

İlaç Analizlerinde İleri Yöntemler-I-Fluorometri

Aytekin TEMİZER (*)

Farmasötik ürünlerin analizi bugün için hayati önemi olan bir konu niteliğindedir. Bu tip analizlerde karşılaşılan analitik problemlerin incelenmesiyle şu şekilde bir sıralamaya uygulanabileceği görülmektedir :

1) İlaç formülasyonlarındaki safsızlıkların tanımı, ayırımı ve tayini,

2) İlaç ham maddesi referans standardının saflık kontrolü,

3) İlaç kalite kontrolü için rutin testler,

4) Düşük doz formülasyonlarında içerik tekdüzellik testi,

5) İlaç etken maddesi ve formülasyonlarında nem, artık çözücü, ağır metaller ve koruyucular gibi maddelerin tayini,

6) İlaç etken maddelerinin ve formülasyon şekillerinin kimyasal ve fiziksel kararlılığının tayini,

7) İlaç etken maddelerin ve formülasyonlarının kristal şekli, çözünme hızı, parçalama hızı, sertliği, pH, renk gibi fiziksel özelliklerinin tayinidir.

Problemin özelliğine göre yaklaşımda farklı olacaktır. Örneğin saflık kontrolü için yüksek duyarlılıkta yöntem gereken varken numuneden istenilenin ayrılması o kadar hassas olmayabilir. Modern farmasötik analizlerde cihazlar yardımıyla yapılan aletli analizler çok önemli olup genel olarak klasik yöntemlerle birlikte kullanılır ilaç kalite kontrolünün rutin olarak yapılmasında klasik yöntemler hala önemini korumaktadır.

İlacın piyasaya sürülmesi öncesi yapılması gereken analitik işlemler şunlardır :

1) İlaç üretiminde kullanılan başlangıç ve ara maddelerinin saflık kontrolleri,

(*) H.Ü. Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı, Hacettepe - Ankara.

- 2) İlaçların saflık kontrolleri,
- 3) İlaçlardaki eser safsızlıkların ayırım ve tanımı,
- 4) İlaçların parçalanma hız ve ürünlerin tayinidir.

İlaç kalite kontrolü için analiz yöntemlerini sınıflandırırsak :

1) Tanıma testleri :

Bu testler hammaddenin ve formülasyondaki etken maddenin tanınması amacıyla yapılır. Kullanılan testler: renk reaksiyonları, ilaç veya türevinin ergime noktası tayini, çökelek oluşturması IR veya NMR spektrumları, kütle spektrumu, X-ışınları difraksiyon, kromatografik özellikler, optik çevirme, kırılma indisi ve yoğunluk ile elektroanalitik yöntemlerdir.

2) İlaç miktar tayinleri :

Formülasyon içerisindeki etken maddenin veya ilaç maddesinin yüzde saflığının tayin edilmesi amacıyla yapılır. Bunun için iki yöntem bulunmaktadır :

a) Mutlak yöntem : Titrasyon, gravimetri, kalorimetri, kulometri, NMR spektrometrisi ve faz çözünürlük analizleridir.

b) Relatif yöntemler : Gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, spektrometri (UV-VİS-IR), FLUOROMETRİ, polarografi ve mikrobiyolojik yöntemlerdir.

3) Safsızlık analizleri : İlaçlarda, su, çözücü, metal ve eser or-

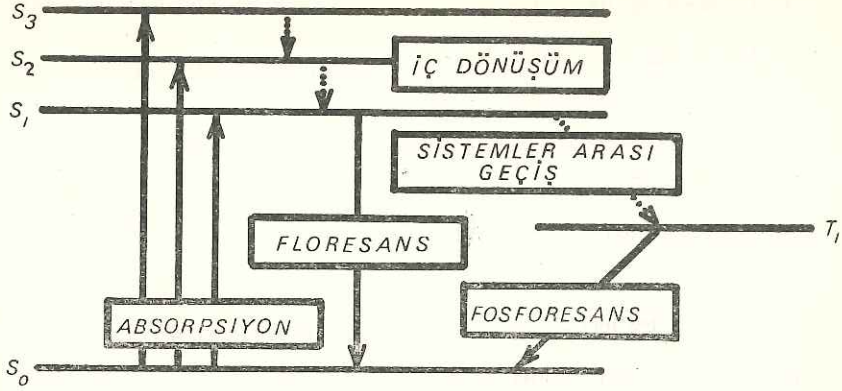
ganik safsızlıkların miktarının tayini amacıyla yapılır. İlaç miktar tayini için kullanılan testlerin yanı sıra, atomik absorpsiyon, atomik emisyon, ince tabaka kromatografisi, leke testleri ve elektroanalitik yöntemler de kullanılır.

4) Kromatografik tarama testleri : İlaçların safsızlıklarının nitel olarak gösterilmesi amacıyla kağıt, ince tabaka, gaz, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve elektroforez ile analiz edilebilir.

5) Diğer çeşitli yöntemler : Kayıtlı özelliklere etkide bulunan bazı spesifik özelliklerin kontrolü amacıyla, kristal şekillerinin incelenmesi, sterilitesi, pirojen, parçacık büyüklüğü, yabancı madde, yoğunluk, renk ve koku gibi özelliklerinin ölçülmesidir.

Molekülün ışığı belli bir dalga boyunda absorplanmasından çok kısa bir zaman sonra ve genellikle daha büyük dalga boyunda ışık emisyonu şeklinde yayması olayına FLUOROSANS adı verilir (1, 2).

Elektromanyetik spektrumun ultraviyole ve görünür bölgesinde absorban ölçümlerine göre fluoro-sans emisyonlarının şiddetlerinin ölçülmesi ile duyarlık ve seçicilik çoğaltılmış olmaktadır. Yayılan ışığın şiddetinin konsantrasyonla orantılı olması sonucunda nicel analizler yapılabilmektedir. Ancak yüksek duyarlıkta çalışmalar gerektiren eser madde analizlerinde dikkat edilmesi gereken önemli ba-



Şekil 1. JABLONSKİ Diyagramı (3)

zı noktalar bulunmaktadır. Molekülün değerlik elektronları ışık absorpsiyonu yaparak elektronik uyarılmış seviyelerden birine yükseldikten sonra, her zaman gözlenebilen bir emisyon oluşturmamasının nedeni, ışımalı ve ışısız olayların yarış içerisinde olmasıdır.

Bu olaylar en iyi bir şekilde JABLONSKİ diyagramı ile açıklanabilir (3).

Işık absorpsiyonu sonucunda elektron, singlet temel seviyeden (S_0), singlet uyarılmış seviyelerden birine (S_1, S_2, S_3) gelen ışığın dalga boyuna bağlı olarak gider. Elektron, kazanmış olduğu fazla enerjiyi, titreşim seviyeleri arasında düşme, iç dönüşüm ($S_3 \rightarrow S_2, S_2 \rightarrow S_1$), sistemler arası geçiş ($S_1 \rightarrow T_1$) ve ürün oluşturan kimyasal reaksiyonlar şeklinde ışısız olarak harcayabileceği gibi, uyarılmış singlet seviyeden, singlet temel seviyeye ($S_1 \rightarrow S_0$) (fluoro-

sans) ve uyarılmış triplet seviyeden, singlet temel seviyeye ($T_1 \rightarrow S_0$) (fosforesans) ışımaya yaparak dönerken de geri verebilir.

Kromofor tarafından absorplanan ışığın fluorosans şeklinde geri yayılan bölümüne fluorosans kuantum verimi (Φ_F) adı verilir :

$$\Phi_F = \frac{\text{Birim hacimde yayılan fotonların sayısı}}{\text{Birim hacimde absorplanan fotonların sayısı}}$$

Fluorosans şiddeti (F) ise :

$$F = I_0 (1 - e^{-abc}) \Phi_F$$

I_0 = numuneye gelen ışık şiddeti,
 a = molar absorptivite değeri,
 b = numune ışık yolu kalınlığı (cm)
 c = molar konsantrasyon,
 Φ_F = fluorosans kuantum verimi

Ancak uyarılma dalga boyunda çözeltinin absorbasının ufak, Φ_F ve I_0 değerlerinin sabit ve konsantrasyonun düşük olduğu durumlarda :

$F = I_0 \cdot 2.303 \cdot a \cdot b \cdot c \cdot \Phi_F$ eşitliği kullanılabilir.

Bu eşitliği ($F = \text{sabit} \times C$) şeklinde de yazabiliriz.

Fluorosans şiddetine etki eden faktörler bu tip çalışmalarda göz önüne alınması gereken en önemli husustur. Bunlar :

1) Fluorosans kauntum verimine etki eden faktörler :

a) Sıcaklık ve viskozite

Molekülün enerjisi ve frekansının artmasıyla iç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve enerji transfer hızları da artar. Dolayısıyla sıcaklığın düşürülüp viskozitenin çoğalması ile Φ_F daha büyük değerlere sahip olur.

b) Çözücü ve pH:

Çözücünün polaritesi arttıkça, emisyon spektrumunda büyük dalga boylarına kayma görülür. Hidrojen bağı veya kompleks oluşumu Φ_F 'yi azaltır.

c) Diğer çözünenlerin etkisi :

Ortamda bulunan diğer çözünmüş maddeler, ağır atomlar ve halojenler fluorosans verimini oldukça çok düşürürler. Bu nedenle çok saf çözeltiler ve karışım halinde olmayan maddeler ile çalışılmalıdır.

2) Gelen ışık şiddetine ve fluorosans şiddetine etki eden faktörler :

a) İç filtre etkisi :

Çözeltinin absorptivitesi küçük değilse fluorosans şiddeti ile konsantrasyon doğrusal değişmeyeceğinden düzeltilmesi gerekmektedir.

$$F_D = \frac{2.303 A (X_2 - X_1)}{10^{-Ax_1} - 10^{-Ax_2}}, F_G$$

A = Uyarma dalga boyunda çözeltinin absorpsiyonu

$X_2 - X_1$ = emisyon slit kalınlığı

F_D, F_G = Düzeltilmiş ve gözlenen fluorosans şiddeti.

b) Saçılmış ışık ve safsızlıklardan gelen emisyon :

Asılı duran parçacıklardan Tyndall saçılması, çözücünden gelen Rayleigh ve Raman saçılması ve numune kabından gelen ışık saçılması gözlenen fluorosans şiddetini etkileyen hususlardır.

KAYNAKLAR

1. Schirmer, R.E., *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, Florida, CRC Press, Inc. Cilt 1, s. 189, 1982.
2. Phillips, D. and Salisbury, K., «Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy», Stangan, B.P. and Walker, S., (ed). *Spectroscopy*, New York, Chapman and Hall Ltd. Cilt 3, s. 161, 1976.
3. Moore, W.J., *Physical Chemistry*, New Jersey, Prentice-hall, Inc., s. 747, 1972.