

Bazı Azol Grubu Antifungal Bileşiklerin Analizi için Ters Faz Sıvı Kromatografi Metot Optimizasyonu

Reverse Phase Liquid Chromatography Method Optimization for Analysis of Some Azole Group Antifungal Compounds

Dilara BAŞAT DERELİ^{1,2*}, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY^{3*}, İlkey KONÇE¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İlaç Araştırma ve Geliştirme Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

²Bitlis Eren Üniversitesi, Tatvan Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Bitlis, Türkiye

³Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Isparta, Türkiye

ÖZET

Bu çalışmada azol türevi antifungal ilaç etken maddeleri klotrimazol, lanokonazol ve klimbazolün ters faz sıvı kromatografi (RPLC) yöntemi kullanılarak geliştirilen metot optimizasyonunda, bileşiklerin kapasite faktörü değerleri ve analizlendikleri hareketli fazdaki metanol derişimi ilişkisi esas alınmıştır. İyonlaşan gruba sahip bu bileşiklerin optimizasyonunda hareketli faz pH değeride optimizasyonda bir diğer etkindir. İzokratik bir ayırma için kapasite faktörü değerlerinin 1-5 aralığında olması tercih edilmektedir.

RPLC yöntemiyle gerçekleştirilen klotrimazol, lanokonazol ve klimbazol bileşiklerinin aynı anda tayini için yapılan optimizasyonda %50, %55 ve %60 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımları kullanılmıştır. Ayırma için çalışılan ortamlarda iki hareketli faz pH değerindeki (pH 4,0 ve 5,5) alıkonma zamanları belirlenmiştir. Hidrofobik özellikteki bileşiklerin tayini için Zorbax SB-CN (4,6x150mm) kolon tercih edilmiştir. Kolon sıcaklığı 37°C'de ve akış hızı da 1 mL/dakikada sabitlenmiştir. Optimizasyon koşullarının belirlenmesinde logk- % (v/v) metanol ilişkisi ve bileşiklerin ayrılmalarını gösteren seçicilik faktörü (α) parametresinden yararlanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antifungal ilaç etken maddeleri, RPLC, Metot Optimizasyonu

Alınış / Received: 03.08.2023 Kabul / Accepted: 07.11.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 29.12.2023



ABSTRACT

In this study, the capacity factor values of the compounds and the methanol concentration in the mobile phase in which they were analyzed were based on the method optimization developed by using the reverse phase liquid chromatography (RPLC) method of theazole antifungal drug active ingredients clotrimazole, itraconazole and terbinafine. In the optimization of these compounds with ionizing groups, the pH value of the mobile phase is another factor in the optimization. For an isocratic separation, it is preferred that the capacity factor values are in the range of 1-5.

Methanol-water binary mixtures containing 50%, 55% and 60% (v/v) methanol were used in the optimization for the simultaneous determination of clotrimazole, itraconazole and terbinafine compounds by RPLC method. Retention times at pH values of two mobile phases (pH 4.0 and 5.5) were determined in the working media for separation. Zorbax SB-CN (4.6x150mm) column was preferred for the determination of hydrophobic compounds. The column temperature was fixed at 37 °C and the flow rate was fixed at 1 mL/min. The logk-% (v/v) methanol relationship and the selectivity factor (α) parameter, which shows the separation of the compounds, were used to determine the optimization conditions.

Keywords: Antifungal drug active ingredients, RPLC, Method Optimization



1. Giriş

Azol antifungal ajanlar iki veya üç azot grubu taşıyan heterosiklik organik bileşiklerdir. Bu gruptaki imidazol bileşiklerden yaygın kullanım alanına sahip olan klotrimazol, itraconazol ve terbinafinin aynı anda tayinine yönelik ters faz sıvı kromatografi metodu geliştirilmiştir. Azol türevi bileşikler içerisinde ilk sentezlenen bileşik olan klotrimazolün az olan yan etkileri ve karmaşık olmayan metabolik profili, sporcu ayağı gibi mikotik salgınların ve mantar cilt enfeksiyonlarının tedavisinde dünya çapında kabul görmesini sağlamıştır. Ayrıca 1995 yılında klotrimazolün, *in vivo* olarak insan melanom ve glioblastoma hücrelerine karşı test edildiğinde kanser hücresi proliferasyonu ve tümör büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [1, 2]. Itraconazol, *Candida*, *Malassezia*, *Aspergillus* ve *Trichophyton* türleri gibi tıbbi açıdan önemli mantarlara karşı geniş spektrumlu aktiviteleri olan yeni imidazol grubu antifungal ajanlardan birisidir [3]. Diğer bileşik terbinafin ise kepek önleyici ve antimikotik koruyucu olarak duş jeli, diş macunu, saç kremi, saç tonikleri ve şampuan gibi kişisel bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılan antifungal bir ajandır [4].

Bu yaygın kullanılan antifungal ajanların kalitatif ve kantitatif tayini için en yaygın kullanılan analitik teknik yüksek performans sıvı kromatografidir. Bu teknik içerisinde bu grubun analizi için en çok ters faz sıvı kromatografi (RPLC) metodu tercih edilmektedir [5-9]. RPLC metot optimizasyonunda en önemli amaç en iyi ayırma koşullarını sağlamaktır. Kromatografik koşulların bir fonksiyonu olarak çözünen tutma davranışını tahmin etmek için çeşitli yaklaşımlar araştırılmıştır. İyonlaşan ve nötral bileşiklerin analizi için kullanılan RPLC metodunda deneme yanılmadan uzak olarak hareketli faz polaritesi, pH ve kolon sıcaklığı değerleri kullanılmaktadır [10-12]. Bu üç parametrenin kromatografik davranış üzerindeki etkisi biraz daha karmaşıktır. Organik çözücü içeriğindeki değişiklik iyonlaşma derecesinde de bir değişikliğe neden olur. İyi bir ayırmanın elde edilmesi çok önemlidir ve sıklıkla belirli pH değerlerinde mümkündür. Hareketli fazın pH'ı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmasında önemli bir faktördür. Zayıf asit/baz özelliğindeki analitler için pH değişikliklerinin etkisi çok önemlidir, çünkü iyonlaşma derecelerinde ve dolayısıyla kromatografik alıkonmalarında bir değişikliğe neden olmaktadır [13, 14]. Günümüzde, hareketli fazda pH ölçüldüğünde, iyonlaşan bileşikler için pH'ın bir fonksiyonu olarak kapasite faktörünün (k) en iyi uyumunun elde edildiği gösterilmiştir [14].

Kromatografide alıkonma tahminine yönelik denklemleri kullanmak daha kısa sürede deneyin gerçekleştirilmesi ve bileşiklerin ayırımını sağlamaktadır [11, 15]. Hareketli fazda organik çözücünün hacimce yüzdesiyle kapasite faktörü değerinin ilişkisi Eşitlik 1'de verilmiştir.

$$\log k = \log k_w - S\varphi \quad (1)$$

φ , çalışmada kullanılan metanolün hacimce yüzdesidir. S değeri ise metanolün çözücü gücü ile ilişkilendirilmiş bir faktördür. Eşitlik 1'de görüldüğü gibi hareketli fazda metanolün hacimce yüzdesine bağlı olarak bileşiklerin k değeri doğrusal ilişki göstermektedir. Bu doğrusal fonksiyonun eğim değeriyle S, kesim değeri ile bileşiklerin su ortamındaki k_w değeri hesaplanabilmektedir [16].

Bu çalışmanın amacı, hareketli fazın metanol içeriği ve pH'ının bazı azol grubu antifungal ajanların alıkonma davranışı üzerindeki etkisini açıklamaktır. Çalışılacak pH değeri bileşiklerin $pK_a \pm 1,5$ aralığında seçilmiştir. Bileşiklerin ayırımının sağlanmasında k değerinin 1-5 aralığında olması gereklidir [16, 17]. Ayırmanın seçicilik faktörü (α) değerleri Eşitlik 2'de verilmiştir. Bileşiklerin kromatografik ayırmalarının sağlanması için $\alpha \geq 1,15$ olmalıdır [17, 18].

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Sunulan bu çalışmada %50, %55 ve %60 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımlarında ve iki hareketli faz pH değerinde (pH 4,0 ve 5,5) klotrimazol, lanokonazol ve klmbazolün alıkonma zamanları (t_R) ve k değerleri belirlenmiştir. Hareketli fazda metanolün hacimce yüzdesiyle bileşiklerin kapasite faktörü değerinin doğrusal ilişkisi dikkate alınarak farklı metanol yüzdesi için kapasite faktörü değerleri tahmin edilmiştir. Ayrıca doğrusal fonksiyonların kesim değerlerinden bileşiklerin su ortamındaki k_w değerleri deney yapmadan tahmin edilmiştir. Bu seçilen üç bileşiğin aynı anda analizine yönelik optimum koşulun belirlenmesi içinde çalışılan kromatografik koşullardaki k ve α değerleri hesaplanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan klotrimazol, lanokonazol, klmbazol, urasil, o-fosforik asit, sodyum hidroksit ve potasyum asit fitalat (KHP) Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltiler 4°C'de saklanmıştır. Bileşikler oldukça hidrofobik olduklarından çalışılan metanol-su (%50, %55 ve %60, v/v) ikili karışımlarımda çözülerek hazırlanmışlardır. Kimyasalların çözeltileri güneş ışığından uzak, 4°C'de ana stoklar saklanmış, günlük olarak ara stoklar hazırlanmıştır.

Kullanılan Cihazlar

Çalışma Shimadzu HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sistemde pompa (LC20AD), UV dedektör (SPD-20A), degazer (DGu-20A3), kolon fırını (CTO-20A) bulunmaktadır. Hareketli fazın pH ölçümleri için Mettler Toledo pH analiz cihazı (Schwerzenbach, Switzerland) kullanılmıştır. Hareketli faz ve kimyasalların çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan saf su Direct-Q3 UV cihazından (Millipore, Bedford, MA, USA) temin edilmiştir.

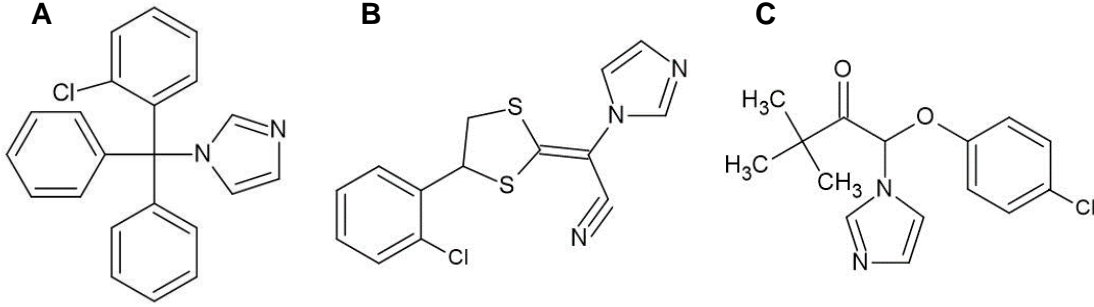
Analizler için Kromatografik Koşullar

Bileşiklerin sıvı kromatografik analizleri karbon içeriği %4 ve pH çalışma aralığı 1-8 olan Zorbax SB-CN kolon (150x4,6 mm, 3,5 μ m; Agilent) tercih edilmiştir. IUPAC kurallarına göre, metanol-su ikili karışımlarında pH elektrot kalibrasyonu için referans standart çözelti olarak KHP (0,05 mol/kg) seçilmiştir. Hazırlanan mobil fazın pH'ı ayarlanırken sıcaklık 25°C \pm 0,1°C'de sabit tutulmuştur. %50, %55 ve %60 (v/v) metanol içeren metanol-su hidroorganik hareketli faza 30 mM o-fosforik asit ilave edilmiş ve istenilen pH değeri 1 M sodyum hidroksit çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır. Hareketli faz pH'sı pH 4,0 ve 5,5 değerlerine ayarlanarak klotrimazol, lanokonazol ve klmbazolun t_R değerleri belirlenmiştir. Urasil (kolonda tutunmayan tür) t_0 marker olarak kullanılmış ve kapasite faktörü değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Bileşikler UV dedektörle 210 nm'de analizlenmiştir. Kromatografik analizler 1 mL/dakika akış hızında ve 37°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Manuel

olarak çalışılmış ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Çalışma üç tekrarlı olarak yapılmış ve bağıl standart sapma değerleri %1'in altında kalmıştır.

3. Bulgular

Bu çalışmada, imidazol grubunu içeren klotrimazol, lanokonazol ve klimbazolun (Şekil 1) alıkonma davranışları, hareketli fazın pH'sı ve metanol derişiminin birleşik etkisi kullanılarak incelenmiştir. Bu asidik ve bazik fonksiyonel grup içeren bileşiklerin RPLC yöntemi kullanılarak analizlenmesi, önemli ölçüde bu bileşiklerin iyonlaşma derecesine ve dolayısıyla hareketli fazın pH'ına bağlıdır.

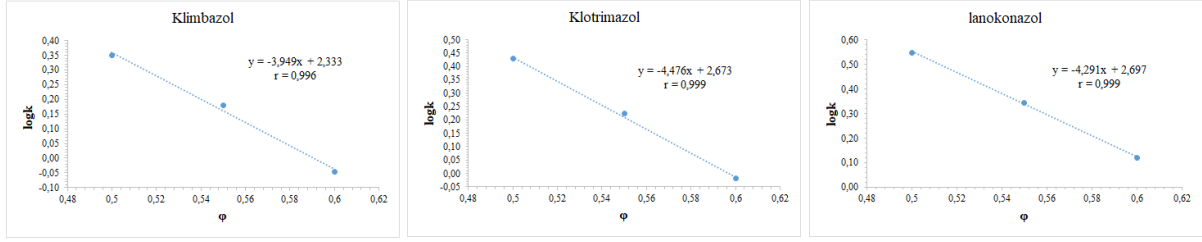


Şekil 1: Bileşiklerin kimyasal yapıları A) klotrimazol, B) lanokonazol C) klimbazol

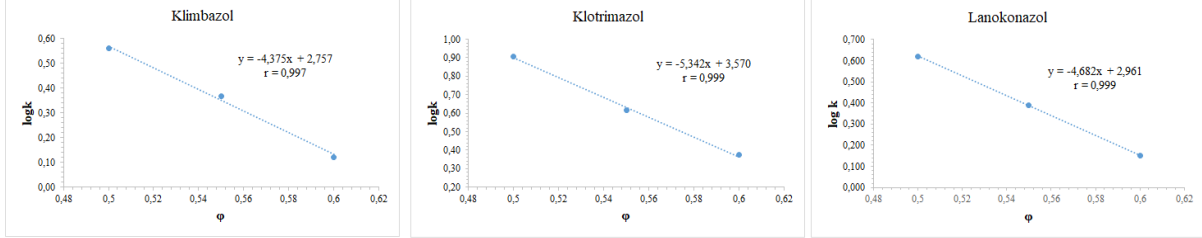
Oldukça hidrofobik bileşikler olan klotrimazol ($8,88 \cdot 10^{-7}$ mg/mL), lanokonazol ($3,56 \cdot 10^{-3}$ mg/mL) ve klimbazolun ($9,63 \cdot 10^{-3}$ mg/mL) suda çözünürlüğü oldukça azdır [19]. Bunun için bu bileşiklerle yapılan sıvı kromatografik analizlerde su-organik çözücü ikili karışımları tercih edilmektedir. Çalışmada suda çözünebilir ve polar özellikteki organik çözücü metanol tercih edilmiştir. Hareketli fazdaki çözücülerinin polaritesi ayırmayı etkilemektedir. Daha polar çözücülerin seçilmesi RPLC'de kolonda alıkonmayı artırmaktadır [17]. Polar çözücü metanolle yapılan bu analizlerde bileşiklerin kolonla etkileşiminin çok fazla olmaması için C18, C8 gibi klasik alkil zincirli kolonlar tercih edilmemiştir. Bileşiklerin analizi için özellikle bazik yapıdaki analitlerin kolonla az etkileşimini sağlayan, kararlı bağ yapısına sahip siyano kolon tercih edilmiştir. Zorbax SB-CN kolon apolar yapıda olduğu için su-metanol veya su-asetonitril ikili karışımları en iyi hareketli faz bileşenleridir.

Sabit kolon sıcaklığı 37°C ve 1 ml/dk akış hızında, %50, %55 ve %60 (v/v) metanol içeren metanol-su hidroorganik karışımlarını içeren hareketli fazlarda bileşiklerin t_R değerleri üç tekrarlı analiz sonucunun ortalaması alınarak belirlenmiştir. Ayrıca her bir koşulda kolonda tutulmayan tür urasil kullanılarak ölçü zaman değerleri de belirlenmiştir. Yapılan kalitatif analizler sonucu elde edilen veriler kullanılarak her bir koşul için bileşiklerin kapasite faktörü değerleri hesaplanmıştır. Çalışılacak hareketli faz pH değeri bileşiklerin $pK_a \pm 1,5$ aralığında seçilmiştir. Bileşiklerin pK_a değerine yönelik herhangi bir deneysel veri olmadığından bu fizikokimyasal parametrenin belirlenmesi için tahmini hesaplama yapan Chemicalize programı [20] kullanılmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapılarında bulunan imidazol grubunun bazik azot (1 nolu azot) atomuna ait pK_a değeri 7 civarındadır (Şekil 1). Bunun için analiz yapılacak pH değerleri pH 4 ve pH 5,5 olarak seçilmiştir. Analiz yapılan kolonun sınır pH değeri 8 olduğundan çalışma pH değeri 7'nin üzerine çıkılmamıştır. pH 7'de bileşiklerin pik simetrisi ve tekrarlanabilirliği iyi olmayacağından bileşiklerin pK_a değerlerinin olduğu pH'da çalışma yapılmamıştır [16, 17].

Hareketli fazda metanolün hacimce yüzdesiyle (ϕ , %50, %55 ve %60, v/v) bileşiklerin logaritmik kapasite faktörü değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrusal ilişkiler pH 4 ve pH 5,5 için sırasıyla Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 2: pH 4'te elde edilen ϕ -logk ilişkisini gösteren grafikler



Şekil 3: pH 5,5'ta elde edilen ϕ -logk ilişkisini gösteren grafikler

Bu grafiklerden elde edilen doğrusal fonksiyonların kesim değeri Eşitlik 1'e göre $\log k_w$ değerini vermektedir. Bu veriye göre herhangi bir deney yapmadan bileşiklerin k_w değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan veriler Tablo 1'de verilmiştir. Kromatografik analizlerde istenilen k değeri 1-5 arasındadır. Hesaplanan bu verilere göre su ortamında hesaplanan k değerleri çok büyüktür. Bu değerlere göre t_R değerlerinin de çok yüksek olacağı ve bu koşulda bu bileşiklerin su ortamında analizlenemeyeceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bazik fonksiyonel gruba sahip bileşiklerin pH değişimine bağlı olarak iyonlaşmakta ve pH değeri arttıkça kolonda alıkonna zamanları da artmaktadır [16]. İki farklı pH değerinde elde edilen k ve k_w değerleri bu durumu desteklemektedir.

Tablo 1: Çalışılan bileşiklerin hesaplanan k_w değerleri

| Bileşikler | pH 4 | pH 5,5 |
|-------------|--------|---------|
| Klumbazol | 215,30 | 570,80 |
| Klotrimazol | 471,20 | 3718,80 |
| Lanokonazol | 498,20 | 914,90 |

Şekil 1 ve Şekil 2'de verilen grafiklerin doğrusal fonksiyonlarında (Eşitlik 1) ϕ değeri yerine metanolün deneysel çalışma dışındaki herhangi bir hacimce yüzde değeri konulduğunda bileşikler için k değerleri tahmin edilebilmektedir. Bunun için yapılan deneysel çalışma aralığı dışındaki %5, %45 ve %70 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımları için bileşiklerin k değerleri de herhangi bir deney yapmadan hesaplanabilmektedir (Tablo 2).

Tablo 2: Bileşiklerin hesaplanan k değerleri

| Bileşikler | pH 4 | | | pH 5,5 | | |
|-------------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | %5 (v/v) | %45 (v/v) | %70 (v/v) | %5 (v/v) | %45 (v/v) | %70 (v/v) |
| Klumbazol | 136,70 | 3,60 | 0,37 | 344,95 | 6,14 | 0,49 |
| Klotrimazol | 281,45 | 4,56 | 0,35 | 2010,44 | 14,67 | 0,68 |
| Lanokonazol | 304,00 | 5,84 | 0,49 | 533,69 | 7,15 | 0,48 |

Tablo 2'deki verilere göre k değeri 1-5 arasında olması gerektiğinden pH 5,5'da %5, %45 ve %70 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımlarında bu bileşiklerin analizi mümkün değildir. pH 4'te ise sadece %45 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımlarında klumbazol ve klotrimazolün tayinin mümkün olabilmektedir.

ϕ -logk ilişkisine göre belirlenen doğrusal fonksiyonların eğim değeri S hareketli fazda kullanılan metanolün gücü ile ilgilidir. Bu değer bir hidrofobik parametre ($\log P$) değerine alternatif olarak önerilmiştir [16]. Tayini yapılan analitlerin kolonun hidrofobik yüzey alanı ile olan etkileşimini göstermektedir. Grafiğin eğim değerinden elde edilen S değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Bu verilere göre Kolondan ilk

elue olan bileşik klmbazol, en son elue olan bileşik klotrimazoldür. Ayrıca hareketli faz pH değişimine bağlı olarak bazı bileşiklerin kolonla etkileşiminin fazla olması bu sonuçları desteklemektedir.

Tablo 3: Bileşikler için hesaplanan S değerleri

| Bileşikler | pH 4 | pH 5,5 |
|-------------|------|--------|
| Klmbazol | 3,95 | 4,38 |
| Lanokonazol | 4,29 | 4,68 |
| Klotrimazol | 4,48 | 5,34 |

Bileşiklerin Swiss ADME programıyla hesaplanan logP değerleri sırasıyla klmbazol için 3,69, lanokonazol için 4,08 ve klotrimazol için 4,98'dir [19]. Bu değerler bileşiklerin hidrofobikliğini gösterdiği gibi aynı zamanda kolondan elue edilme sırasını da göstermektedir. Bu sonuçlara göre tahmin edilen bu değerler, bileşiklerin S değerleriyle uyumludur.

Bu çalışmada hareketli fazda pH standardizasyonu [21] esas alınarak çalışmaya uygun sabit kolon sıcaklığı 37°C seçilerek hareketli faz bileşimi ve pH'sı belirlenmeye çalışılmıştır. Bileşiklerin pH 4 ve pH 5,5'da %50, %55 ve %60 (v/v) metanol içeren metanol-su hidroorganik karışımlarında hesaplanan k ve α değerleri Tablo 4 ve Tablo 5'te verilmiştir.

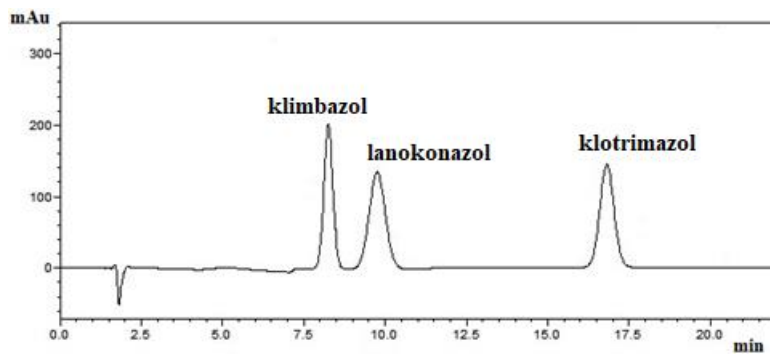
Tablo 4: Bileşiklerin farklı pH değerlerinde hesaplanan k değerleri

| Bileşikler | pH 4 (k değeri) | | | pH 5,5 (k değeri) | | |
|-------------|-----------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|
| | %50 (v/v) | %55 (v/v) | %60 (v/v) | %50 (v/v) | %55 (v/v) | %60 (v/v) |
| Klmbazol | 2,23 | 1,52 | 0,90 | 3,62 | 2,34 | 1,33 |
| Klotrimazol | 2,69 | 1,67 | 0,96 | 8,09 | 4,13 | 2,36 |
| Lanokonazol | 3,54 | 2,21 | 1,32 | 4,16 | 2,45 | 1,42 |

Tablo 5: Bileşiklerin hesaplanan seçicilik faktörü değerleri

| % v/v | pH 4 | | pH 5,5 | |
|-------|--|---|--|---|
| | $\alpha_{\text{klotrimazol/klmbazol}}$ | $\alpha_{\text{lanokonazol/klotrimazol}}$ | $\alpha_{\text{lanokonazol/klmbazol}}$ | $\alpha_{\text{klotrimazol/lanokonazol}}$ |
| %50 | 1,20 | 1,32 | 1,15 | 1,94 |
| %55 | 1,10 | 1,32 | 1,05 | 1,69 |
| %60 | 1,07 | 1,37 | 1,07 | 1,67 |

Tablo 4'teki verilere göre k değeri 1-5 arasında olan hareketli faz içeriği %50 ve %55 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımı için bileşiklerin kalitatif tayini mümkündür. Eşitlik 2 kullanılarak bileşik çiftleri için α değerleri hesaplanmıştır. Tablo 5 incelendiğinde $\alpha \geq 1,15$ olan koşul pH 4 ve pH 5,5 için %50 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımı için mümkündür. Ancak hesaplanan ve tahmin edilen hidrofobisite parametrelerine göre HPLC kolonundan sırasıyla klmbazol, lanokonazol ve klotrimazol elue olmalıdır. Bu koşulu sağlayan hareketli faz pH değeri 5,5'dur. Bu optimum koşulda elde edilen ayırmayı gösteren kromatogram Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4: Optimum ayırma koşulunu gösteren kromatogram

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada günümüzde sıklıkla kullanılan antifungal ajanlardan klotrimazol, lanokonazol ve klimbazolon aynı anda tayinine yönelik ters faz sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemin optimizasyonu için öncelikle bileşiklerin $pK_a \pm 1,5$ aralığındaki hareketli faz pH değerleri ve çalışılacak metanol-su ikili karışımlarındaki metanolün hacimce yüzdesi belirlenmiştir. Hareketli fazda metanolün hacimce yüzdesiyle bileşiklerin tayin edilen kapasite faktörü değerinin doğrusal ilişkisi kullanılarak deneysel çalışma yapmadan farklı hacimdeki ikili karışımlar için kapasite faktörü tahmin edilmiştir. Ayrıca elde edilen doğrusal fonksiyonların eğim değerinden bulunan hidrofobisite sabiti (S) değerlerinden yararlanılarak bu üç bileşiğin HPLC kolonundan elue edilme sırasıda belirlenmiştir. Bileşiklerin üç farklı yüzdesinde metanol içeren metanol-su ikili karışımlarında hesaplanan kapasite faktörü değerleri kullanılarak bileşiklerin seçicilik faktörü (α) değerleri hesaplanabilmiştir. Bu değerler kullanılarak üç bileşik için optimum ayırma koşulu pH'sı 5,5 olan %50 (v/v) metanol içeren metanol-su ikili karışımı olarak belirlenmiştir. Bu bileşiklerin aynı anda tayinine yönelik deneme yapılmadan uzak olarak yapılan bu çalışma literatürde bir ilktir. Son yıllarda RPLC yöntemle yapılan çalışmalar incelendiğinde bu şekilde sistematik olarak gerçekleştirilmiş bir çalışma yoktur. Ayrıca bileşiklerin analizi için çoğunlukla C18 kolonlar tercih edilmiştir. Belirlenen bu kromatografik ayırma koşulu bileşiklerin aynı anda tayini edilmesi güncel bir metot olarak bu alanda çalışma yapanlara katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TYL-2022-8833) tarafından desteklenmiştir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L. 2008. 11th ed.; Goodman & Gilman's The pharmacology basis of therapeutics, McGrawHill eBooks, New York.
- [2] Kadavakollu, S., Stailey, C., Kunapareddy, C. S., White, S. 2014. Clotrimazole as a Cancer Drug: A Short Review. Med Chem, 4(11), 722–724.
- [3] Baghi, N., Shokohi, T., Badali, H., Makimura, K., Rezaei-Matehkolaei, A., Abdollahi, M., Didehdar, M., Haghani, I., Abastabar, M. 2016. In vitro activity of new azoles luliconazole and lanoconazole compared with ten other antifungal drugs against clinical dermatophyte isolates. Medical Mycology, 54(7), 757–763.
- [4] Pan, G. C., Peng, F. J., Ying, G. G. 2018. Removal, biotransformation and toxicity variations of climbazole by freshwater algae Scenedesmus obliquus. Environmental Pollution, 240, 534-540.
- [5] Iqbal, D. N., Ashraf, A., Iqbal, M., Nazir, A. 2020. Analytical method development and validation of hydrocortisone and clotrimazole in topical dosage form using RP-HPLC. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 6(49), 1-7.
- [6] Kumaraswamy, G., Kumar, D. S., Joru, P., Emmadi, S. 2017. RP-HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Lignocaine Hydrochloride and Clotrimazole Hydrochloride in Ear Drops. Asian Journal of Pharmaceutical Analysis, 7(3),163-168.
- [7] Paz-Alvarez, M., Pudney, P. D. A., Hadgraft, J., Lane, M. E. 2018. Topical delivery of climbazole to mammalian skin. International Journal of Pharmaceutics, 549(1-2), 317-324.
- [8] Zhong, Y., Chen, Z. F., Liu, S. S., Dai, X., Zhu, X., Zheng, G., Liu, S., Liu, G., Cai, Z. 2017. Analysis of azole fungicides in fish muscle tissues: Multi-factor optimization and application to environmental samples. Journal of Hazardous Materials, 324, 535–543.

- [9] Üstün, Z., Demiralay, E. Ç. 2017. Simultaneous Quantitative Determination of Imidazole Antimycotics in Human Urine by using RPLC Technique. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12(6), 953-962.
- [10] Roses, M., Bosch, E. 2002. Influence of hareketlie phase acid–base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds. *Journal of Chromatography A*, 982, 1–30.
- [11] Demiralay, E. Ç., Cubuk, B., Ozkan, S. A., Alsancak, G. 2010. Combined effect of polarity and pH on the chromatographic behaviour of some angiotensin II receptor antagonists and optimization of their determination in pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal*, 53, 475–482.
- [12] Erdemgil, F. Z., Sanli, S., Sanli, N., Ozkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J., Beltrán, J.L. 2007. Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, 72, 489–496.
- [13] Horváth, C., Melander, W., Molnár, I. 1977. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases. *Anal Chem*, 49, 142–154.
- [14] Subirats, X., Bosch, E., Rose's, M. 2006. Retention of ionisable compounds on high-performance liquid chromatography XV. Estimation of the pH variation of aqueous buffers with the change of the acetonitrile fraction of the hareketlie phase. *J Chromatogr A*, 1121, 170–177.
- [15] Secilmis, H. C., Demiralay, E. C., Alsancak, G., Ozkan, S. A. 2012. The Combined Effect of the Organic Modifier Content and pH of the Hareketlie Phase on the Chromatographic Behavior of Some Arylpropionic and Arylacetic Acids to Optimize Their Liquid Chromatographic Determinations. *Chromatographia*, 75, 711–720.
- [16] Poole, C. F., Poole, S. K. 1991. *Chromatography Today*. First Ed., Elsevier Science B.V. Amsterdam, 715s.
- [17] Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. 2007. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, First ed., Wiley-Interscience, USA, 1140s.
- [18] Meyer, V. R. 2010. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fifth ed., John Wiley and Sons, United Kingdom, 428s.
- [19] Swiss ADME program, 2023. <http://www.swissadme.ch/index.php> (Erişim Tarihi: 26.07.2023).
- [20] Chemicalize program, Kimyasal Hesaplama. <https://chemicalize.com/#/calculation> (Erişim Tarihi: 10.03.2016).
- [21] Mussini, T., Covington, A. K., Longhi, P., Rondinini, S. 1985. Criteria for Standardization of pH Measurements in Organic Solvents and Water + Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure and Applied Chemistry*, 57(6), 865- 876.