol açar. Terbinafin dikkate değer bir allilamin antifungaldir. Ergosterol sentezinde yer alan bir enzim olan skualen epoksidazı inhibe ederek mantar hücre zarı bütünlüğünü bozar. Flusitozin Pirimidin Analogların bir örneğidır. Fungal RNA ve DNA sentezine müdahale ederek sonuçta hücre ölümüne yol

açar. Antifungal ilaçlar kullanım alanlarına göre 4 ayrı gurupta yer almaktadırlar. Birinci grup Sistemik Enfeksiyonlardır ki iç organları etkileyen veya vücuda yayılan enfeksiyonlardır. Amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol gibi ilaçlar kandidiyaz, aspergilloz ve kriptokokoz gibi sistemik mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılır. İkinci grup Topikal Enfeksiyonlardır ve bu grubun içinde mantar önleyici kremler, merhemler ve klotrimazol, mikonazol ve terbinafin gibi ajanlar içeren tozlar, ayak mantarı, saçkıran ve tırnak mantarı gibi lokalize mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için doğrudan cilde veya tırnaklara uygulanır. Üçüncü grup Profilaksi antifungal ilaçlardırlar, bu ilaçlar bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde (örn. HIV/AIDS hastaları, organ nakli yapılan kişiler) mantar enfeksiyonu riskini azaltmak amacıyla önleyici olarak kullanılabilir ve en son grub Tarımsal kullanımdır, Tarımda bitkileri mantar hastalıklarından korumak için antifungal ajanlar da kullanılmaktadır (Prevalence ve ark., 2018; Rayens ve ark., 2022).

Coronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) ile ilişkili invazif mantar enfeksiyonları, ciddi sayıda hastaneye yatırılan COVID-19 hastasında önemli bir komplikasyondur. Üç grup mantar patojeni, COVID-19'da ortak enfeksiyonlara neden olur: Aspergillus, Mucorales ve Candida auris dahil Candida türleri. Bu çalışmada düşük, orta ve yüksek gelirli ülkelerde bu mantarların neden olduğu COVID-19 ile ilişkili invazif mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığını gözden geçiriyoruz. Epidemiyolojiyi, klinik risk faktörlerini, konakçı ortamın predispozan özelliklerini ve bu koenfeksiyonların patogenezinin altında yatan immünolojik mekanizmaları değerlendirerek, gelecekteki araştırmalar ve klinik rehberliğin geliştirilmesi için zemin hazırlamış olduk (Hoenigl ve ark., 2022).

Mantar enfeksiyonları insanlarda nispeten yaygındır; yaygın, hafif yüzeysel enfeksiyonlardan yaşamı tehdit eden invazif enfeksiyonlara kadar değişebilir. Patojenik

mantarların çoğu, HIV enfeksiyonu, kanser, kemoterapi, organ nakli ve bağışıklık sistemini baskılayan ilaç kullanıcıları gibi bağışıklık sisteminin zayıfladığı koşullar altında hastalığa neden olan fırsatçıdır. Yüksek riskli popülasyonun etkili bir şekilde tespit edilmesi ve tedavi edilmesi, ölümlerin çoğunun önlenmesinde en yüksek öncelik olmaya devam etmektedir. İnvaziv enfeksiyonların büyük çoğunluğu Candida, Aspergillus ve Cryptococcus türlerinden kaynaklanmaktadır. Etkili aşıların, standart teşhis araçlarının, etkili antifungal ilaçların eksikliği ve ilaca dirençli türlerin/suşların ortaya çıkışı, İnvazif mantar enfeksiyonlarını (IFI) kontrol etmek için küresel bir tehdit oluşturmaktadır. Konakçının bağışıklık tepkisinin daha iyi anlaşılması, invazif mantar enfeksiyonları kontrol etmek için yeni veya geliştirilmiş antifungal stratejilerin geliştirilmesine yönelik ana yaklaşımlardan biridir. Bu derlemede, tıbbi açıdan önemli mantarların patogenezini, kalıp tanıma reseptörleri aracılığıyla mantarların konakçıyla etkileşimini ve invazif mantar enfeksiyonuna karşı konakçı bağışıklığını şekillendirmede doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin etkileşimini tartıştık (Pathakumari ve ark., 2020)

Mantar enfeksiyonları, başta bağışıklık fonksiyonu zayıf olanlar olmak üzere, dünya çapında yılda 1.5 milyondan fazla ölümden sorumludur. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların, özellikle de insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) bulunan hastaların sayısının son on yılda artması nedeniyle bu durum endişe vericidir. Bu analizin amacı Amerika Birleşik Devletleri'nde mantar hastalığının mevcut yaygınlığını ve etkisini sağlamaktı (Prevalence ve ark., 2018; Rayens ve ark., 2022).

Deri, saç ve tırnaklardaki mantar enfeksiyonları dünya nüfusunun %25'ini etkilemektedir. Geleneksel antifungal tedavi etkilidir ancak direnç, tedavi başarısızlığı, ilaç etkileşimleri ve tedaviye bağlı toksisite nedeniyle alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Fotodinamik terapi (PDT) antimikrobiyal özellikler göstermiştir ve

mantar enfeksiyonlarında giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu derleme, yüzeysel mikozlarda PDT'nin bildirilen etkinliğini ve yan etkilerini araştırmaktadır (Shen ve ark., 2020). Dermatofitoz gibi yüzeysel mantar enfeksiyonlarının aksine, invazif mantar enfeksiyonları (IFI'ler), mantar elemanlarının dokulara nüfuz etmesiyle karakterize edilir. Hastalık bir bölge içerisinde lokal olarak yayılabileceği gibi hematojen veya lenfatikler yoluyla da yayılabilmektedirler (Barrs ve ark., 2024).

### 2.4. Vorikonazol

Vorikonazol etken maddesine sahip ilaç ilk olarak 1990 yılında icat edildi, 2002 yılında tescil edildikten sonra Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmaya başladı. Dünya Sağlık Örgütü'nün temel ilaçları listesine Vorikonazol Vfend ticari ismi ile girmiştir. 2002 yılında ikinci nesil azol antifungal ajanı olarak piyasaya sürülmüş temel olarak invaziv aspergillozda birinci basamak tedavisi olarak Candida türlerinde kullanılmaktadır (Drabińska ve ark., 2022).

Vorikonazol (eski adıyla UK-109,496), azollerin kimyasal ailesine ait yeni bir sistemik antifungal ajandır. Şu anda klinik uygulamada beş sınıf sistemik antifungal vardır: polienler (amfoterisin B), alkilaminler/tiyokarbamatlar (terbinafin), floropirimidinler (florositozin), azoller ve ekinokandinler (kaspofungin). Ketokonazol dışında yaygın olarak kullanılan tüm sistemik azoller triazollerdir (5 üyeli azol halkasında üç nitrojen) ve bunlar şu anda Flukonazol, Itrakonazol ve Vorikonazolu içermektedir. Avrupa'da vorikonazol, invaziv aspergillozlu yetişkin ve pediatrik hastaların, flukonazole dirençli invaziv Candida enfeksiyonlarının, nötropenik olmayan kandidemili hastaların ve Scedosporium'un neden olduğu yeni ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisi için onaylanmıştır (Levêque ve ark., 2006).

Vorikonazol invaziv mantar hastalığının tedavisinde kullanılan antifungal bir triazol $C_{16}H_{14}F_3N_5O$ kimyasal formülüne sahip tabletler, oral solüsyon ve enjekte

edilebilir solüsyon şeklinde piyasada mevcut olup çocuklarda ve yetişkinlerde mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır (Reginatto ve ark., 2024). Son yıllarda invaziv mantar enfeksiyonları, bağışıklık sisteminde teknik kusur bulunan birçok hastanın (Kemoterapi ve AIDS hastalığında) ölümüne neden olmuştur. Bu ilaç mantar hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyerek enfeksiyonları kontrol altında tutmaktadır. Vorikonazol, aspergillozis ve kandida gibi ciddi mantar enfeksiyonlarının tedavisinde de yaygın olarak kullanılmakta olup ayrıca immün yetmezlik durumlarına sahip olan hastaların profilaktik tedavisinde de kullanılabilmektedir.

İnvaziv mantar enfeksiyonları dünya çapında mortalite ve morbidite oranlarını artırmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisi, düşük biyoyararlanım ve toksisite nedeniyle hala sınırlıdır ve özellikle en ağır vakalarda terapötik izleme gerektirir. Vorikonazol, invaziv aspergilloz, diğer hyalin küfler, birçok dematiasöz küf, flukonazole dirençli olanlar dahil Candida türlerinin tedavisinde ve merkezi sinir sisteminde meydana gelenlere ek olarak endemik mikozların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir azoldür. Bununla birlikte, geniş aktivitesine rağmen, vorikonazol kullanımının doğrusal olmayan farmakokinetiği ile ilgili sınırlamaları vardır, bu da supraterapötik dozlara ve metabolizması sırasındaki bireysel polimorfizmlere göre artan toksisiteye yol açmaktadır. Bu anlamda nanoteknolojiye dayalı ilaç dağıtım sistemleri, antifungaller de dahil olmak üzere farklı ilaç sınıflarının fizikokimyasal ve biyolojik yönlerini başarıyla geliştirmiştir. Bu derlemede, vorikonazol için nanoteknolojiyi uygulayan son çalışmaları vurguladık. Bu sistemler, oküler, pulmoner, oral, topikal ve parenteral gibi farklı uygulama yollarında kontrollü ve başka yollarla vorikonazolün hedef dokulara nüfuz etmesinin ve birikmesinin artmasına olanak sağlamıştır. Böylece vorikonazolün verilmesini amaçlayan

nanoteknoloji uygulaması mantar enfeksiyonlarının tedavisinde daha etkili ve güvenli bir tedavi alternatifi haline gelmektedir. Böylece vorikonazolün verilmesini amaçlayan nanoteknoloji uygulaması mantar enfeksiyonlarının tedavisinde daha etkili ve güvenli bir tedavi alternatifi haline gelmektedir (Almeida Campos ve ark., 2023).

Vorikonazol oldukça değişken ilaç maruziyeti nedeniyle, terapötik ilaç izleme (TDM) önerilmiştir. TDM, maruziyetin doğru bir şekilde tahmin edilmesinde yardımcı olabilir, ancak Vorikonazol metabolizmasını etkileyen şiddetli inflamasyon gibi ortak değişkenler, rutin TDM için uygun popülasyon farmakokinetiği (popPK) modellerine dahil edilmemiştir (Van den Born ve ark., 2023). Yaşlı hastalarda vorikonazolün terapötik ilaç takibine ilişkin veriler sınırlıdır. Yaşlı bireylerde bozulmuş karaciğer fonksiyonu ve inflamatuar durumun, vorikonazol serum seviyesini etkilediği varsayılmaktadır (Cheng ve ark., 2020).

İnvaziv mantar enfeksiyonu (IFI) olan tüm pediatrik hastalar için vorikonazolun TDM' si (terapötik ilaç izlemesi) zorunlu olmalıdır. Vorikonazol farmakokinetiğinde hastalar arası ve hasta içi geniş değişkenlik, bu popülasyonda tedavi sırasında terapötik konsantrasyonun sağlanmasına ve sürdürülmesine neden olur. Gösterilen çalışmalar, güncellenmiş dozaj önerilerine rağmen çoğu durumda vorikonazolün plazma konsantrasyonlarının tedavi edicinin altında olduğunu göstermiştir. Yalnızca tekrarlanan TDM, çocuklarda antifungal tedavide ilaç maruziyetini ve dozajın bireyselleştirilmesini öngörebilir (Resztak ve ark., 2021).

Vorikonazolün yan zincirindeki 2-floropirimidin modifikasyonu, uygun antifungal spektruma, gelişmiş farmakokinetik özelliklere ve tolere edilebilir toksisite profillerine sahip efinakonazol, albakonazol, ravukonazol ve izavukonazol dahil olmak üzere yeni nesil triazolilbütanol ilaçların piyasaya sürülmesini sağlamıştır (Ghobadi ve ark., 2022).

Terapötik ilaç izlemesi (TDM), antifungal tedavinin optimize edilmesinde önemli bir role sahiptir. Çin Farmakoloji Derneği kılavuzlarında, Britanya Tıbbi Mikoloji Derneği kılavuzlarında ve Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği kılavuzlarında vorikonazol mantar tedavisinde rutin olarak önerilmektedir. Ancak, yavaş metabolik genotipe sahip ülkelerde kullanım farklılıkları vardır (Shen ve ark., 2022).

### 2.4.1. Vorikonazol'un Kullanım Şekli ve Maksimum Doz Sınırları

Vorikonazollar, genellikle tablet formunda olup intravenöz (IV) infüzyon formunda da bulunabilmektedir. Damar içine enjekte edilirken infüzyon hızı ve dozu, hastanın durumuna bağlı olarak dikkatlice ayarlanmalıdır. Ayrıca, oral süspansiyon formunda da bulunmaktadır. Özellikle çocuklarda veya hastanın ağız yoluyla ilaç alımında zorluk yaşadığı durumlarda kullanılabilmektedir. Genel olarak kabul edilen standart dozaj aralıkları tedaviye yanıt, yan etkiler ve enfeksiyonun ilerlemesi gibi faktörlere göre düzenlenmelidir. Özellikle çocuklarda ve yaşlılarda dozaj ayarlaması, daha hassas bir şekilde yapılması gerekmektedir (Drabińska ve ark., 2022). Vorikonazolün uygulama sıklığı ve süreleri Tablo 2.1'de verildi (Vfend, Pfizer İlaçlari Ltd, 2005).

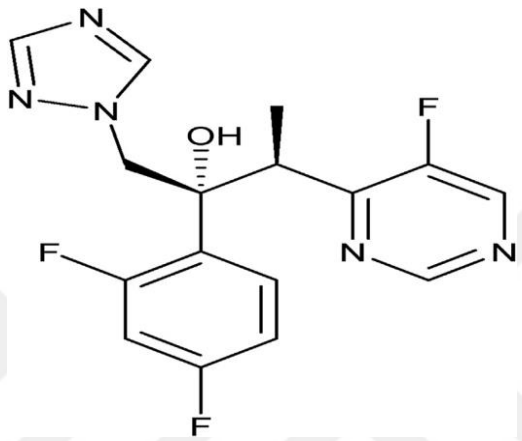
**Tablo 2.1.** Vorikonazolun uygulama sıklığı ve süresi

| **Önerilen dozlar ile ilgili bilgiler** | **Intravenöz** | **Oral (Tablet) 40 kg ve üzerindeki hastalarda** | **Oral (Tablet) 40 kg'ın altındaki hastalarda** |
|---|---|---|---|
| Yükleme Doz Rejimi Bütün endikasyonlar için (ilk 24 saat) | 6mg/kg Günde 2 kez | 400 mg Günde 2 kez | 200 mg Günde 2 kez |
| Ciddi invazif Candida Aspergilloz Scedosporium Fusarium enfeksiyonları (Diğer ciddi mantar enfeksiyonları) | 4 mg/kg Günde 2 kez | 200 mg Günde 2 kez | 100 mg Günde 2 kez |
| Nötropenik olmayan hastalarda kandidemi | 3-4 mg/kg Günde 2 kez | 200 mg Günde 2 kez | 100 mg Günde 2 kez |
| Özofajiyal Candida enfeksiyonları | Doz önerisi bulunmamaktadır. | 200 mg Günde 2 kez | 100 mg Günde 2 kez |

### 2.4.2. Vorikonazol'un Kimyasal Yapısı

Vorikonazolün moleküler formülü $C_{16}H_{14}F_3N_5O$ dur ve moleküler ağırlığı 349.3 kd olup, çekirdek yapısı olarak bir triazol halkası içerir. Bu halka üç nitrojen atomu ve iki karbon atomundan oluşur. Bu triazol halkası, ergosterol biyosentezinde yer alan mantar enzimleriyle etkileşime girerek mantar hücre zarı fonksiyonunu bozduğundan vorikonazolün antifungal aktivitesi için çok önemlidir. Vorikonazol ayrıca florlu bir fenil halkasına sahiptir. Molekülün bu kısmı mantar enfeksiyonlarına karşı gücüne katkıda bulunur. Bu halkaya Florlu Fenil Halkası denilir. Vorikonazol kiral bir moleküldür, yani dört farklı gruba bağlı bir veya daha fazla karbon atomuna sahiptir ve stereoizomerler oluşturur. İki enantiyomerin (R)-Vorikonazol ve (S)-Vorikonazolün rasemik bir karışımı olarak bulunur. (S)-enantiyomeri öncelikle antifungal aktiviteden sorumludur. Vorikonazolün yapısına bağlı birden fazla metil eter ve hidroksil grubu

bulunur. Bu fonksiyonel gruplar, molekülün farmakokinetik özelliklerine ve biyolojik sistemlerle etkileşimlerine katkıda bulunabilir. Vorikonazol, triazol halkası dışında yapısında başka heterosiklik halkalar da içerir. Bu halkalar mantar enzimleri ile bağlanma etkileşimlerinde ve farmakolojik aktivitede rol oynayabilir (Jeu ve ark., 2003; Ou ve ark., 2020).




**Şekil 2.1.** Vorikonazol'un kimyasal yapısı

### 2.4.3. Vorikonazol'un Farmakodinamik Özellikleri

Bir ilacın vücutta nasıl etki gösterdiği ve enfeksiyonlarla nasıl etkileşime girdiği ilacın farmakodinamik özellikleri ile açıklanmaktadır. Vorikonazol, mantar hücre zarlarının yapısında önemli bir rol oynayan ergosterolün sentezini engellemektedir. Bu, sitokrom P450 14-alfa-sterol demetilaz enziminin inhibisyonu yoluyla gerçekleşir. Ergosterolün sentezindeki bu bozulma, mantar hücrelerinin yapısını zayıflatır ve sonunda hücre ölümüne neden olur. Vorikonazol özellikle Aspergillus ve Candida gibi yaygın patojenik mantar türlerine karşı etkilidir. Ayrıca Fusarium, Scedosporium ve diğer bazı mantar türlerine karşı da aktivite gösterir. Mantar hücrelerini öldürme yeteneği, ilacın konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlıdır. Bu nedenle, tedavi

sırasında vorikonazolün terapötik konsantrasyonlardan aşağı düşmemesi oldukça önemlidir. Çeşitli vücut dokularına ve sıvılarına iyi nüfuz edebilir. Bu özellik, ilacın merkezi sinir sistemi gibi derin dokulardaki mantar enfeksiyonlarını etkili bir şekilde tedavi etmesine sebep olmaktadır. Uzun süreli kullanımda veya yoğun maruziyet durumlarında vorikonazola karşı mantar direnci oluşabilmektdir. Bir mantar türüne karşı vorikonazol direnci geliştiğinde, diğer antifungal ilaçlara da direnç gelişme riskide oluşmaktadır. Vorikonazol, öncelikle sitokrom P450 (CYP) izoenzimi CYP2C19 yoluyla karaciğerde yoğun bir şekilde metabolize edilir ve daha az ölçüde CYP2C9 ve CYP3A tarafından vorikonazolün PK değişkenliği, büyük ölçüde CYP2C19 polimorfizmden etkilenir. CYP2C19'un genetik polimorfizmi, CYP2C19 enzim aktivitesini modüle eder ve muhtemelen vorikonazol plazma seviyelerini etkiler (Ou ve ark., 2020; Vfend, Pfizer İlaçlari Ltd).

### 2.4.4. Vorikonazol'un Farmakokinetik Özellikleri

Bir ilacın vücutta nasıl emildiği, dağıldığı, metabolize edildiği ve atıldığı bilgilerine farmakokinetik ile ulaşılır. Vorikonazol, oral alımından sonra hızla ve iyi bir şekilde emilir ve vücutta geniş bir dağılım gösterir. Yağda çözünen bir ilaç olduğu için, yiyeceklerle birlikte alındığında emilimi artabilir. Ancak, alımı sonrası emilimde bireysel farklılıklar olabilmektedir. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır (%58 ila %59 arasında), bu da ilacın dolaşımdaki serbest fraksiyonunu azaltır. Vorikonazol, çeşitli dokulara ve vücut sıvılarına iyi nüfuz eder, özellikle akciğerler, karaciğer, böbrekler, deri ve merkezi sinir sistemi gibi enfeksiyonların sık görüldüğü bölgelere. Karaciğerde metabolizma sonucunda vorikonazolün birkaç aktif olmayan metabolit oluşmaktadır. Plazma yarı ömrü, doza bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Ortalama olarak 6 ila 7 saat arasında değişiklik göstemektedir ve çoğunlukla metabolitleriyle birlikte idrar ve dışkı yoluyla atılır. Vorikonazolün farmakokinetiği, yaş, cinsiyet, ırk,

böbrek veya karaciğer fonksiyonları gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Özellikle karaciğer veya böbrek fonksiyonları bozuk olan bireylerde doz ayarlaması gerekebilir. Vorikonazolün farmakokinetiği, metabolizmasının doygunluğuna bağlı olarak lineer bir artış göstermez. Dozdaki artışa bağlı olarak etkinlikte daha fazla bir artış gözlenir. Oral alımlarda vorikonazol hızlı bir şeklilde tamamına yakın oranda emilir, maksimum plazma konsantrasyonlarına ($C_{maks}$) uygulamadan 1-2 saat içerisinde erişilir. Vorikonazolün oral biyoyararlanımının %96 ve kararlı durum dağılım hacmi 4.6 L/kg'dır. Plazma proteinlerine %58 bağlanmaktadır (Badali ve ark., 2016; Hohmann ve ark., 2017; Vfend, Pfizer İlaçlari Ltd).

### 2.4.5. Vorikonazol'un Klinikte Kullanımı

Vorikonazol, Aspergillus türlerinin neden olduğu potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir enfeksiyon olan invaziv aspergilloz için birinci basamak tedavi olarak kabul edilmektedir. Aspergilloz, özellikle kemoterapi görenler, organ nakli alıcıları veya HIV/AIDS hastaları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde yaygın olarak akciğerleri etkilemektedir. Vorikonazol, invazif aspergilloz tedavisinde amfoterisin B gibi eski antifungal ajanlara kıyasla üstün etkinlik göstermiştir. Kandidemi, sıklıkla kritik hastalarda, santral venöz kateteri olanlarda veya karın ameliyatı geçiren hastalarda görülen, kan dolaşımında Candida türlerinin varlığını ifade eder. Vorikonazol belirli Candida türlerine karşı etkilidir ve özellikle nötropenik olmayan hastalarda (bağışıklık sistemi ciddi şekilde zarar görmemiş olanlar) kandidemi tedavisinde faydalıdır. Başka bir yaygın antifungal ajan olan flukonazolun etkinliğine benzer etkiler göstermiştir. Candida türlerine karşı geniş etki spektrumu, onu bu durumun tedavisinde değerli bir seçenek haline getirmektedir. Vorikonazol, hematolojik maligniteleri olanlar, katı organ nakli alıcıları veya bağışıklık sistemini baskılayıcı tedavi gören hastalar gibi bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda ciddi mantar enfeksiyonlarının tedavisinde çok önemli bir

rol oynamaktadır. Hematopoietik kök hücre nakli veya akciğer nakli yapılanlar gibi bazı yüksek riskli hasta gruplarında, invaziv mantar enfeksiyonlarını önlemek için vorikonazol profilaktik olarak kullanılabilmektedir. Vorikonazolün profilaktik kullanımının mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığını azalttığı ve bu hastalarda genel sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir. Vorikonazol, Scedosporium ve Fusarium türleri gibi daha az yaygın patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar da dahil olmak üzere çeşitli küf enfeksiyonlarına karşı da aktivite gösterir. Etkinliği ve tolere edilebilirliği nedeniyle vorikonazol sıklıkla tercih edilen tedavi yöntemidir. Vorikonazol, korneanın görmeyi tehdit eden bir enfeksiyonu olan fungal keratitin tedavisi için topikal veya oral olarak kullanılabilmektedir. Geniş antifungal spektrumu ve oküler dokulara nüfuz etme yeteneği, onu bu durumun tedavisinde etkili bir seçenek haline getirmektedir. Hepatotoksisite, görme bozuklukları, cilt reaksiyonları ve merkezi sinir sistemi etkileri gibi olumsuz etkiler gibi yan etkileri de mevcuttur. Vorikonazol tedavisi sırasında karaciğer fonksiyon testlerinin, görme keskinliğinin ve ilaç düzeylerinin düzenli olarak izlenmesi gereklidir (Scott ve ark., 2007).

### 2.4.6. Vorikonazol'un Özel Kullanım Uyarıları ve Önlemleri

Vorikonazole yönelik özel uyarılar ve önlemler, hastalarda güvenli ve etkili kullanımını sağlamak için dikkate alınması gereken temel hususlardır. Vorikonazol, ciddi mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan güçlü bir antifungal ilaç olduğundan olası yan etkileri göz önünde bulundurulup sıkı bir takip edilmesi gereklidir (Neely ve ark., 2017). Vorikonazol, hafif karaciğer enzimi yükselmelerinden hepatit ve karaciğer yetmezliği gibi ciddi hepatik reaksiyonlara kadar değişen hepatotoksisite gösterebilmektedir. Tedaviye başlamadan önce karaciğer fonksiyon testleri yapılmalı ve tedavi sırasında sürekli olarak izlenmelidir. Karaciğer fonksiyonu anormallikleri görüldüğü anda vorikonazol kesilmelidir. Kardiyak aritmi öyküsü olan veya QT

aralığını uzattığı bilinen ilaçları alan hastalarda kullanılırken dikkat edilmelidir. EKG alınarak takip edilmelidir. Vorikonazol kullanımıyla halüsinasyonlar, konfüzyon ve fotofobi gibi merkezi sinir sistemi (CNS) etkilerinin olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Özellikle psikiyatrik bozukluk öyküsü olan hastalar dikkatlice takip edilmelidir ve gerekirse ilaç verilmesi kesilmelidir. Vorikonazolün görmede değişiklikler, bulanık görme ve fotofobi dahil olmak üzere görsel rahatsızlıklara neden olduğu da bilinmektedir. Hastalara ilaç başlanacağı zaman potansiyel yan etkileri hakkında bilgi verilmeli ve özellikle uzun süreli tedavi sırasında düzenli oftalmik izleme önerilmelidir. Vorikonazol ile anafilaksi ve anjiyoödemi de içeren ciddi aşırı duyarlılık reaksiyonları, lökopeni, nötropeni ve trombositopeni gibi hematolojik anormallikleri vardır. Özellikle önceden hematolojik rahatsızlıkları olan hastalarda tam kan sayımının düzenli, olarak izlenmesi önerilmektedir (Neely ve ark., 2017).

### 2.4.7. Vorikonazol'un Toksisitesi

Toksisite, ilaç alan hastalarda hafiften şiddetliye kadar değişebilen olumsuz etkilere neden olma potansiyelini ifade etmektedir (Chen ve ark., 2024). Vorikonazol kullanımında en sık görülen toksik durumlar:

**Hepatotoksisite:** Vorikonazol ile ilişkili en önemli toksisitelerden biridir. Bu, karaciğer enzimlerinde (transaminazlar) yükselme, hepatit ve hatta ciddi vakalarda karaciğer yetmezliği şeklinde kendini gösterebilmektedir. Tedavi sırasında karaciğer fonksiyon testleri düzenli olarak izlenmeli ve karaciğer fonksiyon anormallikleri görüldüğünde ilaç verilmesi durdurulmalıdır.

**Nörolojik Etkiler**: Vorikonazol halüsinasyonlar, konfüzyon ve fotofobi gibi çeşitli nörolojik etkilere neden olabilir. Bu etkiler, altta yatan nörolojik rahatsızlıkları olan veya daha yüksek dozda ilaç alan hastalarda daha sık görülmektedir.

**Görme Bozuklukları:** Vorikonazolün bir diğer dikkate değer yan etkisi, görme değişiklikleri, bulanık görme ve ışığa duyarlılık (fotofobi) gibi görsel rahatsızlıklardır. Bu etkiler vorikonazolün oküler dokularda birikmesine bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir.

**Kardiyovasküler Etkiler:** Vorikonazol, hastaları torsades de pointes gibi potansiyel olarak ölümcül aritmilere yatkın hale getirebilen QT aralığının uzamasıyla ilişkilendirilmiştir. Önceden kalp rahatsızlığı olan veya QT aralığını uzatan diğer ilaçları kullanan hastalar daha yüksek risk altındadır.

**Cilt Reaksiyonları:** Bu tedaviyi alan bazı hastalarda döküntü, kaşıntı ve ışığa duyarlılık gibi cilt reaksiyonlarının olabileceği rapor edilmiştir.

**Böbrek Toksisitesi:** Daha az görülmesine rağmen, vorikonazol böbrek fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir. Önceden böbrek yetmezliği olan veya eş zamanlı nefrotoksik ilaç alan hastalar daha yüksek risk altında olabilmektedir.

**Hematolojik Etkiler:** Vorikonazol, lökopeni (düşük beyaz kan hücresi sayısı), nötropeni (düşük nötrofil sayısı) ve trombositopeni (düşük trombosit sayısı) gibi hematolojik anormalliklere neden olabilir.

**Endokrin Etkileri:** Vorikonazol vücuttaki hormon düzeylerini etkileyerek, özellikle uzun süreli tedavide adrenal yetmezliğe veya hormonal dengesizliklere yol açabilir.

**Gastrointestinal Etkiler**: Vorikonazolün yaygın gastrointestinal yan etkileri bulantı, kusma, ishal ve karın ağrısıdır.

**Alerjik Reaksiyonlar:** Çok az görülsede hafif döküntüden şiddetli anafilaksiye kadar değişen alerjik reaksiyonlar meydana gelebilir.

**İlaç Etkileşimleri:** Vorikonazol, özellikle sitokrom P450 sistemi tarafından metabolize edilen ilaçla başta olmak üzere diğer birçok ilaçla etkileşime girip ilaç seviyelerinin değişmesine ve potansiyel toksisiteye yol açabilmektedir.

**Doğurganlık ve Üreme Toksisitesi:** Hayvan çalışmalarıyla vorikonazolün üreme toksisitesi gösterdiği belirlenmiştir (Chen ve ark., 2024).

### 2.4.8. Vorikonazol'un Gebelikte Kullanımı

Hamilelik sırasında vorikonazol kullanımı hem anneye hem de gelişmekte olan fetüse yönelik potansiyel risklere sahip olduğundan dolayı hamilelerde kullanılırken dikkat edilmesi gereklidir. Hamilelerde kullanımı birçok zorluk ve karmaşıklığı beraberinde getirmektedir (Pilmis ve ark., 2015).

Vorikonazol, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından Gebelik Kategorisi D olarak sınıflandırılmıştır. Buda, insan verilerine dayanan fetal riskin olduğunu göstermektedir. Hayvan çalışmaları ile fetal gelişim üzerinde iskelet ve kraniyofasiyal anormallikler gibi olumsuz etkilerin olduğu göstermiş olsa da insanlarda sınırlı sayıda veriler olduğundan bu risklerin olup olmadığı tam olarak gösterilmemiştir. Ek olarak, hamilelik sırasında maruz kalmanın zamanlaması olumsuz etki oluşturabilir: ilk trimesterde maruz kalındığında potansiyel olarak daha yüksek doğum kusur riskleri oluşturur. Hamilelik sırasında vorikonazol kullanılıp kullanılamayacağına hem anne hem de fetal sağlığı dikkate alınarak karar verilmelidir. Doktorlar, annedeki mantar enfeksiyonun fetüsü ne kadar etkileyebileceğini göz önünde bulundurarak tedaviye karar vermelidir. Annedeki enfeksiyonun yaşamı tehdit ettiği ve alternatif tedavilerin mevcut olmadığı bazı durumlarda, vorikonazol kullanmak gerekli olabilir.

Vorikonazol tedavisine ihtiyaç duyan doğurganlık çağındaki kadınlara gebelik öncesi sağlık birimleri tarafından danışmanlık hizmeti verilmelidir. Bu bilgilendirmeler esnasında gebelik sırasında vorikonazol kullanmanın potansiyel riskleri ayrıntılı olarak

açıklanmalı ve gebelik düşünülüyorsa alternatif tedavi seçenekleri de sunulmalıdır. Eğer hamilelik sırasında vorikonazol kullanılması gerekli ise risklerden dolayı ultrasyonla fetüsün gelişimi yakından izlenmelidir. Vorikonazol insan sütüne geçtiği belirlendiğinden emziren annelerin vorikonazol kullanması önerilmez. Vorikonazol tedavisine ihtiyaç duyuluyorsa annenin emzirmeyi kesmesi önerilir (Pilmis ve ark., 2015).

### 2.4.9. Vorikonazol İçeren Eşdeğer Müstahzarlar

Vorikonazol etken maddesini içeren eşdeğer müstahzarlar Tablo 2.2.'de verildi.

**Tablo 2.2.** Vorikonazol etken maddesini içeren eşdeğer müstahzarlar

| Firma | Firma | Firma |
|---|---|---|
| GENSENTA<br>Vorikonazol 200 mg | SANDOZ<br>Vorikonazol 50 mg | WORLD MEDICINE<br>Vorikonazol 200 mg |
| BIEM<br>Vorikonazol 200 mg | DEVA HOLDİNG<br>Vorikonazol 200 mg | VEM ILAC<br>Vorikonazol 200 mg |
| PFIZER PFE<br>Vorikonazol 200 mg | PFIZER PFE<br>Vorikonazol 40 mg (1 ml) | GENVEON<br>Vorikonazol 200 mg |
| FARMA-TEK<br>Vorikonazol 200 mg | FARMA-TEK<br>Vorikonazol 200 mg | NEUTEC ILAC SAN.<br>Vorikonazol 200 mg |
| NEUTEC ILAC SAN.<br>Vorikonazol 50 mg | GEN ILAC<br>Vorikonazol 200 mg | TUM EKIP<br>Vorikonazol 200 mg |
| POLIFARMA<br>Vorikonazol 200 mg | CENTURION<br>Vorikonazol 200 m | SANDOZ<br>Vorikonazol 200 mg |

## 2.5. Spektroskopi

Spektroskopi bir maddenin elektromanyetik radyasyon ile etkileşimini radyasyonun dalga boyu veya frekansının bir fonksiyonu olarak inceleyen bir bilim dalıdır.

Işık, elektromanyetik bir radyasyon formu olup ve insan gözü tarafından algılanabilir. Foton adı verilen parçacıklardan oluşur. Bu fotonlar, belirli bir dalga boyu

ve enerji seviyesine sahiptirler. Işık, birçok kaynaktan gelir, örneğin güneş, lambalar, LED'ler ve diğer ışık kaynakları olup birçok önemli fiziksel ve kimyasal olayda rol oynamaktadır. Optik, görüntüleme, iletişim, tıp, endüstri, bilimsel araştırmalar ve birçok başka alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Işıkla ilgili birçok teori ve model bulunmaktadır: Dalga Teorisi, Parçacık (Kuantum) Teorisi, Dalga-Parçacık Dualitesi ve Kuantum Elektrodinamiği (KED) en önemli teoriler arasında yer almaktadır. Işık, yayılma, kırılma, yansıma gibi özellikleri ile belirli bir dalga boyu ve frekansa sahip olan elektromanyetik dalgalardır. Yapılan çalışmalar ile ışığın hem dalga hem de parçacık özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir. Işık bazı deneylerde dalga gibi davrandığı (örneğin, interferans ve kırılma) bazı deneylerde ise parçacık gibi davrandığı (örneğin, fotoelektrik etki) görülmektedir. Sonuç olarak, ışık, elektromanyetik bir enerji formudur ve evren boyunca fotonlar şeklinde yayılır (Ertaş., 1996). Elektromanyetik dalga olarak, ışık zamanla değişen elektrik ve manyetik alanların birleşiminden oluşur (Özyetgin, 2008; Wilson ve ark., 2000).

### 2.5.1. Elektromanyetik Işınlar

Elektromanyetik radyasyon (EMR) veya Elektromanyatik Işınlar (EMI), hızla hareket eden ve farklı formlarda ortaya çıkabilen bir enerji türüdür. EMI'nin iki temel karakteri bulunmaktadır: dalga ve tanecik (foton). Bu iki karakter, birbirini tamamlayan unsurlardır. Elektromanyetik ışınlar dalga boylarına göre yedi farklı gruptan oluşmaktadır:

Elektromanyetik ışınlar dalga boylarına göre yedi farklı gruptan oluşmaktadır:

#### 2.5.1.1. Radyo Dalgaları Bölgesi

Radyo dalgaları, elektromanyetik spektrumun en uzun dalga boylarına sahip bölgesini oluşturur. Genellikle birkaç milimetreden binlerce kilometreye kadar dalga

boylarına sahiptirler. Bu uzun dalga boyları, geniş bir frekans aralığını kapsar ve bu da radyo dalgalarının iletişim ve diğer çeşitli uygulamalarda kullanılmasını sağlar. Radyo dalga boyları 10 metre ile 1 metre arasında değişen ve frekansları $10^6$ ile $10^8$ Hertz arasında olan bir alandır. Bu dalga boyları en uzun olanları içerir ve dolayısıyla bu bölgedeki ışınlar, sıcaklık ve enerji bakımından en düşük seviyededir. Enerji değişimi genellikle 0.001 ile 10 J/mol arasında olup, bu aralık Elektron Spin Rezonans (ESR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri gibi çalışmalar için uygun bir dalga boyu aralığıdır (Apaydın, 1991).

Radyo dalgaları, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi tıbbi görüntüleme tekniklerinde kullanılır. Bu teknikler, vücut içindeki dokuları görüntülemek için radyo dalgalarını kullanır.

#### 2.5.1.2. Mikrodalga Işın Bölgesi

Mikrodalga bölgesi, elektromanyetik spektrumda 1 cm ile 100 μm arasında değişen dalga boylarına ve $10^{10}$ ile $10^{12}$ Hz arasında değişen frekanslara sahip olan bir aralıktır. Bu aralıkta, moleküllerin dönme hareketlerinden kaynaklanan enerji seviyeleri incelenir. Mikrodalgalar, atomlar ve moleküllerle etkileşerek, bu parçacıkların hareketi sırasında sürtünmeyle ısı enerjisinin açığa çıkmasına neden olurlar (Tuğrul, 2018).

Bu bölge, radyo dalgaları ve kızılötesi ışık arasında yer alır. "Mikrodalga" terimi, dalga boyunun kısa olması nedeniyle verilmiştir. Mikrodalga teknolojisi, çeşitli alanlarda kullanılır. Evlerde, mikrodalga fırınlar yiyecekleri ısıtmak veya pişirmek için kullanılır. Endüstride, mikrodalgalar materyalleri kurutma, yapıştırma, kaynak yapma, ısıtma ve diğer pek çok işlemde kullanılır. Telekomünikasyon alanında, mikrodalga iletişim hatları, yüksek hızlı veri iletimi için kullanılır. Tıpta, mikrodalga teknolojisi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi tıbbi görüntüleme cihazlarında kullanılır.

#### 2.5.1.3. Kızılötesi Işın Bölgesi

Kızılötesi ışın bölgesi, 100 mikrometre ile 1 mikrometre arasında değişen dalga boylarına ve $10^{12}$ ile $3 \times 10^{14}$ Hertz arasında değişen frekanslara sahiptir. Isı kaynağı olan nesneler tarafından yayılan bu dalgalar, çoğu maddeler tarafından kolayca emilirler. Kızılötesi ışınlar, emilen maddelerde ısı enerjisi olarak ortaya çıkar ve dolayısıyla maddenin sıcaklığı artar (Tuğrul, 2018).

Kızılötesi kameralar, nesnelerin sıcaklık farklarını algılayarak termal görüntüler oluşturur. Bu teknoloji, askeri keşif ve gözetim, yangın tespiti, endüstriyel bakım, gece görüş ve tıbbi teşhis gibi alanlarda kullanılır. Kızılötesi ışınlar, tıbbi görüntüleme (örneğin, radyoloji ve dermatoloji) ve terapötik uygulamalarda (örneğin, lazer cerrahisi) kullanılır.

#### 2.5.1.4. Görünür Işın Bölgesi

Görünür ışın, elektromanyetik spektrumun görünür bölgesidir ve dalga boyları yaklaşık 400 nanometreden (mavi) 700 nanometreye (kırmızı) kadar değişir. İnsan gözü, bu dalga boylarındaki ışığı algılayabilir ve renkleri görebilir. Görünür ışın bölgesi, günlük yaşamda en yaygın olarak deneyimlediğimiz ışın türüdür. Renkli cisimler, görünür ışığı yansıtarak veya yayarak çeşitli renklerde görünür hale gelirler. Güneş ışığı, birçok farklı dalga boyundaki görünür ışıkları içerir, bu da doğal renklerin gözlemlenmesine olanak tanır. Farklı dalga boylarındaki görünür ışığın insan algısındaki renklerle ilişkisi vardır. Kısa dalga boylarındaki ışık maviye, uzun dalga boylarındaki ışık ise kırmızıya daha yakındır. Bu nedenle, görünür ışığın tüm renklerini birleştirdiğimizde beyaz ışık elde ederiz.

#### 2.5.1.5. Ultraviole Işın Bölgesi

Gözlerimiz bazı ışınları görebilirken bazı ışınları algılayamaz. Elektromanyetik spektrumda 100 nm ile 400 nm dalga boyu aralığında bulunan yani dalga boyu görünür

bölge ışınlarından kısa, ancak X-ışınlarından uzun olan bir elektromanyetik ışınlar gözlerimiz tarafından algılanamaz. Bu bölgeye ultraviole ışınlar bölgesi denilmektedir. Güneş ışığının yaklaşık %10'nu UV ışınları oluşturmaktadır. 10-200 nm dalga boylu ışınların bulunduğu bölgeye uzak UV bölgesi (uzak mor ötesi) ve 200-400 nm dalga boyu aralığındaki ışınların bulunduğu bölgeye ise yakın UV bölgesi denilmektedir. Uzun dalga boylu UV ışınları atomları iyonize edebilecek güce sahip değildir. Fakat bazı kimyasal reaksiyonların oluşmasına ve birçok maddenin de parlamasını neden olabilmektedir. Spektroforometri cihazları maddelerin UV ışınları ile etkileşimlerini incelemek üzere 200 nm ile 800 nm dalga boyu aralığında çalışacak şekilde oluşturulmuşlardır.

#### 2.5.1.6. X Işınları Bölgesi

X ışınları, elektromanyetik spektrumun yüksek enerjili ve kısa dalga boylarına sahip bir bölgesidir. Dalga boyları yaklaşık 0.01 nanometre ile 10 nanometre arasında değişir. Bu bölge, ultraviyole ışınları ile gama ışınları arasında yer alır. X ışınları, yüksek enerjileri nedeniyle, malzemelerin içine nüfuz edebilme ve fotoğrafik filmleri ışınlama gibi özelliklere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı, tıbbi görüntüleme (röntgen), endüstriyel muayene ve malzeme analizi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılırlar. Tıbbi görüntüleme alanında, röntgen cihazları, vücut içindeki kemikler ve yumuşak dokular gibi yapıları görüntülemek için X ışınları kullanır. Bu sayede, teşhis ve tedavi planlaması yapılabilir. Ayrıca, röntgenler, diş hekimliğinde diş ve çene problemlerini teşhis etmek için de kullanılır. Endüstriyel muayene ve malzeme analizi alanında, X ışınları, bir malzemenin iç yapısını incelemek veya kusurları tespit etmek için kullanılmaktadır.

#### 2.5.1.7. Gama Işınları Bölgesi

Gama ışınları, elektromanyetik spektrumun en yüksek enerjili ve en kısa dalga boylarına sahip bölgesidir. Dalga boyları 0.01 nanometre ile 10 pikometre arasında değişir, bu da gama ışınlarının X ışınlarından daha yüksek enerjili olduğunu göstermektedir. Gama ışınları, çeşitli nükleer olaylardan kaynaklanır, özellikle de radyoaktif bozunma süreçlerinde. Bu süreçler sırasında atom çekirdekleri yüksek enerjili fotonlar yayarak gama ışınlarını oluşturur. Gama ışınları, tıbbi görüntüleme, radyoterapi, endüstriyel muayene, malzeme analizi ve uzay araştırmaları gibi birçok alanda kullanılır. Tıpta, gama ışınları kanser hücrelerini yok etmek için kullanılan radyoterapi tedavisinde ve tıbbi görüntüleme cihazları olan gama kameralarında kullanılmaktadır. Endüstride, malzemelerin kalitesini kontrol etmek, kusurları tespit etmek ve arkeolojik buluntuları incelemek için gama ışınlarından da yararlanılmaktadır.

### 2.5.2. Spektroskopik Yöntemler

Maddelerin ışıkla etkileşimini inceleyerek, bileşimleri, yapısı ve özellikleri hakkında kapsamlı bilgiler elde edilmesini sağlayan atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubu spektroskopi yöntemler olarak adlandırılmaktadır. İnorganik ve organik maddelerin hem kalitatif hem de kantitatif analizlerinde spektroskopik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Altınışık, 2004).

Spektroskopi, astronomi, kimya, malzeme bilimi ve fizik gibi birçok alanda, maddenin bileşimi, fiziksel ve elektronik yapısı, atomik, moleküler veya makro ölçekte araştırılmasını sağlayan temel bir araştırma yöntemler grubudur. Tarihsel olarak, spektroskopinin kökenleri, bir prizma tarafından dağıtılan görünür ışığın gaz fazındaki maddeler tarafından soğurulmasının dalga boyuna bağlı olarak incelenmesine dayanır. Günümüzde, spektroskopinin uygulamaları arasında tıbbi görüntüleme ve doku analizi

gibi biyomedikal spektroskopi de bulunmaktadır (Güler, 1994; Kerr ve ark., 2011; Sastrohamidjojo, 2018).

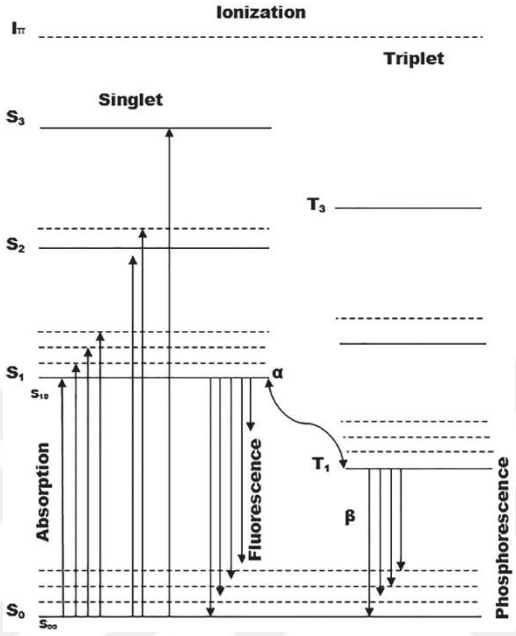
### 2.5.3. Işının Absorpsiyonu

Çeşitli dalga boylarında bulunan bir ışın demeti bir madde üzerine gönderildiğinde madde tarafından soğrulur bu olaya “ışığın absorplanması" denir. Absorpsiyon ile ışının enerjisi maddenin iyonlarına, atomlarına veya moleküllerine aktarılmasıyla gerçekleşir. Maddenin absorpladığı ışın enerjisi ile elektronlar bir üst enerjiye uyarılır. Uyarılan elektronlar kısa bir süre içerisinde absorbe ettiği enerjiyi ya ısı enerjisi ya da daha büyük bird alga boyunda enerji halinde geri vererek temel haline döner. Her madde, absorbe ettiği ışının enerji seviyelerine göre farklı bir "absorpsiyon spektrumları" sergiler. Absorpsiyon spektrumları, genellikle atomik absorpsiyon ve moleküler absorpsiyon olarak iki gruba ayrılır.

Atomik absorpsiyonda, sadece atomdaki bir veya daha fazla elektronun daha yüksek enerji seviyelerine yükselmesiyle elektronik bir süreçte meydana gelir. Atomik absorpsiyon, UV ve görünür ışın bölgesinde meydana gelir, çünkü bu ışınlar, yalnızca dıştaki veya bağ yapan elektronlarda geçişlere neden olacak kadar enerjiye sahiptir. Moleküler absorpsiyon ise, molekülün düşük enerjili molekül orbitallerinden yüksek enerjili molekül orbitallere geçişiyle gerçekleşir. Bu süreçte, UV, görünür bölge ve kızılötesi ışınlar kullanılır. Moleküler absorpsiyon spektrumları, atomik absorpsiyonlardan daha karmaşıktır çünkü çok atomlu moleküllerdeki enerji seviyelerinin sayısı atomlardan daha fazladır.

Moleküller, uyarıldıklarında üç tip geçiş yaşarlar: elektronik geçişler, titreşim geçişleri ve dönme geçişleri. Elektronik geçişler, moleküler elektronların enerji seviyeleri arasında gerçekleşir ve bu geçişler UV ve görünür bölgede meydana gelir. Titreşim geçişleri, moleküler türlerdeki atomlar arası titreşimlerin enerjisiyle oluşur ve

bu geçişler genellikle kızılötesi bölgede gözlemlenir. Dönme geçişleri ise, molekülün içindeki çeşitli dönme hareketlerinin enerjisini temsil eder ve bu geçişler de kızılötesi bölgede yer alır. Bir organik molekülde enerji-düzey diyagramı Şekil 2.2'de verildi (Gupta ve ark., 2020; Holler ve ark., 1999).




**Şekil 2.2.** Bir organik molekül için enerji-düzey diyagramı

### 2.5.4. UV- Görünür Bölgedeki Geçişler

Farklı moleküler yapıların elektronik özelliklerinin analizi için spektroskopik yöntemler kullanılır. Bu yöntemler, elektronik yapıdaki farklı orbitaller arasındaki geçişlerin incelenmesine dayanır. Organik moleküllerde, pi (π), sigma (σ) ve n orbitalleri bulunduğundan dolayı bu orbitaller arasında geçişler meydana gelir. Spektroskopik yöntemler, bu moleküllerdeki pi-elektronlarının, sigma-elektronlarının ve n-elektronlarının birbirlerine geçişlerini inceleyerek moleküler yapının tanımlanmasında kullanılır (Praveen ve ark., 2014).

### 2.5.4.1. π, σ ve n Orbitalleri Arasındaki Geçişler

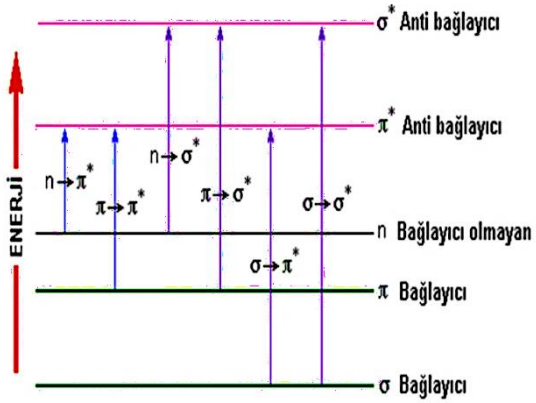
Moleküllerde oluşan geçişler aşağıda ve Şekil 2.3'de verildi (Christian ve ark., 2013).

σ → σ* Geçişleri: Doymuş bileşiklerde gerçekleşir. Bir moleküldeki σ bağ orbitalindeki bir elektron, vakum UV bölgesindeki bir ışığı absorbe ederek antibağ orbitaline uyarılır. Bu durumda σ → σ* geçişi meydana gelir. Diğer elektronik geçişlere kıyasla, σ → σ* geçişleri için gereken enerji oldukça yüksektir.

n → σ* Geçişleri: Bu geçişler, ortaklanmamış elektron çiftleri içeren bileşiklerde (bağ yapmayan orbitalde bulunan elektronlar) gözlenir. Genellikle, bu geçişler σ → σ* geçişlerinden daha az enerji gerektirir ve absorpsiyon piklerinin çoğu 150-250 nm aralığındaki bölgede yer alır.

π → π* Geçişleri: Doymamış bileşiklerde gerçekleşir. Bu geçişler 200-700 nm arasındadır. Moleküler UV spektroskopisinde en yaygın gözlenen ve en kullanışlı geçiş türüdür.

n → π* Geçişleri: Doymamış ve heteroatom içeren bileşiklerde gerçekleşir. Bu geçişler de 200-700 nm arasındadır. Moleküler UV spektroskopisinde, yine en yaygın gözlenen ve en kullanışlı geçişlerdendir.




**Şekil 2.3.** Elektronlar arasındaki muhtemel geçişler

### 2.5.5. UV-Gör. Bölge Spektrofotometresi

UV ve görünür bölgede maddenin ışını absorplama özelliğine göre geliştirilen cihazlara spektrofotometre denilmektedir. Ultraviyole ve görünür bölgede meydana gelen absorpsiyon, genellikle bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. UV-Gör. Bölge spektrofotometre cihazları 200-900 nm arasında çalışır. $N_2$ ve $O_2$ molekülleri, 160 ve 200 nm'de absorpsiyon yaptıkları için 200 nm altındaki dalga boylarında vakumlu spektrofotometre cihazları kullanılır. Spektrofotometre cihazı aşağıdaki kısımlardan oluşur (Şekil 2.4).

#### 2.5.5.1. Işın Kaynağı

Işın kaynağı, genellikle değişik dalga boylarında monokromatik ışınlar sağlayan bir lamba veya lazerdir.

Spektrofotometrede, bir molekülün absorpsiyon özelliklerini incelemek için, sürekli ve stabil bir ışın kaynağına ihtiyaç vardır. Bu amaçla, UV ve Görünür bölgede yaygın olarak döteryum (D2), tungsten (W), hidrojen (H2) ve ksenon (Xe) lambalar kullanılmaktadır. UV bölgesinde sıklıkla tercih edilen lambalar hidrojen veya döteryum elektriksel deşarj lambalarıdır. Bu lambalarda, düşük basınçlı hidrojen veya döteryum gazlarına uygulanan bir elektrik akımı ile gazların deşarj edilmesi sağlanır ve 180 nm ile 380 nm arasında ışınlar elde edilir. Döteryum lambaları, hidrojen lambalarına göre daha uzun ömürlüdür ve genellikle daha yoğun bir ışın kaynağı olarak tercih edilir.

Görünür ve yakın kızılötesi bölgede ise tungsten flaman lambaları kullanılır. Elektrik akımıyla ısıtılan tungsten flaman, özellikle 320 nm ile 3000 nm dalga boyu aralığında ışın yayarlar. Ancak, yüksek sıcaklıkta çalışan tungsten lambalarının görünür bölgede yaydığı ışın, toplam enerjinin sadece %15'ine tekabül eder. Bu nedenle, bazı tungsten lambalarına iyot veya brom buharı eklenerek ömrü uzatılır ve daha yüksek yoğunlukta ışınlar elde edilir. Bu tür lambalara tungsten-halojen lambaları denir.

Ksenon ark lambası, UV ve görünür bölgedeki geniş bir spektrumu kapsayabilen bir başka ışın kaynağıdır. Civa buhar lambası da benzer şekilde her iki bölgede ışıma yapabilir. Özellikle luminesans spektroskopisi gibi uygulamalarda ksenon ve civa lambaları tercih edilir.

#### 2.5.5.2 Dalga Boyu Seçici (Monokromatör)

Spektrofotometrede istenilen dalga boyunda ışını seçmek için monokromatör filtreler kullanılır.

Absorbansın ölçülmesi sırasında, kullanılan ışık kaynağından gelen polikromatik ışın, tek bir dalga boyunda ışına dönüştürülerek örneğe gönderilir. Bu dönüşümü gerçekleştiren düzeneğe "monokromatör" denir. Monokromatörler, genellikle prizmalar veya optik ağlar olarak adlandırılan parçalar kullanılarak yapılmıştır.

Prizmalardaki dalga boyu seçimi, ışığın farklı dalga boylarında farklı miktarlarda kırılması prensibine dayanır. Prizma, ışık kaynağına göre döndürülerek çeşitli dalga boylarına sahip ışık, belirli bir aralıktan geçirilerek numuneye iletir. Monokromatörler, polikromatik ışığı belirli bir dalga boyunda tek bir ışığa dönüştürerek örneğe göndermek için kullanılır. Bu yöntem, örneğin belirli bir dalga boyunda absorpsiyonunu ölçmek için gereklidir ve spektrofotometrelerde önemli bir bileşendir (Miloğlu ve Miroğlu, 2013).

#### 2.5.5.3. Numune Kabı

Analiz sırasında incelemek üzere maddenin konulduğu kaplara numune kabı denilmektedir. Numune kabı veya hücreleri, çalışılan spektrum bölgesindeki ışını geçirebilen maddelerden olmalıdır. Bu amaçla, soft cam, borosilikat cam, plastik ve kuvars küvetler sıkça kullanılır.

Plastik küvetler, genellikle görünür bölgede kullanılır (350-780 nm). Soft cam küvetler asidik çözeltiler için uygundur, borosilikat cam küvetler ise kuvvetli alkali

çözelti ortamları için tercih edilir. Cam küvetler, hem görünür bölge hem de yakın kızılötesi bölgede kullanılabilir (350-2000 nm). Kuvars küvetler ise 350 nm ile 3 nm arasındaki bölgede kullanılır. Uygulama sırasında, küvetlerin yüzeylerindeki parmak izleri, yağ ve diğer safsızlıklar, hücrelerin ışığı geçirgenliğini önemli ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle, küvetlerin temiz ve düzgün olması, doğru sonuçlar elde etmek için önemlidir.

#### 2.5.5.4. Dedektörler

Numune üzerine belli bir şiddete ışın gönderilir ve numne tarafından belli bir dalga boyunda ışını absorplanır. Maddeden çıkan ışınların emilimini veya geçişini ölçen ve bir sinyal oluşturan kısımlarına dedektör denir. Dedektörler, ölçülen ışına karşı duyarlı olmalıdır. Bu, dedektörün örneğin absorpsiyonunu hassas bir şekilde ölçmesini sağlar.

Dedektörün ürettiği sinyal, ölçülen ışığın şiddetiyle doğru orantılı olmalıdır. Yani, daha güçlü bir ışın şiddeti, daha büyük bir sinyal üretmelidir. Dedektör, giren ve çıkan ışına hızlı bir şekilde tepki vermelidir. Bu, ölçümlerin hızlı bir şekilde yapılmasını sağlar. Dedektör, deney süresince kararlı bir şekilde çalışmalıdır. Bu, ölçümlerin tekrarlanabilirliğini sağlar. Dedektör tarafından üretilen sinyal, elektronik devreler tarafından kolayca işlenebilir olmalıdır.

Spektrofotometrelerde kullanılan üç ana dedektör türü vardır. Bunlar:

Fotovoltatik Dedektörler: Işık absorpsiyonu sonucunda iletkenlik bandına çıkarılan elektronlar, bir elektrik akımı oluşturarak ışın şiddetine doğru orantılı bir sinyal üretirler. Bu dedektörler genellikle UV ve görünür bölgedeki ölçümlerde kullanılır.

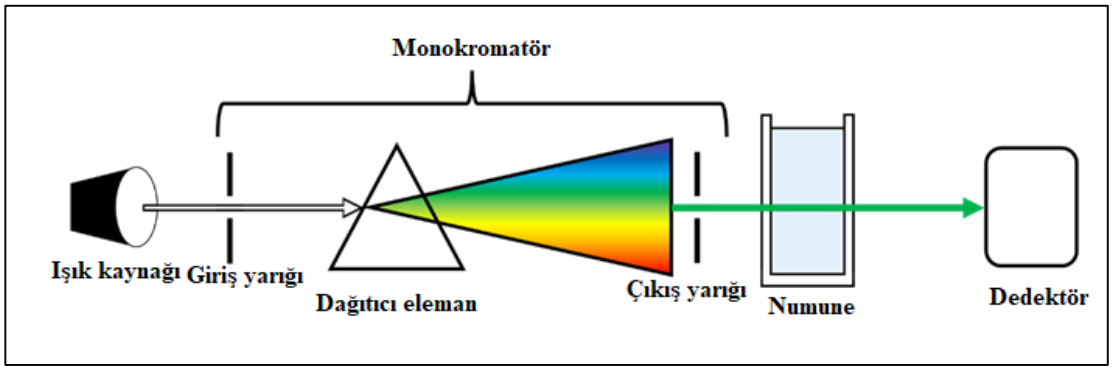
Fototüpler: Alkali metal oksit filmlerden yapılan fotokatotlar, üzerlerine düşen fotonlar tarafından uyarılır ve bu fotokatotlardan çıkan elektronlar bir anotta toplanarak elektrik akımına dönüştürülür. Fototüpler, UV ve görünür bölgedeki ölçümlerde kullanılır.

Foto Çoğaltıcı Tüpler: Bu tür dedektörlerde, fotokatot yüzeyinden foton çarpmasıyla fırlatılan elektronlar dinot adı verilen yüzeylere çarparak çoğaltılır. Her bir çarpma sonucunda bir dizi elektron oluşur ve bu elektronlar sonunda bir anotta toplanarak elektrik akımına dönüştürülür. Foto çoğaltıcı tüpler, genellikle düşük ışın seviyelerinde kullanılır.

Bu dedektörler, spektrofotometrelerin hassasiyeti, hızı ve ölçüm aralığı gibi özelliklerini belirler (Şener, 2006).

#### 2.5.5.5. Okuyucu (Sinyal İşlemcisi)

Dedektörlerden gelen sinyalleri işleyen ve sonuçları gösteren bir bileşendir. Bu bileşen, ölçülen verileri analiz eder, işler ve sonuçları bir ekranda veya yazılı olarak gösterir (Şener, 2006; Miroğlu ve Miloğlu, 2013).




**Şekil 2.4.** Spektrofotometre cihazının görseli

### 2.5.6. UV-Gör. Bölge Cihaz Çeşitleri

Cihazlar, fotometreler ve spektrofotometreler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır.

Fotometreler: Basit cihazlardır ve genellikle tek bir dalga boyunu dedekte edebilirler. Fotometreler, görünür bölge fotometreleri, UV fotometreleri ve probe tip fotometreler olarak üçe ayrılır.

Spektrofotometreler: UV bölgesinden başlayarak görünür bölgenin tamamını tarayabilen ve monokromatör veya dispersif elemanlarla dalga boyu taraması yapabilen cihazlardır. Organik, inorganik ve biyokimyasal türlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılırlar. Fotometrelere göre daha karmaşık optik sistemlere sahiptirler ve genellikle daha pahalıdırlar.

Spektrofotometreler iki ana tipe ayrılabilir: Tek Işın Yollu Spektrofotometreler: Bu tür spektrofotometreler, ışın kaynağı, dalga boyu seçici (filtre veya monokromatör), numune hücresi, referans hücresi, dedektör, sinyal yükseltici ve gösterge aletinden oluşur. Ölçüm yapmadan önce, referans madde numune bölmesine konularak cihaz sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi yerleştirilir ve ölçüm gerçekleştirilir.

Çift Işın Yollu Spektrofotometreler: Bu tür spektrofotometreler, gelen ve geçen ışınları ayrı ayrı ölçebilirler. Gelen ve geçen ışınları ayrı ayrı dedekte eden iki dedektör kullanırlar, bu da daha hassas ölçümler yapmalarını sağlar. Bu cihazlar, özellikle numunenin zaman içindeki değişimlerini izlemek için idealdir (Räty ve ark., 2004)

### 2.6. Kromatografi

Kromatografi, analitik kimya alanında, karmaşık karışımların ayrılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için yaygın bir şekilde kullanılan temel tekniklerden biridir. Kimya, biyokimya, eczacılık, çevre bilimi, gıda bilimi ve adli analiz dahil olmak üzere çok sayıda bilimsel alanlarda kullanılmaktadır.

Sabit bir faz üzerinden hareketli bir faz yardımıyla geçirilen maddelerin farklı etkileşimlerinden yararlanılarak birbirlerinden ayrılıp tanınması işlemine kromatografi denilmektedir. Sabit faz, bir kolon veya düzlem üzerinde bir katı veya bir katı üzerinde

desteklenen bir sıvı olabilmektedir. Hareketli faz ise gaz veya tipik olarak bir sıvıdır. Numune bileşenleri sabit faz boyunca ilerledikçe ayırma işlemi gerçekleşir. Boyut, polarite, yük ve afinite gibi faktörler, her bir bileşenin hareketli faza karşı sabit fazla ne kadar güçlü etkileşime girdiğini belirler. Bu, karışımı etkili bir şekilde kendi bileşenlerine ayırarak alıkonma sürelerinin değişmesine yol açar. Yıllar geçtikçe maddelerin özelliklerine göre kromatografi çeşitlenmiştir. Hareketli fazın özelliğine göre kromatografi Gaz kromatografisi (GC) ve Sıvı Kromatografisi (LC) olmak üzere iki ana kısma ayrılır. GC'de hareketli faz bir gazdır, LC'de ise tipik olarak bir sıvıdır. Sıvı kromatografisiside kendi içerisinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), iyon kromatografisi, boyutlandırma kromatografisi, afinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi olarak değişik şekillere ayrılmıştır.

Kromatografide örnek bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri arasındaki fark ne kadar belirginse, bileşenler o kadar iyi ayrılabilir. Kolonda en az tutulan bileşenler kolonu ilk önce terk eder, güçlü tutulan bileşenler ise kolonu daha geç terk ederler. Kromatografik yöntemlerle hem kalitatif hem de kantitatif analizler yapılır.
Sıvı kromatografisinde normal faz ve ters faz olmak üzere iki farklı teknik kullanılır. Sabit faz polar hareketli faz apolar olan kromatografik tekniğe normal faz, sabit faz apola hareketli faz polar olan tekniğe ise ters faz kromatografisi denir (Coşkun, 2016; Jungbauer ve ark., 2009).

Bilim insanları genellikle, HPLC'nin yaygın kullanımı öncesinde standart sıvı kromatografisini araştırmalarda tercih ederlerdi. Ancak sıvı kromatografisinde, hareketli fazın yer çekimine bağlı olan akış hızı nedeniyle istenilen verim sağlanamayabilir. Bu nedenle, hareketli fazın ve numunenin hızlı bir şekilde ilerlemesi için basınç uygulanarak kromatografi tekniği geliştirilmiştir. HPLC'nin teknik

cihazlarının gelişimi, alternatif analiz yöntemleriyle yapılan çalışmaların bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (Coşkun, 2016; Perea ve ark., 2000).

### 2.6.1. Kromatografi Yöntemleri

Kromatografi genellikle bileşenlerin farklı özelliklerine dayanarak ayrılmasını sağlayan geniş bir teknik yelpazesine sahip olan ve farklı uygulamalar için farklı türlerde kromatografi teknikleri mevcuttur. Bunlar:

#### 2.6.1.1. Gaz Kromatografisi (GC)

Bileşenler sabit bir faz üzerinden bir gaz vasıtasıyla taşınması suretiyle farklı güçlerde tutunmalarından yararlanarak numune bileşenlerinin birbirinden ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Bileşenlerin ayrılması, sabit fazdaki farklı etkileşimlerden kaynaklanır. Hareketli fazın ayırmada bir etkisi bulunmamaktadır. Sadece nımue bileşenlerinin kolon içerisinde hareket etmesini sağlamaktadır. Gaz kromatografisi yöntemiyle gazların ve uçucu hale gelebilen maddelerin analizleri ve ayrılmasında kullanılmaktadır.

Kromatografik yöntemlerin, daha basit bir ayırma cihazına sahip olması, kullanım kolaylığı ve dikkate değer şekilde az zamana ihtiyaç duyması gibi üstünlükleri vardır (Ferda Orhun, 1968).

#### 2.6.1.2. Sıvı Kromatografisi (LC)

Sıvı kromatografisi, sabit faz üzerinden numunenin hareket ettirilmesinde uygun bir sıvı kullanılmaktadır. Sabit faz genellikle bir doldurulmuş kolon veya ince tabaka şeklindedir. Hareketli faz ise sabit faz ile etkileşmeye girmeyen uygun bir çözücü veya çözücü karışımıdır. Numune bileşenleri sabit faz ve hareketli faz ile gösterdikleri farklı etkileşimler sonucunda birbirlerinden ayrılırlar. Sıvı kromatografisinin temel prensipleri şunlardır (Niessen, 2006; Small, 2013):

a) Hareketli Faz (Taşıyan Faz): Genellikle bir çözücü veya çözücü karışımı olan sabit faz üzerinden numune bileşenlerinin hareketini sağlar.
b) Sabit Faz: Genellikle bir katı veya bir katı destek üzerine kaplanmış sıvıdan oluşan fazdır.
c) Alıkonma (Retansiyon) Zamanı: Bileşenlerin kolonu terk ettiği süreye denir. Bu süre numune bileşenlerinin sabit faz ve hareketli faz ile farklı etkileşimlerine bağlı olarak değişir.
d) Dedektör: Kromatografik yöntem sonucunda kolonu terk eden bileşenlerin algılanmasına bağlı olarak sinyal üreten kısmıdır. Bu sinyal, genellikle bir grafik olarak kaydedilir ve her bir bileşenin belirli bir zamanda belirli bir sinyal ile eşleşmesini sağlar.
e) Kromatogram: Dedektör tarafından üretilen sinyalin zamanla değişimini gösteren grafiktir. Bu grafik, her bir bileşenin ayrılma zamanını ve genellikle bu bileşenlerin miktarlarını da sağlar.

### 2.6.2. Ayırma Mekanizmalarına Göre Kromatografinin Sınıflandırılması

#### 2.6.2.1. Partisyon (Dağılma) Kromatografisi

Partisyon Kromatografisi hem sabit fazın hem de hareketli fazın sıvı olduğu sistemelerde bileşenlerin iki sıvı faz arasında farklı çözünmelerine bağlı olarak numune bileşenlerinin birbirinden ayrıldığı bir kromatografi yöntemidir. Ayırma işlemi, bir sabit faz (genellikle bir sıvı) ve bir mobil faz (bir başka sıvı) arasındaki dengeye dayanır. Bileşenler, sabit faz ile mobil faz arasında farklı oranlarda çözünürler, bu da ayrılmalarını sağlar (Lambert ve ark., 1964).

#### 2.6.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi, ayırma işleminde numune bileşenlerinin sabit faz yüzey üzerinde farklı güçlerde adsorbe olması soncunda maddelerin birbirinden

ayrılması sonucuna dayaynan bir kromatografi tekniğidir. Bu teknik, bileşenlerin sabit fazla farklı oranlarda etkileşime girmesi sonucunda ayrılmasına dayanmaktadır.

Sabit faz olarak katı bir malzeme (silikajel gibi) ve hareketli faz olarakta bir çözücü veya çözücü karışımı kullanılır. Hareketli faz, sabit fazla temas halinde olduğundan dolayı bileşenler sabit fazla farklı oranlarda etkileşime girer. Bu etkileşimlerin gücü, bileşenlerin sabit faz yüzeyinde ne kadar uzun süre tutulacağını belirler. Adsorpsiyon kromatografisi, özellikle polar bileşenlerin ayrılması için etkilidir (Belenky ve ark., 1978).

#### 2.6.2.3. İyon Değişim Kromatografisi

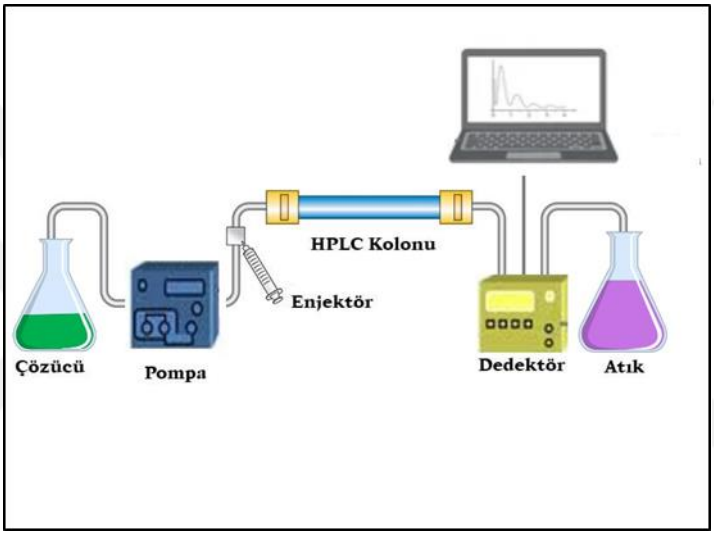
İyon Değişim Kromatografisi sabit fazda yüklü iyonik gruplar bulunmaktadır. Numune içerisindeki anyon veya katyonlar sabit fazdaki iyon grupları ile yer değiştirerek numune içerisinden ayrılmaktadırlar. Yani sabit faz içinde bulunan yüklü iyonik gruplar, mobil faz ile taşınan iyonik bileşenlerle etkileşime girer. Bu etkileşimlerin gücü, iyonik bileşenlerin sabit fazdan ne kadar uzun süre tutulacağını belirler. Bu teknik, özellikle proteinler, peptidler, amino asitler ve diğer yüklü biyomoleküllerin analizi için kullanışlıdır. Ayrıca, metal iyonlarının ve diğer iyonik bileşenlerin analizi için de yaygın olarak kullanılır (Cummins, 2017).

#### 2.6.2.4. Boyutlandırma (Eleme) Kromatografisi

Boyutlandırma Kromatografisinde numune bileşenleri molekül büyüklüklerine göre ayrılmasında kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Bu yöntemde, sabit fazın içinde bulunan bir jel matrisi, örnek içindeki molekülleri boyutlarına göre sıralar ve ayrıştırır. Bu teknikte çeşitli gözenek büyüklüğüne sahip katı sabit faz kullanılır. Küçük moleküller gözenek içerisine haps olurken büyük molekküler kolon içerisinde hareket ederk birbirlerinden ayrılırlar. Özellikle proteinler, nükleik asitler, polimerler ve diğer biyomoleküllerin analizi için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Mori ve ark., 1999).

### 2.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, yüksek basınç altında yüksek hassasiyetle çalışan bir sıvı kromatografi tekniğidir. Bu yöntem, daha hızlı analiz süreleri ve daha iyi çözünürlük sağlar. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), karmaşık karışımlardaki bileşenleri ayırmak, tanımlamak ve nicel olarak analiz etmek için kullanılan güçlü bir analitik tekniklerden birisidir. HPLC tekniğinin temel parçaları arasında hareketli fazın depolandığı çözücü rezervuarlar, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciler yer alır (Şekil 2.5).




**Şekil 2.5.** Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

#### 2.7.1. Çözücü Rezervuarları

Kromatografide, kolon boyunca sıvının hareket etmesi için bir basınç uygulanır; bu sıvı karışımına hareketli faz denir. Hareketli faz, sabit faz boyunca ilerleyerek, enjekte edilen numuneyi taşır. Her bir bileşenin, kolonda farklı bir hızda hareket etmesi, yani bileşenlerin kolon çıkışına farklı zamanlarda ulaşması demektir. HPLC cihazı, cam veya çelikten yapılmış bir veya daha fazla hazne içerir; her biri 200-1000 mL çözücü içerir (Moldoveanu ve ark., 2022).

#### 2.7.2. Pompalar

Hareketli fazın (çözücü veya çözücü karışımının) ince gözenekli bir kolon içerisinden geçmesini sağlamak için pompalar kullanılır.

HPLC pompası, iki önemli özelliği bünyesinde bulundurmalıdır. İlki, 350 veya 500 bar'a kadar yüksek basınç üretebilen sağlam bir cihaz olmalıdır. İkincisi ise, seçilen herhangi bir akış hızında yüksek akış doğruluğu ve hassasiyette çalışabilmelidir. HPLC sisteminde kullanılan iki farklı ayrım tekniği vardır; değişken bir hız değerinde ve belirli bir basınç altında hareketli faz ile numunenin sistem içerisinde dolaşımını sağlayan en önemli bileşenlerden birisi pompadır. HPLC pompaları, Sabit Basınç Pompaları ve Sabit Hacim Pompaları olarak sınıflandırılabilir. Temel olarak pompa, mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, çözücü rezarvuarlarından hareketli fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir. HPLC sistemlerinde genellikle iki tür pompa bulunur: izokratik (sabit bileşimli mobil faz) ve gradient (kompozisyonu zamanla değişen mobil faz) elüsyon sağlayan pompalar. İzokratik çalışmalarda mobil fazın bileşiminde herhangi bir değişiklik olmaz. Gradient çalışmalarda ise ayırım esnasında çözücü oranlarında zamanla bir değişim gerçekleştirilir (Broeckhoven ve ark., 2019).

### 2.7.3. Enjektör

Numune enjeksiyon sistemi, HPLC sisteminde basınç altında hareketli faza numunenin verilmesini sağlar. Genel olarak HPLC sisteminde 5–500 µL miktarında numune örneği uygun şekilde enjekte edilebilir. Numune enjeksiyon hacminin belirlenmesi için likid kromatografi cihazının türü, dedektörün hassasiyeti, kolon kapasitesi ve kullanılan çözücünün numuneye ait pik şekli üzerindeki etkisi dikkate alınmalıdı. Enjeksiyon sistemleri manuel ve otomatik olarak bulunmaktadır. Tipik olarak, numune enjektörü, numuneyi enjekte etmek için otomatik veya manuel olarak çalışabilen bir enjektör valfi içerir (Steiner ve ark., 2019).

Sıvı kromatografik ölçümlerin kesinliği, genellikle numunenin kolon dolgu maddesine taşınmasının tekrarlanabilirliği tarafından belirlenir. Aşırı numune

yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkileyebilir, bu nedenle kullanılan numune hacmi oldukça küçük olmalıdır. Ayrıca, numunenin sisteme girişi sağlanırken sistemin basıncı düşürülmemelidir.

### 2.7.4. Kolonlar

Kolon, HPLC yönteminin temel bir bileşendir. Bu bileşen, maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayrılmasını sağlar. Kolon, genellikle çelik, PEEK (polyether ether ketone) veya cam gibi dayanıklı malzemelerden imal edilir. İçi belirli ölçülerde sabit fazla doldurulmuştur. Sabit faz, çoğunlukla silika veya polimer gibi malzemelerden oluşur. Bu malzemelerin üzerine istenen kimyasal bağları içeren modifiye edilmiş gruplar yerleştirilir.

Kolonun içindeki sabit faz, ayırma işlemini gerçekleştirir. Bu ayrılma, analizdeki bileşenlerin belirli bir süre boyunca sabit faz ile etkileşime girmesiyle gerçekleşir. Bileşenlerin farklı kimyasal özellikleri, bu etkileşim sürecinde farklı davranmalarına neden olur. Bu farklı davranışlar, bileşenlerin sabit fazda farklı hızlarda ilerlemesini sağlar ve sonuç olarak bileşenler ayrışır. Kolon fırını, kolonu saklamak ve sabit bir sıcaklıkta tutmak için kullanılır. Sabit sıcaklık, kromatografi işleminin tekrarlanabilirliğini ve hassasiyetini artırır. Ayrıca, sıcaklık, sabit fazın performansını da etkiler. Çünkü bazı sabit fazlar, belirli sıcaklık aralıklarında daha verimli çalışır.

Kolon boyutu, kromatografik ayrılma performansını etkileyen önemli bir faktördür. Verimliliği artırmak için kolon boyutunda artış gerekebilir. Ancak, kolon boyunu uzatmak her zaman en iyi yol değildir. Çünkü kolon boyundaki artış, sistemin geri basıncını artırır ve analiz süresini uzatır. Ayrıca, kolon boyunun artması, analiz süresi yanında elde edilen çözünürlüğü de artırabilir. Kolon dolgu maddesinin boyutu genellikle mikrometre cinsinden ifade edilir. Bu boyut, sabit fazın iç yapısının homojenliğini ve dolgunun verimliliğini belirler. Optimal kolon boyutu ve dolgu

boyutu, analiz gereksinimlerine ve kullanılan HPLC sisteminin özelliklerine bağlıdır (Cabrera ve ark., 2000).

### 2.7.5. Dedektör

HPLC dedektörleri, yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) en önemli unsurlarından biridir. Bu dedektörler, kromatografik ayrım sonucunda elde edilen bileşenlerin tanınması, tespiti ve nicel olarak ölçülmesi için kullanılır.

HPLC dedektörleri, genellikle numunenin kolon çıkışından geçtiği sırada bileşenlerin varlığını algılayarak çalışır. Bu dedektörler, çeşitli prensiplere dayanarak farklı türde analitik bilgiler sağlarlar. HPLC'de yaygın olarak kullanılan bazı dedektör türleri aşağıda verilmiştir:

- UV-Gör. Bölge (UV-VIS) Dedektörler: Bu dedektörler bileşenlerin UV veya görünür bölge ışınlarının absorplanması esasına göre çalışırlar. Her bileşenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Bu dedektörler belirli dalga boylarındaki emilimi analiz ederek bileşenleri tanımlanması için kullanılır.
- Floresans Dedektörler: Floresans dedektörleri, bileşenlerin UV ışınları tarafından uyarılmasını ve bu uyarılma sonucunda yayılan floresans ışığını ölçer. Bazı bileşenler, UV ışığa maruz kaldıklarında belirli dalga boylarında floresan gösterirler. Bu özellik, floresans dedektörleriyle hassas tespitler yapılmasını sağlar.
- Refraktif İndeks Dedektörleri (RI): RI dedektörleri, numune ile eluent arasındaki kırılma indisindeki farklılıkları ölçerek çalışır. Bu dedektörler, bileşenlerin optik özelliklerine dayalı olarak çalışır ve genellikle polar olmayan bileşenlerin tespiti için kullanılır.
- Elektrokimyasal Dedektörler: Elektrokimyasal reaksiyonlardan kaynaklanan akım değişikliklerini ölçerek çalışır. Özellikle redoks aktif bileşenlerin tespiti

için kullanılırlar. Bu tür dedektörler belirli türdeki bileşenlerin elektrokimyasal özelliklerine duyarlıdır.

- Kütle Spektrometresi Dedektörleri (MS): MS dedektörleri, ayrılan bileşenlerin kütlelerini ölçerek çalışır. Bu dedektörler, belirli bileşenlerin tanımlanması ve moleküler yapılarının belirlenmesi için kullanılır. MS dedektörleri, yüksek seçicilik ve hassasiyet sunarlar.

Her dedektör tipi, belirli analitlerin tespiti ve analizi için avantajlara sahiptir ve genellikle belirli uygulamalara yönelik tercih edilir. HPLC dedektörleri, ilgilenilen bileşenlerin hassas bir şekilde tespit edilmesi ve analiz edilmesi için kritik öneme sahiptir. Bu dedektörler, çeşitli endüstriyel, bilimsel ve klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Morgan ve ark., 2010).

### 2.7.6. Veri Toplama ve İşleme Sistemi (Kaydediciler)

Dedektörden gelen verilerin toplandığı, işlendiği ve analiz edildiği bir bilgisayar sistemidir. Bu sistem, kromatogramları oluşturur, piklerin entegrasyonunu yapar, bileşenlerin miktarlarını hesaplar ve sonuçları raporlar (Ali, 2022; Morgan ve ark., 2010).

## 2.8. HPLC'de Temel Parametreler

Sıvı kromatografisi, bir analitik kimya yöntemi olup, birçok farklı uygulama alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, karmaşık karışımlardaki bileşenleri ayrıştırmak ve analiz etmek için kullanılır.

### 2.8.1. Alıkonma (Retansiyon) Zamanı

HPLC'de alıkonma zamanı (retansiyon zamanı), kromatografik ayırma esnasında numune bileşenin kolonu terk etme süresi olarak adlandırılmaktadır yani numune bileşenlerinin sabit bir analitik kolonda seyir süresini göstermektedir.

Alıkonma zamanı, bir bileşiğin kromatografik kolonda ne kadar kalacağını belirleyen birçok faktörden etkilenir. Bunlar arasında mobil fazın polaritesi, sabit fazın türü, kolonun boyutu ve şekli, akış hızı gibi faktörler yer alır. Alıkonma zamanı, analitik kimyada önemlidir çünkü bir bileşiğin belirli bir süre boyunca kolonda kalması, ayrı bileşenler arasındaki farkları ve analitik sonuçların doğruluğunu sağlar. Bu, bileşenlerin ayrışma derecesini, saflık ve kimlik tespitini değerlendirmek için temel bir ölçüttür.

Pratikte, analitik kimyacılar, standart maddelerin alıkonma zamanlarını bilerek bilinmeyen bir numunenin bileşenlerini belirleyebilirler. Alıkonma zamanı, HPLC analizinde bilinmeyen bileşenlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılan önemli bir parametredir (Sun ve ark., 2017).

### 2.8.2. Kapasite Faktörü

HPLC'de kapasite faktörü, bir bileşiğin kromatografik kolonda ne kadar süre boyunca kalacağını ve bu sürenin sabit fazdan ne kadar uzaklaştığını gösteren bir ölçümdür. Bu faktör, analitik kimyanın temel bir kavramıdır ve kromatografik ayrışma sürecini anlamak için önemlidir.

Kapasite faktörü (k), aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$K = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Burada:

- $t_R$, analitin alıkonma zamanı
- $t_0$ , ölü zaman (kolonda tutulmayan maddenin geliş süresi)

Kapasite faktörü, analitik bileşiğin sabit fazda ne kadar iyi tutulduğunu gösterir. Küçük kapasite faktörleri, bileşiğin sabit fazda zayıf bir şekilde tutulduğunu, büyük kapasite faktörleri ise daha iyi bir ayrışma sağlandığını ifade eder.

Bir bileşiğin kapasite faktörü, kromatografik koşullara (örneğin, sabit fazın polaritesi, mobil fazın bileşimi, kolonun özellikleri gibi) bağlıdır. Kapasite faktörü, analitik kimyanın birçok yönünü etkiler. İyi bir ayrışma elde etmek için, analitik bileşiklerin kapasite faktörlerinin dikkatlice ayarlanması gerekir. Ayrıca, bu faktör, farklı bileşiklerin tanınması ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılır (Ohmacht ve ark., 2000).

### 2.8.3. Seçicilik (α) Ve Ayırma Faktörü (R)

HPLC'de seçicilik (α) ve ayırma faktörü (R), kromatografik ayrışma sürecinin değerlendirilmesinde önemli olan iki temel kavramdır.

Seçicilik (α), iki farklı bileşiğin kromatografik ayrışmasının ne kadar etkili olduğunu ölçer. Şu formülle hesaplanır:

$$\alpha = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{t_{R1}}$$

Burada:

- $t_{R1}$ ve $t_{R2}$, sırasıyla birinci ve ikinci bileşiğin alıkonma zamanlarıdır.

Seçicilik, iki farklı bileşiğin kolonda ne kadar ayrıldığını gösterir. Büyük α değerleri, iki bileşiğin iyi ayrıldığını ve ayrıca ölçülen alıkonma sürelerinde belirgin bir fark olduğunu gösterir. Daha küçük α değerleri, ayrışmanın daha az etkili olduğunu ve bileşiklerin daha yakın alıkonma sürelerine sahip olduğunu gösterir.

Ayırma faktörü (R), iki bileşiğin ayrılma derecesini ifade eder ve şu şekilde hesaplanır:

$$\mathrm{R} = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{\frac{t_{R1} - t_{R2}}{2}}$$

Ayırma faktörü, iki bileşiğin ayrılma derecesini, yani birbirlerinden ne kadar etkili bir şekilde ayrıldığını ölçer. R değeri 1'e yakınsa, iki bileşik birbirinden iyi ayrılmış demektir. R değeri ne kadar büyük olursa, iki bileşik o kadar etkili bir şekilde ayrılır.

Seçicilik ve ayırma faktörü, HPLC koşullarının optimize edilmesinde ve analitik ayrışmanın kalitesinin değerlendirilmesinde önemlidir. Bu kavramlar, analitik kimyacıların hangi koşullarda en iyi ayrışmayı elde edebileceklerini belirlemelerine yardımcı olur (Rodrıguez-Cuesta ve ark., 2003).

### 2.8.4. Kolon Etkinliği

HPLC kolon etkinliği, bir kromatografik kolonun ayrışma kapasitesi ve performansıyla ilgilidir. Bu, bir kolonun ayrışma gücünü ve analitik ayrışmanın ne kadar iyi olduğunu belirler. Kolon etkinliği, genellikle plak sayısı (N) veya plak teorik sayısı (N) olarak ifade edilir. Plak teorik sayısı, bir kolon boyunca sabit bir zamanda ne kadar çok teorik plak olduğunu ifade eder. Bu, kromatografik ayrışmanın ne kadar iyi olduğunu gösterir.

Kolon etkinliği, aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$N=16(\frac{\mathrm{tR}}{W1/2})^2$$

Burada:

- $t_R$, analitik bileşiğin alıkonma zamanıdır.
- $W_{1/2}$, analitik pik yarı-genişliğidir.

Kolon etkinliği, kolonunun ayrışma gücünü ve kromatografik performansını belirleyen kritik bir parametredir. Daha yüksek bir kolon etkinliği, daha iyi bir ayrışma ve daha dar piklerle sonuçlanır. Bu, analitik kimyacıların daha iyi çözünürlük elde etmesine ve daha hassas analizler yapmasına olanak tanır.

Kolon etkinliği, kolonun boyutu, şekli, sabit fazı ve mobil fazı gibi birçok faktöre bağlıdır. Daha uzun ve daha ince bir kolon, genellikle daha yüksek bir etkinliğe sahiptir. Ayrıca, sabit fazın kalitesi ve mobil fazın bileşimi de kolon etkinliğini etkiler.

HPLC kolon etkinliği, analitik kimyada kaliteli ayrışma ve doğru sonuçlar elde etmek için kritik bir faktördür. Optimize edilmiş koşullar altında yüksek bir kolon etkinliği,

analitik ayrışmanın güvenilirliğini ve hassasiyetini artırır. Bu da analitik kimyacıların daha iyi sonuçlar elde etmelerine yardımcı olur (Young ve ark., 2002).

### 2.8.5. Kolonun Ayırma Gücü

HPLC'de kolonun ayırma gücü, bir analitik yöntemin en önemli özelliklerinden biridir. Bu, kolonun ayrışma kabiliyetini ve analitik ayrışmanın ne kadar etkili olduğunu belirtir. Kolonun ayırma gücü, genellikle çözünürlük (R) olarak ifade edilir. Çözünürlük, iki yakın bileşiğin kolon üzerinde ne kadar iyi ayrıldığını ölçer.

Çözünürlük, aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$R = \frac{2(tR2 - tR1)}{WR1 + WR2}$$

Burada:

- $t_{R1}$ ve $t_{R2}$, sırasıyla ilk ve ikinci bileşiğin alıkonma zamanlarıdır.
- $W_{R1}$ ve $W_{R2}$, sırasıyla ilk ve ikinci bileşiğin pik genişlikleridir.

Daha yüksek bir çözünürlük, iki bileşiğin daha iyi ayrıldığını ve piklerin daha dar olduğunu gösterir. Kolonun ayırma gücü, birçok faktöre bağlıdır. Kolonun boyutu ve şekli, sabit fazın türü, mobil fazın bileşimi ve akış hızı gibi faktörler, ayırma gücünü etkiler. Optimize edilmiş bir HPLC yöntemi, yüksek bir çözünürlük sağlayarak iki veya daha fazla bileşiği ayrıştırabilir. Bu, analitik kimyacıların karmaşık karışımları analiz etmesine ve bileşenleri belirlemesine olanak tanır.

Kolonun ayırma gücü, analitik kimyada kaliteli ayrışma ve doğru sonuçlar elde etmek için kritik bir faktördür. Analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve optimize edilmesi sürecinde, bu parametreye özel dikkat gösterilir (Kalili ve ark., 2011).

### 2.8.6. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırıma Etkisi

HPLC'de, hareketli faz bileşiminin ayırma üzerinde büyük bir etkisi vardır. Hareketli faz, analitik bileşiklerin sabit fazdan (kolon iç yüzeyi) geçmesini sağlayan çözücü veya çözücü karışımlarıdır. Bu nedenle, hareketli fazın bileşimi, analitik ayrışma

üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Hareketli fazın bileşiminin değiştirilmesi, aşağıdaki yollarla ayırma üzerinde etkili olabilir:

Polarite: Hareketli fazın polaritesi, analitik bileşiklerin sabit faz ile etkileşimini belirler. Polar hareketli fazlar, polar bileşiklerin ayrılmasını artırırken, apolar hareketli fazlar apolar bileşiklerin ayrılmasını artırır. Böylece, bileşiklerin seçiciliği ve ayrılma derecesi, hareketli fazın polaritesine bağlıdır.

Çözücü Gücü: Hareketli fazın çözücü gücü, analitik bileşiklerin sabit faz ile etkileşim derecesini belirler. Çözücü gücü, genellikle hareketli fazın konsantrasyonu veya polaritesiyle ilişkilidir. Daha güçlü bir çözücü, daha fazla ayrışma sağlar, ancak piklerin daralması ve analiz süresinin uzamasına neden olabilir.

PH: Bazı analitik uygulamalarda, hareketli fazın pH değeri önemlidir. Örneğin, asit veya baz içeren bileşiklerin analizi sırasında, pH değeri bileşiklerin iyonlaşmasını ve dolayısıyla ayrılmasını etkiler.

Tamponlar ve Katkı Maddeleri: Bazı durumlarda, hareketli fazın tamponlar veya katkı maddeler içermesi gerekebilir. Bu, analitik bileşiklerin istenmeyen reaksiyonları veya ayrışmalarını önler ve analizin daha hassas olmasını sağlar.

Hareketli faz bileşiminin ayırma üzerindeki etkisi, analitik kimyada yöntem optimizasyonu sürecinde önemlidir. Doğru bir hareketli faz bileşimi seçilerek, istenilen bileşiklerin belirlenmesi, ayrılması ve ölçülmesi mümkün olur. Bu nedenle, HPLC analizinde hareketli faz bileşiminin dikkatlice ayarlanması, başarılı analitik sonuçlar elde etmek için kritik öneme sahiptir (Issaq ve ark., 2003).

### 2.8.7. Teorik Plaka Sayısı (N)

Kolonun etkinliğini ortaya koyan, katı ve sıvı faz arasında tam bir denge sağlayabildiği yeterli düzey alanlara sahip olan ve birbiri ile bitişik çok sayıda plakadan oluştuğundan dolayı kuramsal bir kavram olduğu bilinir. Kolon etkinliğini ve

performansını ortaya koyan teorik plaka sayısı 2000'den büyük olursa iyi bir kromatografik sistem oluşturmuş olur (Gritti, 2018; Ito ve ark., 2018).

$$\mathbf{N= 16\ (tr/w)^2}$$

### 2.8.8. Kuyruklanma ve Pik Simetri Faktörleri

Pikin simetrik olması için pik kuyruklanma faktörü 1 olması gerekir. Pik simetri faktörü **0.5≤ T ≤1,5** aralıkta ve kuyruklanma faktörü ise **0.5≤ T ≤2** aralığında olması gerekir (Ito ve ark., 2018).

## 2.9. Yöntem Geliştirme ve Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)

Analitik kimyada, zamanında ve güvenilir veri temin etmek kritik önem taşır. Analitik verinin kalitesi, metodoloji geliştirme ve doğrulama testlerinin sağlamasına bağlı olarak proses kalitesini etkiler. Yöntem geliştirme ve doğrulama testlerinin başlangıcı, kabul edilebilir minimum standartları belirlemektir (Miloğlu ve Miroğlu, 2013).

### 2.9.1. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme süreci aşağıdaki adımları içermektedir:

1. Yöntemin hedefi, kapsamı ve uygulanabilirliği belirlenmelidir.
2. Yöntemin performans ölçütleri ve kabul edilebilir kriterleri tanımlanmalıdır.
3. Cihazın performans özellikleri belirlenmelidir.
4. İncelenen materyallerin nitelikleri belirlenmelidir.

Son olarak, yöntem geliştirilmeli ve belgelendirilmelidir (Miroğlu, 2013).

### 2.9.2. Analitik Yöntem Validasyonu (Yöntem Geçerlilik Testleri)

Analitik yöntem validasyonu, bir analitik yöntemin belirlenmiş gereksinimleri karşılayıp karşılamadığını değerlendirmek için yapılan işlem sürecidir. Bu süreç, bir analitik yöntemin doğruluk, hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve belirlilik gibi performans

özelliklerini değerlendirerek yöntemin güvenilirliğini sağlar. Validasyon süreci genellikle uluslararası standartlara ve düzenlemelere uygun olarak gerçekleştirilir ve analitik yöntemin kullanılacağı özel uygulamaya göre belirlenmiş gereksinimleri karşılayıp karşılamadığını belirlemek için kapsamlı testler içerir. Bu süreç, analitik yöntemin kalitesini ve güvenilirliğini sağlamak için önemlidir ve analitik çalışmaların sonuçlarının güvenilirliğini sağlamaya yardımcı olur.

Yöntem problemleri, geçerlilik testlerinin kapsamlı bir şekilde uygulanmasıyla en aza indirgenebilir. Analitik çalışmalarda, çeşitli amaçlar doğrultusunda belirlenen kurallar dünya genelinde farklı bölgeler ve amaçlar için değişiklik gösterebilir. Yöntem geçerlilik testlerine ilişkin kuralları belirleyen kuruluşlar arasında ICH (International Conference on Harmonization), GLP (Good Laboratory Practies), GMP (Good Manufactoring Practies), FDA (Food and Drug Administration) ve USP (US Pharmacopeia) gibi kuruluşlar bulunmaktadır (Güngör ve ark., 2020; Harmancık, 2017; Miloğlu ve Miroğlu, 2013).

Çalışmamızda kullanılan analitik yöntemler ICH Q2 (R1) (ICH 2005) kılavuzuna uygun olarak doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, analitik geri kazanım, gözlenebilme sınırı (LOD), miktar tayin sınırı (LOQ) gibi parametreleri çalışılarak valide edildi.

Validayon Parametreleri:

**1**. Doğruluk (Accuracy)

**2.** Kesinlik (Precision)

a. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

b. Arakesinlilik (Intermediate precision)

c. Yenilenebilirlik (Intermediate precision)

**3.** Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)

**4.** Belirleyicilik/Seçicilik (Specificity/Selectivity)

**5.** Duyarlılık

a. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

b. Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

**6.** Geri Kazanma (Recovery)

**7.** Stabilitesi (Stability)

**8.** Sağlamlık/dayanıklılık (Robustness/Rugggedness)

#### 2.9.2.1. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, bir analitik yöntem ölçümlerinin gerçek değere (doğru değere) ne kadar yakın olduğunu gösterir. Bu, analitik yöntemin verimliliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek için önemli bir kriterdir. Doğruluk, analiz sonuçlarının istenilen seviyede güvenilir olup olmadığını belirlemek için dikkate alınır. Doğruluk, ölçülen değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu belirlemek için karşılaştırma yaparak değerlendirilir (İpek, 2012; Miloğlu ve Miroğlu, 2013).

Doğruluk, bağıl hata (BH), mutlak hata (MH) ve yüzde geri kazanım değerleri ile verilir. Yöntemin doğruluğu üç farklı şekilde gösterilebilir:

1. Bilinen konsantrasyonlara sahip bir seri örneğin analiz sonucunun gerçek değerle karşılaştırılmasıyla.
2. Sonuçların daha önceden belirlenmiş doğru bir yöntemle alınmış sonuçlarla kıyaslanmasıyla.

Analitik işlemin doğruluğu, en az üç farklı konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numunelerde belirlenen konsantrasyonlardaki geri kazanım değerlerinin ortalaması, bu değerlerin standart sapması ve % bağıl standart sapması hesaplanarak belirlenir (Güngör ve ark., 2020; Raposo ve ark., 2020).

#### 2.9.2.2. Kesinlik (Precision)

Analitik kimyada "kesinlik", aynı numunenin veya örneğin birden fazla kez analiz edilmesi durumunda, sonuçların birbirine ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür. Daha yüksek bir kesinlik derecesi, tekrarlanabilir sonuçların daha yakın olması anlamına gelir, bu da analitik yöntemin güvenilirliğini arttırır. Kesinlik genellikle standart sapma, bağıl standart sapma, varyans veya varyans katsayısı gibi istatistiksel parametrelerle değerlendirilir. Kesinlik genellikle üç farklı şekilde değerlendirilir (İpek, 2012; Miroğlu ve Miloğlu, 2013). Kesinlik, belirlenen işlem koşullarında yöntemin tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olmak üzere üç farklı seviyede incelenir (Güngör ve ark., 2020; Raposo ve ark., 2020).

Gün içi tekrarlanabilirlik, (Repeatability) aynı gün içinde, aynı analizci ve aynı cihaz altında gerçekleştirilen işlemlerde elde edilen sonuçların kesinliğini ifade eder. Tekrarlanabilirliğin sağlanabilmesi için, analitik prosedürde belirlenen konsantrasyon aralığında en az 3 farklı konsantrasyonda 3 enjeksiyon tekrarı ile elde edilen 9 veri noktasına veya %100'lük test konsantrasyonundan elde edilen 6 enjeksiyon verisine ihtiyaç duyulur (Miloğlu ve Miroğlu, 2013). Arakesinlilik (Intermediate Precision), aynı yöntemin farklı laboratuvarlarda uygulanmasıdır. Çevresel koşullardaki değişikliklerin analitik prosedürü nasıl etkilediğini belirler. Tüm bu değişiklikler ayrı ayrı değil, aynı zamanda yapılarak değişiklikler tespit edilir. Laboratuvarlar arasındaki farkların (gün değişikliği, analizci değişikliği, cihaz değişikliği vb.) kesinlik değerlerini gösteren bir ölçüdür. Günlerarası kesinlik, en az üç gün boyunca (n=6'dan az olmamak üzere) aynı çalışma koşullarında tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine olan yakınlığını ölçmek için gün değişkenliği kullanılarak gerçekleştirilen bir ara kesinlik çalışmasıdır (Miroğlu ve Miloğlu, 2013). Yenilenebilirlik (Reproducibility), çalışmalar arasındaki kesinliği

belirlemek için gerçekleştirilir. Aynı anda yapılan işlemleri standartlaştırmak için başvurulan bir yöntemdir (Miloğlu ve Miroğlu, 2013; Sakarya, 2005).

#### 2.9.2.3. Kararlılık (Stability)

Analitik kimyada, "kararlılık" bir analitik yöntemin, belirli koşullar altında ne kadar tutarlı ve güvenilir sonuçlar üretebildiğini ifade eder. Yani, bir analitik yöntemin, zaman içinde veya değişen çevresel koşullar altında aynı sonuçları tekrar tekrar üretebilme yeteneğidir. Kararlılık, analiz sonuçlarının değişkenlik göstermemesi ve analitik sürecin güvenilirliğini koruması açısından önemlidir. Bu kavram, yöntemin belirlenmiş şartlarda ne kadar güvenilir olduğunu ve sonuçların ne kadar uzun süre aynı kalacağını değerlendirmek için kullanılır.

Yöntem geliştirirken, örneklerin saklanması sırasında analitin stabil kalması için stabilite testlerinin yapılması gereklidir. Saf analit veya analit çözeltisinin stabilitesi, nem, sıcaklık, ışık ve hava gibi faktörler altında laboratuvar testleri ve yayınlanmış literatürlerle değerlendirilmelidir. Stabilite deneylerinde kullanılan koşullar, numunelendirme ve analiz sürecindeki tüm faktörleri içermelidir. Bu faktörler, çalışma sırasında ortaya çıkabilecek değişimleri dikkate alarak belirlenmelidir (Miroğlu ve Miloğlu, 2013).

#### 2.9.2.4. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)

Analitik kimyada, doğrusallık bir analitik yöntemin belirli bir konsantrasyon aralığındaki yanıtının, analitin konsantrasyonuyla doğrusal bir ilişki göstermesidir. Yani, analitin konsantrasyonu arttıkça ölçüm sonucunun da doğrusal olarak artması beklenir. Bu, analitik yöntemin doğru ve güvenilir sonuçlar üretebilmesi için önemli bir özelliktir. Doğrusallık, genellikle bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirilir ve analitin belirlenmiş bir konsantrasyon aralığındaki yanıtının bu eğri üzerinde lineer bir şekilde dağılması beklenir.

Yöntemin doğrusallığı, en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona kadar bir seri çözelti hazırlanarak belirlenir. Bu aralık tespit edildikten sonra, çözeltinin konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen yanıtların grafiksel olarak temsil edilmesiyle kalibrasyon eğrisi çizilir. Kalibrasyon eğrisinin istatiksel analiz sonucunda doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı belirlenir. Korelasyon katsayısı değerinin 0.900'dan fazla olması yöntemin doğrusallığının yüksek olduğunu gösterir. Doğrusallık gösterdiği aralıkta çalışma aralığı olarak tanımlanır (İpek, 2012; Miroğlu ve Miloğlu, 2013; Harmancık, 2017; Güngör ve ark., 2020). Bir yöntemin doğrusallığı, konsantrasyona bağlı olarak yanıtın ne kadar düzgün bir şekilde arttığının bir gösterir, bu da kalibrasyon grafiğinin düz bir çizgiye ne kadar yaklaştığını belirler. Doğrusallık, çeşitli analitlerde farklı konsantrasyonlarda yapılan tekil ölçümlerle değerlendirilebilir. Bu veriler daha sonra doğrusal en küçük kareler regresyonu kullanılarak işlenir (Ravisankar ve ark., 2015).

Analitik kimyada çalışma aralığı, analitik bir yöntemin ilgilenilen analiti güvenilir ve doğru bir şekilde ölçebildiği konsantrasyon aralığını ifade eder. Yöntemin kabul edilebilir kesinlik, doğruluk, doğrusallık ve duyarlılık sergilediği konsantrasyon aralığını kapsar.

#### 2.9.2.5. Belirleyicilik/Seçicilik (Specificity/Selectivity)

Analitik kimyada seçicilik, analitik bir yöntemin, numune matrisindeki diğer girişim yapan maddelerin veya analitlerin varlığında ilgilenilen hedef analitleri doğru bir şekilde ayırt etme ve ölçme yeteneğini ifade eder. Seçici bir yöntem, diğer bileşenlerden kaynaklanan etkileşimi en aza indirirken ilgilenilen analite spesifik olarak yanıt verir, böylece ölçülen sonucun yalnızca hedef analitin konsantrasyonunu yansıtmasını sağlar. Analitik kimyada seçicilik çok önemlidir çünkü birçok numune, potansiyel olarak analize müdahale edebilecek çeşitli bileşikler içeren karmaşık

matrisler içerir. Seçici bir yöntem, bu müdahalelerin analitik sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini etkilememesini sağlar, böylece hedef analitin doğru şekilde ölçülmesine ve tanımlanmasına olanak tanır (İpek, 2012; Miroğlu ve Miloğlu, 2013; Raposo ve ark., 2020).

#### 2.9.2.6. Duyarlılık Limiti (Sensitivity)

Analitik kimyada duyarlılık, analitik bir yöntemin analit konsantrasyonundaki küçük değişiklikleri tespit etme ve bunlara yanıt verme yeteneğini ifade eder. Yöntemin farklı düzeylerde analit konsantrasyonu arasında ne kadar etkili bir şekilde ayrım yapabildiğini ölçer. Hassas bir yöntem, düşük konsantrasyondaki analitleri yüksek hassasiyet ve doğrulukla tespit etme kapasitesine sahiptir. Hassasiyet genellikle gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) parametreleri ile verilir (İpek, 2012; Miroğlu ve Miloğlu, 2013; Raposo ve ark., 2020).

**Gözlenebilme Sınırı (LOD):** Miktar tayini yapılan analitin analitik yöntemle güvenilir bir şekilde tespit edilebilen ancak mutlak olarak ölçülemeyen bir analitin en düşük konsantrasyonudur. LOD değerinin belirlenmesi yöntemden yönteme değişiklik gösterir. Kromatografik yöntemlerde sinyal/gürültü oranın 3 olduğu değerdir. Spektroskopik yöntemlerde 3.3 σ/S formülüyle (σ kalibrasyon eğrisinin kaymasının standart sapması, S kalibrasyon eğrisinin eğimi) belirlenir (İpek, 2012; Miloğlu ve Miroğlu, 2013; Raposo ve ark., 2020; Sakarya, 2005).

**Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ):** Analitik bir yöntemle analiz edilen analitin kabul edilebilir bir hassasiyet ve doğrulukla güvenilir bir şekilde ölçülebilen en düşük konsantrasyonudur. LOQ değerinin belirlenmesi yöntemden yönteme değişiklik gösterir. Kromatografik yöntemlerde sinyal/gürültü oranın 10 olduğu değerdir. Spektroskopik yöntemlerde 10 σ/S formülüyle (σ kalibrasyon eğrisinin kaymasının

standart sapması, S kalibrasyon eğrisinin eğimi) belirlenir (İpek, 2012; Miloğlu ve Miroğlu, 2013; Raposo ve ark., 2020; Sakarya, 2005).

#### 2.9.2.7. Geri Kazanım (Recovery)

Analitik kimyada geri kazanım, bir numuneden başarıyla ekstrakte edilen veya ölçülen bir analitin, numunedeki o analitin bilinen veya beklenen miktarına kıyasla yüzdesini ifade eder. Bir numune matrisindeki hedef analitin miktarının belirlenmesinde analitik bir yöntemin doğruluğunun ve verimliliğinin ölçüsüdür. Geri kazanım genellikle ilgili analitin bilinen bir miktarının bilinen bir konsantrasyonda bir numune matrisine eklenmesi ve ardından eklenen numunenin analitik yöntem kullanılarak analiz edilmesiyle belirlenir. Eklenen numunedeki analitin ölçülen konsantrasyonu beklenen konsantrasyonla karşılaştırılır. %100'e yakın bir geri kazanım değeri, analitik yöntemin numune matrisindeki ilgilenilen analiti doğru bir şekilde ölçtüğünü gösterirken, daha düşük bir geri kazanım, eksik geri kazanım veya matris bileşenlerinden kaynaklanan girişim gibi ekstraksiyon veya ölçüm prosesinde sorunlar olabileceğini gösterir.

Genellikle %100'e yakın bir geri kazanım faktörü arzu edilse de belirlenmiş bir minimum değer bulunmamaktadır. Bu nedenle, yöntemin duyarlılığı yeterliyse, düşük geri kazanımı olan bir analitik yöntem belirli bir analit için uygun olabilir (İpek, 2012; Miloğlu ve Miroğlu, 2013; Raposo ve ark., 2020; Sakarya, 2005).

#### 2.9.2.8. Çözelti Stabilitesi (Solution Stability)

Analitik kimyada çözelti stabilitesi, hazırlanan bir çözeltinin belirli depolama koşulları altında kimyasal bileşimini ve konsantrasyonunu zaman içinde koruyabilme yeteneğini ifade eder. Çözeltinin bileşimindeki veya konsantrasyonundaki değişiklikler analitik sonuçların doğruluğunu ve kesinliğini etkileyebileceğinden, bu stabilite doğru ve güvenilir analitik ölçümler için çok önemlidir. Çözelti stabilitesi, hazırlanan

standartların veya kalibrasyon çözeltilerinin kullanıldığı yöntemlerde özellikle önemlidir; çünkü bu çözeltilerdeki herhangi bir bozulma veya değişiklik, analitlerin hatalı miktarının belirlenmesine yol açabilir. Çözelti stabilitesini etkileyebilecek faktörler arasında ışığa maruz kalma, sıcaklık dalgalanmaları, kap malzemeleriyle etkileşim ve çözeltinin içindeki kimyasal reaksiyonlar yer alır. Analitik kimyacılar, hazırlanan çözeltilerin uygun saklama koşullarını ve raf ömrünü belirlemek için sıklıkla stabilite çalışmaları yaparlar. Bu, bileşimindeki veya konsantrasyonundaki değişiklikleri değerlendirmek için çözeltinin zaman içinde izlenmesini içerir. Analizciler, çözelti kararlılığını anlayarak ve optimize ederek analitik ölçümlerinin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini sağlayabilirler (İpek, 2012; Miloğlu ve Miroğlu, 2013; Raposo ve ark., 2020; Sakarya, 2005).

#### 2.9.2.9. Sağlamlık/Dayanıklılık (Robustness/Rugggedness)

Analitik kimyada sağlamlık, analitik bir yöntemin sıcaklık, pH veya reaktif konsantrasyonundaki hafif değişiklikler gibi deneysel koşullardaki küçük değişikliklerden etkilenmeden kalma yeteneğini ifade eder. Sağlam bir yöntem, ideal deney koşullarından küçük sapmalar olsa bile tutarlı bir şekilde doğru ve kesin sonuçlar sağlayan yöntemdir. Sağlamlık, analitik yöntemlerde önemli bir kalitedir çünkü sonuçların farklı laboratuvarlarda, deney düzeneklerinde güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini sağlar. Sağlam bir yöntem, küçük değişikliklere karşı daha az duyarlıdır, bu da hata olasılığını azaltır ve elde edilen analitik verilere olan güveni artırır. Ayrıca yöntemin daha kolay uygulanmasına ve önemli ayarlamalar yapılmadan farklı ayarlara aktarılabilmesine olanak tanır.

Bir yöntemin tutarlılığı ise, farklı deney koşullarında, farklı ekipmanlar, farklı operatörler, farklı laboratuvarlar, farklı kimyasallar, değişen deney sıcaklıkları ve farklı

zamanlarda yapılan deneylerin sonuçlarının ne kadar tutarlı olduğunu gösterir (İpek, 2012; Miloğlu ve Miroğlu, 2013; Raposo ve ark., 2020; Sakarya, 2005).

### 2.10. Vorikonazol ile Yapılan Çalışmaların Literatür Özetleri

Bir antifungal ilaç olan vorikonazolün miktar tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi yaygın bir şekilde kullanılan yöntemlerden birisidir. Vorikonazolün farmasötik preparatlarda, biyolojik sıvılarda ve diğer numunelerde miktarının belirlenmesinde yüksek hassasiyeti, seçiciliği ve doğruluğu nedeniyle HPLC yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntem, ilgilenilen spesifik bileşiği tanımlamak ve ölçmek için bir karışımın bileşenlerinin ayrılmasını içerir. İlk olarak, vorikonazol içeren numune, HPLC sistemine verilebilmesi için genellikle seyreltme veya ekstraksiyon gibi yöntemlerle hazırlanan numune, enjekte edilmeye hazır hale getirilir. Numune matrisine bağlı olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu veya katı faz ekstraksiyonu gibi çeşitli ekstraksiyon teknikleri kullanılabilir. Daha sonra hazırlanan numune, tipik olarak otomatik bir numune alıcı aracılığıyla HPLC sistemi içine enjekte edilir. Numune, sabit bir fazla doldurulmuş bir kolon boyunca taşınırken, bileşenler arasındaki ayrım gerçekleşir. Vorikonazolün ayrılmasında genellikle su, asetonitril veya metanol gibi organik çözücülerin bir karışımından oluşan bir hareketli faz kullanılır. Bu hareketli faz, numunenin sabit fazla olan ilgisiyle birlikte çalışarak ayrışmayı sağlar. Vorikonazolün spesifik alıkonma süreleri ve absorbans özellikleri, HPLC'de yaygın olarak kullanılan UV esaslı dedektörler ile belirlenir. Dedektör, elüsyon yapan bileşiklerin absorbansını kaydederek numunedeki farklı bileşenlerin pik alanları belirlenir. Bilinen standartlarla karşılaştırılarak, vorikonazol konsantrasyonu doğru bir şekilde belirlenebilir. Yöntem doğrulama süreci, HPLC yönteminin vorikonazol analizi için güvenilir, doğru ve kesin olmasını sağlar. Doğrusallık, kesinlik, doğruluk, gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) gibi parametreler, yöntemin

amaçlanan amaca uygunluğunu değerlendirir. HPLC, farmasötik formülasyonlarda, biyolojik numunelerde ve diğer matrislerde vorikonazolün miktarının belirlenmesi için geneklikle kullanılan güçlü bir analitik araçtır. Bu yöntem, önemli bir antifungal ilaç olan vorikonazol ile ilgili farmasötik kalite kontrolüne, farmakokinetik çalışmalara ve klinik araştırmalara önemli katkılarda bulunur.

Bu çalışmada farmasötik preparatlarda vorikonazolün miktar tayini için HPLC yöntemini geliştirip valide etmişlerdir. Çlışmada, asetonitril ve ultra saf su karışımından (50:50, h/h) oluşan hareketli faz, C18 kolon, 256 nm dalga boyu ve 1.0 ml/dk akış hızı kullanılmıştır. Yöntem doğrusallık, LOD, LOQ, kesinlik, doğruluk, özgüllük, seçicilik ve kararlılık parametreleri yönünden valide edilmiştir. Yöntemin 1.0-30 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu, LOD ve LOQ değerlerinin ise sırasıyla 0.022 µg/ml ve 0.065 µg/ml olduğu tespit edilmiştir (Okur ve ark., 2016).

Bir çalışmada, Vfend adlı farmasötik bir preparttaki vorikonazol miktar tayini için UV dedektörlü RP-HPLC yöntemi geliştirilip valide edilmiştir. Çlaışmada, 260 nm dalga boyu, asetonitril ve su karışımından (50:50, h/v) oluşan hareketli faz ve 1.0 mL/dk akış hızı parametreleri kullanılmıştır. Kantitasyon, dahili standart yöntemiyle yapılmıştır. Yöntem, doğrusallık (korelasyon katsayısı = 0,9999), doğruluk, sağlamlık ve orta hassasiyet açısından doğrulanmıştır. Sağlamlık ve ara kesinlik için deneysel tasarım kullanılmıştır. Sağlamlık testi üç faktör göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Hareketli fazdaki asetonitril yüzdesinde, akış hızında ve pH daki artışlar ilaçda bulunan vorikonazol etken maddesinin miktarının belirlenmesinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Yöntemin BSS değeri %0.45 (n=24) olarak belirlenmiştir (Srinubabu ve ark., 2007).

Deneyde plazmada vorikonazol miktar tayini için HPLC yöntemini uygulamışlardır. Çalışmada, 1.0 mL/dk akış hızı, 255 nm dalga boyu, asetonitril ve

sudan (7:3) oluşan hareketli faz parametrelerini kullanmışlardır. Perklorik asitle plazma proteinleri çöktürüldükten sonra filtrelenen süpernat C18 kolonundan (250 x 4.6 mm, 5 µm) geçirilerek vorikonazol saflaştırılmıştır. Vorikonazol miktarının belirlenmesi sınırının 0.2 mg/L, yöntemin 0.2-15 mg/L aralığında doğrusallık gösterdiği tespit edilmiştir. Rutin kalite kontrol numuneleri için analizler arası hassasiyet %15'in altında olduğu tespit edilmiştir. İnvaziv mantar enfeksiyonlarının ampirik tedavisi için 26 hastaya vücut ağırlığına göre vorikonazol verilmiş hastaların plazmalarında geliştirilen yöntemle analizleri gerçekleştirilmiştir. Vorikonazol tedavisi, başlangıç ilaç seviyelerinden yönetilmiş ve takip analizi klinik etkililikte başarıyı yansıtmıştır (Chawla ve ark., 2016).

Vorikonazol, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı tarafından belirlenen farklı stres şartlarında stabilitesi incelenmiştir. Bu stres şartlarında oluşturulan numunelerde vorikonazol miktar tayini HPLC yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, bir Hypersil C18 (250x4.6 mm) kolonu, 1 mL/h akış hızı, asetonitril: sudan oluşan (40:60, h/h) hareketli faz ve fotodiyot dedektör kullanılmıştır. Yöntemin 5-25 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal bir yanıt (r>0,99) verdiği, geri kazanım değeri ortalama %100.06, gün içi ve günlerarası için BSS değerini ≤ %1.5 olarak belirlemişlerdir (Khetre ve ark., 2009).

Bir başka çalışmada vorikonazol kan düzeylerini belirlemek amacıyla DAD dedektörlü HPLC yöntemi geliştirilip valide edilmiştir. Çalışmada internal standart olarak posakonazol kullanılmıştır. Optimum kromatografik koşullar, 25°C kolon sıcaklığı, vorikonazol için 256 nm ve posakonazol için 261 nm dalga boyu, 50 µL enjeksiyon hacmi, 0.8 mL/dk akış hızı ve hareketli faz olarak asetonitril:su (60:40) dur. Yöntem, 0.125 µg/mL ile 16 µg/mL aralığında doğrusal bir yanıt (r>0.99) göstermiştir.

Geri kazanım değeri ortalama %100.06, gün içi ve günlerarası bağıl standart sapmanın %1.5'den küçük olduğu tespit edilmiştir (Zapata ve ark., 2024).

Bu araştırmada invazif aspergilloz nedeniyle oral veya intravenöz vorikonazol ile tedavi edilen hastalarda inceleme yapmışlardır. Demografik özellikler, klinik veriler, sonuçlar ve olumsuz etkiler incelenmiştir. Her hasta için plazma numunesi kararlı durum koşulları altında toplanmış HPLC yöntemi ile analizleri yapılmıştır. Toplamda 22 ölçüm yapılmıştır. Hastaların %50'si terapötik aralığın dışında, %27.27'sinin subterapötik aralıkta (<1 μg/mL) ve %22.73'ünün ise supraterapötik aralıkta (>5,5 μg/mL) olduğu belirlenmiştir. Vorikonazol plazma konsantrasyonu ile tedavi sonuçları arasında anlamlı bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Tedavi başarısızlığı, subterapötik aralıkta olanlarda tedavi başarısından beş kat daha yüksek olduğu, supraterapötik konsantrasyonlara sahip hastalarda, supraterapötik olmayan seviyelere kıyasla yan etkilerin daha sık görüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca, tedavi başarısızlığı yaşayan hastalardaki ölüm oranı, tedavisi başarılı olanlara göre 2.17 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Yousefian ve ark., 2021).

Bu incelemede on mikrolitre plazma numunesi ekstre edildikten sonra HPLC yöntemiyle vorikonazol miktar tayini gerçekleştirlmiştir. Ketokonazol iç internal standart olarak kullanılmıştır. Yöntemin, 0.125-12.5 μg/mL plazma vorikonazol konsantrasyonları üzerinde doğrusal ve kalibrasyon eğrisi korelasyon katsayısının ise 0.9999 olduğu tespit edilmiştir. Gün içi ve günlerarası doğrulama katsayıları sırasıyla %0.9–2.2 ve %1.3–6.1 olarak, yöntem doğruluğunu ise-%4.2 ile %1.6 arasında olduğu ve geri kazanım değeride>%97.8 olarak belirlenmiştir (Yasu ve ark., 2022).

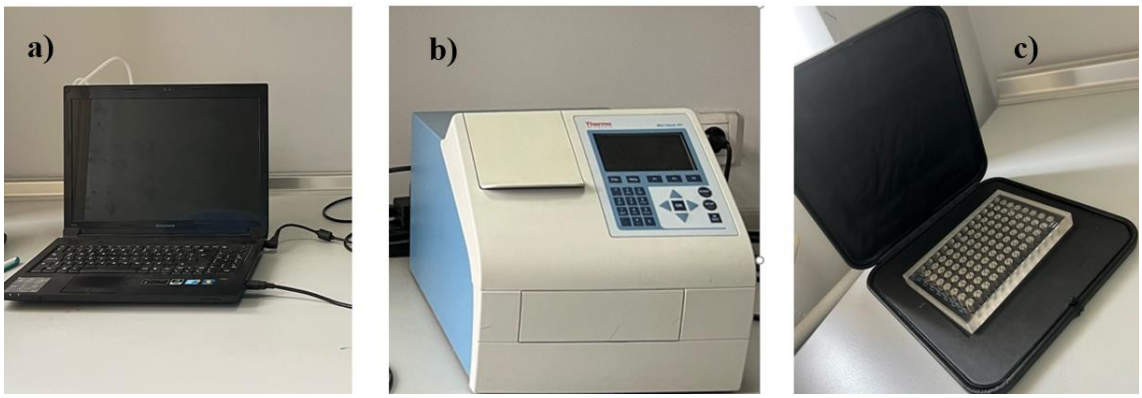
# 3. MATERYAL VE METOT

## 3.1. Yöntemlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Vorikonazol etken maddesi, Polifarma İlaç Sanayi ve Ticaret INC'den ve vorikonazol etken maddesini içeren Vorent (200 mg) tablet Erzurum Şehir Hastanesi Eczanesinden temin edildi. Çalışma sürecinde çözeltilerin hazırlanmasında ve kimyasal çözücü olarak Milli-Q saf su (ultra saf su) kullanıldı. Parasetamol, HPLC saflıkta metanol, asetonitril, formik asit ve etanol Merck firmasından temin edildi. Eppendorf Research Plus markalı otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL), oto örnekleyici vial kitleri (Agilent, 1.8 mL s.c.), santrifüj (Hettich, RPM x 100), terazi (Metler Toledo Ad 104- 5), pH metre, karıştırıcı vorteks (IKA), ultrasonik banyo (Elma LC30), Eppendorf tüpleri, mezürler, deney tüpleri ve balon jojeler Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarı'ndan sağlandı.

## 3.2. UV-Gör. Bölge Spektrofotometre Cihazı

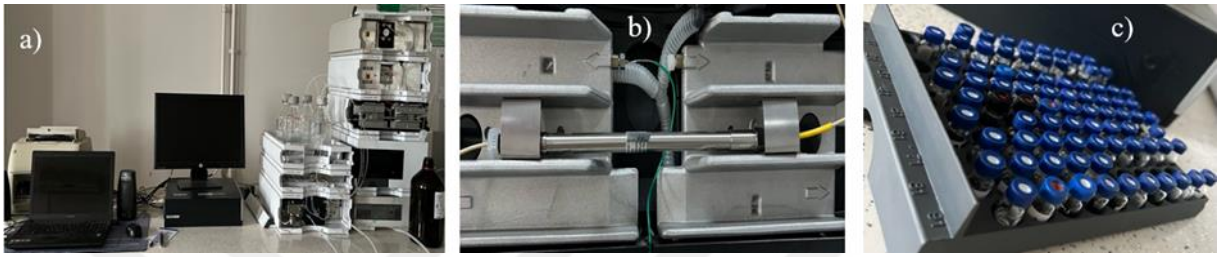
Moleküler absorpsiyon ölçümleri ve kinetik çalışmalar için Thermo Scientific'in Multiscan GO 51119300 model UV-Gör. bölge spektrofotometresi (1.0 nm band aralığı), bir Lenovo bilgisayar ve standart 96 Well UV kuvartz mikroplakaları (Hellma, 370 µL) kullanıldı (Şekil 3.1).




**Şekil 3.1.** a) Bilgisayar, b) Sepektrofotometre cihazı, c) Küvet.

### 3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Cihazı

HPLC çalışmasında Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya AD araştırma laboratuvarında bulunan, UV Dedektörü, Degazer, pompa ve oto örnekleyici sitemlerine sahip Agilent 1001 markalı HPLC Sistemi kullanıldı (Şekil 3.2).




**Şekil 3.2.** a) HPLC cihazı, b) Sabit faz (kolon), c) Vial

### 3.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Çalışma Şartları

Çalışmada kullanılan UV-Gör. bölge spektrofotometre yöntem çalışma parametreleri Tablo 3.1'de verildi.

**Tablo 3.1.** UV-Gör. Bölge Spektrofotometre yöntem şartları

| **Yöntem Şartları** | |
|---|---|
| Etken Madde | Vorikonazol |
| Start Lamba (nm) | 200 |
| Stop Lamba (nm) | 400 |
| Data modu | Absorbans |
| Bant Genişliği (nm) | 1.0 |
| Tarama Hızı | Hızlı |
| Mikroplaka Sıcaklığı (°C) | 32.3 |
| Absorbans gösteren dalga boyu (nm) | 255 |
| Çalışma prensibi | 200-400 nm aralığında 1 nm aralıklar ile tarama |

Çalışmada kullanılan HPLC yöntem şartları Tablo 3.2'de verildi.

**Tablo 3.2.** HPLC Yöntem Şartları

| **Yöntem Şartları** | **Vorikonazol** |
|---|---|
| Kolon | C18 (250x4.6mm,5µm) |
| Akış Hızı (mL/dk) | 1.0 |
| Kolon Sıcaklığı (ºC) | Oda sıcaklığında |
| Dalga Boyu (nm) | 255 |
| Hareketli Faz (h/h/h) | Asetonitril-Su-Metanol (50/45/5) |
| Enjeksiyon Hacmi (µL) | 10 |
| Dedektör | UV Dedektör |

### 3.5. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Erzurum Şehir Hastahanesi Eczanesin'den 200 mg' lik Vorent tablet temin edildi. Bu tablet'ten üç tane alınıp her bir tablet tek tek hassas terazide tartılıp ortalama değerleri kayd edildi (ortalama= 0.30363 g). Tabletler havanda iyice öğütülerek toz haline getirildi. Homojen olması için iyice karıştırıldı (Şekil 3.3). Daha sonra ortalama bir tablet kütlesine denk gelecek şekilde (0.30369 g) tartıldı. 100 mL' lik balon jojeye aktarılıp ve asetonitril eklenerek 15 dk iyi bir şekilde karıştırılarak tam olarak çözülmesi sağlandı. Sonra hacmi asetonitril ile 100 mL tamamlandı. Hazırlanan tablet çözeltileri whatman 42 süzgeç kağıdından süzüldü. UV-Gör. bölge spektrofotometri yöntemi ve HPLC yöntemi için sırasıyla 6 µg/mL ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda tablet çözeltileri hazırlandı ve analizleri yapıldı.




**Şekil 3.3.** Vorikonazol (VORENT 200 mg) tablet çalışması

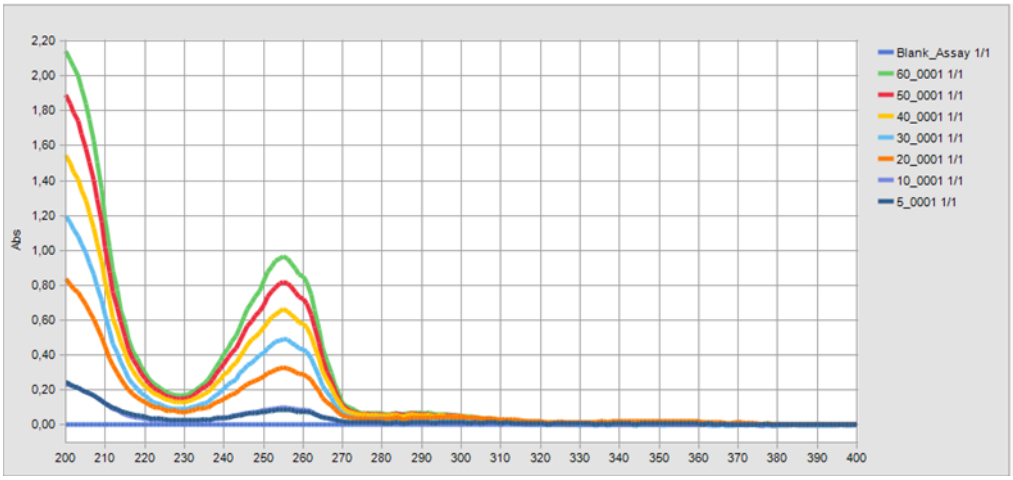
# 4. BULGULAR

## 4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

### 4.1.1. Kalite Kontrol, Stok ve Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanmaları

Vorikonazol etken maddesinin en uygun çözücüsünü belirlemek için öncelikle metanol, etanol, asetonitril, metanol-asetonitril karışımı ve asetonitril-su karışımı çözücüleri test edildi. Spektrofotometri çalışmaları sonucunda en iyi spektrumların asetonitril çözücüsünde elde edildiği belirlendi. Etken madde, hassas terazi kullanılarak 0.00054 gram (540 µg) olarak tartıldı ve 5 mL asetonitril çözücü içinde çözündürülerek stok çözelti hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltiden 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/mL konsantrasyonlarında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Ayrıca, kalibrasyon eğrisi için 10, 30 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında kalite kontrol çözeltileri oluşturuldu.

Vorikonazol çözeltisi, spektrofotometri cihazında 200-400 nm arasında tarama yapılarak analiz edildi. 255 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değerinin elde edildiği belirlendi ve çalışma bu dalga boyunda spektrumlar kaydedildi (Şekil 4.1).

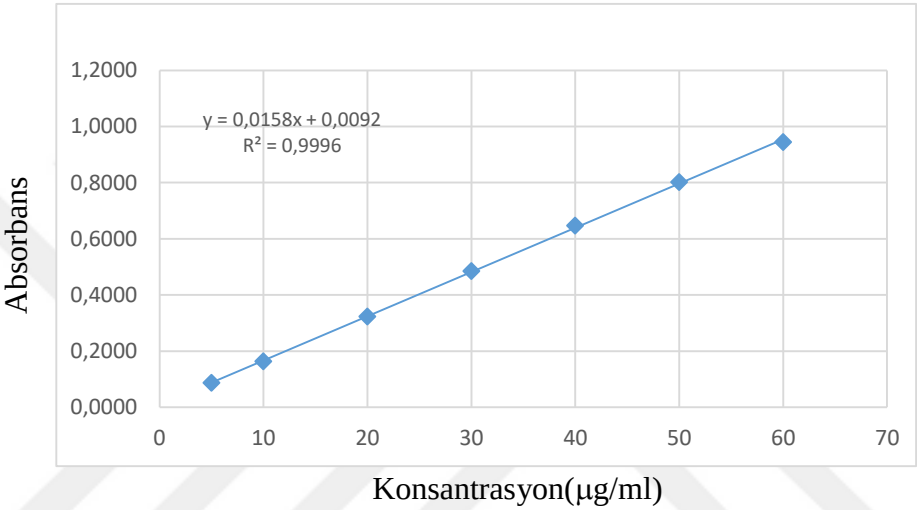



**Şekil 4.1.** 5-60 (µg/mL) konsantrasyon aralığında standart çalışma çözeltilerinin spektrumu

### 4.1.2. Spektrofotomeri Yönteminin Validasyonu (Geçerlilik Testleri)

#### 4.1.2.1. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

Hazırlanan 5-60 µg/mL konsantrasyon aralığındaki çözeltiler, 255 nm dalga boyunda standart çalışma çözeltilerinin her biri altı kez absorbansları ölçülerek spektrumları alındı. Standart çalışma çözeltilerinin konsantrasyonlarına karşılık gelen ortalama absorbans değerleri grafiğe çizilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.2).




**Şekil 4.2.** UV- Gör. bölge spektrofotometri yönteminin kalibrasyon grafiği

UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemi, 5-60 µg/mL konsantrasyonlarında doğrusal olduğu belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analizleri yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.1'de sunuldu.

**Tablo 4.1.** UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemiyle vorikonazol standart çalışma çözeltilerinden ortaya çıkan kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları

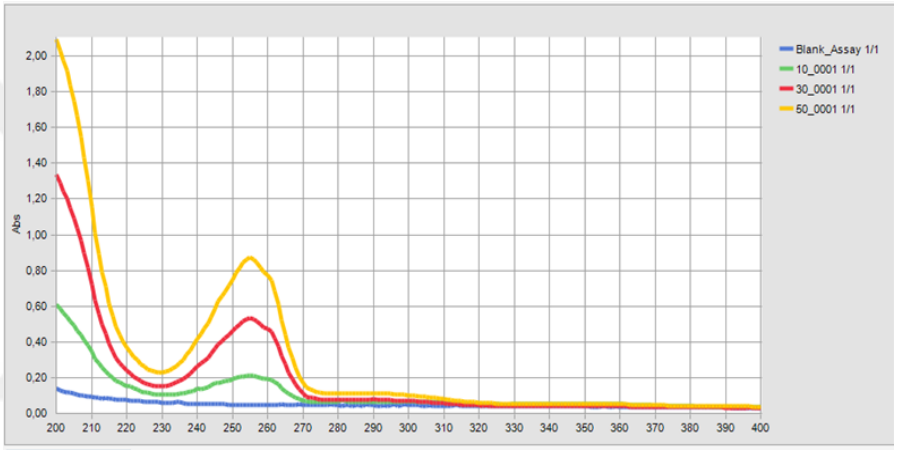
| Etken madde | Çalışma aralığı µg/mL | λ (nm) | Sa | Sb | LR | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vorikonazol | 5-60 | 255 | 0.000121 | 0.00160 | A=0.0158x+0.0092 | 0.9996 |

λ: dalga boyu, a: 6, Sa: regresyon doğrusu üzerindeki kaymanın standart sapması, Sb: Regresyon çizgisindeki eğimin standart sapması, $R^2$: regrasyon katsayı değeri, LR: lineer regresyon

#### 4.1.2.2. Doğruluk/Kesinlik

Doğruluk, ölçüm sonuçlarının gerçek değere ne kadar yakın olduğunu kesinlik ise tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine ne kadar yakın olduğunu gösterir. Bu çalışma ile yöntemimizin doğruluğunu ve kesinliğini belirlenmiş oldu.

Bu çalışma kapsamında, kalibrasyon eğrisine dahil edilen 10, 30 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarını kontrol etmek için hazırlanan kalite kontrol çözeltileri günlük ve günlerarası değişkenliklerin belirlenmesi için aynı laboratuvar koşullarında spektrofotometri yöntemiyle analiz edildi ve absorbans değerleri kaydedildi (Şekil 4.3).




**Şekil 4.3.** Vorikonazol kalite kotrol çözeltilerinin (10, 30 ve 50 µg/mL) spektrumları

Spektrofotometri yöntemiyle oluşan analiz verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hata hesaplandı. Bu hesaplamalar için aşağıdaki formüller kullanıldı.

En az üç kez analiz sonucunda elde edilen verilerin toplamı alınıp analiz sayısına bölünmesiyle ortalama değer elde edildi. Standart Sapmanın hesaplanmasında

$S = \sqrt{[(\Sigma(Xi - \bar{X})^2) / (n - 1)]}$ formülü, Bağıl Standart Sapmanın hesaplanmasında $\left(\frac{\text{standart sapma}}{\text{ölçülen değerlerin ortalaması}}\right) \times 100$ formülü ve Bağıl Hatanın hesaplanmasında ise $\left(\frac{\text{ölçülen değer} - \text{gerçek değer}}{\textit{gerçek değer}}\right) \times 100$ formülü kullanıldı.

"Standart Sapma", ölçüm değerlerinin dağılımının ölçüm değerlerinin ortalamasından ne kadar uzak olduğunu gösterir, Ölçülen Değerlerin Ortalaması" ise ölçüm değerlerinin genel ortalamasını ifade eder. Yüzde oranında standart sapma ne kadar küçük olursa, ölçüm sonuçları o kadar tutarlı ve kesin demektir. Bu değer, analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti hakkında bilgi sağlar.

Tabloda UV- Gör. bölge spektrofotometri yöntemde, doğruluk bağıl hata (%BH) ile ve kesinlilik bağıl standart sapma (%BSS) ile gösterildi (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** UV- Gör. bölge spektrofotometri yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlilik hesaplamaları

| Etkin Madde | Eklenen (µg/mL) | Güniçi | | | Günler Arası | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Ortalama ±SS (µg/mL) | Doğruluk %BH | Kesinlik %BSS | Ortalama ±SS (µg/mL) | Doğruluk %BH | Kesinlik % BSS |
| Vorikonazol | 10 | 10.18 ± 0,16 | 1.85 | 1.62 | 10.22 ± 0.12 | 2.23 | 1.22 |
| | 30 | 30.32 ± 0.20 | 0.08 | 0.66 | 30.62 ± 0.09 | 2.06 | 0.29 |
| | 50 | 50.42 ± 0.14 | 0.84 | 0.28 | 50.91 ± 0.68 | 1.81 | 1.33 |

SS: Standart Sapma, %BH: Bağıl Hata, %BSS: Bağıl Standart Sapma

#### 4.1.2.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

Spektrofotometri sisteminde Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ) belirlenmesi, analitik metodun duyarlılığını ve hassasiyetini değerlendirirken eş zamanda analiz sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak için gereklidir. Bu amaçla, vorikonazol çözeltileri UV-Görünür bölge spektrofotometri yöntemiyle düşük konsantrasyonlarda spektrumları alınarak absorbans değerleri belirlendi. LOD değeri 3.3 σ/S formülüyle, LOQ değeri ise 10 σ/S formülüyle hesaplandı, burada σ kalibrasyon eğrisinin standart sapması, S ise eğimi temsil eder. Metodun LOD sonucu1.0 µg/mL olarak belirlenirken, LOQ sonucu ise 5.0 µg/mL olarak hesaplandı.

#### 4.1.2.4. Analitik Geri Kazanım

Bölüm 3.5'te açıklandığı gibi, 6 µg/mL konsantrasyonunda tablet çözeltisi hazırlandı. Spektrofotometri yöntemiyle spektrumu alındı absorbans değeri belirlendi. 15, 30 ve 44 µg/mL konsantrasyonda vorikonazol kalite kontrol çözeltileri hazırlandı bu çözeltilerinde spekrumları alınıp absorbans değerleri belirlendi. Tablet çözeltileri üzerine hazırlanan kalite kontrol çözeltileri eklendi (15+6, 30+6 ve 44+6). Sonradan elde edilen toplam çözeltilerin spektrofotometri yöntemiyle spektrumları alındı ve absorbans değerleri elde edildi. Yöntemin Analitik Geri Kazanım (AGK) değerleri aşağıda verilen formül ile hesaplandı. Analiz sonuçları Tablo 4.3'de verildi.

$$\%\ \text{AGK} = \frac{(\text{Ölçülen örnek+standart}) - \text{Ölçülen örnek derişimi}}{\text{Örneğe eklenen standart derişim}} * 100$$

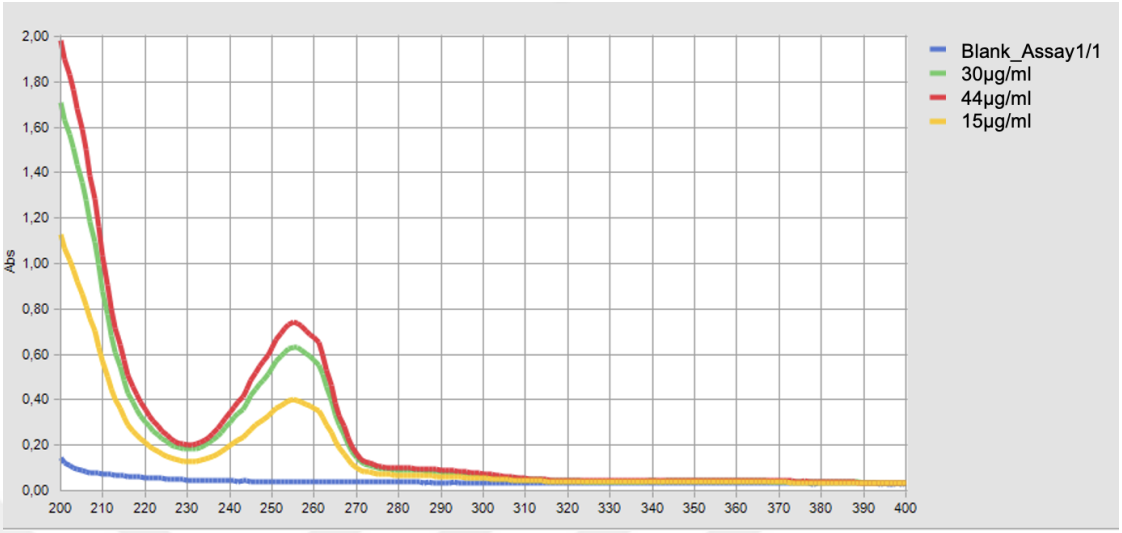
**Tablo 4.3.** Farmasötik preparatlarda vorikonazolün analitik geri kazanım hesaplamaları

| Farmasötik formülasyon | Tablet konsntrasyonu (µg/mL) | Eklenen (µg/mL) | Ortalama±SS (µg/mL) | Geri kazanım % | BSS % |
|---|---|---|---|---|---|
| Vorent | 6 | 15 | 21.25±0.30 | 101.09 | 1.39 |
| (200 mg) | | 30 | 36.83±0.26 | 101.69 | 0.71 |
| | | 44 | 50.40±0.44 | 101.66 | 0.88 |

#### 4.1.2.5. Tablet Çözeltilerinde Vorikonazol Analizi

Piyasada satılan vorikonazol etken maddesine sahip antifungal ilaç Vorent Tablet (200mg) Erzurum Şehir Hastahanesinin Eczanesinden temin edildi. Tablet çözeltisi Bölüm 3.5.'de belirtildiği şekilde 15, 30 ve 44 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı ve spektrumları alındı (Şekil 4.4). Tablet çözeltisi spektrumları incelenip standart çözelti spektrumları ile karşılaştırıldığında tablet içerisindeki diğer katkı maddelerinin herhangi bir girişim yapmadığı tespit edildi. Sonuç olarak, farmasötik

preparatlarda vorikonazol miktar tayini geliştirilip valide edilen UV- Gör. bölge spektrofotometre yöntemiyle başarıyla uygulanabileceği düşünülmektedir.



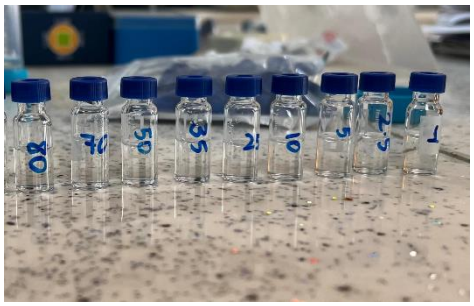

**Şekil 4.4.** Tablet çözeltilerinin spektrumları

### 4.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografis (HPLC) Yöntemi

#### 4.2.1. Kalite Kontrol, Stok, Standart Çalışma ve İnternal Standart Çözeltilerinin Hazırlanmaları

Vorikonazol etken maddesinden 0.00075 gram hassas terazide tartıldı ve 100 mL'lik balon joje aktarıldı. Asetonitril-su-metanol (hacimce 50-45-5) çözücü karışımında çözülerek 150 µg/mL konsantrasyonunda stok çözelti oluşturuldu. Hazırlanan stok çözeltiden 1, 2.5, 5, 15, 25, 35, 50, 70 ve 80 µg/mL konsantrasyonlarında standart çalışma çözeltileri ve 3, 30 ve 75 µg/mL konsantrasyonlarında kalite kontrol çözeltileri oluşturuldu (Şekil 4.5).

HPLC çalışmasında parasetamol internal standart (IS) olarak kullanıldı. İnternal standart çalışma çözeltisini hazırlamak için 0.00107 gram parasetamol hassas terazide tartırıldı 100 mL balon joje içerisine konuldu. Aynı çözücü karışımında çözülerek internal standart çalışma çözeltisi hazırlandı. Deneylerde kullanılan internal standart çalışma çözeltisinin konsantrasyonı 332 µg/mL'dir.




**Şekil 4.5.** HPLC çalışması için 1-80 µg/mL konsantrasyo aralığında hazırlanan çözeltilerin viallerdeki görünümü

### 4.2.2. HPLC Yöntem Geliştirme

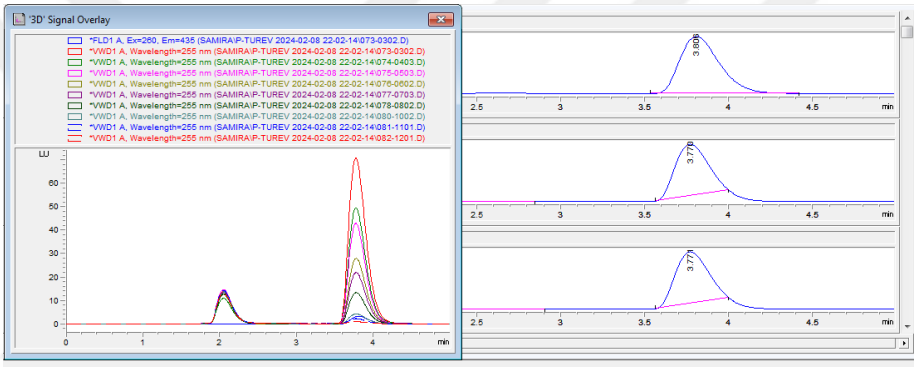
HPLC çalışmalarında yöntem geliştirme, genellikle bir dizi adımdan oluşur ve analitik kimyada oldukça önemli bir süreçtir. Yapılan bu çalışmanın amacı farmasötik preparatlarda vorikonazol etken maddesinin miktar analizi için HPLC yönteminin çalışma parametrelerini belirlemek (geliştirmek) ve validasyonlarını gerçekleştirmektir. İlk olarak en iyi ayırımı elde edeceğimiz ayırma kolonu C18 kolon olarak belirlendi. Hareketli faz olarak çözücü (metanol, asetonitril, su gibi) ve çözücü karışımları [(metanol=10, asetonitril=40, TFA'lı su=50); (asetonitril=60, su=30, metanol=10); ve (asetonitril=30, su=20, metanol=50) ve (asetonitril=50, su=45, metanol=5] denendi. En iyi ayırım asetonitril-su-metanol (50/45/5, h/h/h) çözücü karışımında elde edildi. Çalışmada bu çözücü karışımı hareketli faz olarak kullanıldı.

### 4.2.3. HPLC Yöntem Validasyonu

Bu çalışmada, HPLC yöntemi özgünlük (belirleyicilik), doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı (LOD), miktar tayin sınırı (LOQ) ve analitik geri kazanım parametreleri üzerinde çalışılarak valide edildi. Bu parametrelerin incelenmesi, HPLC yönteminin güvenilirliğini ve uygunluğunu değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

#### 4.2.3.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

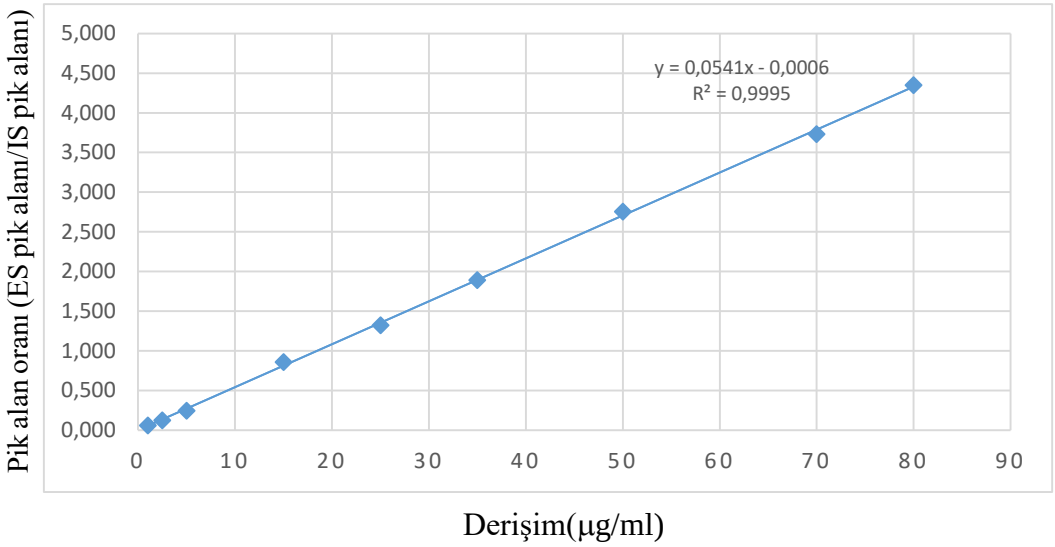
Vorikonazol ve parasetamol (IS) çözeltilerinin HPLC kromatogramları alındı. Vorikonazol standart çalışma çözeltilerinde 332 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde internal standart (parasetamol) çözeltisi eklendi. 255 nm dalga boyunda her bir çözeltinin kromatogramı alındı. Kromatogramlar Şekil 4.6.'da verildi. Vorikonazol ve parasetamol'ün alıkonma zamanları sırasıyla 3.76 dk ve 2.04 dk olarak belirlendi.




**Şekil 4.6.** 332 µg/mL parasetamol (IS) içeren 1, 2.5, 5, 15, 25, 35, 50, 70 ve 80 µg/mL konsantrasyonlarda Vorikonazol standart çalışma çözeltilarinin HPLC kromatogramı

#### 4.2.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

HPLC çalışma koşullarında, 332 µg/mL parasetamol (IS) içeren vorikonazol standart çalışma çözeltileri 1-80 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlandı ve her iki bileşiğin kromatogramları elde edildi. Pik alanları belirlendi ve pik alan oranları hesaplandı. Vorikonazolün konsantrasyonuna bağlı olarak pik alan değerleri (Vorikonazol pik alanı/IS pik alanı) grafiğe aktarılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu çalışmanın sonuçları, Şekil 4.7'de sunulan kalibrasyon eğrisi ile gösterildi.




**Şekil 4.7.** HPLC yöntemi ile oluşan ortalama kalibrasyon grafiği

HPLC yöntemiyle alınan kalibrasyon eğrileri verilerinin istatiksel analizleri yapıldı. Tablo 4.4.'te regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları verildi.

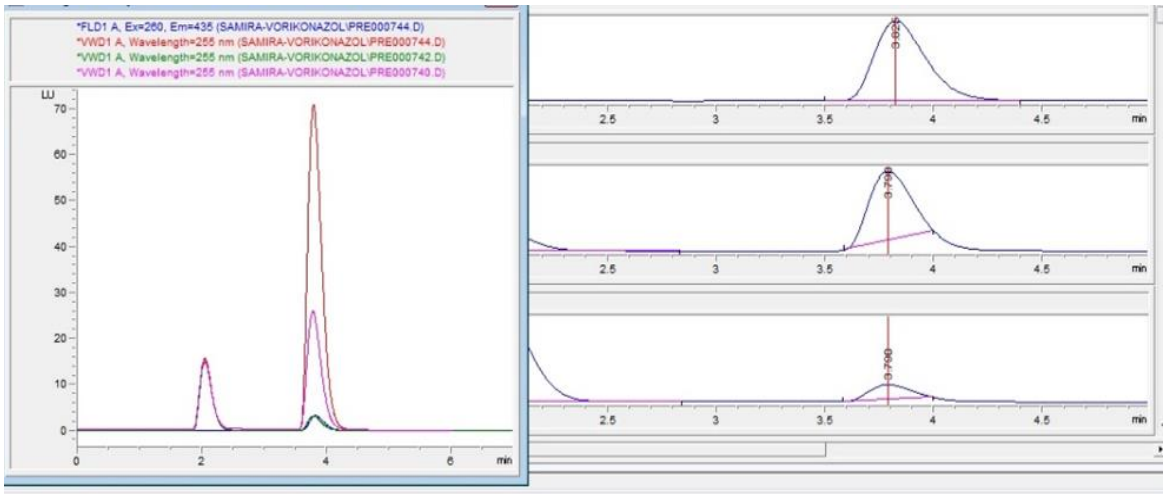
**Tablo 4.4.** Vorikonazol HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz verileri

| Etken madde | Çalışma aralığı µg/mL | λ (nm) | Sa | Sb | LR | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vorikonazol | 1-80 | 255 | 0.0003 | 0.0061 | y =0.0541x- 0.0006 | 0.9995 |

λ: dalga boyu, Sa: Regresyon çizgisindeki kaymanın standart sapması, Sb: Regresyon doğrusu eğiminin standart sapması, LR: lineer regresyon denklemi, $R^2$: regrasyon katsayısı

#### 4.2.3.3.Doğruluk/Kesinlik

Vorikonazol kalibrasyon eğrisine dahil edilen üç farklı konsantrasyonda (3, 30 ve 75 µg/mL) IS (parasetamol) içeren kalite kontrol çözeltileri oluşturuldu. Bu kalite kontrol çözeltileri, aynı gün içinde ve üç farklı gün boyunca en az üç kez analiz edilerek kromatogramları alındı ve pik alanları ölçüldü (Şekil 4.8).




**Şekil 4.8.** Kalite kontrol çözeltilerinin HPLC kromatogramı

Analiz sonuçlarından ölçünen miktarların bağıl standart sapması, bağıl hatası, ortalaması ve standart sapması, Excel kullanılarak hesaplandı. Bu hesaplamalar, metodun doğruluğunu ve hassasiyetini değerlendirmek için kritik öneme sahiptir. Doğruluk değeri yüzde bağıl hata (% BH) ile ifade edilmiş olup, hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\%\mathrm{BH} = \frac{\text{Ölçülen analitik konsantrasyonu} - \text{Doğru konsantrasyon}}{\text{Doğru kontrasyon}} \text{ x } 100$$

Kesinlik değeri yüzde bağıl standart sapma (% BSS) kullanılarak ifade edildi ve aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\%\ \mathrm{BSS} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama Değer}} \text{ x } 100$$

Analiz sonucundan alınan verilerden, yöntemin doğruluk ve kesinlik miktarları Tablo 4.5 görüldüğü gibi hesaplandı.

**Tablo 4.5.** HPLC yönteminin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

| Metod | Eklenen (µg/mL) | Ortalama ±SS (µg/mL) | Doğruluk %BH | Kesinlilik %BSS | |
|---|---|---|---|---|---|
| HPLC-UV | 3 | 2.97 ± 0.03 | -0.97 | 1.12 | Gün içi |
| | 30 | 30.59 ± 0.16 | 1.99 | 0.54 | |
| | 75 | 75.69 ± 0.39 | 0.93 | 0.51 | |
| | 3 | 2.98 ± 0.03 | -0.58 | 1.23 | Günler arası |
| | 30 | 30.24 ± 0.04 | 0.80 | 0.16 | |
| | 75 | 75.83 ± 0.07 | 1.11 | 0.09 | |

SS: standart sapma (n=3), % BSS: bağıl standart sapma , % BH: bağıl hata;

#### 4.2.3.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

Daha düşük konsantrasyonlarda standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlardan elde edilen sinyal-gürültü oranı, LOD olarak belirlenen değeri 3 ve LOQ olarak belirlenen değeri ise 10 olarak tespit edildi. HPLC yönteminin LOD ve LOQ miktarları 0.2 µg/mL ve 1.0 µg/mL'dir. Bu küçük LOD ve LOQ değerleri, yöntemin yüksek hassasiyetini ve duyarlılığını göstermektedir.

#### 4.2.3.5. Analitik Geri Kazanım

Farmasötik preparatlarda vorikonazol etken maddesinin analitik geri kazanımı, standart ekleme yöntemi kullanılarak çalışıldı. İlk olarak, tablet çözeltisi Bölüm 3.5'te belirtildiği şekilde 5 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı ve kromatogramı alındı; buradan elde edilen pik alanları belirlendi. Daha sonra, 10, 30 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında vorikonazol kalite kontrol çözeltileri oluşturuldu ve çözeltilerin kromatogramları alınıp pik alan değerleri belirlendi. Tablet çözeltisi üzerine hazırlanan

kalite kontrol çözeltilerine belirli miktarlarda eklemeler yapıldı (örneğin, 10+5, 30+5 ve 50+5). Son olarak, elde edilen toplam çözeltilerin HPLC ile Kromatogramlar elde edildi ve pik alanları yeniden belirlendi. Yöntemin Analitik Geri Kazanım (AGK) değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve analiz sonuçları Tablo 4.6'da sunuldu.

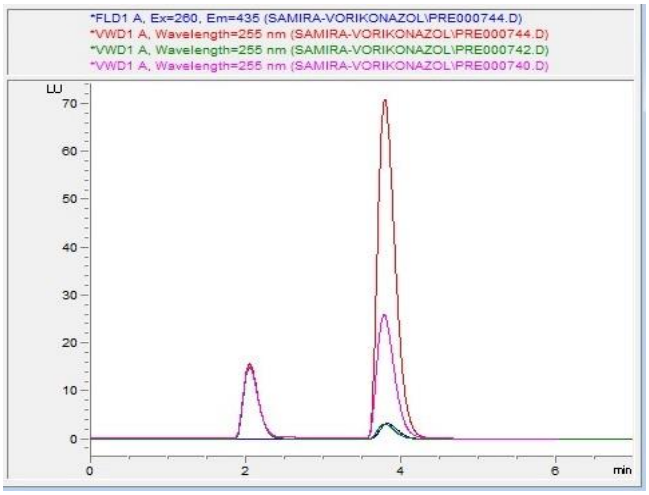
$$\%\ \text{AGK} = \frac{(\text{Ölçülen örnek} + \text{standart}) - \text{Ölçülen örnek derişimi}}{\text{Örneğe eklenen standart derişim}} * 100$$

**Tablo 4.6**. Farmasötik preparatlarda yöntemin analitik kazanım değerleri

| Farmasötik preaparat | Tablet (µg/mL) | Eklenen (µg/mL) | Ortalama±SS (µg/mL) | Geri kazanım % | BSS % |
|---|---|---|---|---|---|
| Vorent (200 mg) | 5 | 10 | 15.05±0.34 | %100.00 | 2.29 |
| | | 30 | 34.10±0.28 | %99.68 | 0.83 |
| | | 50 | 54.83±1.05 | %100.23 | 1.92 |

#### 4.2.3.6. Tablet Çözeltilerinde Vorikonazol Analizi

Piyasada satılan vorikonazol etken maddesine sahip antifungal ilaç Vorent Tablet (200mg) Erzurum Şehir Hastahanesinin Eczanesinden temin edildi. Tablet çözeltisi Bölüm 3.5.'de belirtildiği şekilde 10, 30 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlandı. Bu çözeltilere 332 µg/mL parasetamol (IS) eklendi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.9). Tablet çözeltisi kromatogramı incelendiğinde tablet içerisindeki vorikonazolün aynı alıkonma zamanına sahip olduğu ve tablet içerisindeki diğer katkı maddelerinin herhangi bir girişim yapmadığı tespit edildi. Sonuç olarak, farmasötik preparatlarda vorikonazol miktar tayini geliştirilip valide edilen HPLC yönteminin başarıyla uygulanabileceği düşünülmektedir.




**Şekil 4.9.** 10, 30 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda Vorent tablet (200mg) çözeltilerinin kromatogramı

# 5. TARTIŞMA

Bu araştırmada, farmasötik preparatlarda vorikonazol miktarının ölçülmesi için UV-Görünür spektrofotometri ve HPLC yöntemleri geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. UV-Görünür spektrofotometri yöntemi, vorikonazol tayininde oldukça kullanışlı ve pratik bir yöntem olduğunu göstermiştir. Vorikonazol, 255 nm'de maksimum absorbans göstererek analitin çözeltide kolayca tespit edilmesini sağlamıştır. Spektrofotometrik yöntemde, hazırlanan çözeltilerin absorbans değerlerinin konsantrasyonlarıyla doğrusal olarak ilişkili olduğu ve yüksek bir korelasyon katsayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, yöntemin doğrusal bir aralıkta çalıştığını ve analitik açıdan güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

UV-Görünür bölge spektrofotometri yönteminin 5-60 µg/mL aralığındaki doğrusal konsantrasyonunda vorikonazol çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu yöntemin regresyon doğrusu denklemi ve korelasyon katsayısı ($R^2$) sırasıyla A = 0.0158x + 0.0092 (A: Absorbans, x: vorikonazol konsantrasyonu) ve 0.9996 olarak belirlendi. Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) 1.0 µg/mL ve miktar tayin sınırı (LOQ) ise 5.0 µg/mL olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik analizlerinde, yüzde bağıl standart sapma (%RSD) ve doğruluk analizlerinde yüzde bağıl hata (%RE) değerleri sırasıyla %0.29 ve %0.08'den düşük olarak bulundu. Yöntem, vorikonazol içeren Vorent Tablet (200 mg) üzerinde uygulanarak etken madde analizi yapıldı. Farmasötik preparattaki analitik geri kazanım değeri ortalama %101.48 olarak hesaplandı.

Bu elde edilen sonuçların, yöntem 5-60 µg/mL konsantrasyon aralığında yüksek doğruluk ve kesinlik değerlerine sahip olduğu, doğruluk ve kesinlik testlerinde elde edilen düşük yüzde bağıl hata (%BH) ve yüzde bağıl standart sapma (%BSS) değerleri, yöntemin tekrarlanabilirliğini ve tutarlılığını desteklemiştir. Bu sonuçlar, UV-Görünür

Bölge Spektrofotometri yönteminin farmasötik preparatlarda vorikonazolün analizinde etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), karmaşık karışımlardaki bileşenlerin ayrıştırılması ve niteliksel ve niceliksel analizlerinin yapılması için kullanılan bir analitik kimya tekniğidir. Bu yöntemde, sıvı faz yüksek basınç altında pompalanarak analitlerin kromatografik kolona taşınmasını sağlar. Kolon içindeki sabit faz ile etkileşime giren analitler, farklı zamanlarda detektöre ulaşarak ayrışır. Kolon, genellikle katı bir adsorbent madde ile doldurulmuştur ve bu madde sayesinde kromatografik ayrışma gerçekleşir. Modern HPLC cihazları, birçok endüstriyel ve bilimsel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromatografik kolonun aktif bileşeni, genellikle granüler yapıda katı partiküllerden oluşur ve bu partiküller aracılığıyla bileşenler ayrılır. Sıvı faz, genellikle yüksek basınç altında birkaç çözücü veya çözücü karışımından (örneğin su, asetonitril, metanol) oluşur. Bu çözücüler, analitlerin kolondan ayrılmasını sağlar. Analitler kolona taşınır. Kolon, sabit faz kullanarak analitleri ayrıştırır ve detektöre gönderir. Detektöre ulaşan analitler, miktarlarına ve özelliklerine bağlı olarak sinyaller üretir. Bu sinyaller, mikroişlemciler ve veri analizi programları ile analiz edilir. Bu analizler, kalitatif ve kantitatif sonuçların elde edilmesini sağlar.

HPLC çalışmasında, aşağıdaki parametreler kullanıldı: UV dedektör (255 nm dalga boyu), ters faz C18 kolon, hareketli faz olarak asetonitril-su-metanol (50/45/5, h/h/h), ambient sıcaklık, 1.0 mL/dk akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacmi. Parasetamol iç standart (IS) olarak kullanıldı. HPLC yöntemiyle, vorikonazol ve parasetamol (IS) alıkonma zamanları sırasıyla 3.76 dakika ve 2.04 dakika olarak belirlendi. Yöntemin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığında (1-80 µg/mL) vorikonazol çözeltisi konsantrasyonuna karşı pik alan oranlarının (vorikonazol pik alanı/parasetamol-IS pik

alanı) grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi. HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi sonucunda, regresyon doğrusu denklemi ve korelasyon katsayısı ($R^2$) sırasıyla y = 0.0541x + 0.0006 (y: vorikonazol pik alanı/IS pik alan oranı, x: vorikonazol konsantrasyonu) ve 0.9995 olarak belirlendi. Yöntemin tespit sınırı (LOD) 0.2 µg/mL ve miktar tayin sınırı (LOQ) 1.0 µg/mL olarak belirlendi. Gün içi ve günler arası kesinlik analizlerinde, yüzde bağıl standart sapma (%RSD) ve doğruluk analizlerinde yüzde bağıl hata (%RE) değerlerinin sırasıyla %0.09 ve %0.93'ten düşük olduğu gözlendi. Vorikonazol içeren Vorent Tablet (200 mg) üzerinde yöntemin uygulanabilirliği test edildi ve farmasötik preparatın kromatogramında herhangi bir girişim olmadığı gözlendi. Yöntemin farmasötik preparatta analitik geri kazanım değeri ortalama %99.97 olarak belirlendi.

HPLC yöntemi, özellikle düşük konsantrasyonlardaki analitlerin tespitinde ve nicel analizlerinde üstün performans sergilemiştir. Vorikonazolün HPLC analizi, geniş bir konsantrasyon aralığında (1-80 µg/mL) doğrusal sonuçlar vermiştir. HPLC yönteminin yüksek duyarlılığı, özellikle düşük konsantrasyonlardaki analitlerin güvenilir bir şekilde tespit edilmesini sağlamıştır. HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri, yüksek doğruluk ve kesinlik ile sonuçlanmıştır. Bu da yöntemin analitik geçerliliğini pekiştirmektedir.

Karşılaştırmalı değerlendirme yapmak istersek her iki yöntem de vorikonazol analizi için uygun ve güvenilir sonuçlar vermiştir. Ancak, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi, daha hızlı ve daha az maliyetli olması nedeniyle rutin analizlerde tercih edilebilir. Spektrofotometrik yöntemin daha az karmaşık olması ve laboratuvar koşullarında kolaylıkla uygulanabilir olması da önemli bir avantaja sahiptir. Buna karşılık, HPLC yöntemi, daha düşük limitlerde analiz yapabilme yeteneği ve yüksek duyarlılığı ile kritik ve detaylı analizler için tercih edilmektedir.

Vorikonazol içeren farmasötik preparatların analizinde her iki yöntemin de yüksek doğruluk ve kesinlik sağlaması, bu çalışmanın önemli bir bulgusudur. Spektrofotometrik yöntem, özellikle hızlı ve maliyet etkin analizler için uygun iken, HPLC yöntemi, duyarlılık gerektiren ve detaylı analizler için daha uygun bir seçenek sunmaktadır.

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, farmasötik preparatlarda vorikonazol analizini gerçekleştirmek için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve HPLC yöntemleri geliştirilip valide edildi. Yapılan analizler ve elde edilen bulgular, her iki yöntemin de etkinlik ve güvenilirlik açısından önemli potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi, analiz sürecinde hızlı ve basit bir yaklaşım sunarak farmasötik preparatların rutin kontrolünde tercih edilebilir bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Vorikonazol'ün belirli bir dalga boyunda maksimum absorbans göstermesi, analizin basitliğini ve etkinliğini artırmıştır. Bu yöntem, özellikle geniş ölçekte üretim yapılan tesislerde tekrarlanabilir analizler için uygun olabilir. Öte yandan, HPLC yöntemi, yüksek hassasiyet ve duyarlılık sağlayarak düşük konsantrasyonlardaki analitlerin tespiti için ideal bir seçenek sunmaktadır. HPLC'nin ayrıntılı ve detaylı analizler için uygunluğu, farmasötik preparatların karmaşık bileşenlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu yöntem, özellikle kalibrasyon eğrisi oluşturma ve doğruluk testleri gibi daha kapsamlı analizler için kullanılabilir.

Her iki yöntem de doğruluk, doğrusallık ve tekrarlanabilirlik açısından başarılı sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar, farmasötik preparatlardaki analitik süreçlerin güvenilirliğini ve etkinliğini artırmak için önemli bir adımdır. Ancak, gelecekteki çalışmalarda yöntemlerin daha da optimize edilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir.
Bu çalışmanın sonuçları, vorikonazol miktar tayini yapan ilaç endüstrisinde ve kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

# KAYNAKLAR


Ali, A. H. (2022). High-performance liquid chromatography (HPLC): a review. *Ann. Adv. Chem*, *6*, 010-020.

Altınışık, M., & AD, A. B. (2004). Spektroskopik analiz yöntemleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Ders Notları, 25.*

Apaydın, F. (1991). Magnetik Rezonans, *Hacettepe Üniversitesi*, 3, 6-8.

Badali, H., Vaezi, A., Aslani, N., Zahedi, N., & Shiran, M. R. (2016). Overview of Voriconazole Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Parameters. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, *26*(136), 225-235.

Barrs, V. R., Bęczkowski, P. M., Talbot, J. J., Hobi, S., Teoh, S. N., Hernandez Muguiro, D., ... & Sandy, J. (2024). Invasive fungal infections and oomycoses in cats: 1. Diagnostic approach. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *26*(1), 1098612X231219696.

Belenky, B. G., Gankina, E. S., Tennikov, M. B., & Vilenchik, L. Z. (1978). Fundamental aspects of adsorption chromatography of polymers and their experimental verification by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A, 147*, 99-110.

Broeckhoven, K., Shoykhet, K., & Dong, M. (2019). Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices.

Cabrera, K., Lubda, D., Eggenweiler, H. M., Minakuchi, H., & Nakanishi, K. (2000). A new monolithic-type HPLC column for fast separations. *Journal of High Resolution Chromatography*, *23*(1), 93-99.

Casadevall, A. (2018). Fungal diseases in the 21st century: the near and far horizons. *Pathogens & immunity*, *3*(2), 183.

Chawla, P. K., Dherai, A. J., & Ashavaid, T. F. (2016). Plasma voriconazole estimation by HPLC. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *31*, 209-214.

Chen, C., Xu, T., Zhou, K., & Zhu, S. (2024). Factors affecting voriconazole concentration to dose ratio changes according to route of administration. *European Journal of Hospital Pharmacy*, *31*(1), 31-35.

Cheng, L., Xiang, R., Liu, F., Li, Y., Chen, H., Yao, P., ... & Xia, P. (2020). Therapeutic drug monitoring and safety of voriconazole in elderly patients. *International Immunopharmacology*, *78*, 106078.

Christian, G. D., Dasgupta, P. K., & Schug, K. A. (2013). *Analytical chemistry*. John Wiley & Sons

Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, *3*(2), 156.

Cummins, P. M., Rochfort, K. D., & O'Connor, B. F. (2017). Ion-exchange chromatography: basic principles and application. *Protein chromatography: methods and protocols*, 209-223.

De Almeida Campos, L., Fin, M. T., Santos, K. S., de Lima Gualque, M. W., Freire Cabral, A. K. L., Khalil, N. M., ... & Mendes-Giannini, M. J. S. (2023). Nanotechnology-Based Approaches for Voriconazole Delivery Applied to Invasive Fungal Infections. *Pharmaceutics*, *15*(1), 266.

Drabińska, B., Dettlaff, K., Kossakowski, K., Ratajczak, T., Kujawski, R., Mikołajczyk, A., & Kujawski, J. (2022). Structural and spectroscopic properties of

voriconazole and fluconazole–Experimental and theoretical studies. *Open Chemistry*, *20*(1), 1575-1590).

Ertaş İ.: "*Denel Fizik Dersleri* ", Cilt II, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, Türkiye, (1996)

Fang, W., Wu, J., Cheng, M., Zhu, X., Du, M., Chen, C., ... & Pan, W. (2023). Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. *Journal of biomedical science*, *30*(1), 42.9.

Firacative, C. (2020). Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *115*, e200430.

Ghobadi, E., Saednia, S., & Emami, S. (2022). Synthetic approaches and structural diversity of triazolylbutanols derived from voriconazole in the antifungal drug development. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *231*, 114161.

Gritti, F., Basile, M., Cormier, S., Fogwill, M., Gilar, M., McDonald, T., ... & Yan, Q. (2018). Semi-preparative high-resolution recycling liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1566*, 64-78.

Gupta, Santosh & Mao, Yuanbing. (2020). Nano Scintillator-Book.

Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., & Baskı, B. (1994). Elektromanyetik radyasyon. SB, Ankara.

Güngör-Ak, A., & Karataş, A. (2020). Fitozom formülasyonundan berberin miktar tayini için HPLC yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonu. Eurasian *Journal of Biological and Chemical Sciences*, *3*(2), 154-159.

Harmancık, B. Z. (2017). Kütle spektrometrik yöntemle plazma oksisterollerinin ölçümü ve analitik validasyonun değerlendirilmesi.

Hoenigl, M., Seidel, D., Sprute, R., Cunha, C., Oliverio, M., Goldman, G. H., ... & Carvalho, A. (2022). COVID-19-associated fungal infections. *Nature microbiology*, *7*(8), 1127-1140.

Hohmann, N., Kreuter, R., Blank, A., Weiss, J., Burhenne, J., Haefeli, W. E., & Mikus, G. (2017). Autoinhibitory properties of the parent but not of the N-oxide metabolite contribute to infusion rate-dependent voriconazole pharmacokinetics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *83*(9), 1954-1965.

Holler, J. F., Skoog, D. A., & West, D. M. (1999). Fundamentals of analytical chemistry Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F eds. *Analitik Kimya Temelleri, Bilim Matbaa. Ankara, 497*-597

Issaq, H. J., Fox, S. D., Mahadevan, M., Conrads, T. P., & Veenstra, T. D. (2003). Effect of experimental parameters on the HPLC separation of peptides and proteins. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, *26*(14), 2255-2283.

İpek, C. (2012). *Türkiye'deki bal numunelerinde bulunan hidroksimetilfurfural miktarı, stabilitesi ve hidrosimetilfurfural miktar tayini analitik metod validasyonu* (Doctoral dissertation, Marmara Universitesi (Turkey)).

Jeu, L., Piacenti, F. J., Lyakhovetskiy, A. G., & Fung, H. B. (2003). Voriconazole. *Clinical therapeutics*, *25*(5), 1321-1381.

Jungbauer, A., & Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography. *Methods in enzymology*, *463*, 349-371.

Kalili, K. M., & de Villiers, A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of separation science*, *34*(8), 854-876.

Kerr, A., Rafuse, H., Sparkes, G., Hinchey, J., & Sandeman, H. (2011). Visible/infrared spectroscopy (VIRS) as a research tool in economic geology: background and pilot studies from Newfoundland and Labrador. *Geological Survey, Report, 11*, 145-166.

Khetre, A. B., Sinha, P. K., Damle, M. C., & Mehendre, R. (2009). Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for voriconazole. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, *71*(5), 509.

Lambert, S. M., & Porter, P. E. (1964). Analytical and Preparative Applications of Liquid-Liquid Partition Chromatography. *Analytical Chemistry*, *36*(1), 99-104.

Leveque, D., Nivoix, Y., Jehl, F., & Herbrecht, R. (2006). Clinical pharmacokinetics of voriconazole. *International journal of antimicrobial agents*, *27*(4), 274-284.

Loh, J. T., & Lam, K. P. (2023). Fungal infections: immune defense, immunotherapies and vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews, 196*, 114775.)

Miroğlu, E., & Miloğlu, F.D. (2013). *Farmasötik preparatlarda losartan potasyumun spektrofotometrik yöntem ile analizi* (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk ÜniversitesiSağlık Bilimleri Enstitüsü).

Moldoveanu, S. C., & David, V. (2022*). Essentials in modern HPLC separations.* Elsevier.

Morgan, N. Y., & Smith, P. D. (2010). HPLC detectors. Handbook of HPLC, 7, 207-231

Mori, S., & Barth, H. G. (1999). *Size exclusion chromatography*. Springer Science & Business Media.

Neely, M., & Neofytos, D. (2017). Voriconazole. In Kucers' The Use of Antibiotics (pp. 2823-2842). CRC Press. Niessen, W. M. (2006). Liquid chromatography-mass spectrometry. CRC press.

Ohmacht, R., & Boros, B. (2000). Effect of pressure on solute capacity factor in HPLC using a non-porous stationary phase. *Chromatographia*, *51*, S205-S210.

Okur, N. Ü., ÇaĞlar, E. Ş., & Yozgatlı, V. (2016). Development and validation of an HPLC method for voriconazole active substance in bulk and its pharmaceutical formulation. *Marmara Pharmaceutical Journal, 20*(2), 79-85.

Orhun, F., Gaz Kromatografisi, Taşiyici Gazin Akış Hızının Tesirleri Üzerinde Tecrübi Araştırmalar ve Metodun Türkiye'deki Bazi Tabiî Gazlarin Hidrokarbon Analizlerine *Tatbiki, Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü, Ankara*, 1968.

Ou, Y. H., Du, R. K., Zhang, S. P., Ling, Y., Li, S., Zhao, C. J., ... & Zhang, L. (2020). Synthesis, crystal structure and in vitro antifungal activity of two-dimensional silver (I)-voriconazole coordination complexes. *Journal of Molecular Structure, 1215*, 128229.

ÖZYETGİN, O. (2008). *Eğitim Amaçli Spektrofotometre Tasarimi Ve Uygulamalari*

*Pathakumari,* B., Liang, G., & Liu, W. (2020). Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 130, 110550.

Perea, S., Pennick, G. J., Modak, A., Fothergill, A. W., Sutton, D. A., Sheehan, D. J., & Rinaldi, M. G. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatographic and microbiological methods for determination of voriconazole levels in plasma. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*(5), 1209-1213.

Pilmis, B., Jullien, V., Sobel, J., Lecuit, M., Lortholary, O., & Charlier, C. (2015). Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(1), 14-22.

Praveen, P. L., & Ojha, D. P. (2014). Effect of substituent on UV–visible absorption and photostability of liquid crystals: DFT study. *Phase Transitions*, *87*(5), 515-525.

Prevalence and healthcare burden of fungal infections in the United States, 2018. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 9, No. 1, p. ofab593). US: Oxford University Press.

Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 129*, 115913.

Räty, J. A., Peiponen, K. E., & Asakura, T. (2004). *UV-visible reflection spectroscopy of liquids* (Vol. 92). Springer Science & Business Media.

Ravisankar, P., Navya, C. N., Pravallika, D., & Sri, D. N. (2015). A review on step-by-step analytical method validation. *IOSR J Pharm, 5*(10), 7-19.

Rayens, E., & Norris, K. A. (2022), *January*.

Reginatto, P., de Jesus Agostinetto, G., Teixeira, M. L., de Andrade, S. F., & Fuentefria, A. M. (2024). Synergistic activity of clioquinol with voriconazole and amphotericin B against fungi of interest in eye infections. *Journal of Medical Mycology, 34(1)*, 101462.

Resztak, M., Sobiak, J., & Czyrski, A. (2021). Recent advances in therapeutic drug monitoring of voriconazole, mycophenolic acid, and vancomycin: a literature review of pediatric studies. *Pharmaceutics, 13*(12), 1991.

Rodrıguez-Cuesta, M. J., Boqué, R., & Rius, F. X. (2003). Influence of selectivity and sensitivity parameters on detection limits in multivariate curve resolution of chromatographic second-order data. *Analytica chimica acta, 476*(1), 111-122.

Sakarya, S. (2005). *Film kaplı Finasterid Tabletleri'Nde safsızlık Metodunun Analitik Validasyonu* (Doctoral dissertation, Marmara Universitesi (Turkey)).

Sastrohamidjojo, H. (2018). *Dasar-dasar spektroskopi*. UGM PRESS.

Scott, L. J., & Simpson, D. (2007). Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. *Drugs, 67*, 269-298.

Shen, J. J., Jemec, G. B., Arendrup, M. C., & Saunte, D. M. L. (2020). Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy, 31*, 101774.)

Shen, K., Gu, Y., Wang, Y., Lu, Y., Ni, Y., Zhong, H., ... & Su, X. (2022). Therapeutic drug monitoring and safety evaluation of voriconazole in the treatment of pulmonary fungal diseases. Therapeutic advances in drug safety, 13, 20420986221127503.

Sherma, J., & Fried, B. (Eds.). (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press.

Small, H. (2013). *Ion chromatography*. Springer Science & Business Media.

Srinubabu, G., Raju, C. A., Sarath, N., Kumar, P. K., & Rao, J. S. (2007). Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceutical formulation using an experimental design. *Talanta*, *71*(3), 1424-1429.

Steiner, F., Paul, C., & Dong, M. (2019). HPLC autosamplers: Perspectives, principles, and practices.

Striegel, A., Yau, W. W., Kirkland, J. J., & Bly, D. D. (2009). *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. John Wiley & Sons.

Sun, L., Jin, H. Y., Tian, R. T., Wang, M. J., Liu, L. N., Ye, L. P., ... & Ma, S. C. (2017). A simple method for HPLC retention time prediction: linear calibration using two reference substances. *Chinese Medicine, 12*, 1-12.

Şener, M. (2006). *İçme sularında kalsiyum ve magnezyumun spektrofotometrik metotla simultane tayini ve yapay sinir ağları ile kemometrik analizi* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi).

TUĞRUL, Ö. (2018). *Azo Boyar Maddelerin Yapisal Ve Bazi Spektroskopik Özelliklerinin Ab-Initio Yöntemi İle İncelenmesi*.

Van den Born, D. A., Märtson, A. G., Veringa, A., Punt, N. C., van der Werf, T. S., Alffenaar, J. W. C., ... & Touw, D. J. (2023). Voriconazole exposure is influenced by inflammation: A population pharmacokinetic model. *International journal of antimicrobial agents*, *61*(4), 106750.

Wilson J.; Hawkes J.F.B.: "Optoelektronik", *Çev. Okur İ.; Değişim Yayınları, Adapazarı*, Türkiye, (2000)

Yasu, T., Nomura, Y., Gando, Y., Matsumoto, Y., Sugita, T., Kosugi, N., & Kobayashi, M. (2022). High-Performance Liquid Chromatography for Ultra-Simple Determination of Plasma Voriconazole Concentration. *Journal of Fungi*, 8(10), 1035.

Young, C. S., & Weigand, R. J. (2002). An efficient approach to column selection in HPLC method development. *LC GC NORTH AMERICA*, *20*(5), 464-473.

Yousefian, S., Dastan, F., Marjani, M., Tabarsi, P., Barati, S., Shahsavari, N., & Kobarfard, F. (2021). Determination of voriconazole plasma concentration by HPLC technique and evaluating its association with clinical outcome and adverse effects in patients with invasive aspergillosis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2021, 1-6.

Zapata, J. D., Cáceres, D. H., Cano, L. E., De Bedout, C., Granada, S. D., & Naranjo, T. W. (2024). Standardization and validation of a high-efficiency liquid chromatography with a diode-array detector (HPLC-DAD) for voriconazole blood level determination. *Biomédica*, *44*, 113-8.

# EKLER

## EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
Graduate School of Health Sciences

**ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU**[1]

| | |
|---|---|
| Öğrencinin Adı ve Soyadı | Samira SAMADZADEH |
| Öğrencinin Numarası | |
| Ana Bilim Dalı | |
| Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü | |

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

| Bölümler | Benzerlik Oranı | Maksimum Benzerlik Oranları |
|---|---|---|
| I. Giriş | %0 | % 15 |
| II. Genel Bilgiler | %10 | % 35 |
| III. Materyal ve Metod | %15 | % 35 |
| IV. Bulgular | %13 | % 15 |
| V. Tartışma | %19 | % 20 |

*Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.*

[1] Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp tezin Ekler kısmına EK-1 olarak eklenmelidir.

## EK-2. Etik Kurul Onay Formu

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Birim Etik Kurulu

**Sayı : 93722986.12/**
**Konu: Birim Etik Kurul Kararı** **02/10/2023**

**İlgi: 02.10.2023 tarih ve 2300309944 sayılı dilekçeniz.**

Fakültemiz Birim Etik Kurulunun 02.10.2023 tarihinde 4 numaralı kararı ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Samira SAMADZADEH'in yürüteceği "Vorikonazol Etken Maddesinin Farmasötik Preparatlarda ve Plazmada Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyonu" (İn vitro) başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

**Karar -4-** Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'nun danışmanı olduğu yüksek lisans öğrencisi Samira SAMADZADEH'in Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yürüteceği "Vorikonazol Etken Maddesinin Farmasötik Preparatlarda ve Plazmada Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyonu" (in vitro) başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 02.10.2023 tarih ve 2300309944 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu (Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU çalışma ekibinde olduğundan oylamaya katılmadı) mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.

Atatürk Üniversitesi kampusu 25040 Tlf: 0442-231 52 07 Fax: 0442 – 2315201 Elektronik Post: eczfak@atauni.edu.tr ERZURUM

**EK-3. Tez Adı Değişikliği Bildirim Formu**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
Graduate School of Health Sciences

**TEZ ADI DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU**

| | |
|---|---|
| Öğrencinin Adı ve Soyadı | Samira Samadzadeh |
| Ana Bilim Dalı | **Analitik Kimya** |
| Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü | Yüksek Lisans |

**Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Başkanlığına**

Danışmanlığını yürüttüğüm ve yukarıda bilgileri yazılı olan ana bilim dalımız öğrencisinin tez adı aşağıda belirtilen şekilde değiştirilmiştir. Bilgilerinize arz ederim. 04.07.2024

| | |
|---|---|
| Değişiklik Türü | Tez adı değişikliği ☒ |
| Tezin Eski Adı | Vorikonazol Etken Maddesinin Farmasötik Preparatlarda ve Plazmada Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyonu |
| Tezin Yeni Adı | Vorikonazol Etken Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini İçin Analitik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyonu |
| Tezin İngilizce Adı | Development and Validation of Analytical Methods for Quantification of the Active Ingredient Voriconazole in Pharmaceutical Preparations |
| Değişikliğin Gerekçesi | Plazmada Miktar Analizi Yöntemi geliştirilmemiştir. Tez adından bunun çıkarılması gereklidir. |

OF29_V1_08.01.2020