

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AMOKSİSİLİNİN FARKLI MATRİKSLERDE YÜKSEK BASINÇLI
SIVI KROMATOĞRAFI SİSTEMİ İLE DÜŞÜK SEVİYELERDE
TAYİNİ**

TUĞÇE UNUTKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. SEYFULLAH KEYF**

**EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEZGİN BAKIRDERE**

İSTANBUL, 2016

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AMOKSİSİLİNİN FARKLI MATRİKSLERDE YÜKSEK BASINÇLI
SIVI KROMATOĞRAFI SİSTEMİ İLE DÜŞÜK SEVİYELERDE
TAYİNİ

Tuğçe UNUTKAN tarafından hazırlanan tez çalışması 10 Mayıs 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Seyfullah KEYF
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Seyfullah KEYF
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Fatma TURAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yusuf DİLGİN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Prof. Dr. Fırat AYDIN
Dicle Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2014-07-01-KAP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Kimya Mühendisliği'nde yapmış olduğum yüksek lisans öğrenimim boyunca ve hazırlamış olduğum tez sürecimde maddi manevi sonsuz yardımları dokunan, çalışmamın her aşamasında yol gösteren değerli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Seyfullah Keyf'e,

Bana mesleğimi daha çok sevdiren, yaptığım çalışmalardaki yol göstericiliğiyle ve zekasıyla çalışmalarımındaki başarılarımın kilit anahtarı değerli eş danışmanım Doç. Dr. Sezgin Bakırdere'ye,

Tez çalışmalarım ve hayatımda bana her konuda destek olan dostlarım Elif Seda Koçoğlu, Hakan Serbest ve Ezgi Sarıbaş'a,

Laboratuvar çalışmalarım çok büyük yardım ve desteği olan Dotse Selali Chormey'e ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemi sağlayan, her koşulda yanımda olduklarını bana daima hissettiren ve her türlü fedakârlığı gösteren sevgili aileme teşekkür ederim.

Mayıs, 2016

Tuğçe UNUTKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	3
BÖLÜM 2	
ANTİBİYOTİKLER.....	4
2.1 Antibiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi	4
2.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması.....	5
2.2.1 Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma	5
2.3 Antibiyotik Direnci	5
2.4 Akılcı Antibiyotik Kullanımı.....	6
BÖLÜM 3	
AMOKSİSİLİN	7
3.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	7
3.2 Amoksisilinin Antibiyotiklerdeki Yeri	7
3.3 Farmakokinetik Özelliği	8
3.4 Amoksisilinin İlaç Endüstrisindeki Yeri.....	8

BÖLÜM 4

İLAC ETKEN MADDE MİKTAR TAYİNLERİ	10
4.1 Spektroskopik Yöntemlerle Miktar Tayini	10
4.2 Elektroanalitik Yöntemler	11
4.3 Kromatografik Yöntemler	12
4.3.1 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	12
4.4 Amoksisilin Miktar Tayin Yöntemleri	13

BÖLÜM 5

YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)	14
5.1 HPLC Türleri	14
5.2 HPLC Temel Donanımları	15
5.2.1 Mobil Faz	15
5.2.2 Pompa	15
5.2.3 Enjektör	16
5.2.4 Kolon	16
5.1.4.1. Kolonda alıkonma süresi	16
5.1.4.2. Rezolüsyon	17
5.2.5 Dedektör	18
5.2.6 Görüntüleme Sistemi	18
5.3 Kromatografik Koşulları Etkileyen Faktörler	19
5.3.1 Sıcaklık	19
5.3.2 pH	19
5.3.3 Mobil Fazda Tampon Konsantrasyonu	19
5.4 HPLC ile İlgili Yapılan Çalışmalar	20

BÖLÜM 6

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
6.1 Kullanılan Cihazlar	22
6.1.1 HPLC Donanımı	22
6.1.2 Kolonlar	23
6.1.3 Diğer Ekipmanlar	23
6.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
6.3 Optimizasyon Çalışmaları	24
6.4 Amoksisilin Sistem Analitik Performansının Tespiti	28
6.5 Farklı Ortam Koşullarında Amoksisilin Bozunma Tayini	31
6.6 İnertsil Kolonda Optimizasyon Çalışmaları	33
6.7 İnertsil Kolonda Amoksisilin Sistem Analitik Performansı	34
6.8 İlaç Endüstrisinde Amoksisilin İçeren İlaçların HPLC Sisteminde Miktar Tayini	36
6.8.1 Marka A	37
6.8.2 Marka B	38
6.8.3 Marka C	40
6.8.4 Marka D	41
6.9 Amoksisilin Yapay Mide Ortamındaki Davranışı	43

6.10 Atıksu Numunelerinde Bulunan Amoksisilinin Kantitatif Tayini.....	45
6.11 Amoksisilinin Biyoerişilebilirlik Çalışması.....	48
BÖLÜM 7	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	64



SİMGE LİSTESİ

°C	Derece Celsius
i	Net akım
k	Kapasite faktörü
M	Molar
mm	Milimetre
ng	Nanogram
R	Rezolüsyon
t _A	A bileşenin alıkonma süresi
t _B	B bileşenin alıkonma süresi
t _r	Analizin detektöre ulaşma zamanı
t ₀	Ölü zaman
v	Hacim
w _B	B bileşenin pik genişliği
w _A	A bileşenin pik genişliği
µL	Mikrolitre

KISALTMA LİSTESİ

ACN	Asetonitril
DAD	Diyot Dizi Dedektör
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
min	Dakika
MS	Kütle Spektroskopisi
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
ODS	Oktadesilsilan
PC	Kağıt Kromatografi
RI	Reaktif İndeksi
RP	Ters Fazlı
TEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TLC	İnce Tabaka Kromatografi
UV	Ultraviyole
XRD	X Işını Difraksiyonu

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1 Amoksisilinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 4.1 Elektroanalitik yöntemlerden dinamik yöntemin sınıflandırılması	11
Şekil 5.1 HPLC sisteminin şematik gösterimi	15
Şekil 5.2 HPLC’de alıkonma zamanı parametrelerinin şematik gösterimi.....	17
Şekil 5.3 HPLC’de rezolüsyon parametrelerinin şematik gösterimi.....	18
Şekil 6.1 HPLC cihazı.....	23
Şekil 6.2 %15 CH ₃ OH - %85 Tampon (pH 8.5) sisteminde amoksisilinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogram	27
Şekil 6.3 Phenomenex kolonda amoksisilinin 5.0-1000 mg L ⁻¹ aralığındaki kromatogramları.....	28
Şekil 6.4 Amoksisilin pik alanı kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği.....	28
Şekil 6.5 Amoksisilin pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği	29
Şekil 6.6 0.05 mg L ⁻¹ standart amoksisilin çözeltisinin optimum şartlar altında sisteme gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar	29
Şekil 6.7 Amoksisilinin oda koşulunda 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi	31
Şekil 6.8 Amoksisilinin buzdolabında 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi .	31
Şekil 6.9 Amoksisilinin derin dondurucuda 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi	32
Şekil 6.10 Inertsil kolonda (Çalışma 4, Çizelge 6.3) amoksisilinin 5.0-100 mg L ⁻¹ derişim aralığında elde edilen kromatogramları	34
Şekil 6.11 Inertsil kolonda (Çalışma 4, Çizelge 6.3) pik alanı kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği	35
Şekil 6.12 Inertsil kolonda (Çalışma 4, Çizelge 6.3) pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 6.13 Marka A numunelerinin HPLC sisteminde (Çalışma 4, Çizelge 6.3) elde edilen kromatogramı	37
Şekil 6.14 Marka A ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar	38
Şekil 6.15 Marka B numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı.....	39
Şekil 6.16 Marka B ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar	39
Şekil 6.17 Marka C numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı.....	40
Şekil 6.18 Marka C ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar	41
Şekil 6.19 Marka D numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı	42

Şekil 6.20	Marka D ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar	42
Şekil 6.21	Amoksisilinin yapay mide ortamında bekleme sürelerine ilişkin kromatogramları.....	43
Şekil 6.22	Amoksisilinin yapay mide ortamında 0. min ve 240. min' deki bekleme sürelerine ilişkin kromatogramları.....	44
Şekil 6.23	Amoksisilinin mide ortamında 120. dakika bekleme süresinde ve bu numuneye spike deneyi sonrasında elde edilen kromatogramlar	45
Şekil 6.24	Atıksu örneğinden optimum şartlarda elde edilen kromatogramlar	46
Şekil 6.25	Spike edilmiş atıksu örneğinden elde edilen HPLC kromatogramı.....	47
Şekil 6.26	Standard ilave edilmiş ve spike edilmiş örneklere ait kromatogramların büyütülmüş halleri	48
Şekil 6.27	Kereviz, kıvırcık, marul ve nane için hazırlanan topraksız tarım sistemi.....	49
Şekil 6.28	Kıvırcık için amoksisilin içeren besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki kromatogramları.....	50
Şekil 6.29	Kıvırcık için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için kromatogramları.....	50
Şekil 6.30	Kereviz için amoksisilin içeren besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki kromatogramları.....	51
Şekil 6.31	Kereviz için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için kromatogramları.....	51
Şekil 6.32	Marul için amoksisilin içeren besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki kromatogramları.....	52
Şekil 6.33	Marul için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için kromatogramları.....	52
Şekil 6.34	Nane için amoksisilin içeren besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki kromatogramları.....	53
Şekil 6.35	Nane için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için kromatogramları.....	53

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Amoksisilin içeren ilaçlar	9
Çizelge 6.1 HPLC sisteminde amoksisilin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları.....	25
Çizelge 6.2 Amoksisilin için elde edilen sistem analitik performans değerleri	30
Çizelge 6.3 HPLC sisteminde amoksisilin alıkonmasına yönelik farklı kolon için yapılan optimizasyon çalışmaları	33
Çizelge 6.4 İnertsil kolonda amoksisilin için elde edilen sistem analitik performans değerleri.....	36
Çizelge 6.5 Amoksisilinin mide ortamında bekleme sürelerine ilişkin HPLC sistemindeki analiz verileri	44
Çizelge 6.6 Bitkiler için kullanılan besiyerin amoksisilin ve blank çalışması için bileşimleri.....	49

**AMOKSİSİLİNİN FARKLI MATRİKSLERDE YÜKSEK BASINÇLI
SIVI KROMATOĞRAFİ SİSTEMİ İLE DÜŞÜK SEVİYELERDE
TAYİNİ**

Tuğçe UNUTKAN

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Seyfullah KEYF

Eş Danışman: Doç. Dr. Sezgin BAKIRDERE

Bu tezde, amoksisilin ilaç etken maddesinin tayini için HPLC-UV sisteminde analitik bir metod geliştirilmiştir. Sistemin değişken tüm parametreleri optimize edilerek analitin düşük seviyelerde tayin edilmesine yönelik deneysel çalışmalar yapılmıştır. Optimizasyon sonrasında amoksisilin tayininin Phenomenex Nucleosil C₁₈ kolonunda 0.80 mL min⁻¹ akış hızında %15 metanol-%85 fosfat tamponundan (pH 8.5) oluşan hareketli fazın kullanılması ile 230 nm dalga boyunda yapılmasına karar verilmiştir. Amoksisilin için sistem analitik performansı tespiti yapılmış, 0.5-1000 mg L⁻¹ aralığında hazırlanan standartlar ile yapılan tayinler sonucunda pik alanı için LOD değeri 0.016 mg L⁻¹, LOQ değeri 0.052 mg L⁻¹ ve korelasyon katsayısı (R²) değeri 1.0000 olarak bulunmuştur. İlk çalışmada hazırlanan 100 mg L⁻¹ standart amoksisilin 30 gün için 3'er günlük periyotlarla analiz edilmek koşuluyla oda koşulu (25°C), buzdolabı (4°C) ve derin donduruya (-28°C) konularak zaman içerisindeki davranışları incelenmiştir. Amoksisilin oda koşulunda 12 günde bozunurken, buzdolabı ve derin dondurucuda bozunmadığı tespit edilmiştir.

Piyasada bol tüketimi olan Marka A (süspansiyon), Marka B (süspansiyon), Marka C (tablet) ve Marka D (tablet) ilaçlarının yapılarında bulunan amoksisilin kalitatif ve kantitatif tayini amacı ile analiz edilmiştir. Amoksisilin mide ortamındaki davranışının tespiti amacı ile yapılan çalışmada, mide ortamı hazırlandıktan sonra Marka D antibiyotigidinden bir adet tablet yapay mide sıvısına atılmıştır. 0. ve 240. dakika arasında her yarım saatte bir numune alınarak analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre zamanla

amoksisilin pik alanı ve yüksekliği azalırken, yaklaşık 3. dakikada başka bir pik oluştuğu, bu pikin alan ve yüksekliğinin zaman içerisinde arttığı gözlenmiştir.

Geliştirilen analitik yöntemin atıksu örneklerinde bulunan amoksisilin taininde kullanılabilirliğini tespit etmek amacı ile çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla atıksu örneği filtreden geçirilip optimum şartlar altında HPLC sisteminde analiz edilmiş ve örneğin amoksisilin içermediği görülmüştür. Örneğe 10 mg L⁻¹ derişim elde edecek şekilde stok çözeltilerden amoksisilin spike edilmiş elde edilen verilerden amoksisilin atıksudan geri kazanım veriminin %97 olduğu bulunmuştur.

Amoksisilin için yapılan biyoerişilebilirlik çalışması için ise dört farklı bitki (marul, kıvırcık, nane, kereviz) topraksız tarım ile yetiştirilmiştir. Bitkilerin yetişmesi için gerekli besinler amoksisilin çözeltilerinde hazırlanmıştır. Çözeltilerden ilk gün, 6. gün ve 12. günlerde alınan numunelerin analizleri sonucunda amoksisilin zamanla matriks kaynaklı olarak bozunduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amoksisilin, HPLC, İlaç, Yapay Mide Ortamı, Atıksu, Biyoerişilebilirlik

ABSTRACT

DETERMINATION OF LOW QUANTITIES OF AMOXICILLIN IN DIFFERENT MATRIXES WITH HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Tuğçe UNUTKAN

Department of Chemical Engineering

MSc. Thesis

Adviser: Asst. Prof. Dr. Seyfullah KEYF

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE

In this thesis, a highly sensitive analytical HPLC-UV method was developed for the determination of amoxicillin which is a pharmaceutical active compound. All variable parameters of the system was optimized and experimental studies were achieved for the determination of low levels of the analyte. After optimization studies, amoxicillin determination were decided to be performed on Phenomenex Nucleosil C₁₈ (100A 250x4.00 mm, 5 μ m) column with mobile phase with the ratio of %15 methanol (CH₃OH)-%85 phosphate buffer, 0.8 mg mL⁻¹ flow rate and UV detection at 230 nm. Linearity range for amoxicillin was found as 0.5-1000 mg L⁻¹. Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and correlation coefficient (R²) values for peak area are 0.016 mg L⁻¹, 0.052 mg L⁻¹ and 1.0000, respectively. As first study, 100 mg L⁻¹ standard amoxicillin behaviour was determined in room condition (25°C), refrigerator (4°C) and freezer (-28°C). In every 3 days since 30 day, a sample was taken from each and analyzed on HPLC system. Amoxicillin degraded in 12 days in room condition and did not degrade in refrigerator and freezer.

Amoxicillin in the structure of the most consumed drugs on the market as Brand A (suspension), Brand B (suspension), Brand C (tablet) and Brand D (tablet), was analyzed for the qualitative and quantitative determination. In a study performed for the behavior of amoxicillin in the simulated gastric juice, after the preparation of the simulated gastric juice, one tablet of Brand D was put into. A sample was taken in every half hour period between 0 min and 240 min for analyzing. Based on obtained datas, amoxicillin peak area and peak height was decreased in time while another undefined peak values at about 3 min was increased.

In order to determine the availability of the developed analytical method for the determination of amoxicillin in waste water samples, some studies was performed. A sample of wastewater was filtered and analyzed on HPLC system under the optimum conditions and it was observed that wastewater did not contain amoxicillin. Amoxicillin was spiked from stoke solution to wastewater. As a result of the obtained datas, the recovery efficiency from wastewater of amoxicillin was found as 97%.

Furthermore, 4 different plants (lettuce, cabbage, mint, celery) was grown with hydroponics for bioaccessibility study of amoxicillin. Plants with hydroponics were prepared with amoxicillin solutions containing the necessary nutrients for the growth of the plants. First day, 6. day and 12. day a sample was taken from each plant solution. As a result of analysis, it was observed that amoxicillin was degraded in time by matrix effect.

Keywords: Amoxicillin, Medicine, Simulated Gastric Juice, Wastewater, Bioaccessibility

1.1 Literatür Özeti

İlaçlar, insan ve hayvanlarda hastalıkların önlenmesinde, tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır [1]. Antibiyotikler, dünyada ve Türkiye’de en çok kullanılan ilaçlardandır [2], [3]. En geniş kullanım alanına sahip antibiyotikler ise beta laktam sınıfıdır. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta laktamaz inhibitörleri (klavulonat, sulbaktam, tazobaktam) olmak üzere sınıflandırılırlar [4], [5]. Penisilinler en önemli ve en eski antibiyotiklerdendir. Bakteriyel hücre duvarlarındaki peptidoglikan tabakanın sentezini engelleyici etkide bulunurlar [6], [7].

Amoksisilin, antibiyotik ilaçlardan penisilinler grubuna dâhildir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı belirgin etkinliğe sahip geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerindendir ve iyi bir oral biyoyararlılığa sahiptir [8], [9]. Buna karşın, beta laktam halkasının C-N bağı ayrılması nedeniyle gastrik asitte düşük bir karalılığa sahiptir [8], [10]. Tablet, kapsül ve süspansiyon gibi çeşitli formülasyonlarla ilaç endüstrisinde yer bulmuştur [8].

Amoksisilin tayininde en sık ve en başarılı şekilde kullanılan yöntemlerden biri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)’dir. HPLC uçucu olan ve uçucu olmayan bileşenleri analiz edebilme yeteneğiyle klinik laboratuvarlarda kullanılabilir [11]. HPLC bu alanda kullanılan en temel metottur. HPLC metod optimizasyonu, parametrelerin ve kimyasal değişkenlerin (mobil faz pH’sı, tampon tür ve konsantrasyonu, akış hızı, kolon sıcaklığı, detektör dalga boyu) çeşitliliği nedeniyle karmaşık bir işlemdir. Optimizasyon, ayırma seçiciliğini ve diğer performans kriterlerini gerçekleştirmek için önemli bir adımdır [12].

Ashnagar ve Gharib (2007), HPLC tekniğiyle bazı İnan ilaç Őirketlerinde ũretilen antibiyotik ilaçların her birindeki deđiŐen dozajdaki aktif bileŐeni inceleyip belirlemiŐlerdir. Bu çalışmada penisilin içindeki amoksisilin, kloksilin ve amfisilin saflığı tayin edilmiştir. Elde edilen sonuca göre, çeşitli dozaj formlarında kullanılan ilaçların aktif bileŐenlerinin saflık yũzdesi %100 olarak bulunmuştur [13].

Samanidou ve arkadaşları (2006), amoksisilin, oksasilin, kloksasilin ve dikolksasilin içeren 4 penisilin antibiyotiğini belirlemek için HPLC'de kantitatif tayin metodu geliştirmişlerdir. Biyolojik matrikteski penisilinli ilacın seçici çözeltiye alınmasından sonra Inertsil ODS-3 (250x4 mm, 5 µm) kolonda ayrıŐtırılmıŐtır. Mobil faz olarak 0.1% TFA (pH 1.0) ve ACN, PDA dedektrũnde 240 nm'de çalışılmıştır. İç standart olarak ise salisilik asit (5 ng µL⁻¹) kullanılmıştır. HPLC metodu biyolojik örneklere başarıyla uygulanmış ve %91 ve %103 arasında deđiŐen geri kazanım elde edilmiştir [14].

Dousa ve Hosmanova (2004), hazır karıŐımlarda amoksisilin miktar tayinini yapmak için HPLC metodu geliŐtirmiŐler ve test etmişlerdir. Hazır karıŐımlar 100 mL metanol-su (800:200, v/v) karıŐımında 10 min boyunca ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrakt, Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mmx150 mm, 5µm) kolonunda, 10 mM heksan-1-sũlfonik asit sodyum tuzu içeren su-metanol-fosforik asit-trietilamin (842:150:4:4) bileŐiminde mobil faz (pH 3.5) kullanılmıştır. UV dedektrũyle 230 nm'de çalışılmıştır. 2.0-40 mg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında yaptıkları kalibrasyon sonuçlarına göre, hesaplanan %100.1 doğruluk ve %0.6 standart sapma ile metodun uygun olduğunu göstermiŐlerdir [15].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalıŐmasının ana amacı farklı matrikslerde bulunan amoksisilinin dũŐũk seviyelerde tayin edilmesine yönelik bir analitik yöntem geliŐtirmektir. Bu kapsamda geliştirilen yöntem raf mrũ aŐamasındaki amoksisilinin yapsında deđiŐimi HPLC ile analiz edilerek antibiyotiğin etkinliğini koruma Őartlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. İlaç endũstrisinde aktif bileşen olarak bulunan amoksisilin içeren ilaçlardaki amoksisilin miktar tayini ile ilaç prospektũslerinde belirtilen miktarlar karŐılaŐtırılmak istenmiştir. Amoksisilinin mide ortamındaki davranışının incelenmesi tezin diğer bir amacını oluŐturmuŐtur. Ayrıca eser miktarda amoksisilinin atıksulardan yũksek geri kazanım yoluyla tayin edilmesi hedeflenmiŐtir. Bunlara ek olarak, topraksız

tarımla amoksisilin yetiştirilmesi amaçlanarak amoksisilin biyoyerişilebilirlik çalışması hedefi konulmuştur.

1.3 Hipotez

Dünyadaki toplam Ar-Ge harcamalarının %15-16 ilaç sektörü tarafından gerçekleştirilmektedir. İlaç Ar-Ge harcamaları uzun süreç ve yüksek maliyet gerektirmektedir. Bir molekülün sağlık yaşantısında kullanılabilir güvenlikte ilaca dönüşmesi ortalama 10-15 yılı bulabilmekte ve yüksek yatırım tutarları gerektirmektedir. İnsan sağlığı yapılan bu kadar yatırımın karşılığında en üst düzeyde verim alınabilmesi gerekirken özellikle antibiyotiklerin kullanımında uygunsuzluk, gereksiz sarfiyat bulunmaktadır. Antibiyotiklerin üretimden hastanın kullandığı zamana kadar hizmet ömrü konusunda yapılan çalışmalar yetersizdir. Antibiyotiklerin kullanımının detayları hakkında bilgisizlik, duyarsızlık konusuna dikkat çekmek gerekmektedir. Antibiyotiğin raf ömrü boyunca aktif madde miktarındaki değişimin antibiyotik direncine etkisinin belirlenmesiyle sağlık harcamalarındaki antibiyotiğin ekonomik değeri ve gerçek anlamda insan sağlığına etkisinin değerlendirilmesi için önemlidir. HPLC amoksisilin analitinin farklı matrislerde yüksek doğruluk ve kesinlikte tayininde kullanılan en güvenilir yöntemlerden birisidir. HPLC sistem parametreleri optimize edilmelidir. Amoksisilin vücutta biyoyerişilebilirliğinin tespitinde mide ortamında davranışı son derece önemlidir. Bu kapsamda yapılacak çalışmalar literatürde var olan eksikliği tamamlamada önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca, amoksisilin özellikle atıksularda eser miktarlarda tayini, bir arıtma stratejisi olmayan bu türün çevre örneklerinde derişiminin tespitinde önem taşımaktadır.

ANTİBİYOTİKLER

2.1 Antibiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi

Antibiyotikler, bakteri, mantar ve aktinomisetler gibi mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon hastalıklarını tedavisinde kullanılan, bu mikroorganizmaları öldüren veya onların üremelerini durduran maddelerdir [16]. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ilaçlar arasındadır. Başka mikroorganizmalar tarafından oluşturulup ortama salınanlar antibiyotikler, kimyasal maddelerden oluşturulanlar ise kimyasal antimikrobik ilaçlar olarak isimlendirilir [17], [18].

Günümüzden 4000-5000 yıl önce Çinliler, bazı bitkisel maddeleri enfeksiyonların iyileştirilmesi için kullanmışlardır. Bu alandaki ilk önemli gelişme, 1877 yılında Pasteur ve Joubert'ın, mikroorganizmaların antibiyotikler tarafından tedavi edilebileceğini düşünmesi olmuştur [19], [20]. Almanya'da I. G. Farbenindustrie'de araştırmacı olan Domagh, 1935 yılında bakteriyel hastalıklar üzerine çalışmalar yapmış ve ilk oral/kemoterapötik antibiyotik olan prontosili keşfederek 1938 yılında Nobel ödülünü kazanmıştır. II. Dünya Savaşı'nın yaşandığı yıllarda sulfonamidlerin giderek artan direnç gelişmesine bağlı olarak kullanılabilirliği azalmış ve daha dar alanlarda kullanılmaya başlanmıştır [21].

Londra'da St Mary's Hospital'da çalışmalar yapan Alexander Fleming'in bir tesadüf sonucunda gözlemlendiği ve penisilin adını verdiği madde, 1940'da Chain ve Flarey'in mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkisi ile deneysel olarak kanıtlanıp tedavide yer almaya başlamıştır [21].

Günümüzde ise birçok yeni antibiyotik grupları geliştirilmiştir ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra hayvanların ve balık gibi canlıların sağlığı, besin verimliliği gibi alanlarda da kullanım alanları bulunmaktadır [22].

2.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikleri etki güçlerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırmak mümkündür [23].

2.2.1 Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma

Antibiyotikler, kimyasal yapılarına göre beta laktamlar, fenikoller, sülfonamidler, tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler, linkozamidler, polipeptidler, kinolonlar, nitrofuranlar, imidazoller ve rifamisinler olarak sınıflandırılırlar [22], [24].

Beta-laktam antibiyotikler, kimyasal yapıları farklı birçok antibiyotiği içeren, en yaygın ve geniş bir sınıftır. Bu sınıfta yer alan antibiyotiklerin tümü, beta-laktam halkası bulundurur ve etki mekanizmaları aynıdır. Bu grupta bulunan antibiyotikler penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktam grubu beta-laktam antibiyotiklerdir [25].

Penisilinler, geniş spektrumlu, klinik olarak gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı kullanılan en eski ve en önemli antibiyotiklerdir [10]. Bakterilerin neden olduğu enfeksiyonu tedavi etmek için kullanılan ilk doğal antibiyotiktir. Penisilin keşfi, antibiyotik biliminin başlangıcı olarak kabul edilebilir. Bu sebeple biyoloji, tıp ve kimya gibi alanlardaki gelişmeler için çok önemlidir [26].

2.3 Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci, tedavi sürecince bakterilerin direnç mekanizması geliştirerek antibiyotikten etkilenmemesidir. Antibiyotik direnci, doğal ve kazanılmış direnç olarak ikiye ayrılır. Doğal direnç, ilacın mikroorganizmaya etki etmesi için organizmanın yapısından kaynaklanan doğal engellerin bulunmasından dolayı oluşur ve kalıtsal değildir. Kazanılmış dirençte ise ilk tedavi uygulamasında mikroorganizma antibiyotiğe karşı dirençlidir. İlaç-mikroorganizma temas süresi arttığında ve yinelenen tedavilerle antibakteriyel etkiye karşı direnç gelişir [23], [27].

Antibiyotik direnci ile ilk olarak hastanelerde karşılaşılmıştır. Bu durum, kontrolsüz ve artan antibiyotik kullanımı ile birlikte gelişen ülkeler için önemli bir problem haline gelmiştir [23], [28]. Günümüzde antibiyotiklere karşı mikrobiyal direnç artışı, tedavilerin etkinliğini azaltması, ölüm oranlarını ve sağlık hizmet maliyetlerini artırması sebebiyle dünya genelinde halk sağlığını tehdit etmektedir [29].

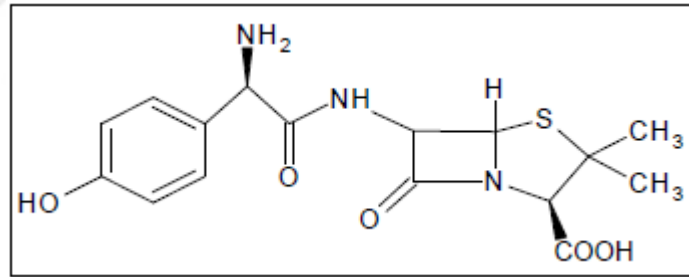
2.4 Akılcı Antibiyotik Kullanımı

Antibiyotiklerin yanlış tüketimi son yıllarda halk sağlığı açısından önemli bir konudur. Antibiyotiklerin yanlış ve kontrolsüz kullanımı, mikroorganizmaların antibiyotiğe karşı direncini de artıracığından, hastaların yüksek dozda, uzun bir zamanda tedavileriyle ya da ölümleriyle sonuçlanmaktadır. Bu durum ekonomik olarak yüksek ilaç harcamalarına da sebep olmakla birlikte, hasta ve kurumlar için de sorunlara da yol açmaktadır. [30].

Antibiyotik kullanımının doğru yapılması ve tedavinin etkili olabilmesi için akılcı antibiyotik kullanımı oldukça önemlidir. Antibiyotikler uygun doz ve optimum aralıklarla alınmalı doktor tarafından onaylandığı durumlarda kullanılmalıdır. Bu şekilde mikroorganizmanın antibakteriyel etkiye karşı direnç oluşturması engellenir ve en etkili biçimde tedavi sağlanmış olur [31].

AMOKSİSİLİN**3.1 Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

Amoksisilin; kirli beyaz renkte, karakteristik kokulu, acımsı kristalize tozudur. Kimyasal formülü $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ 'dir ve 6-[2-amino-2-(4-hidroksifenil)] asetamino-3,3-dimetil-7-okso-4-tiya-1-azabisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilik asit şeklinde adlandırılır. Trihidrat, sodyum tuzu veya susuz formu olarak hazırlanabilir [32]. Şekil 3.1'de amoksisilin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 3.1 Amoksisilin Kimyasal Yapısı

3.2 Amoksisilin Antibiyotiklerdeki Yeri

Amoksisilin, geniş spektrumlu, yüksek çözünürlük ve absorpsiyona sahip, asidik koşullar altında yüksek aktiviteli, önemli beta-laktam antibiyotiklerden biridir [33], [34]. Gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı etkili bir yarı sentetik bir penisilindir. Diğer beta-laktam antibiyotiklerden daha iyi absorbe olduğu için genellikle bu sınıf içinde daha çok tercih edilir. Bağlayıcı protein için düşük kapasiteye sahiptir ve absorpsiyondan sonra çeşitli dokularda dağıtılır. Tüm beta-laktam antibiyotikler gibi, peptidoglikan sentezinin son aşamasında müdahale ederek bakteri hücre duvarı oluşumunu engeller [33], [34], [35], [36], [37], [38], [39]. Amoksisilin, yan etkilerinin

az olması ve bakterisid olmaları sebebiyle de diğer beta-laktam antibiyotiklerine göre bir adım öndedir.

Penisilinler, moleküler yapılarına göre, doğal penisilinler, penisilinaza dirençli penisilinler, aminopenisilinler, karboksipenisilinler, üreidopenisilinler ve beta-laktamaz inhibitörlü penisilinler olmak üzere 6 başlıkta incelenebilir. Amoksisilin, penisilinlerden aminopenisilinler grubuna girer [40].

3.3 Farmakokinetik Özelliği

Amoksisilin oral ve parenteral yollarla kullanılabilir. Biyoerişilebilirliği (>90), ampisilin ve bakampisiline göre daha yüksektir. Bağırsaklardan emilimi hızlı gerçekleşir [40]. Amoksisilin %90 oranında vücuda absorbe edilir, yiyeceklerden ve eşzamanlı alınan diğer ilaçlardan etkilenmez. 500 mg oral dozu 1 ile 1.5 saat içinde yaklaşık $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda en yüksek pik plazmasını üretir. İlacın yarılanma ömrü 1 saattir [41], [42]. Amoksisilin asıl atılım yolu böbreklerdir ve 6 saat içinde %75'i idrarla atılır [41], [43], [44], [45].

3.4 Amoksisilin'in İlaç Endüstrisindeki Yeri

Amoksisilin kulak, burun, boğaz, idrar, deri ve deri yapısı, alt solunum yolları ve spesifik organizmaların duyarlı suşlarının neden olduğu akut komplikasyonsuz gonore enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır [46]. Bu aktif bileşen ilaçlarda süspansiyon, tablet ve flakon şeklinde, trihidrat formunda ve potasyum klavunalat ile kombine olmuş halde bulunabilir [47]. Potasyum klavulanat, amoksisilin etkisini artırıcı etkide bulunur. Bu antibiyotikleri içeren yeni ilaç iletim sistemlerinin geliştirilmesi ve bu aktif maddeleri içeren farklı formülasyonların karşılaştırılması için çalışmalar sırasında eş zamanlı olarak sulu konsantrasyonları halinde ölçülmesi istenmektedir [48].

Çizelge 3.1' de Türkiye'de kullanımda olan amoksisilin içeren ilaçların ilaç piyasasında bulunuşlarının listesi görülmektedir [49].

Çizelge 3.1 Amoksisilin içeren ilaçlar

İlaç	Firma	İlaç formu
Alfoxil	Actavis	Tablet Süspansiyon
Atoksilin	Atabay	Tablet
Largopen	Bilim	Tablet Süspansiyon
Largopen-BID	Bilim	Süspansiyon
Remoxil	İ. E. Ulagay	Tablet Süspansiyon Flakon

İLAÇ ETKEN MADDE MİKTAR TAYİNLERİ

4.1 Spektroskopik Yöntemlerle Miktar Tayini

Spektroskopik yöntemler; atomik ve moleküler spektroskopiden oluşan, ilaç etken maddelerin tayininde sık olarak kullanılan yöntemler bütünüdür. Molekül, atom veya iyonun elektron sisteminin uyarılmasıyla absorplanan ya da yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesiyle ilaçtaki etken maddeleri ve miktar tayinlerini yapmak mümkündür [50], [51], [52]. Spektrometrinin esası, atom, molekül veya iyonların çeşitli şekillerde etkileşimi sonucu (absorpsiyon, emisyon vb.) kalitatif ve/veya kantitatif olarak ölçülmesidir [50], [53].

Literatürde kullanılan birçok spektroskopik yöntem mevcuttur. Bunlar; Ultraviyole ve Görünür Alan Spektroskopisi, Floresans ve Fosforesans Spektroskopisi, Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi, Titreşim (İnfrared + Raman) Spektroskopisi, Nükleer Mağnetik Rezonans Spektroskopisi, Kütle Spektroskopisi, X-ışınları Spektroskopisi, Yüzey Analiz Metotları olarak özetlenebilir [54].

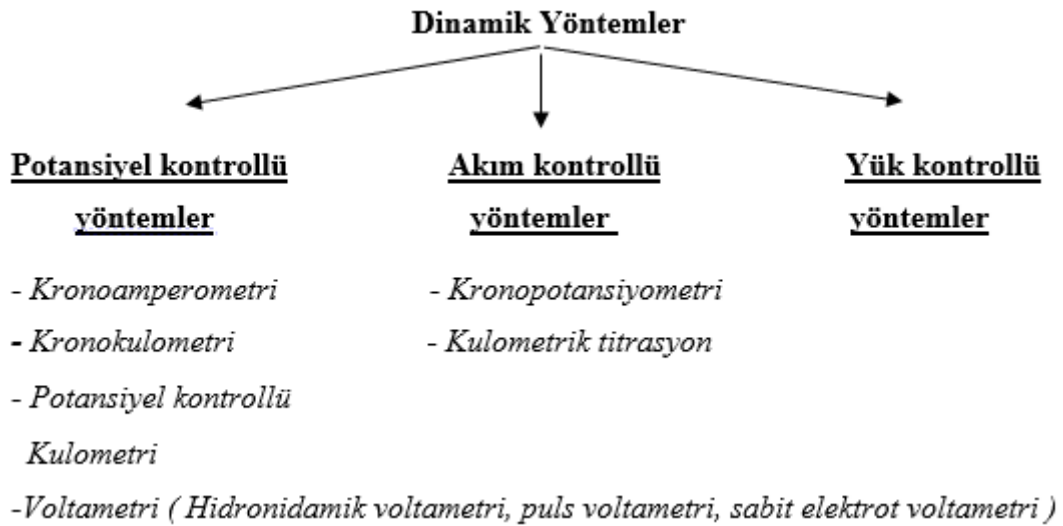
Literatürde amoksisilin tayininde birçok analitik yöntem kullanılmıştır. Her yöntemin diğerlerine avantaj ve dezavantajları vardır. Matrikste bulunan miktar, doğruluk, duyarlık gibi birçok parametre tayinde kullanılan yöntemin seçiminde parametre olarak göz önüne alınmaktadır. Ahmadi ve arkadaşları, amoksisilin tayini için ucuz ve kolay bir yöntem olduğundan dolayı spektrometrik yöntemi tercih etmişlerdir. Fakat bu yöntemin hassasiyetinin düşüklüğü ve seçiciliğinin zayıf olması nedeniyle bir ön işlem olarak katı faz ekstraksiyonu kullanmışlardır. Amoksisilin spektrometrik tayini için hassasiyeti artırmak amacıyla amoksisilin renkli azo-türevini sentezleyip UV-spektrometresinde tayini yapılmıştır. Nano adsorban sentezleyip TEM, XRD ve FT-IR

cihazlarında ölçümlerini yapılmıştır. Sonraki adımda amoksisilinin adsorpsiyon ve desorpsiyon verimliliği etkileyen faktörleri optimize edilmiştir. 5.0–1000.0 ng mL⁻¹ aralığında konsantrasyon ölçülmüş ve belirtilen çalışmada LOD değeri 3.0 ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur [55].

4.2 Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik yöntemler, bağımsız değişken kullanılarak bağımlı değişkeni ölçme prensibine dayanan, çözelti ve çözelti ile elektrod sisteminin elektrikle etkileşimi sonucu sistem tarafından verilen cevabın ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Potansiyel, akım ve zaman bu tekniğin parametreleridir [56].

Elektroanalitik yöntemler, statik yöntemler ve dinamik yöntemler olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır [57], [58]. Statik yöntemler, net akımın sıfır olduğu ($i=0$) denge durumundadır ve potansiyometri, seçici elektrotlar ve potansiyometrik titrasyonlar olmak üzere gruplandırılabilir. Dinamik yöntemlerde ise denge durumundan net akım gözlenir ($i \neq 0$). Potansiyel kontrollü, akım kontrollü ya da yük kontrollü yöntemler olarak sınıflandırılabilirler [57], [59]. Dinamik yöntem sınıflandırılması Şekil 4.1’de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.1 Elektroanalitik yöntemlerden dinamik yöntemin sınıflandırılması [60]

Elektrot tepkime mekanizmalarının belirlenmesi, eser miktardaki maddelerin miktar tayinlerinin yapılması, elektrot tepkimelerinin kinetiklerinin incelemesinde akımın sıfıra eşit olduğu teknikler ve voltametrik teknikler kullanılmaktadır. Voltametrik teknikler

kronoamperometri, kronokulometri, dönüşümlü voltametri, kare dalga voltametri, diferansiyel puls voltametri, normal puls voltametrisi, sıyırma voltametri olarak gruplandırılabilir [56]. Elektroanalitik tekniklerin birbirinden farkı, miktar tayini için kullanılan elektrik sinyalinin dalga şekillerinin çeşitli olmasıdır [57], [60].

Brahman ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, misel ortamda karbon past elektrotla modifiye edilmiş polianilin filminde amoksisilinin adsorplayıcı voltametrik davranışını inceleme amacıyla hassas ve seçici bir yöntem geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla dönüşümlü voltametri, kare dalga voltametri ve diferansiyel puls voltametri kullanılmıştır. Amoksisilinin 2.0-6.5 pH'ta 0.2 M asetat tamponundaki voltamogramları için OH grubunun oksidasyonuna bağlı olarak bir oksidasyon piki gözlemlenmiştir. Dönüşümlü voltametri çalışmalarında elektrot yüzeyinde amoksisilin oksidasyonunun geri dönüşümlü bir adım ve difüzyon kontrollü olduğu görülmüştür. Analizler sonucunda amoksisilin için LOD/LOQ değerleri kare dalga voltametri ile $3.5 \times 10^{-10}/1.5 \times 10^{-9}$, diferansiyel puls voltametri ile $7.3 \times 10^{-10}/5.4 \times 10^{-9}$ elde edilmiştir [61].

4.3 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımdaki fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirine çok benzeyen maddeleri birbirinden ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde sabit faz ve hareketli faz olmak üzere birbiriyle karışmayan iki faz bulunur. Karışımdaki bu maddeler, hareketli faz yardımı ile sabit faz üzerinden farklı hızlarda geçerek birbirinden ayrılırlar [62]. Sabit faz ve hareketli faza tutunmalarına göre, hareketli faza daha fazla tutunan madde daha hızlıdır ve sistemden daha önce çıkar [63].

4.3.1 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler ayırma mekanizmalarına göre, hareketli faza göre, uygulanan tekniğe ve kullanım amacına göre dört farklı şekilde sınıflandırılabilirler [62]. En çok kullanılan sınıflandırma çeşidi hareketli faza göre yapılır.

Ayırma mekanizmasına göre sınıflandırma: Adsorpsiyon kromatografisi, partiyon kromatografisi, iyon değiştirme kromatografisi, jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografisi, afinite kromatografisi, zone elektroforez ve chiral kromatografi olarak sınıflandırılırlar. Bunlardan adsorpsiyon kromatografisi, bilinen en eski kromatografik yöntemlerden biridir [62], [64], [65].

Hareketli faza göre sınıflandırma: Sıvı ve gaz kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır. Sıvı kromatografisi (LC), sıvı-katı ve sıvı-sıvı kromatografisi olmak üzere iki şekildedir. Gaz kromatografisi (GC) ise gaz-katı ve gaz-sıvı kromatografisi olmak üzere iki çeşittir [62], [64], [65].

Kullanım amacına göre sınıflandırma: Analitik kromatografi (kalitatif ve kantitatif kromatografi) ve preparatif uygulamalar (karışımlardan saf madde elde etme) olarak sınıflandırılabilir [62].

Uygulanan tekniğe göre sınıflandırma: Kolon kromatografisi, düzlemsel kromatografi, gaz kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografi ve elektrokromatografi olarak sınıflandırılırlar [64], [65]. Düzlemsel kromatografi ise kendi içinde ince tabaka kromatografi (TLC) ve kâğıt kromatografi (PC) olmak üzere ikiye ayrılır [62].

Kromatografik yöntemler hassas ve verimli sonuçlar elde edilmesini sağlar. Buna karşın toplam kromatografik çalışma süresi uzun ve rutin analizler için uygun olmayabilir [55].

4.4 Amoksisilin Miktar Tayin Yöntemleri

Amoksisilin miktar tayinini yapabilmek için birçok analiz yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler mikrobiyolojik tekniklerle ölçme [66], enzimatik ölçüm [67], spektrofotometrik [68], [69], UV spektrofotometrik [70], [71], kapiler elektroforez [15], [72], [73] [74], [75], [76], polarografi/voltametri [77] ve sıvı kromatografi ardışık kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) [79] ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak özetlenebilir [19], [79].

Yapılan analizlerin koaylık, maaliyet, hassasiyet, doğruluk ve seçicilik kavramları göz önüne alındığında, HPLC yönteminin diğer yöntemlere göre üstünlükleri olduğu literatürde rapor edilmiştir [15].

YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, bir çözelti içerisindeki belirli bir bileşenin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılır [80]. Yüksek doğruluk ve hassasiyette çalışılabilmesi, uçucu olan ve uçucu olmayan bileşikler analiz edebilme yeteneği önemli avantajlarından [11]. Prensipleri, bileşiklerin sıvı olan hareketli faz ve katı olan sabit faz arasında ayrımının gerçekleştirilmesine dayanır. Sabit faz, gözenekli bir ortamdır [4], [81]. Ayrırma işlemi, sabit faza bağlı olarak dağılma, adsorpsiyon veya iyon değiştirme mekanizmaları ile meydana gelir [19].

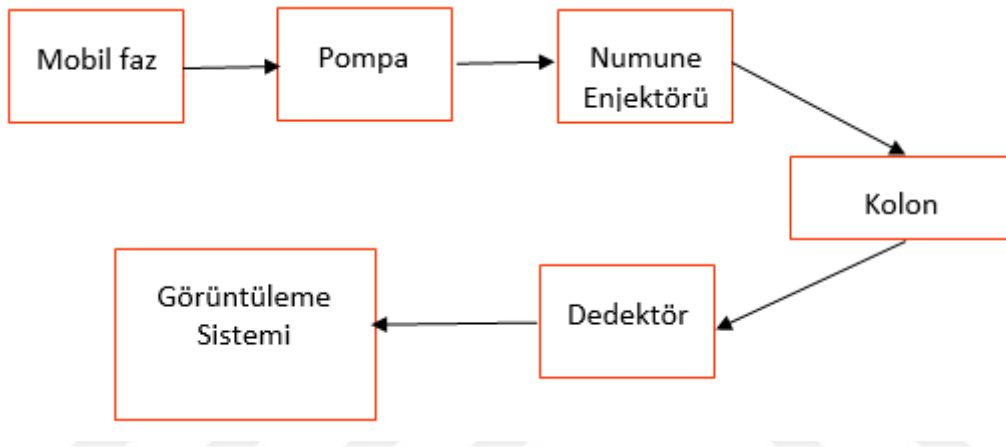
5.1 HPLC Türleri

HPLC; dağılma (partition), adsorpsiyon sıvı kromatografisi, iyon değiştirme sıvı kromatografisi ve jel geçirgenlik veya moleküler eleme sıvı kromatografisi olmak üzere dört çeşittir. Adsorpsiyon sıvı kromatografisi; normal fazlı ve ters fazlı olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır [82], [83], [84].

Normal fazlı kromatografide, sabit faz polar, mobil faz apolardır. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksektir. Bu sebeple bileşenlerden polaritesi düşük olan mobil fazda daha iyi çözüneceğinden kolondan daha önce çıkar. Ters fazlı kromatografide ise sabit fazın polarlığı mobil fazdan daha fazladır. Sabit faz genellikle hidrokarbondur. Oktadesilsilan (ODS), C₈, kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil grupları sabit faz olarak kullanılmaktadır. Mobil faz ise genellikle sulu karışım veya tamponlardır. Metanol, asetonitril, etanol, propanol ve tetrahidrofur en çok kullanılan çözücülerdir [4], [85].

5.2 HPLC Temel Donanımları

HPLC sisteminin donanımı pompa, enjektör, dedektör ve görüntüleme sistemi içerir. Sistemde en önemli kısım, ayırma işleminin gerçekleştiği kolondur. Yüksek basınçlı pompa, mobil fazın kolon boyunca hareket etmesini sağlar. Analit(ler) enjekte edildiği anda kromatografik süreç başlar. Bileşenlerin polarite farkına göre ayrılması gerçekleşir ve mobil faz kolon boyunca pompalanır. Sonuç olarak kolonda ayrılan her bir bileşen görüntüleme sisteminde pik olarak görülür. Dedektörün her bileşen için cevabı bir kromatogramdır. Ayrıştırılan bileşenlerin tespiti, kullanılan detektöre bağlıdır [86], [87]. Şekil 5.1’de HPLC sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 5.1 HPLC sisteminin şematik gösterimi

5.2.1 Mobil Faz

Mobil faz tipi ve bileşimi analitlerin birbirlerinden ayrılmasını etkiler. Değişik tür HPLC cihazları için değişik çözücüler kullanılır. Normal fazlı HPLC için çözücü genellikle apolardır. Ters fazlı HPLC için ise çözümü suyun bir karışımıdır ve polar bir organik çözücüdür. Mobil faz hazırlamak için kullanılan çözücülerin ve inorganik tuzların saflığı çok önemlidir. Uygun olan en yüksek saflıkta çözücünün kullanılması gerekmektedir [80].

5.2.2 Pompa

Mobil fazı sabit faz üzerinden geçirmek için yüksek basınçlı pompa gerekir. Tekrarlanabilirlik ve doğruluk elde etmek amacıyla kararlı bir pompanın basıncına (genellikle 1000-2000 psi) ihtiyaç vardır. Pompalar genel olarak sağlam olmasıyla

bilinir fakat bu özelliğini koruması için gerekli bakımlarının yapılması gerekir [80]. Mobil fazın akış hızını değiştirir.

5.2.3 Enjektör

Enjektör, manuel enjeksiyon ya da otomatik enjeksiyon sistemi olabilir. HPLC sistemi için bir enjektör, yüksek basınç altında (4000 psi' e kadar) ve yüksek tekrarlanabilirlik ile 0.10-100 mL hacim aralığındaki sıvı numunenin enjeksiyonunu sağlamalıdır. Sıvı kromatografisi için sıvı örnekleri doğrudan enjekte edilebilir. Katı numunelerin ise sadece uygun bir çözücüde seyreltilmeleri gerekir [80].

5.2.4 Kolon

Kolon veya sabit faz kromatografik sistemin temelini oluşturur. Kolonlar farklı uzunluk, boyut ve dolgu malzemeleriyle çeşitlilik gösterir. Etkili ve iyi bir ayırma sağlamak için kolonun bu özelliklerinin uygun kombinasyonu ile doğru bir mobil faz uyumu çok önemlidir. HPLC için en çok kullanılan dolgu malzemeleri silika bazlı olanlardır. Bunlardan en çok kullanılanı C₁₈ kaplama içeren oktadesil-silikadır (ODS-silika). Bunun yanı sıra C₁, C₂, C₄, C₆, C₈ and C₂₂ kaplamalı olanları da kullanılabilir [80].

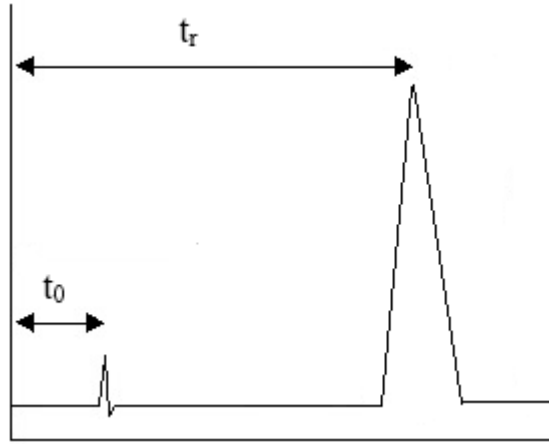
Kolon uzunluğu, bileşenlerin kolonda daha uzun süre kalmalarına olanak sağlar ve ayırım daha iyi gerçekleşir. Fakat analiz süresi uzayacağından, mobil faz kullanımını artırır. Bileşenlerden polaritesi hareketli faza en yakın olan kolonu önce terkeder, sabit faza daha yakın olan ise kolonda daha fazla tutulur. Kolon çapı ise akış hızını etkiler. Çap arttıkça, analizlerin hassasiyeti ve pik doğruluğu azalabilir. Bileşene en uygun kolon ve mobil faz uyumu, optimizasyon çalışmaları ile belirlenmelidir [88].

5.1.4.1. Kolonda alıkonma süresi

Alıkonma süresi, bir bileşenin mobil fazla birlikte kolondaki dolgu maddesi tarafından tutulduğu süre olarak tanımlanabilir ve bu alıkonma zamanında bileşen piki elde edilir [80]. Bu pikin alıkonma süresi t_r olarak ifade edilir. Analizi yapılan türlerin kolon içinde göç etme hızı, Eşitlik 5.1'de görüldüğü gibi kapasite faktörü (k) olarak ifade edilir.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (5.1)$$

Bu eşitlikte t_0 alıkonulmayan türün dedektöre kadar ulaşma zamanı yani ölü zaman, t_r ise analitin dedektöre ulaşma zamanıdır.



Şekil 5.2 HPLC’de alıkonma zamanı parametrelerinin şematik gösterimi

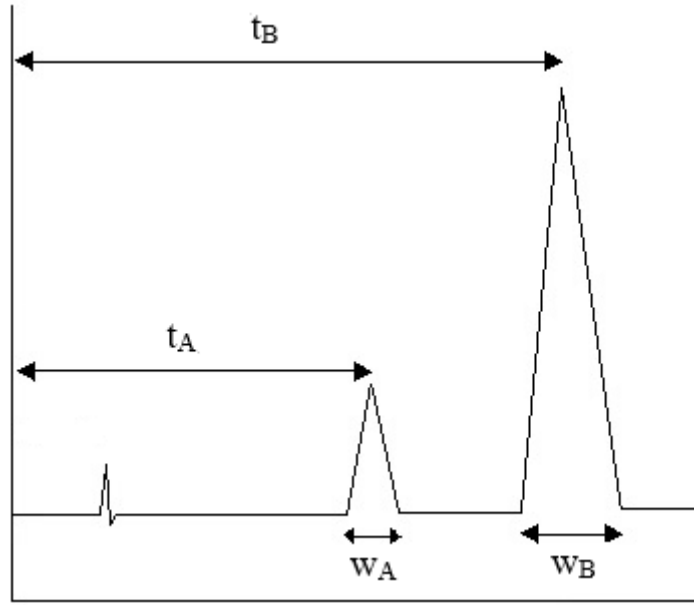
Kapasite faktörü; uygulanan method ve her maddenin fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak değişir. Optimizasyon aşamasında göz önünde bulundurulması gereken önemli bir parametredir. Bileşenin kolonda iyi tutulması ile k değeri büyük olur ve bileşenin kolon boyunca yavaş ilerlediği anlamında gelmektedir. Eğer k değeri küçük ise, bileşen kolon boyunca daha hızlı yol alıyor anlamına gelir ve polaritesi mobil faza daha yakındır. k değerinin 1 ile 10 arasında tutulması çalışmalar için istenilen bir sonuçtur. Aksi elde edildiği durumlarda mobil faz ve sabit faz bileşimlerinde değişimler yapılarak uygun değer sağlanabilir [89].

5.1.4.2. Rezolüsyon

Kolonun kromatogramdaki pikleri ayırma yeteneğidir. Rezolüsyon (R), Eşitlik 5.2’de görüldüğü gibi iki pik arasındaki maksimum mesafenin, zemindeki ortalama pik genişliğine oranıdır. 2

$$R = \frac{2(t_B - t_A)}{w_A + w_B} \quad (5.2)$$

Bu eşitlikte; t_B B bileşeninin alıkonma süresi, t_A A bileşeninin alıkonma süresi, w_B B bileşeninin pik genişliği ve w_A A bileşeninin pik genişliğidir. Eğer R değeri 1’e eşit veya 1’den büyükse bileşenler tamamen ayrılmıştır. R değeri 1’den düşükse bileşenlerin kromatogramda çakıştığı anlamına gelmektedir [80].



Şekil 5.3 HPLC'de rezolüsyon parametrelerinin şematik gösterimi

5.2.5 Dedektör

HPLC için çok farklı dedektör türleri bulunmaktadır. Dedektör bir bileşiğin varlığını algılamak ve veri toplama cihazına bir elektronik sinyal sağlamak için kullanılır. Başlıca kullanılan dedektör türleri; refraktif indeks (RI), ultraviyole (UV-VIS), floresans, diyot dizisi, elektrokimyasal ve iletkenlik dedektörleridir. Her bir dedektörün sınırlamaları ve en etkili olduğu analit türleri vardır. İlaç analizi uygulamalarının çoğunda, çözünen dedektör içindeki akış hücresinden geçerken ultraviyole radyasyonunun absorpsiyonuna (veya görünür ışık) cevap veren dedektörler kullanılır [80]. Analitin yapısal özelliği göz önünde bulundurularak uygun dedektörün seçilmesi yüksek doğruluk, seçicilik ve duyarlılığın elde edilmesi bakımından son derece önemlidir.

5.2.6 Görüntüleme Sistemi

Dedektör sinyali elektronik olduğundan, günümüzdeki veri toplama teknikleri sinyal analizlerine yardımcı olabilmektedir. Birçok HPLC sistemi için veri toplama sistemi bilgisayardır. Bilgisayar, her bir bileşen için dedektör cevabını entegre eder ve verilerin daha kolay okunması ve yorumlanması için onları bir kromatograma yerleştirir. Ayrıca bilgisayar kontrollü otomatik enjektörler, çoklu pompalı gradyan denetleyicileri ve

numune fraksiyon toplayıcıları gibi kromatografik sisteme uygulanan daha gelişmiş sistemler de vardır [80].

5.3 Kromatografik Koşulları Etkileyen Faktörler

Kromatografik sistemde analitlerin ayrılmalarında sistemin tüm değişken parametrelerinin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla aralarında sıcaklık, hareketli faz içeriği ve derişimi, sıcaklık, pH gibi birçok değişkenşn optimize edilmesi gerekmektedir.

5.3.1 Sıcaklık

Sıcaklık değışikliği farklı etkilerden ötürü analitin tayinini etkilediği literatürde rapor edilmiştir. Mekanizmaya bağlı olarak, sıcaklık değışimi sebebiyle çözünürlükteki değışim bazen belli belirsizdir, bazen de oldukça önemli olabilir. Çözünürlük, iyonik etkileşim ve sterik etkileşimlerin dahil olduğu yerlerde kritik olabilir. Yüksek oranda polar eluent kullanılması sıcaklık değışimlerine bağlı olarak seçicilikte büyük farklılıklara yol açabilir. pH sıcaklığa bağlı olmasına rağmen, kritik bir değışiklik pik alanı, alıkonma süresi ve pik şeklini etkileyebilir [12], [90].

5.3.2 pH

Hareketli fazın pH değeri analitlerin etkin bir şekilde birbirlerinde ayrılmalarında son derece önemlidir. pH seviyesi sabit faz yüzeyindeki silanol gruplarının ve asidik-bazik bileşiklerin ayrışma derecesini etkiler. Yani pH değeri, polar=iyonik analit ve sabit faz arasındaki etkileşim derecesinin kontrol edilmesi için kullanılabilir. Bu nedenle pH alıkonma süresini ve pik şeklini etkiler [91]. Kasıtlı (metod optimizasyonu) ya da kasıtsız (sıcaklık) pH değışimi pik alanında değışime de neden olur [12], [90].

5.3.3 Mobil Fazda Tampon Konsantrasyonu

Mobil fazın tampon kapasitesi (tamponun sabit bir pH' ı koruma yeteneği) tampon konsantrasyonu ile orantılıdır. Ayırmada iyi bir tekrarlanabilirlik elde etmek için, kullanılan tamponun yeterli tampon kapasitesinde olması gerekmektedir. Yetersiz tamponlama, çözünenin pKa değeri ile tampon pKa değeri ve mobil fazın pH' ı arasındaki dengelerin değışmesine yol açabilir. Dolayısıyla pik şekli bozulur [12].

5.4 HPLC ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Tavakoli ve arkadaşları (2007), ilaç salım profilleri ve ilaç-katkı maddesi uyumluluk çalışmalarını değerlendirmek amacıyla amoksisilin ve metronidazolun tek dalga boyunda (254 nm) miktar tayinini yapabilmek için basit, hızlı, hassas ve güvenilir bir ters fazlı HPLC (RP-HPLC) metodu geliştirmişlerdir. Mobil fazın bileşimi fosfat tamponu-metanol (95:5, pH 4.0) olarak ayarlanmış ve C₁₈ kolonunda akış hızı 1.5 ml min⁻¹ olarak belirlenmiştir. İki aktif bileşen tayini katkı maddelerinden etkilenmemiştir. Ayrıca ilaçların çözünme ve salma çalışmaları, bu analitik yöntemle başarılı bir şekilde yapılabilmektedir [48].

Teixeira ve arkadaşları (2008), farklı sınıflarda 5 antibiyotiği (amoksisilin, metronidazol, sefazolin, kloramfenikol ve sülfametoksazol) diyot dizi dedektörle (DAD) HPLC sisteminde tayinine yönelik analitik bir yöntem geliştirmiş ve geliştirdikleri bu yöntemi antibiyotiklerin atıksularda tayininde kullanmışlardır. Toplam analiz süreleri 35 dakikadır. Atık suya amoksisilin, metronidazoli, sefazolin ve kloramfenikol 400 µg L⁻¹, sülfametoksazol 200 µg L⁻¹ spike edildiğinde elde edilen geri kazanımlar sırasıyla %101, %100, %97, %93 ve %96 olarak bulunmuştur [92].

Ahmed ve arkadaşları (2011), amoksisilinin bulk ve değişik formülasyonlarda RP-HPLC sisteminde analizi için metod geliştirmişlerdir. Hipersil C₁₈ kolonuyla fosfat tamponu-metanol (95:5 v:v) mobil fazında, 1.0 ml/min akış hızında ve 238 nm dalga boyunda çalışılmıştır. İlacın çözeltilerden geri kazanımı %99.39 olarak bulunmuştur [93].

Tokumura ve arkadaşları (2012), aç bırakılmış farelerde amoksisilin absorpsiyonunu araştırmışlardır. Farelere süspansiyon ve çözelti şeklinde iki formda 15 mg kg⁻¹ ve 50 mg kg⁻¹ amoksisilin verilmiştir. Amoksisilin plazma konsantrasyonları HPLC ile belirlenmiştir. Asetonitril-su-perklorik asit (60%)-sodyum perklorat monohidrat (100:900:1:5, v/v/v/w) oranında mobil faz, YMC Pack AM312 ODS 5 µm (150 mmx6 mm) kolon, 1.0 mL min⁻¹ akış hızı, 220 nm dalga boyu ve 40 °C sıcaklıkta çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, amoksisilin biyoyararlılığının fareler üzerinde beslenme etkisi olmadığı görülmüştür. Aç olmadıkları koşullar altında amoksisilin biyoyararlılığının düşmesinin sebebinin belli olmadığını belirtilmiştir [94].

Matar (2006), sefadroksil iç standartı kullanarak amoksisilinin insan plazmasında kantitatif tayinini yapma amacıyla HPLC metodu geliştirmiştir. Çalışmada Symmetry C₁₈ kolon (5 µm, 150x4.6 mm), metanol-fosfat tamponu (10:90,v/v) (pH 3.0) oranında

mobil faz ve 1.5 mL min⁻¹ akış hızı kullanılmıştır. UV dedektörü 228 nm' ye ayarlanmıştır. Her örnek için analiz süreleri 10 dakikayı geçmemiştir. Metod başarıyla uygulanmış, amoksisilinin ortalama bağıl geri kazanımı %99.67 ve ortalama mutlak geri kazanımı %86.68 olarak bulunmuştur. Yapılan stabilite testleri, amoksisilinin plazmada -70 °C' de en az 4 haftada kararlı oldukları görülmüştür. Bu metod, farmakokinetik çalışmayla sağlıklı tavşanlara da başarıyla uygulanmıştır [95].

Tippa ve Singh (2010), amoksisilin ve klavulanik asitin enjekte edilebilir dozaj formunda eşzamanlı tayinleri için HPLC metodu geliştirmişlerdir. Ayırma Inertsil C₁₈ kolonunda (250x4.0 mm, 4 µm), UV dedektöründe 220 nm'de, 1.0 ml min⁻¹ akış hızında ve 95:5 (v/v) (pH 5.0) tampon-metanol mobil faz ile gerçekleştirilmiştir. Amoksisilin ve klavulanik asit çözeltisinin 24 saat kadar kararlı olduğu bulunmuştur. Amoksisilin ve klavulanik asit pikleri simetrik, kuyuksuz ve iyi tanımlanmış şekilde elde edilmiştir. Klavulanik asit için kolonda alıkonma süresi 5.3 min, amoksisilin için ise 7.5 min bulunmuştur [96].

Dhoka ve arkadaşları (2010), amoksisilin trihidrat ve bromeksin hidroklorürün oral dozaj formlarında HPLC sisteminde eşzamanlı tayinini yapmışlardır. Çalışmalar HiQ Sil C₁₈ (4.6x250mm, 5µm) ters fazlı kolonunda metanol:0.02 M amontum asetat (90:10v/v, pH 5.0) oranında mobil faz kullanılmıştır. Mobil fazın akış hızı 1.0 ml min⁻¹ olarak belirlenmiştir. UV dedektörü 254 nm'de uygulanmıştır. Kolonda ayrılma 10 min sürede gerçekleşmiştir. Geri kazanım yüzdeleri amoksisilin trihidrat için %99.5-%101.32 ve bromeksin hidroklorür için %98.93-%101.18 olarak bulunmuştur [97].

Ghassempour ve arkadaşları (2007), farmakopede belirlenen aralıkta pH' ta amoksisilin trihidratın bazı fizikokimyasal ve katı haldeki özelliklerini incelemişlerdir. Amoksisilin örnekleri Dane tuzu yöntemi kullanılarak 4.39' dan 4.97' a kadar olan pH değerleri için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar için; optik ve taramalı elektron mikroskopu, X-ışını difraksiyonu, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. HPLC analizi ile pH artışı ve amoksisilin saflığı arasında doğrudan bir ilişki olduğu görülmüştür [98].

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu tez çalışmasında, ilaç etken maddesi olan amoksisilin tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde hassas, analitik ve tek dalga boylu (230 nm) bir yöntem geliştirilmesine yönelik deneysel çalışmalar yapılmıştır. Amoksisilin farklı ortam sıcaklıklarında zaman içerisindeki bozunmaları tespit edilmiştir. İlaç piyasasındaki amoksisilin içeren bazı ticari ilaçlardan amoksisilin tayini yapılmıştır. Yapay mide ortamı hazırlanıp tayin için kullanılan ticari ilaçlardan birini kullanarak bu ortamdaki amoksisilin davranışı incelenmiştir. Topraksız tarım metoduyla amoksisilin içeren besiyer kullanılarak dört farklı bitki yetiştirilmiş ve zaman içerisinde amoksisilinde meydana gelen değişim incelenmiştir. Ayrıca atıksu numunelerinde bulunan amoksisilin miktar tayini yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan tüm standartlar, 1000 mg L⁻¹ amoksisilin trihidrat stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanmıştır.

6.1 Kullanılan Cihazlar

6.1.1 HPLC Donanımı

- Vakum: Spectra System SCM1000
- Pompa: Spectra System P1500
- Kontrol elemanı: Spectra System SN4000
- Otomatik örnekleyici: Spectra System AS3000
- Dedektör: Spectra System UV2000
- ChromQuest programı



Şekil 6.1 HPLC cihazı

6.1.2 Kolonlar

- Phenomenex Nucleosil C₁₈ (100A 250x4.00 mm, 5µm)
- Inertsil ODS-3V (4.6x250 mm, 5µ)

6.1.3 Diğer Ekipmanlar

- Mikro pipet: PhysioCare Concept - Eppendorf Research Plus (100-1000 µl; 0.5-5 ml)
- Hassas terazi: Sartorius Analytic A 120 S
- pH metre: Hanna HI 2211
- Manyetik karıştırıcı: IKA (RTC basic) manyetik karıştırıcı + ETS-D5 Elektronik Kontakt Termometre
- Derin dondurucu: Uğur Derin Dondurucu UCF 1600 L
- Mikrovialler: Agilent
- Cam malzemeler: Balon joje, beher, erlen, mezür

6.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amoksisilin trihidrat, Sanovel İlaç San. ve Tic. A. Ş.'den temin edilmiştir. Saf su Yıldız Teknik Üniversitesi merkez laboratuvarlarından A Milli-Q® Reference System cihazı ile elde edilmiştir. Bunlara ek olarak aşağıda görülen solvent ve kimyasallar deneylerde kullanılmıştır;

- Metanol (>%99): Merck
- Asetonitril (>%99): Merck
- Potasyum dihidrojen fosfat: Merck
- Sodyum hidroksit: Merck
- Nitrik asit: Merck
- Hidroklorik asit (%37): Merck
- Sodyum Klorür: Merck

6.3 Optimizasyon Çalışmaları

Amoksisilin HPLC-UV sisteminde eser seviyelerde tayini amacı ile HPLC sisteminde alıkonmasına yönelik yapılan deneysel çalışmalar Çizelge 6.1'de görülmektedir.

Çalışma 1 tamponu için 21.0 g sitrik asit, 200 mL 1.0 M sodyum hidroksitle çözülerek 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır, bu karışımın 40.3 mL'si alınıp 100 mL tamamlanıp 0.10 M HCl ile pH değeri ayarlanmıştır.

2, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 numaralı çalışmalarda ise tampon; 50 mL 0.20 M potasyum dihidrojen fosfata 46.8 mL 0.20 M sodyum hidroksit eklenip, distile su ile 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. pH ayarı ise 0.10 M NaOH ile yapılmıştır.

3. çalışmada, 250 mL 0.20 M potasyum dihidrojen fosfata 28.5 mL 0.20 M sodyum hidroksit katılıp 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmasıyla tampon çözelti hazırlanmıştır ve 0.10 M NaOH ile pH ayarı yapılmıştır.

Çalışma 4'te, 250 mL 0.20 M potasyum dihidrojen fosfata 393.4 mL 0.10 M sodyum hidroksit katılarak pH ayarı yapılmıştır.

Çalışma 5 tamponunu hazırlamak için ise 2 ayrı çözelti hazırlanmıştır. 1. çözelti olarak 119.31 g disodyum hidrojen fosfat 1000 mL'ye saf su ile tamamlanıp karıştırılmıştır. 2.

çözelti olarak 45.36 g potasyum dihidrojen fosfat 1000 mL'ye saf su ile tamamlanıp karıştırılmıştır. 1. çözeltilerden 85 mL ve 2. çözeltilerden 15 mL alınarak bir tampon oluşturulmuştur ve 0.10 M NaOH ile pH ayarı yapılmıştır.

Çalışma 6' da ise başka bir fosfat tamponu kullanılmıştır. 1.74 g potasyum dihidrojen fosfat 80 mL distile su ile çözülüp 1.0 M potasyum hidroksitle pH ayarlanmıştır ve 100 mL' ye distile su ile tamamlanmıştır.

Çizelge 6.1 HPLC sisteminde amoksisilin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları

	Parametreler				
	Mobil Faz	pH	Akış Hızı, mL min ⁻¹	Dalga Boyu, nm	Kolon
Çalışma 1	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	3.43	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 2	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	8.55	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 3	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	6.25	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 4	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	7.5	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 5	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	7.8	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 6	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	9.0	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 7	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	8.2	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 8	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	8.0	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 9	%20 CH ₃ OH - %80 Tampon	8.5	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 10	%30 CH ₃ OH - %70 Tampon	8.5	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈
Çalışma 11	%10 CH ₃ OH - %90 Tampon	8.5	1.0	230	Phenomenex Nucleosil C ₁₈

Çizelge 6.1 HPLC sisteminde amoksisilin alıkonmasına yönelik yapılan optimizasyon çalışmaları (devamı)

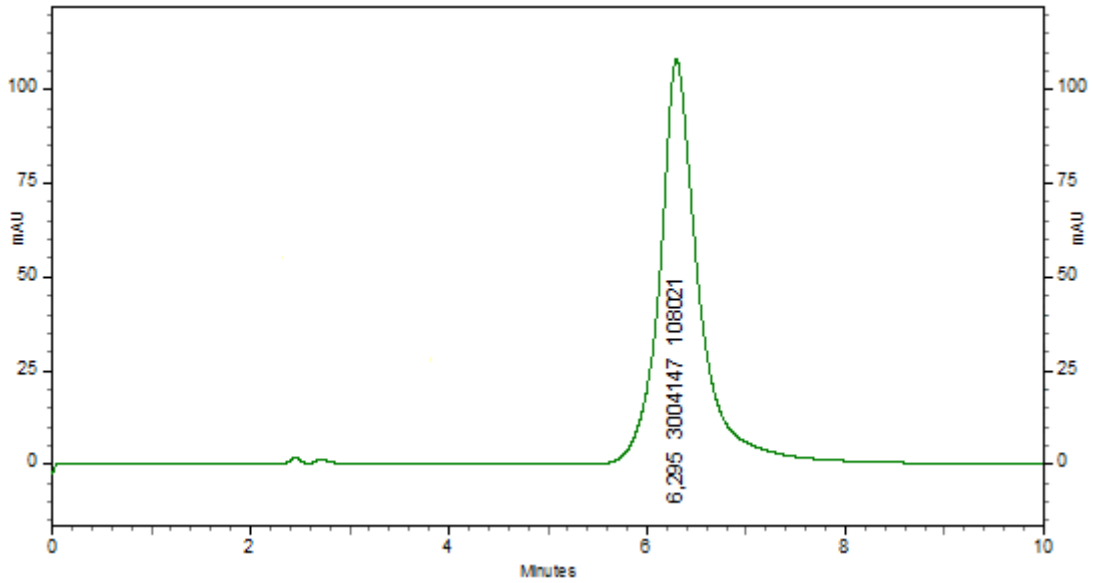
	Parametreler			
	Mobil Faz	pH	Akış Hızı, mL min ⁻¹	Dalga Boyu, nm
Çalışma 12	%15 CH ₃ OH - %85 Tampon	8.5	1.0	230
Çalışma 13	%15 CH ₃ OH - %85 Tampon	8.5	0.8	230

Optimum koşulları elde etmek amacıyla uygun kolon, pH, dalga boyu, akış hızı ve mobil faz belirlenmiştir. Phenomenex kolonu tüm çalışmalarda analitin alıkonması amacı ile kullanılmıştır. Çalışmalara öncelikle pH optimizasyonu ile başlanmıştır ve asidik/bazik ortamlarda tampon çözeltiler (3.43-8.55) hazırlanmıştır. Çalışma 1'deki kromatogram sonucuna göre elde edilen pikin alıkonma süresi 3.57 min'dir ve ölü zamana yakındır. Ayrıca zeminde kayma mevcuttur. Bu istenilmeyen bir durumdur. Çalışma 2'de ise amoksisilin için belirtilen şartlar altında 4.47 min'de kolonda alıkonma elde edilmiştir. Fakat pikin başlangıç ve bitiş noktalarında pik genişlemesi olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, pH optimizasyonu için bazik ortamda çalışmasına karar verilmiş ve tüm çalışmalar %20 metanol-%80 tampon oranında mobil fazla ve 1.0 mL min⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Çalışma 3'te elde edilen 3.11 min alıkonma süresindeki kromatogramda pikin ölü zamana çok yakın olduğu ve sağ tarafında bir omuz oluştuğu görülmüştür. Bu sebeple bu kromatografik şartlar altında amoksisilin tayini için uygun olmadığına karar verilmiştir. Çalışma 4'te 3.88 min alıkonma süresinde amoksisilin piki elde edilmiştir fakat pikin sağ tarafında yaklaşık 2.0 min genişlikte bir omuz görülmüştür. Çalışma 5'te yine sinyalin sağ tarafında bir omuz tespit edilmiştir. Çalışma 6'da 4.05 min alıkonma süresinde elde edilen pikin sol tarafında küçük bir omuz oluştuğu görülmüştür. Çalışma 7'deki kromatogramda pikin alıkonma süresi 2.82 min'dir ve ölü zamana çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Çalışma 8'da elde edilen pikin zemini kaydığı ve pikin sağ tarafında bir omuz oluştuğu tespit edilmiştir. Bu bakımdan dolayı amoksisilin kantitatif tayininin belirlenen kromatografik ayırma şartlarında yapılamayacağına karar

verilmiştir. Farklı pH denemeleri sonucunda pH 8.5 olduğu durumda (Çalışma 9) 6.29 min alıkonma süresine sahip simetrik bir analit sinyali tespit edilmiştir.

Bundan sonraki adım olarak mobil faz içerik optimizasyonu yapılmasına karar verilmiştir ve metanol/tampon oranı optimize edilmiştir. Çalışma 10'da kullanılan %30 CH₃OH-%70 tampon oranı ile yapılan analiz sonucunda zeminde kayma meydana geldiği ve alıkonma süresi 2.27 min olup sürede azalma meydana geldiği görülmüştür. Çalışma 11'de ise mobil faz oranı %10 CH₃OH-%90 tampon olarak kullanılmıştır ve simetrik bir pik elde edilememiştir. Baseline'da kayma görülmüştür ve 3.0 min genişliğinde bir amoksisilin piki elde edilmiştir. Bu sebeple bu kromatografik şartların amoksisilin için uygun olmadığına karar verilmiştir. Çalışma 12'te kullanılan %15 CH₃OH-%85 tampon ile 4.98 min alıkonma süresinde simetrik bir sinyal tespit edilmiştir.

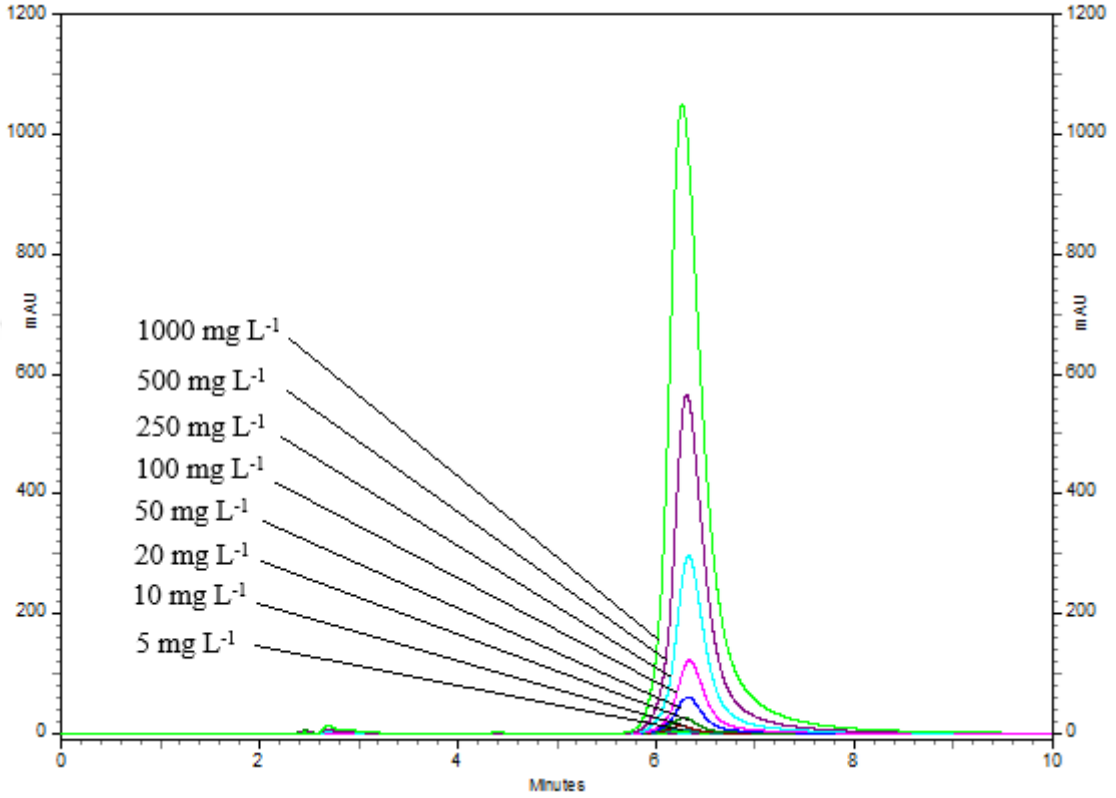
Çalışma 13'te ise akış hızında değişikliğe gidilmiştir ve Şekil 6.2'de görüldüğü gibi, 0.8 mL min⁻¹ akış hızı için 6.29 min alıkonma süresinde simetrik, ölü zamandan uzakta, yaklaşık 1.0 min genişlikte bir pik elde edilmiştir ve optimum koşul olarak kabul edilmiştir.



Şekil 6.2 %15 CH₃OH - %85 Tampon (pH 8.5) sisteminde amoksisilin HPLC sisteminde elde edilen kromatogram

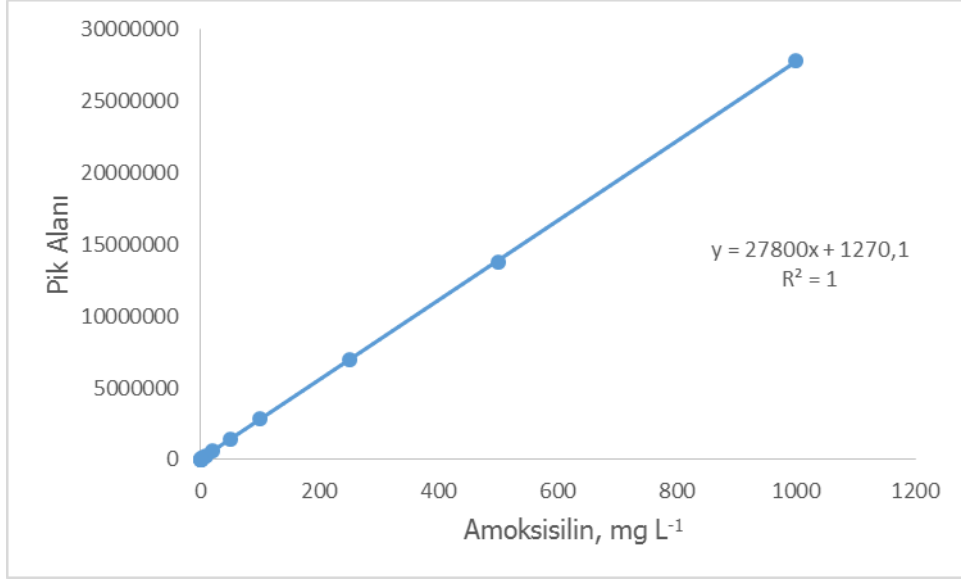
6.4 Amoksisilinin Sistem Analitik Performansının Tespiti

Amoksisilinin sistem performans değerlerinin tespiti amacı ile belirlenen optimum kromatografik şartlar altında $0.05-1000 \text{ mg L}^{-1}$ aralığında standartlar HPLC sistemine enjekte edilmiş ve Şekil 6.3'te görülen kromatogramlar elde edilmiştir.

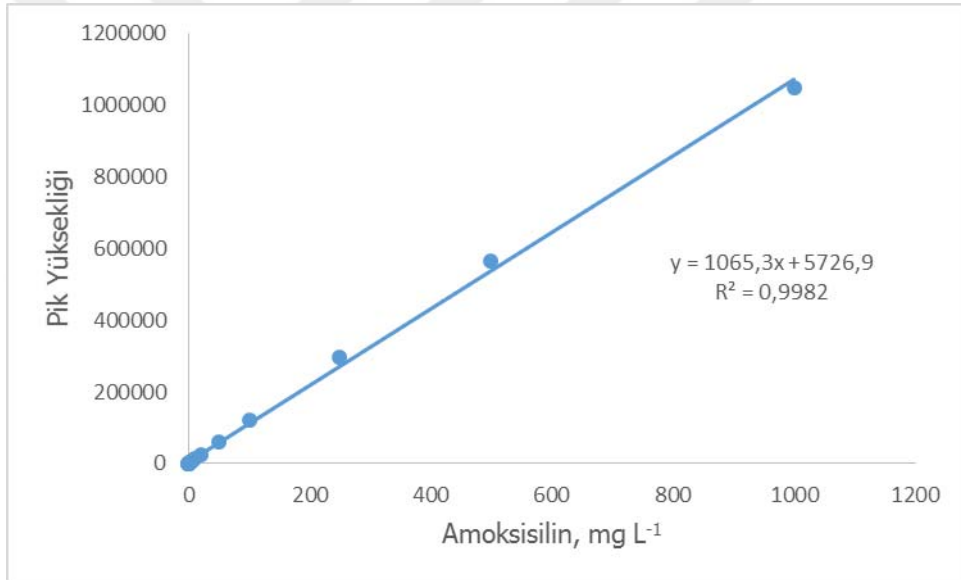


Şekil 6.3 Phenomenex kolonda amoksisilinin $5.0-1000 \text{ mg L}^{-1}$ aralığındaki kromatogramları

Şekil 6.3'te görülen kromatogramlarda amoksisilinin pik alanı ve pik yüksekliği kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 6.4 ve Şekil 6.5' te görülmektedir.

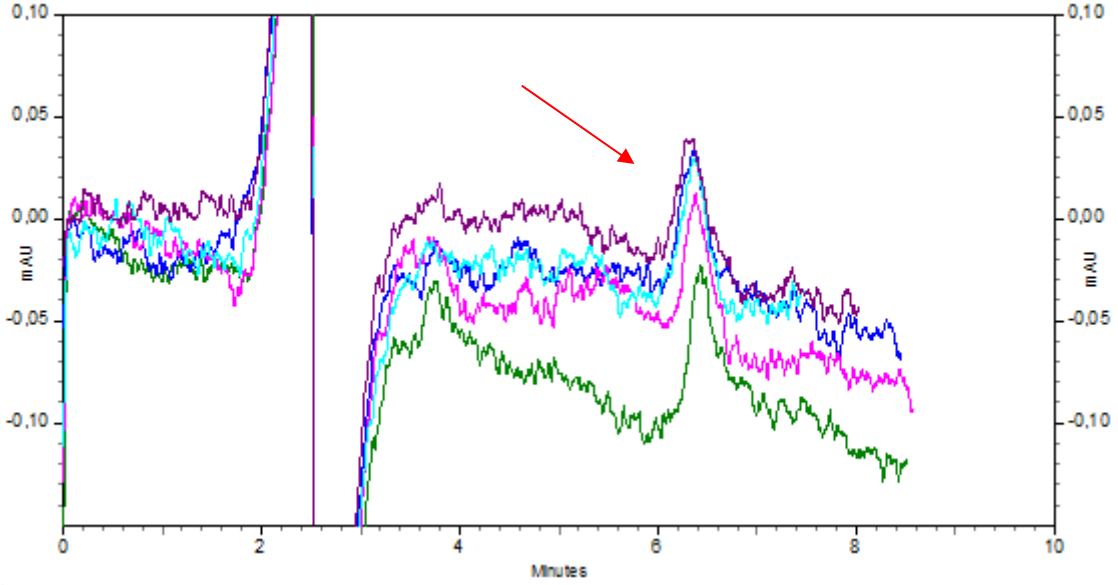


Şekil 6.4 Amoksisilin pik alanı kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği



Şekil 6.5 Amoksisilin pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

HPLC sisteminin LOD (Limit of Detection, Gözlenebilme Limiti) ve LOQ (Limit of quantitation, Tayin Limiti) değerlerinin tespiti amacı ile kalibrasyon grafiğinde kullanılan en düşük derişim 0.05 mg L^{-1} , sisteme 5 defa gönderilmiş ve Şekil 6.6'teki kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.6. 0.05 mg L⁻¹ standart amoksisilin çözeltisinin optimum şartlar altında sisteme gönderilmesi ile elde edilen kromatogramlar.

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır;

$$LOD = \frac{3 \times \text{Standart Sapma}}{\text{Eğim}} \quad (6.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \text{Standart Sapma}}{\text{Eğim}} \quad (6.2)$$

Elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin de aralarında olduğu amoksisilin için tespit edilen sistem analitik performans değerler Çizelge 6.2' de görülmektedir.

Çizelge 6.2 Amoksisilin için elde edilen sistem analitik performans değerleri.

	Pik Alanı	Pik Yüksekliği
LOD, mg/L	0.016	0.008
LOQ, mg/L	0.052	0.025
R²	1.0000	0.9982
y=mx+n	y=27800x+1270.1	y=1065.3x+5726.9
Doğrusal Aralık	0.05-1000 mg L ⁻¹	0.05-1000 mg L ⁻¹

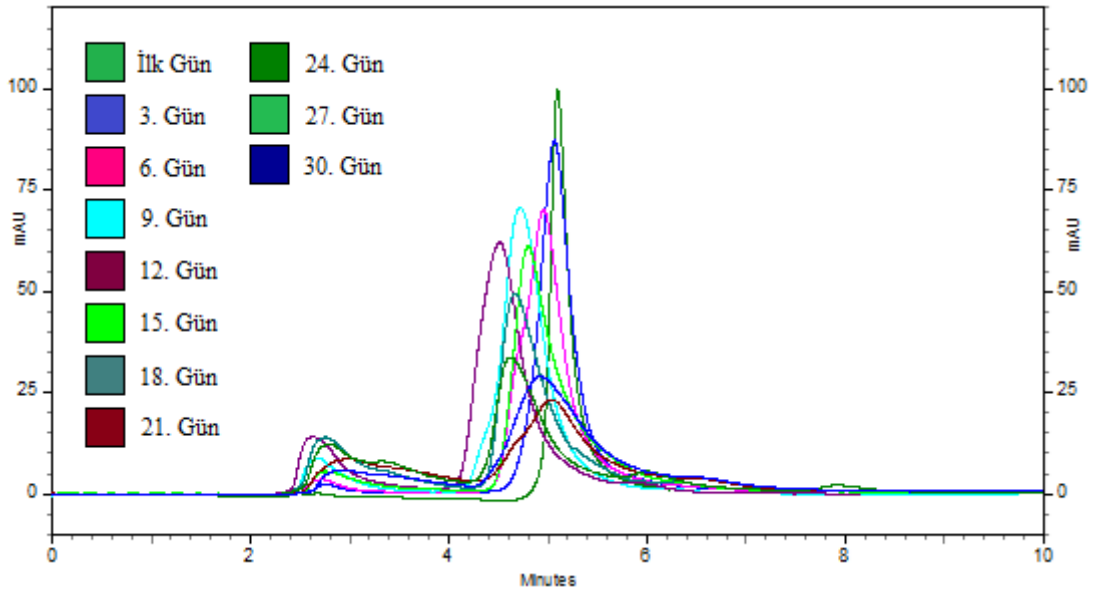
Tabloda görüldüğü gibi optimize edilen şartlar altında amoksisilin basit bir HPLC sistemi ile çok düşük seviyelerde tayin edilebilmektedir.

6.5 Farklı Ortam Koşullarında Amoksisilin Bozunma Tayini

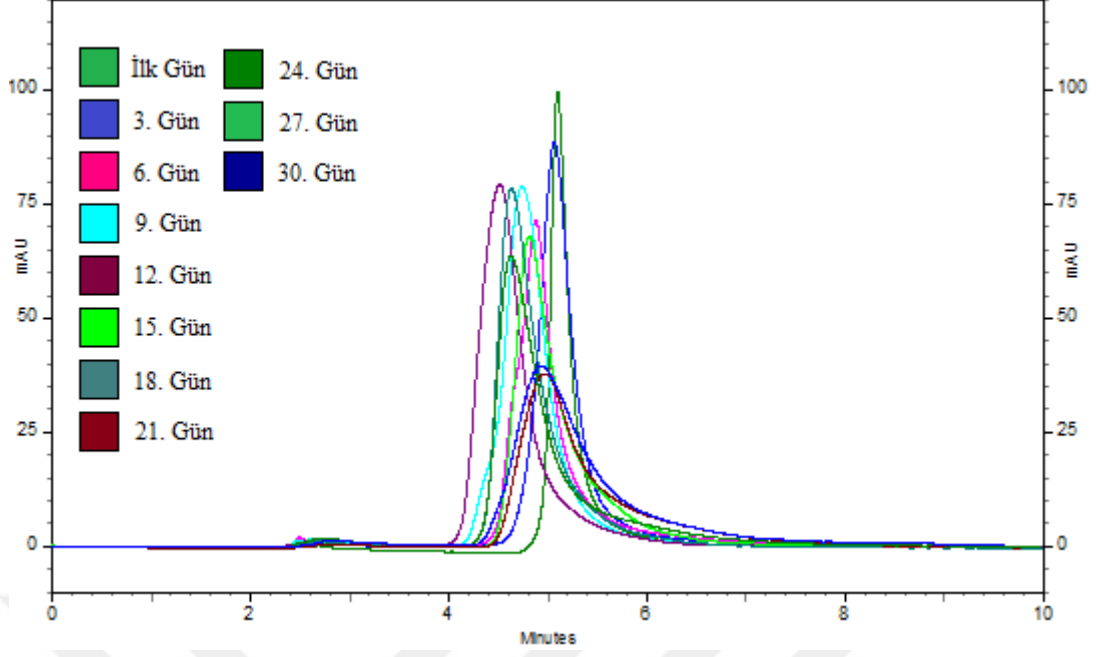
Amoksisilin farklı şartlar altında ne tür bir davranış gösterdiği, bozunup bozunmadığının tespiti amacı ile stok çözeltisinden 100 mg L⁻¹ standart çözeltisi hazırlanıp vialler konulup oda koşuluna, buzdolabına ve derin dondurucuya yerleştirilmiştir.

Standart çözelti hazırlandıktan sonra HPLC ile amoksisilin tayini yapılmış ve ilk günkü değer olarak kaydedilmiştir. Bundan sonraki her 3'er günlük periyotta 30. güne kadar her ortamdan alınan vialerletayinler yapılmıştır.

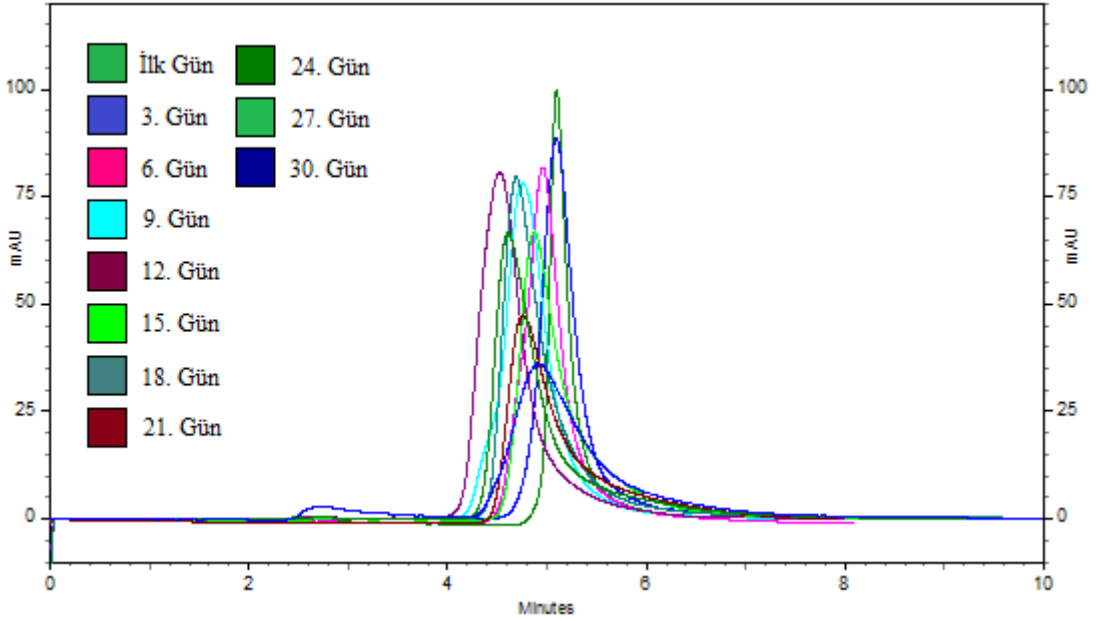
Amoksisilin, oda koşulunda 25 °C, buzdolabında 4 °C ve derin dondurucuda -28 °C' de bekletilmiştir. 30 günün sonunda her ortam için elde edilen kromatogramlar Şekil 6.7, Şekil 6.8 ve Şekil 6.9'da görülmektedir.



Şekil 6.7 Amoksisilin oda koşulunda 3 günlük sürelerle bozunma kromatografisi



Şekil 6.8 Amoksisilinin buzdolabında 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi



Şekil 6.9 Amoksisilinin derin dondurucuda 3 günlük süreçlerle bozunma kromatografisi

Yapılan çalışmalar sonrasında oda koşulunda amoksisilin 12. günde bozunmaya başladığı görülmüştür. Analit sinyalinde azalma ve ölü zamana yakın alıkonma süresine sahip oluşan yeni sinyalde artış görülmüştür. 30 günlük periyodun sonuna doğru ise bozunmanın gitgide arttığı gözlenmiştir. Buna karşın buzdolabı ve derin dondurucuda 30 gün içinde amoksisilinde herhangi bir bozunma görülmemekle birlikte, kolon

performansından dolayı amoksisilin pikinin genişliğinde artma ve sağ tarafında simetriyi bozacak şekilde bir eğilme oluşmaya başladığı görülmüştür. Bu sebeple farklı bir kolonda çalışmaların devam edilmesi kararı alınmıştır.

6.6 İnertsil Kolonda Optimizasyon Çalışmaları

Bundan sonraki çalışmalarda Çizelge 6.3'te görülen kolonda çalışmalara devam edilerek öncelikle mobil faz optimizasyonu yapılmıştır.

Çizelge 6.3 HPLC sisteminde amoksisilin alıkonmasına yönelik farklı kolon için yapılan optimizasyon çalışmaları

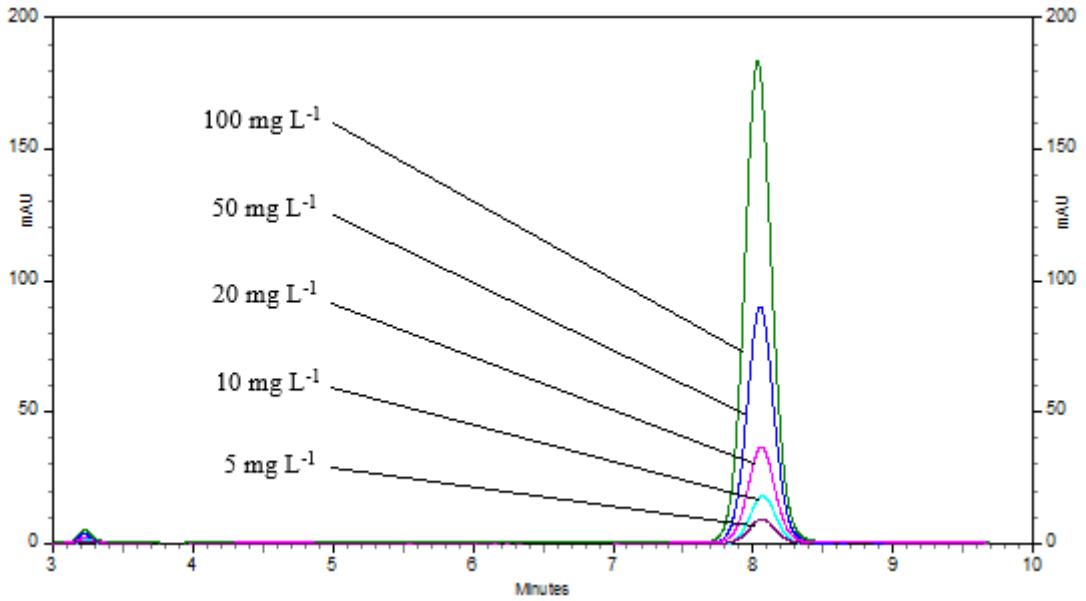
	Parametreler				
	Mobil Faz	pH	Akış Hızı, mL min ⁻¹	Dalga Boyu, nm	Kolon
Çalışma 1	%15 CH ₃ OH - %85 Tampon	8.5	1	230	Inertsil ODS- 3V
Çalışma 2	%20 ACN - %12 CH ₃ OH - %68 Tampon	8.5	1	230	Inertsil ODS- 3V
Çalışma 3	%10 ACN - %13.5 CH ₃ OH - %76.5 Tampon	8.5	1	230	Inertsil ODS- 3V
Çalışma 4	%5 ACN - %14.25 CH ₃ OH - %80.75 Tampon	8.5	1	230	Inertsil ODS- 3V

Bu kolona Çalışma 1'de görüldüğü gibi bir önceki optimum şartlar uygulandığında, 7.88 min gibi uygun bir alıkonma süresinde simetrik bir pik elde edilmiştir. Fakat pik genişliği yaklaşık 2.0 min olduğundan, mobil faz iyileştirilmesine gidilmiştir. Çalışma 2'de mobil faza %20 ACN eklendiğinde 4.14 min alıkonma süresinde, sol tarafında omuz oluşmuş bir pik elde edilmiştir. Aynı zamanda ölü zamana da yakın olduğundan dolayı kromatografi şartlarına uygun olmadığına karar verilmiştir. Çalışma 3'te 4.17 min alıkonma süreli bir pik elde edilmiş ve ölü zamana yakınlığından dolayı tercih edilmemiştir. 4. çalışmada ise %5 ACN eklenmiştir ve 8.12 min alıkonma süresinde

simetrik ve tekrarlanabilir bir pik elde edilmiştir. Bu çalışmadaki değerler optimum koşul olarak not edilmiştir.

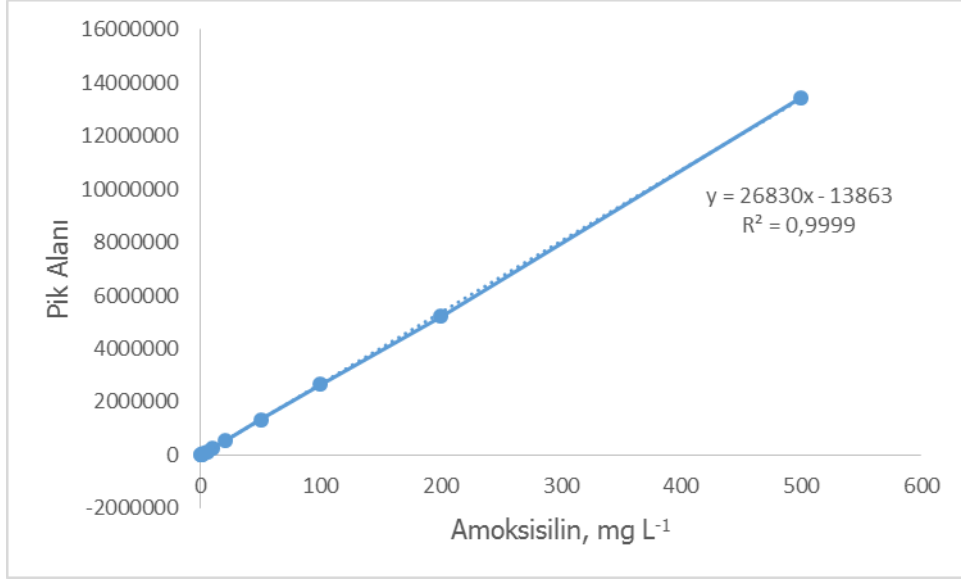
6.7 Farklı Kolonda Amoksisilinin Sistem Analitik Performansı

Sistem performans değerlerinin tespiti amacı ile belirlenen optimum şartlar altında 0.05-500 mg L⁻¹ aralığında standartlar HPLC sistemine enjekte edilmiş ve Şekil 6.10'deki kromatogramlar elde edilmiştir.

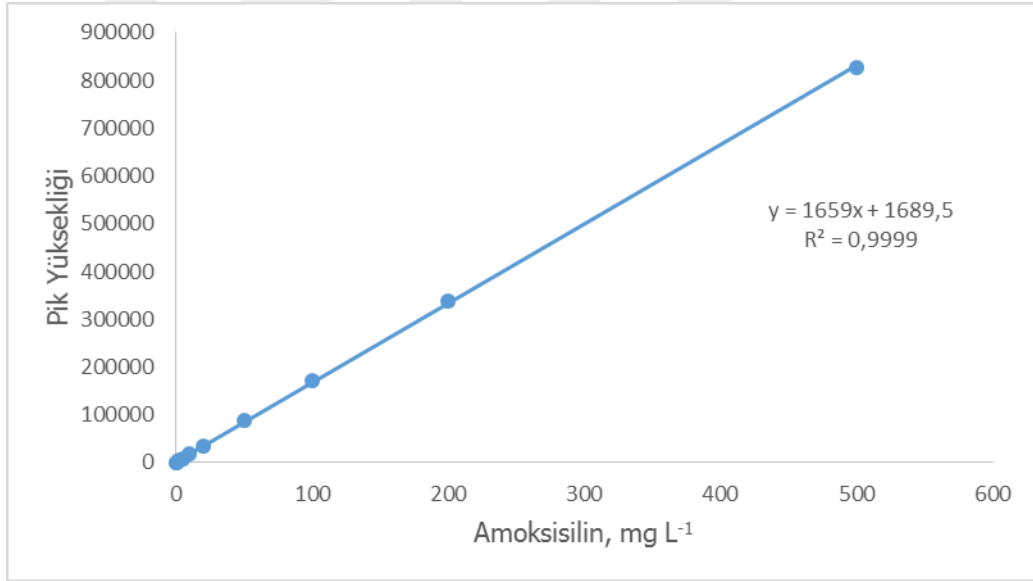


Şekil 6.10 İnertsil kolonda (Çalışma 4, Çizelge 6.3) amoksisilinin 5.0-100 mg L⁻¹ derişim aralığında elde edilen kromatogramları

Şekil 6.10'da görülen kromatogramlarda amoksisilinin pik alanı ve pik yüksekliği kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 6.11 ve Şekil 6.12'de görülmektedir.



Şekil 6.11 Inertsil kolonda (Çalışma 4, Çizelge 6.3) pik alanı kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği



Şekil 6.12 Inertsil kolonda (Çalışma 4, Çizelge 6.) pik yüksekliği kullanılarak elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği

Bu kolonda HPLC sisteminin LOD (Limit of Detection) ve LOQ (Limit of quantitation) değerlerinin tespiti amacı ile kalibrasyon grafiğinde kullanılan en düşük derişim 0.05 mg L⁻¹, sisteme 5 defa gönderilmiştir.

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında, Eşitlik 6.1 ve Eşitlik 6.2 kullanıldı. Amoksisilin için tespit edilen sistem analitik performans değerleri Çizelge 6.4’de görülmektedir.

Çizelge 6.4 İnertsil kolonda amoksisilin için elde edilen sistem analitik performans değerleri

	Pik Alanı	Pik Yüksekliği
LOD, mg/L	0.016	0.022
LOQ, mg/L	0.054	0.074
R²	0.9999	0.9999
y=mx+n	y=26830x-13863	y=1659x+1689.5
%RSD	%0.34-%1.65 (gerçek numuneler için)	%0.65-%1.78 (gerçek numuneler için)
Doğrusal Aralık	0.05-500 mg L ⁻¹	0.05-500 mg L ⁻¹

Tabloda görüldüğü üzere analit için çok düşük tayin limiti elde edilmiştir ve doğrusal kalibrasyon grafiğinin ilk noktası ile LOQ değeri birbirine çok yakın olarak bulunmuştur. Deneysel çalışmaların tümünde hem pik alanı hem de pik yüksekliği kayıt altına alınmıştır. Kantitatif çalışmalarda pik alanı esas alınmış, herhangi bir problemle karşılaşılmaması durumunda kontrol amacı ile pik yüksekliği değerleri de hesaplamaya dahil edilmiştir.

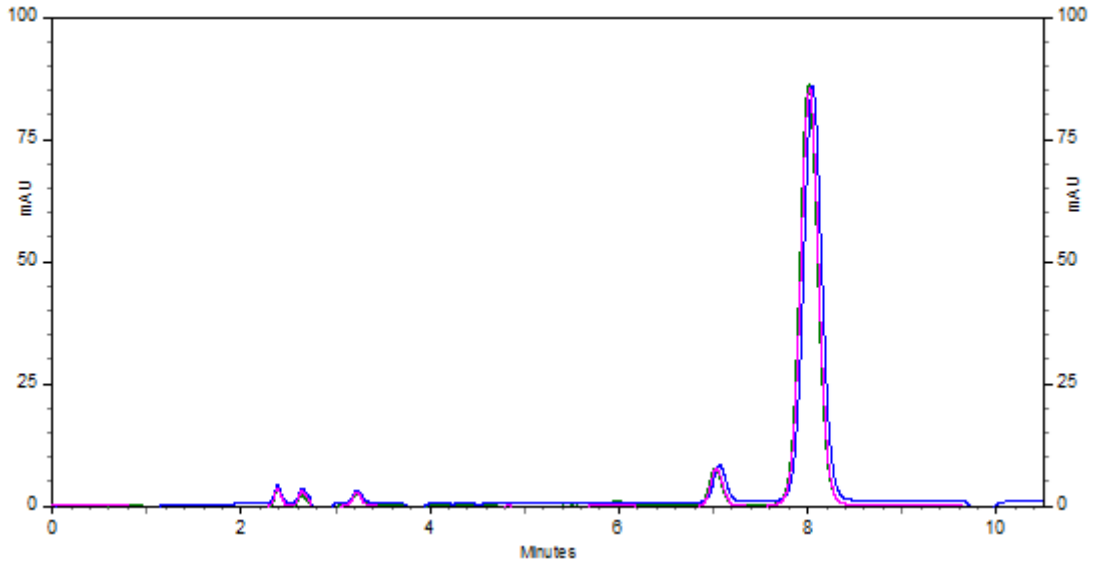
6.8 İlaç Endüstrisinde Amoksisilin İçeren İlaçların HPLC Sisteminde Miktar Tayini

Bu çalışmada kullanılan tüm markalar, ülkemiz ilaç endüstrisinde aktif olarak kullanımı devam eden antibiyotik ilaçlardır. Süspansiyon şeklinde satılan Marka A ve Marka B, tablet şeklinde satılan Marka C ve Marka D yapılarında bulunan amoksisilin kalitatif ve kantitatif tayininin yapılması amacı ile optimum şartlar altında tayin edilmiştir. Toz halinde olan Marka A ve Marka B 80 mL saf su ile süspansiyon haline getirilmiştir. Derişimleri 50 mg L⁻¹ olacak şekilde saf su ile seyreltilmiş ve 1 saat boyunca karıştırılmıştır. İlaçların her biriden 3’er farklı numune hazırlanıp HPLC sisteminde miktar tayini yapılmak üzere viallere alınmıştır. Marka C ve Marka D tablet ilaçlarından

3'er tablet alınıp saf su ile çözülmüştür. Oluşan çözeltiler 0.45 mikron filtrede süzülerek istenmeyen partiküllerden (dolgu maddesi) arındırılmıştır. Her bir çözeltiden son derişimleri 40 mg L⁻¹ olacak şekilde saf su ile seyreltilip 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır ve analizleri yapılmak üzere viallere konulmuştur. Hazırlanan tüm numuneler HPLC sisteminde optimum şartlar altında analiz edilmiştir.

6.8.1 Marka A

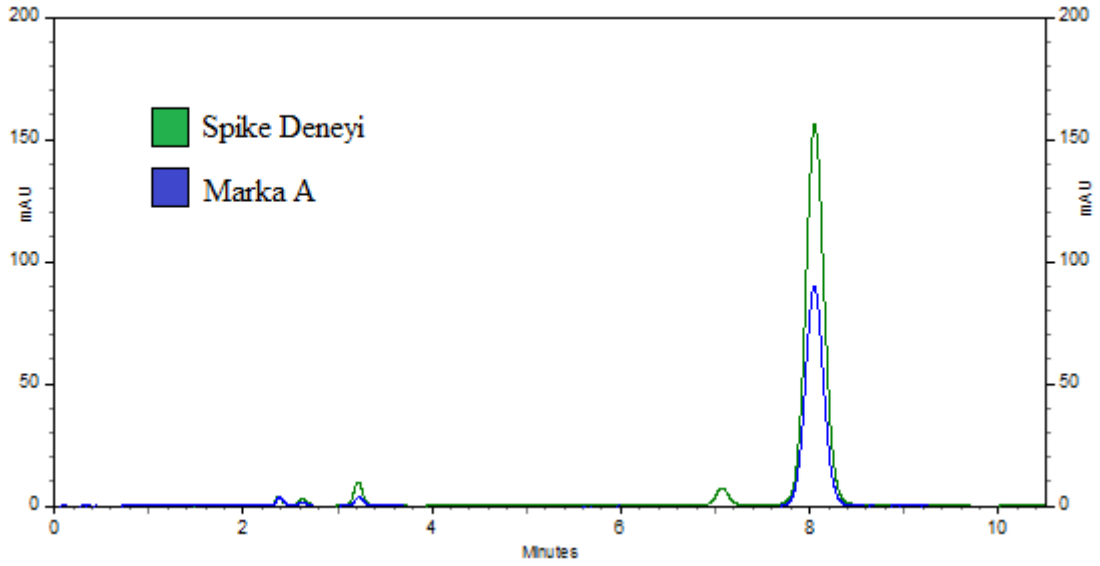
Ürün prospektüsünde, 80 mL'lik süspansiyonda 4000 mg (250 mg/5 mL) amoksisilin bulunduğu iddia edilmektedir. 50 mg L⁻¹ derişimde 3 numune şeklinde hazırlanan Marka A'nın HPLC sisteminde optimum koşullarda analizi sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 6.13'de görülmektedir.



Şekil 6. 13 Marka A numunelerinin HPLC sisteminde (Çalışma 4, Çizelge 6.3.) elde edilen kromatogramları

Yapılan hesaplamalara göre, süspansiyon içerisindeki ortalama toplam amoksisilin miktarı pik alanına göre 3736.59 ± 13.5 mg, pik yüksekliğine göre ise 3750.99 ± 26.95 mg olarak bulunmuştur. Bu sonuçların ürün kutusunda iddia edilen değerden düşük olduğu açıkça görülmektedir.

Elde edilen kromatogramda yaklaşık 8 min alıkonma süreli pikin amoksisiline ait olduğundan emin olma amacıyla spike deneyi yapılmıştır. 0.50 mL 500 mg L⁻¹ standart amoksisilin 5.0 mL ilaç numunesiyle karıştırılıp HPLC sistemindeki analizinden elde edilen kromatogramlar Şekil 6.14'te görülmektedir.

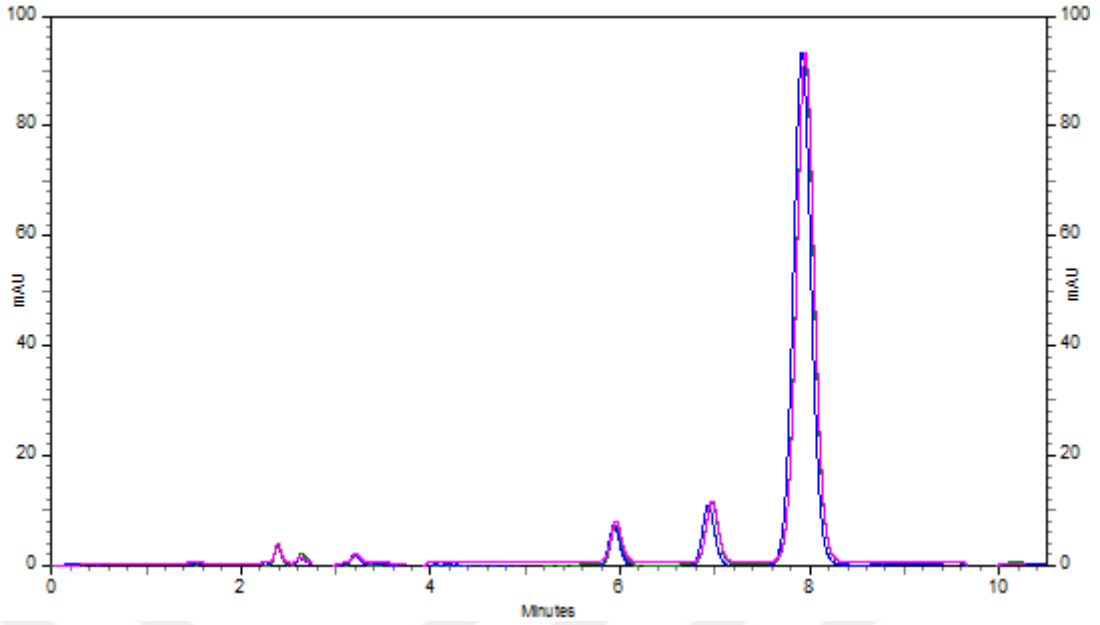


Şekil 6.14 Marka A ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.14' te görüldüğü üzere spike edilen amoksisilin ile analit sinyali aynı yerde çıkmıştır. Bu durum analit sinyali üzerine optimum koşullar altında matriks etkisinin olmadığını ve elde edilen sinyalin analite ait olduğunu ispatlamaktadır.

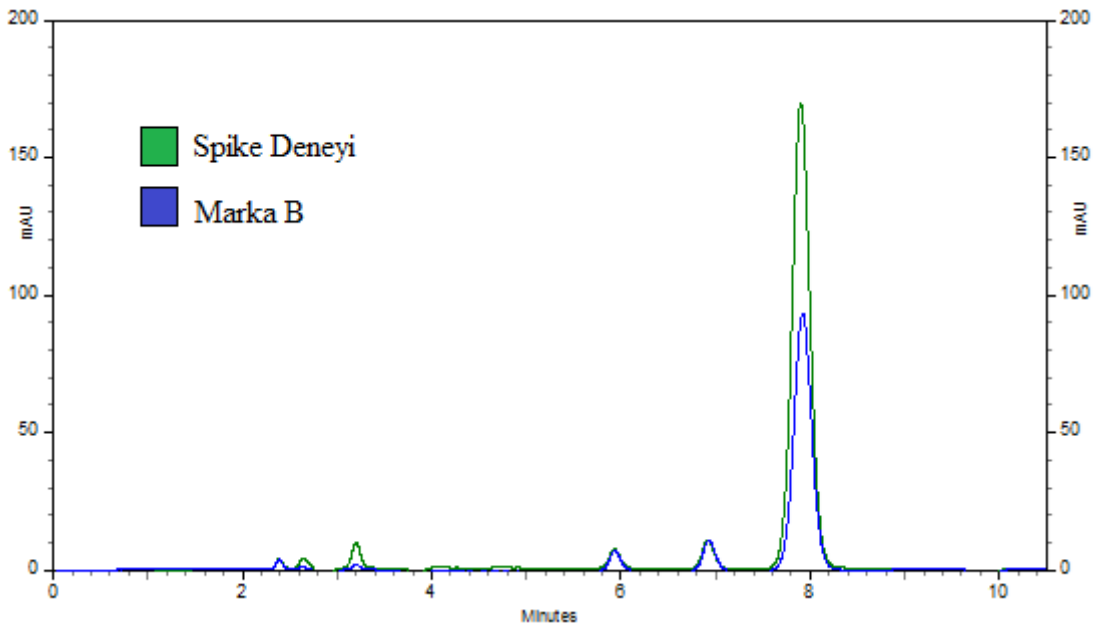
6.8.2 Marka B

Marka A ile aynı şekilde Marka B nin ürün prospektüsünde 80 mL'lik süspansiyonda 4000 mg (250 mg/5 mL) amoksisilin bulunduğu iddia edilmektedir. Hazırlanan 3 numunenin HPLC sisteminde optimum koşullarda analizinden elde edilen kromatogramlar Şekil 6.15'te görüldüğü gibidir.



Şekil 6.15 Marka B numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı

Görüldüğü gibi amoksisilin sinyali standartlarda olduğu gibi yaklaşık 8 dakikada elde edilmiştir. Analit sinyaline ilave olarak örnek kromatogramlarında numunede bulunan diğer bileşenlere ait olduğu düşünülen farklı sinyaller görülmektedir. Amoksisilin sinyalinden emin olmak ve elde edilen diğer sinyallerin amoksisilin den kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek amacı ile spike çalışması yapılmıştır. Yapılan spike deneyinde 0.5 mL 500 mg L⁻¹ standart amoksisilin 5.0 mL ilaç numunesine eklenmiştir ve HPLC sisteminde Şekil 6.16’te görüldüğü gibi analizi yapılmıştır.



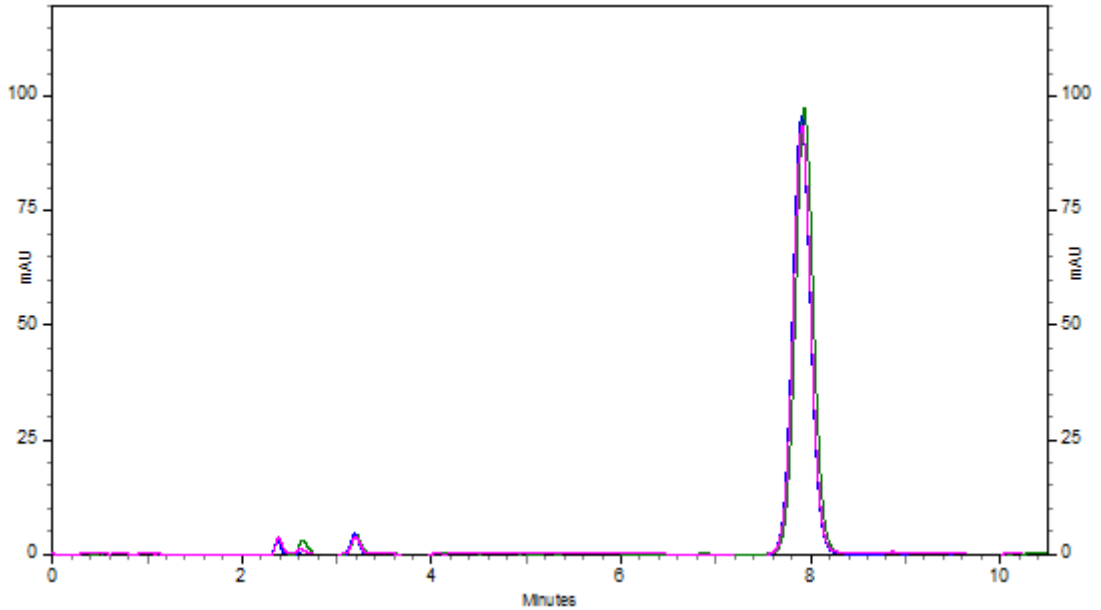
Şekil 6.16 Marka B ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar

Kromatogramlardan da görüldüğü üzere 8. Dakikada amoksisiline ait sinyalde artış gözlenirken diğer sinyallerde bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu durum diğer sinyallerin matrikste bulunan ve bizim çalışma dalgaboyumuzda absorpsiyon özelliğine sahip diğer bileşenlere ait olduğunu ispatlamaktadır.

Süspansiyon içerisindeki ortalama toplam amoksisilin miktarı, iddia edilen miktara oldukça yakındır. Amoksisilin miktarı pik alanına göre 3960.60 ± 13.54 mg, pik yüksekliğine göre ise 4033.02 ± 26.11 mg olarak bulunmuştur.

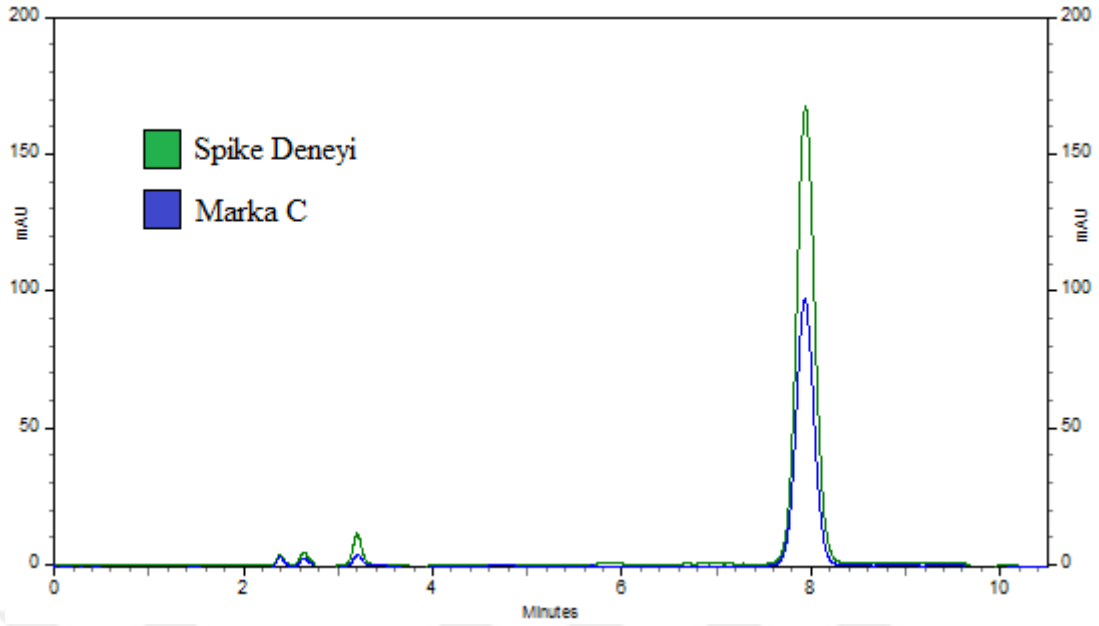
6.8.3 Marka C

Tablet şeklinde bir antibiyotik ilaç olan Marka C için ürün prospektüsünde her bir tablette 1000 mg amoksisilin bulunduğu iddia edilmektedir. Hazırlanan 3 paralel numunenin HPLC sisteminde optimum koşullarda analizinden elde edilen sinyaller Şekil 6.17’de görüldüğü gibidir.



Şekil 6.17 Marka C numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı

Kromatogramlarda görüldüğü üzere standartlarda amoksisilin sinyaline ait alıkonma süresinde simetrik bir sinyal elde edilmiştir. Belirtilen sinyalin amoksisiline ait olduğunu ispatlamak ve analit sinyali üzerine matriks etkisini görmek için spike deneyi yapılmıştır. Bu amaçla 0.50 mL 500 mg L^{-1} standart amoksisilin 5.0 mL ilaç numunesiyle karıştırıldı ve Şekil 6.18’de görülen kromatogramlar elde edilmiştir.

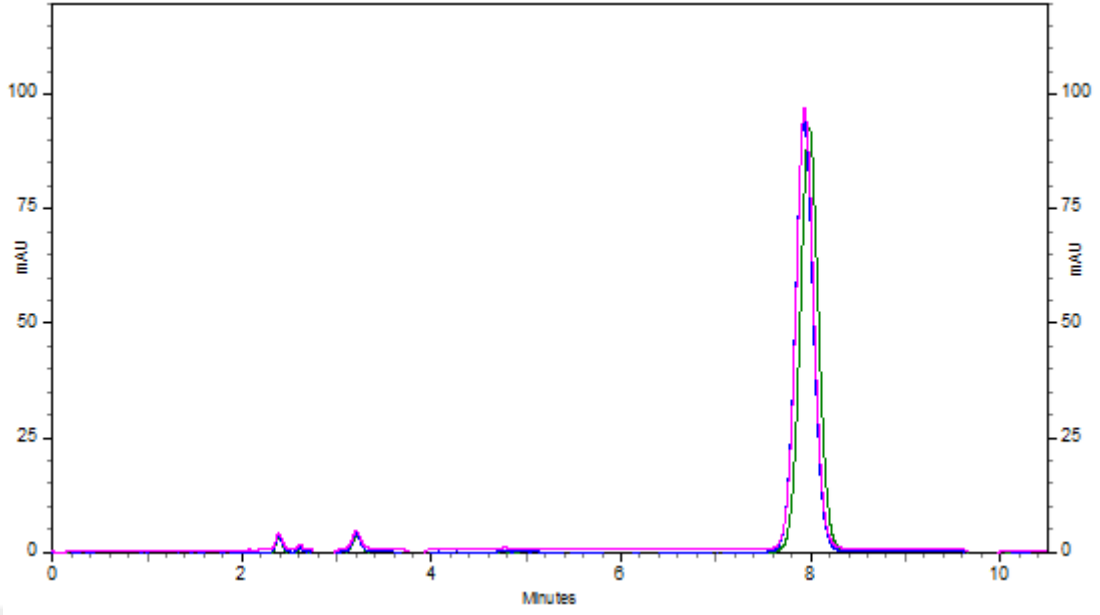


Şekil 6.18 Marka C ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.18. de görüldüğü gibi bulunan sinyal amoksisiline aittir. Marka C numuneleri için yapılan analizler sonucunda ortalama amoksisilin miktarı pik alanına göre 1016.11 ± 16.73 mg/tablet, pik yüksekliğine göre ise 1044.52 ± 16.18 mg/tablet bulunmuştur. Bulunan değerlerden ürün prospektüsünde yazılan değerlerin doğruluğu ortaya konulmuştur.

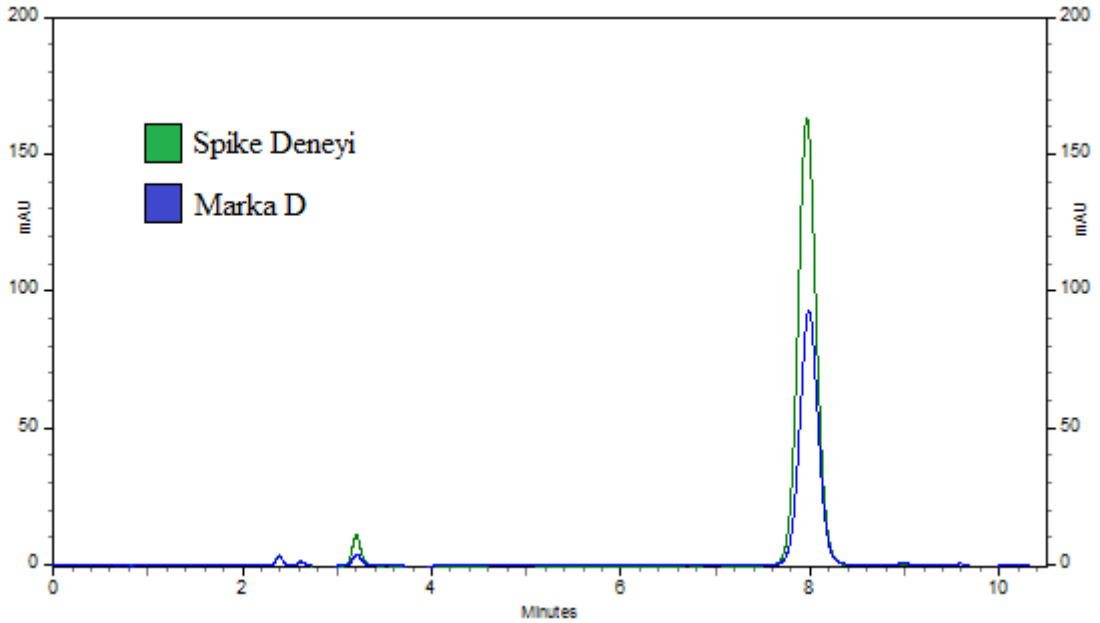
6.8.4 Marka D

Marka D tablet ilacı için de tablet başına içerdiği amoksisilin miktarı 1000 mg olarak belirtilmiştir. Her numunenin HPLC sisteminde optimum koşullarda analiz sonuçları Şekil 6.19'da görülmektedir.



Şekil 6.19 Marka D numunelerinin HPLC sisteminde elde edilen kromatogramı

Tüm paralel analizlerden elde edilen sinyallerin alıkonma süreleri yaklaşık 8 dakikada tespit edilmiş ve diğer örneklerde olduğu gibi spike deneyleri yapılarak Şekil 6.20’de görülen kromatogramlar elde edilmiştir.



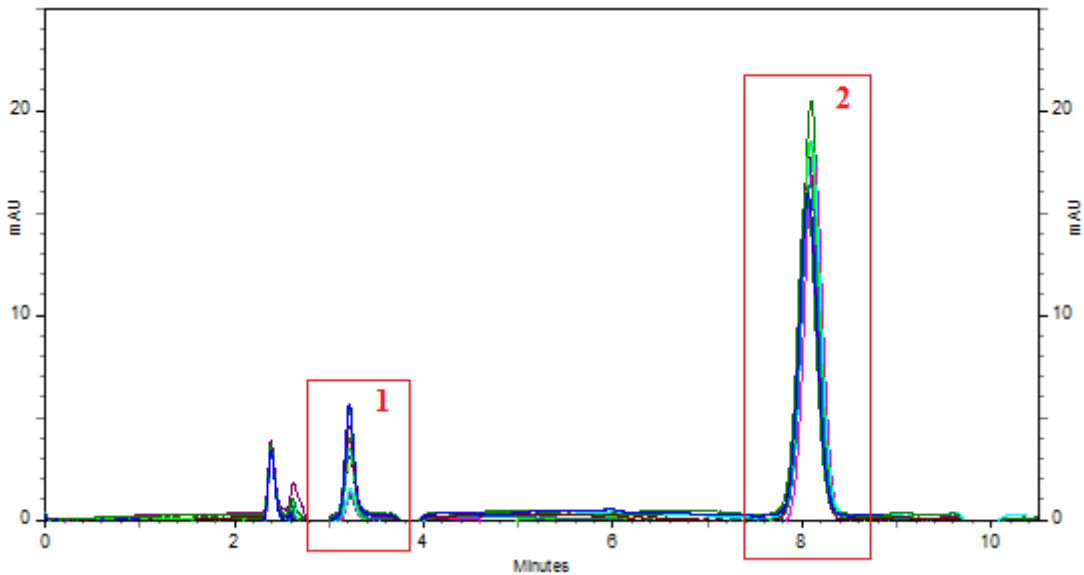
Şekil 6.20 Marka D ve spike deneyi için HPLC sisteminde elde edilen kromatogramlar

Marka D’ nin her tabletinde bulunan ortalama amoksisilin miktarı pik alanına göre 1014.72 ± 10.46 mg, pik yüksekliğine göre 1034.33 ± 18.44 mg olarak bulunmuştur. Bulunan bu değer, ilaç bilgilerinde söylenen değere oldukça yakındır.

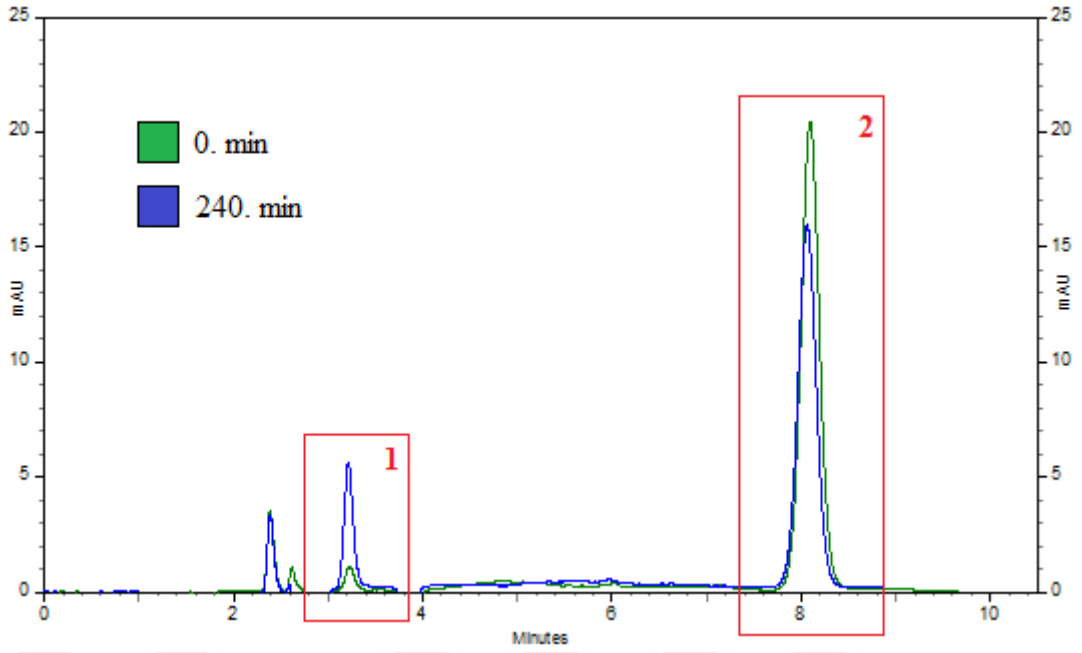
Optimum şartlarda HPLC sisteminde amoksisilin için yapılan miktar tayinine göre; Marka A, Marka B, Marka C ve Marka D ilaçları için hazırlanan tüm numunelerin analizleri sonucunda elde edilen piklerin tümü simetrik ve paralel analizlerden elde edilen sinyallerin alıkonma sürelerinde bir fark yoktur. Yapılan spike deneyleriyle de, amoksisilinde matris kaynaklı alıkonma süresinde kayma olmadığını ve pikin amoksisiline ait olduğunu görülmüştür.

6.9 Amoksisilinin Yapay Mide Ortamındaki Davranışı

Bu çalışmada, mide ortamında amoksisilinin davranışının incelenmesi için Marka D tablet ilacı kullanılmıştır. Yapay mide sıvısını hazırlamak için literatürde belirtilen procedür kullanılmıştır [99]. Bu amaçla 0.70 mL HCl, 0.20 g NaCl ve 0.32 g pepsin 100 mL saf su ile tamamlanarak karıştırılmıştır. Marka D ilacından rastgele seçilen bir adet tablet mide sıvısına atılıp manyetik karıştırıcıda 37°C’ de karıştırılmıştır. Tablet yapay mide çözeltisinde çözündüğü anda çözeltide numune alınıp 0.45 mikron enjektör ucu filtrede süzölmüştür. Süzölen numunenin 0.10 mL’si 100 mL’ye saf su ile seyreltilmiş ve elde edilen 10 mg L⁻¹ derişimindeki numune HPLC sisteminde 0. min olarak analiz edilmiştir. Bundan sonraki her yarım saatlik dilimde aynı işlemler uygulanarak 240. min’e kadar analizler yapılmıştır ve Şekil 6.21 ve Şekil 6.22’de görölen kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 6.21 Amoksisilinin yapay mide ortamında bekleme sürelerine ilişkin kromatogramları



Şekil 6.22 Amoksisilin yapay mide ortamında 0. min ve 240. min' deki bekleme sürelerine ilişkin kromatogramları

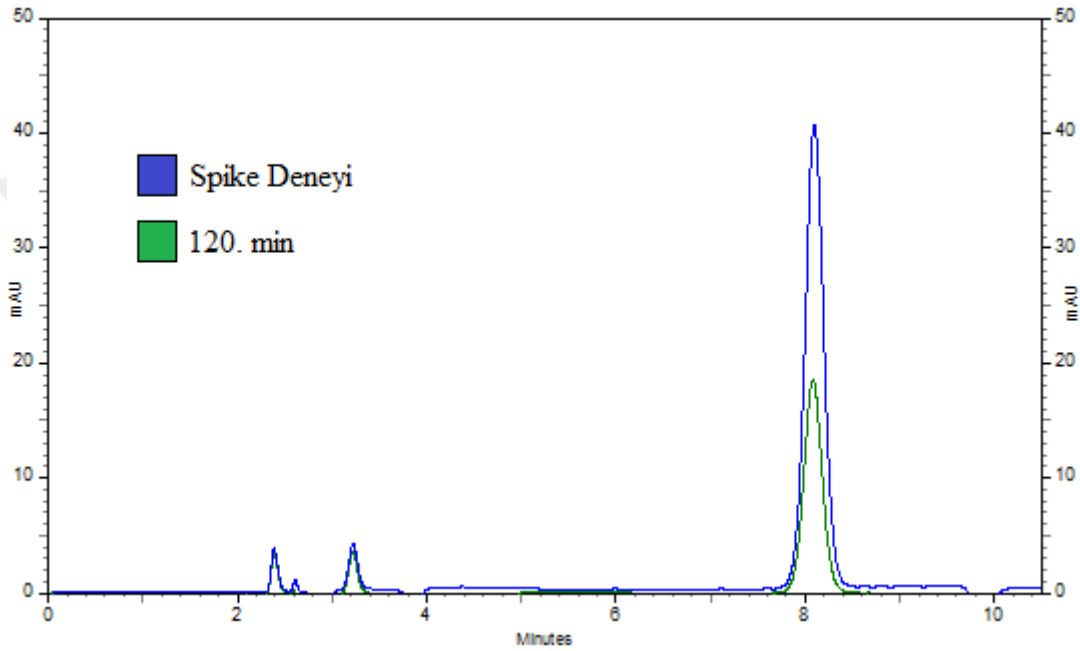
Şekillerde gösterilen 1 ve 2 numaralı pik verilerinde Çizelge 6.5' te de görüldüğü gibi zaman geçtikçe belirgin şekilde farklılık oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir. Amoksisilin sinyalinde azalma ve yaklaşık 3.2 dakika alıkonma süresine sahip analitin bozunma ürününün sinyalinde belirgin bir artış tespit edilmiştir.

Çizelge 6.5 Amoksisilin mide ortamında bekleme sürelerine ilişkin HPLC sistemindeki analiz verileri

	Pik Alanı (1)	Pik Yüksekliği (1)	Pik Alanı (2)	Pik Yüksekliği (2)
0. min	7183	1042	281802	20309
30. min	9673	1457	253113	18193
60. min	9780	1497	254416	18341
90. min	20101	2869	246002	17870
120. min	24801	3651	256612	18471
150. min	26835	3934	227368	16397
180. min	30102	4415	215749	15661
210. min	35773	5115	218570	15885
240. min	38167	5521	217143	15739

1 numaralı pik alan ve yüksekliği zaman içinde giderek artarken, 2 numaralı amoksisiline ait pikinin alan ve yüksekliğinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu noktada 1 numaralı pikin, 2 numaralı pikin de zamanla azalmasına bağlı olarak, amoksisilin bozunduğu veya yeni bir yapı oluşturmasına bağlı bir pik oluştuğu sđylenbilir.

Bu çalışmaya ek olarak amoksisilin 120. min bekleme sđresi için yapılan spike deneyinden elde edilen kromatogramlar Şekil 6.23’de gđrđlmektedir.



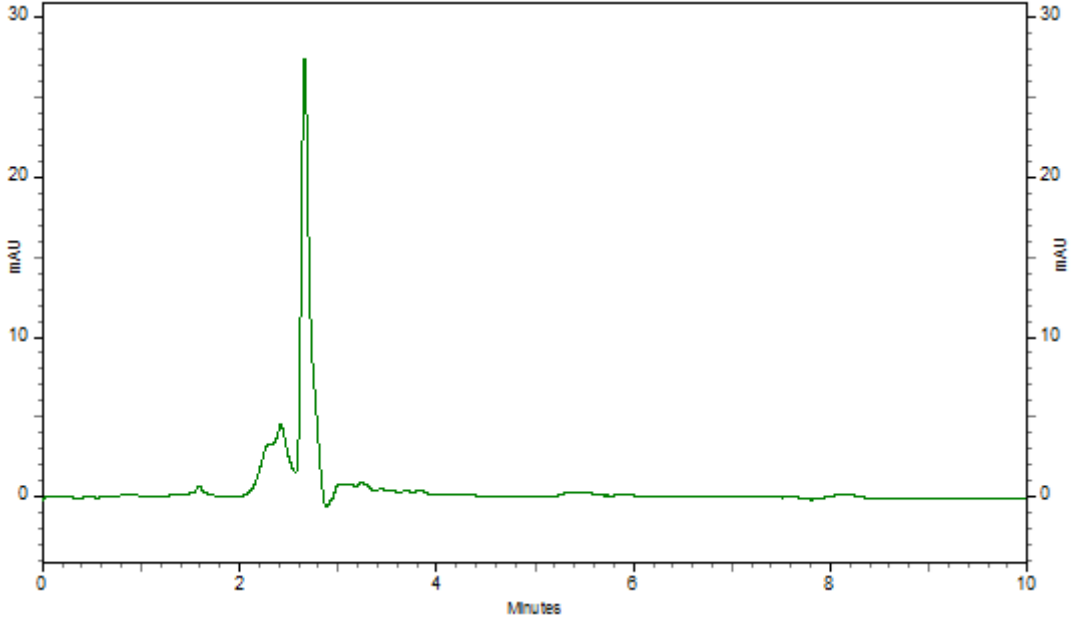
Şekil 6.23 Amoksisilin mide ortamında 120.dakika bekleme sđresinde ve bu numuneye spike deneyi sonrasında elde edilen kromatogramlar

Şekil 6.23 te gđrđldđđđ üzere bozunma őrđnđ olduğu dđřđnđlen sinyal lerde spike sonrası seyrelme oranında bir azalma gđrđlđrken analit sinyalinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Bu durum mide ortamında amoksisilin analitinde zamana bağlı olarak bir bozunma olduğunu gđstermektedir.

6.10 Atıksu Numunelerinde Bulunan Amoksisilin Kantitatif Tayini

Bu çalışmanın amacı, matriksi yoğun olan atıksu numunelerinde bulunan amoksisilin HPLC sisteminde optimize edilen şartlar altında kantitatif olarak doğruluğu yđksek bir şekilde tayin edilip edilemeyeceğini belirlemeye çalışmaktır. Bu amaçla Yıldız Teknik őriversitesi İnşaat Mđhendisliđi Fakđltesi, evre Mđhendisliđi Bđlđmđnden analiz edilmek őrere atıksu őrneđi temin edilmiş ve sistematik deneyler yapılmıştır. Atıksu

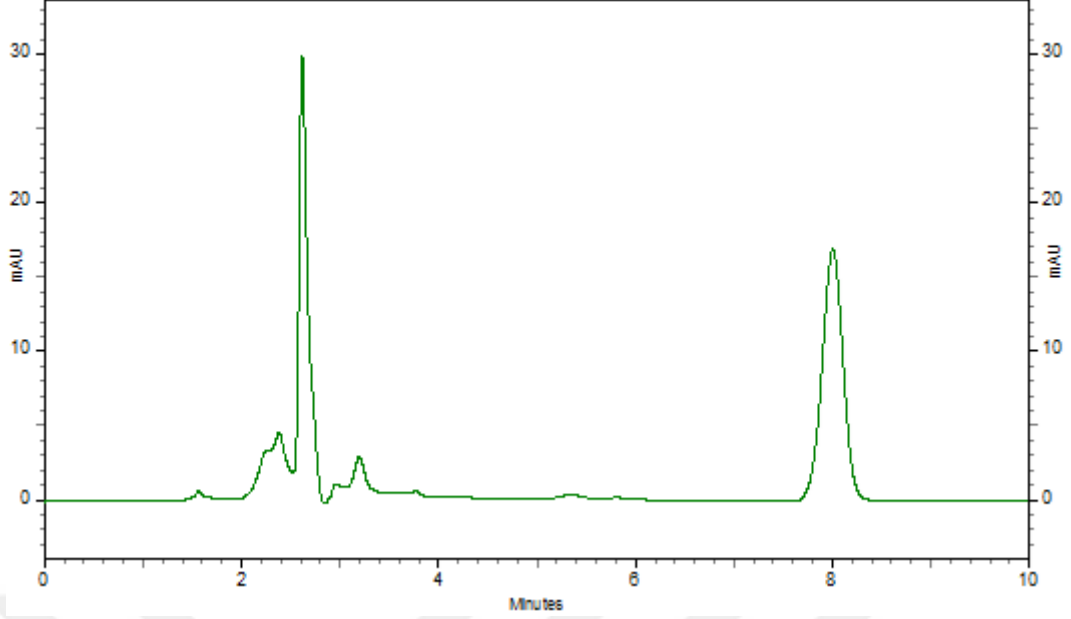
örneğinde amoksisilin olup olmadığını tayin etmek üzere laboratuvara getirilen örnek süzülerek optimum şartlar altında analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogram Şekil 6.24. te görülmektedir.



Şekil 6.24 Atıksu örneğinden optimum şartlarda elde edilen kromatogram

Şekil 6.24'te görüldüğü üzere amoksisiline ait alıkonma süresinde herhangi bir sinyal elde edilememiştir. Bu da örnekte amoksisilin olmadığını göstermektedir.

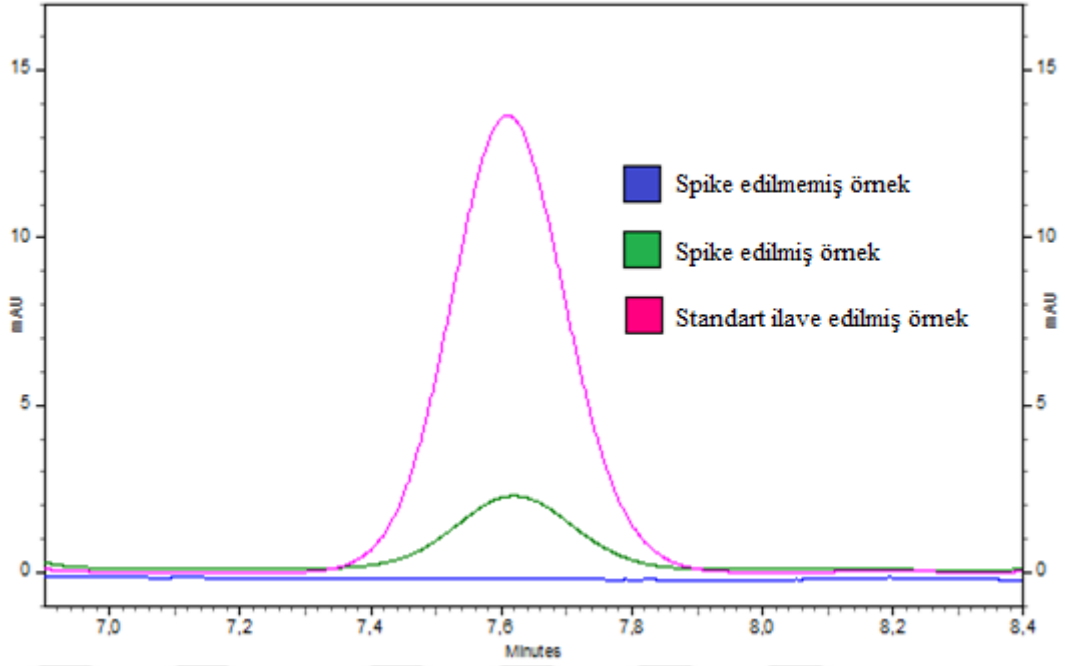
Atıksu numunesinde amoksisilin bulunduğu durumda geliştirilen analitik yöntem ile doğruluğu yüksek bir şekilde tayin yapılabileceği ve analit sinyali üzerine matris etkisini tespit etmek amacıyla spike deneyi yapılmıştır. Bu amaçla 10 mL'lik balon jöjeye 1.0 mL 100 mg L⁻¹ amoksisilin konularak atıksu numunesi ile hacmi tamamlanmıştır. Örnekler 0.45 micron enjektör ucu filtrelerde süzülerek analize hazır hale getirilmiştir. Toplam derişim 10.0 mg L⁻¹ olacak şekilde spike yapılan örneğe ait kromatogram Şekil 6.25'te görülmektedir.



Şekil 6.25 Spike edilmiş atıksu örneğinden elde edilen HPLC kromatogramı

Şekil 6.25'te görüldüğü üzere amoksisilin analitine ait alıkonma süresinde bir analitik sinyal elde edilmiştir. Analit sinyali üzerine matriks girişimi olup olmadığını tespit etmek amacı ile kalibrasyon doğrusu yardımı ile atıksu örneğinde bulunan amoksisilin derişimi tespit edilmiştir. Spike yapılmış numunede amoksisilin miktarı 9.7 mg L^{-1} olarak bulundu. Görüldüğü gibi spike edilen numunede 10 mg L^{-1} amoksisilin beklenirken bu değer 9.7 mg L^{-1} olarak tespit edilmiştir. Bu da geri kazanım veriminin %97 olduğunu göstermektedir. Bu durum geliştirilen analitik yöntem ile atıksu örneklerinde HPLC yardımı ile amoksisilin kantitatif olarak doğruluğu yüksek bir şekilde tayin edilebileceğini göstermektedir.

Analit alıkonma süresinde matriks kaynaklı bir problem olup olmadığını tespiti amacı ile 0.45 micron filtreden süzölmüş spike örneğinden 0.90 mL alınarak üzerine 0.10 mL 500 mg L^{-1} amoksisilin ilave edilmiştir. Bu şekilde seyreltme miktarı minimum tutularak alıkonma süresi üzerine matriks etkisinin olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Örneklere ait kromatogramlar Şekil 6.26'da görölmektedir.



Şekil 6.26 Standard ilave edilmiş ve spike edilmiş örneklere ait kromatogramların büyütülmüş halleri

Elde edilen kromatogramlarda, amoksisiline ait sinyalin alıkonma süresinde bir değişikliğin olmadığı, atıksu örnek matrisinin analit tayininde olumsuz etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır.

6.11 Amoksisilinin Biyoerişilebilirlik Çalışması

Bu çalışmada, bitkinin amoksisilini hangi oranda bünyesine aldığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla marul, kereviz, kıvırcık ve nane olmak üzere 4 farklı bitkiyle çalışılmıştır. Bu bitkiler topraksız tarım ile yetiştirilmek üzere beslenmesi ve büyümesini sağlamak amacı ile her bir bitki için Çizelge 6.6'te de görüldüğü gibi 25 mg L⁻¹ amoksisilin içeren 100 mL'lik besiyerler hazırlanmıştır. Besiyerde kullanılan fide tozu ve fide besini ise İstanbul'da topraksız tarım yetiştiren bir dükkândan temin edilmiştir. Ayrıca kör çalışma olarak besiyerde amoksisilin kullanılmadan bu işlemler tekrar edilip her bitki için 100 mL'lik besiyerler hazırlanmıştır. Bitkilere ilişkin yapılan deneylere başlarken çekilen fotoğraflar Şekil 6.27. de görülmektedir.



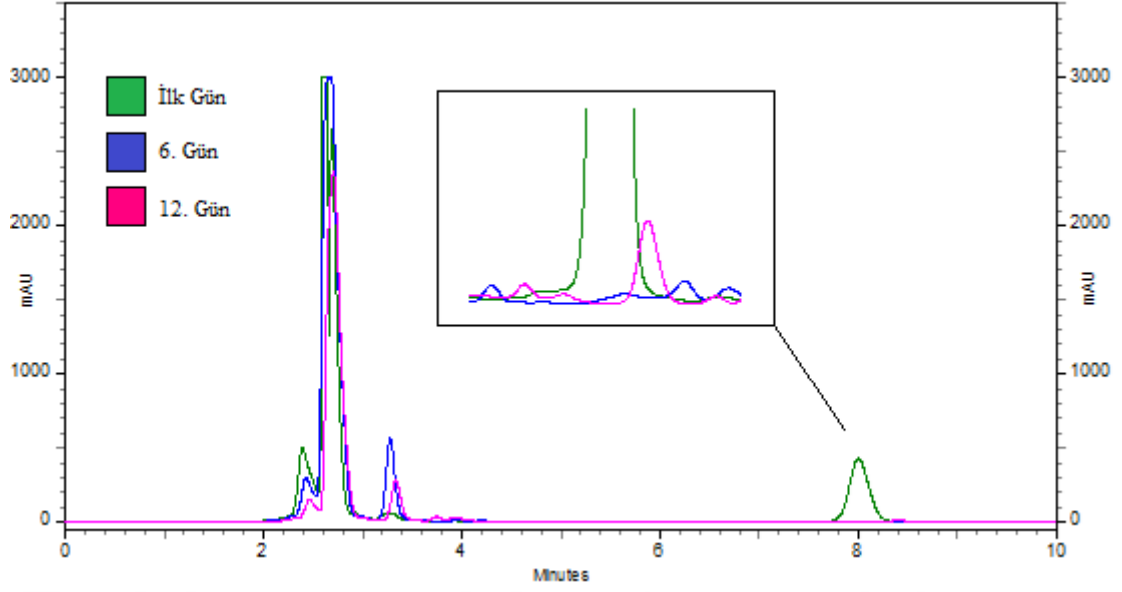
Şekil 6.27 Kereviz, kıvırcık, marul ve nane için hazırlanan topraksız tarım sistemi

Çizelge 6.6 Bitkiler için kullanılan besiyerin amoksisilin ve blank çalışması için bileşimleri

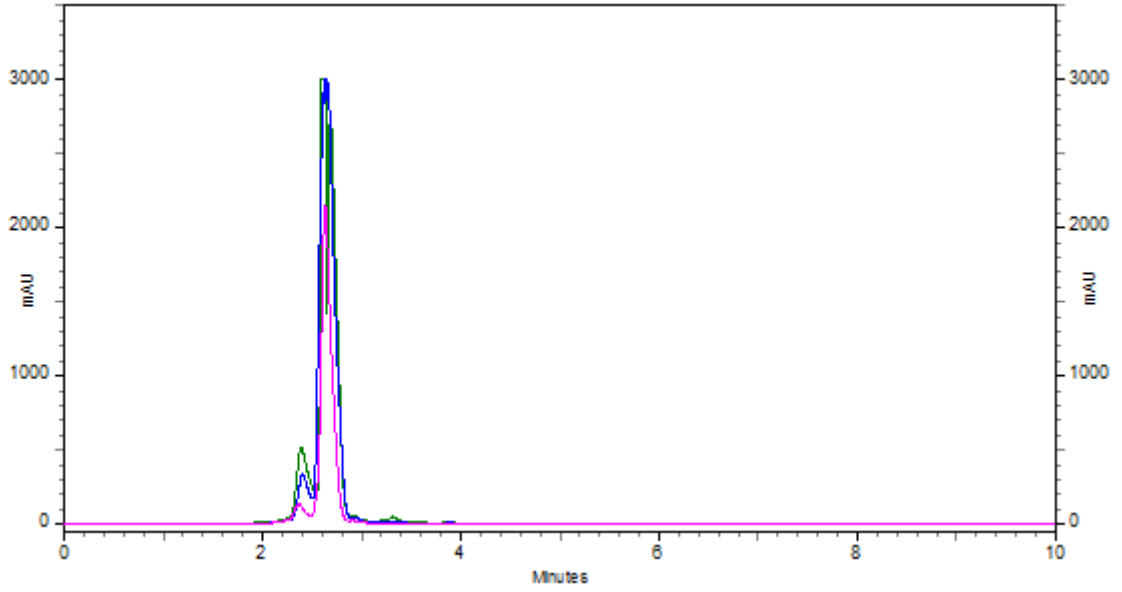
Bitki	Besiyerdeki amoksisilin miktarı (mg/L)	Fide Besini (μ L)	Fide Tozu (mg)
Nane	25	200	0.5
Kereviz	25	200	0.5
Marul	25	500	0.5
Kıvırcık	25	500	0.5

Besiyerler hazırlandıktan sonraki ilk aşamada, 6. ve 12. günlerde numuneler alınmıştır. 12 . güne kadar yapılmasının sebebi ise önceki çalışmalardan amoksisilinin bozunma süresinin oda koşullarında 12 günde gerçekleşmiş olmasıdır. Alınan numuneler 0.45 micron enjektör ucu filtrelerde süzülerek analize hazır duruma getirilmiştir. İki gün aralıklarla besiyerlerin kaybettiği miktar kadar saf su eklenip eklenip miktarlar kayıt altına alınmıştır.

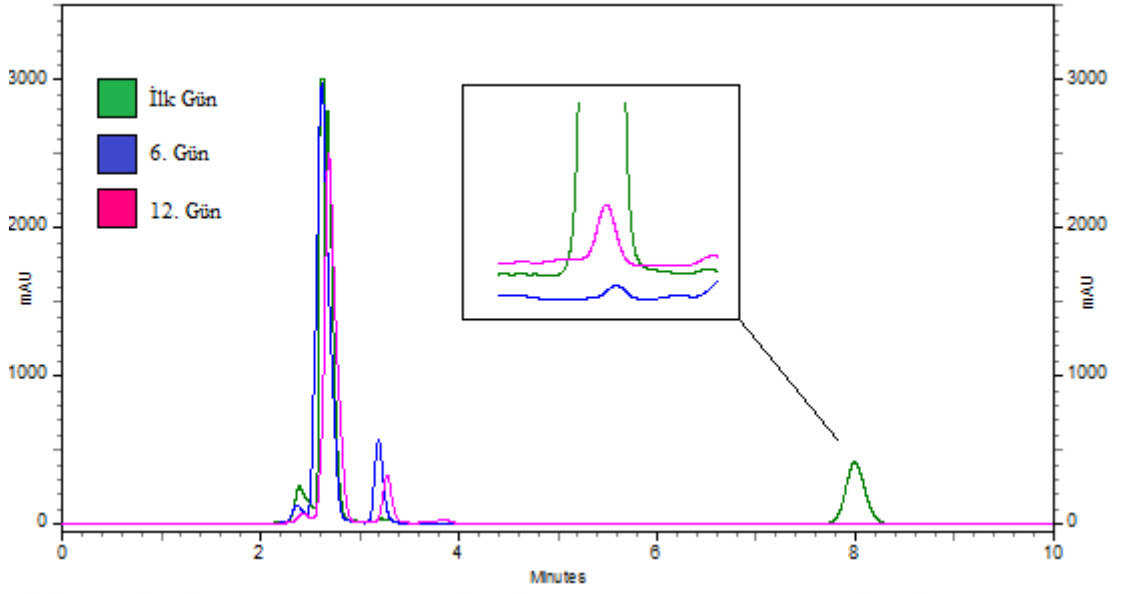
Her bir bitkinin HPLC sistemindeki analizlerinde elde edilen kromatogramlar aşağıdaki şekillerde görüldüğü gibidir.



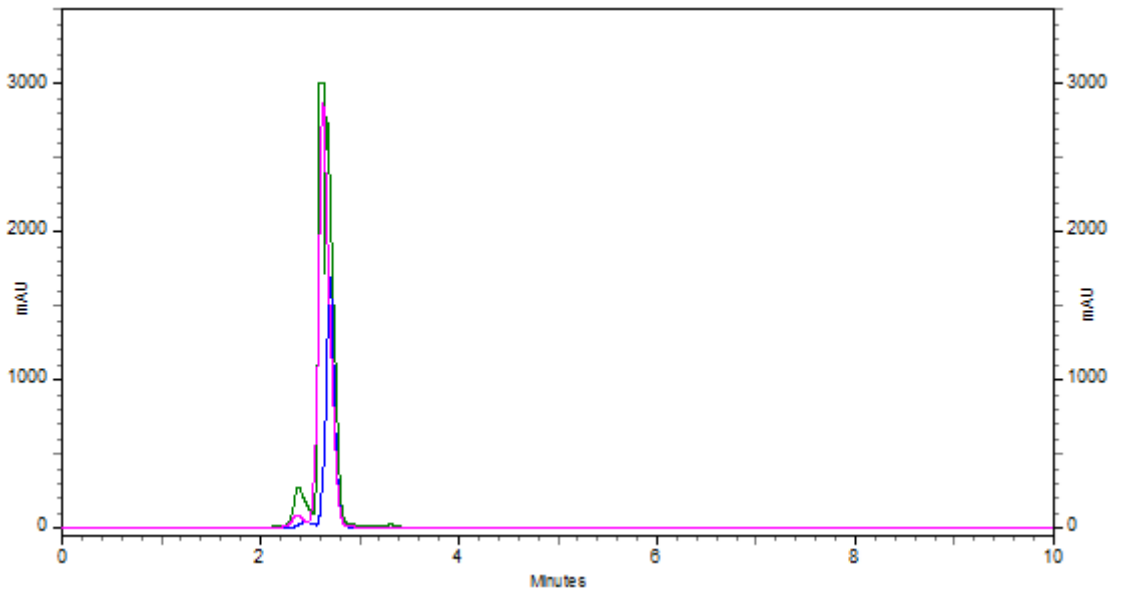
Şekil 6.28 Kivircik için amoksisilin içeren besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki kromatogramları



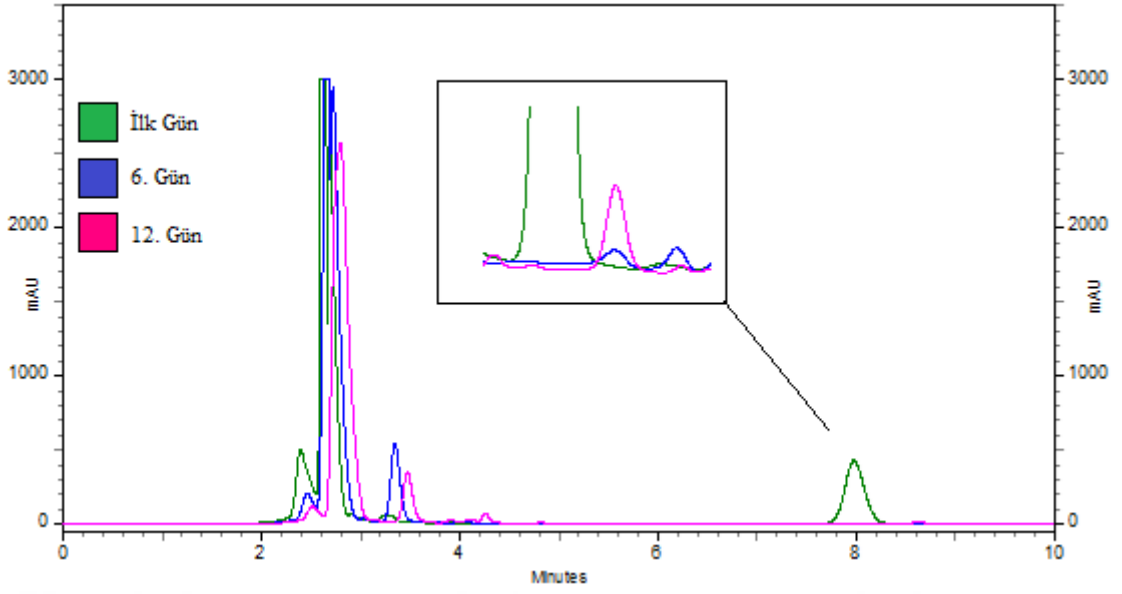
Şekil 6.29 Kivircik için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için elde edilen kromatogramlar



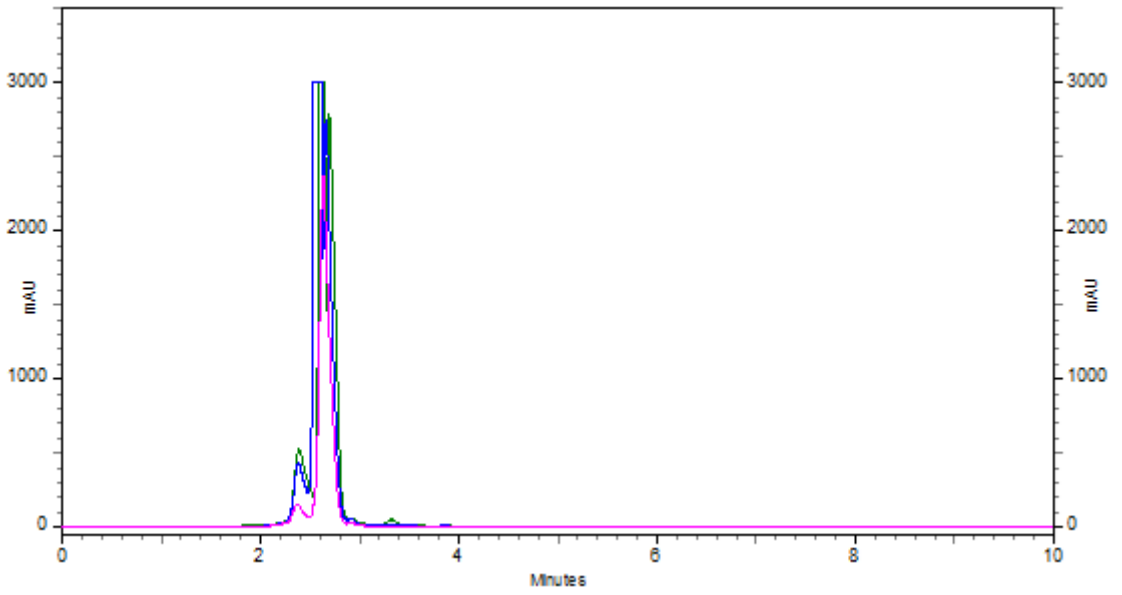
Şekil 6.30 Kereviz için amoksisilin içeren besiyerin 0., 6. ve 12. günler için elde edilen kromatogramlar



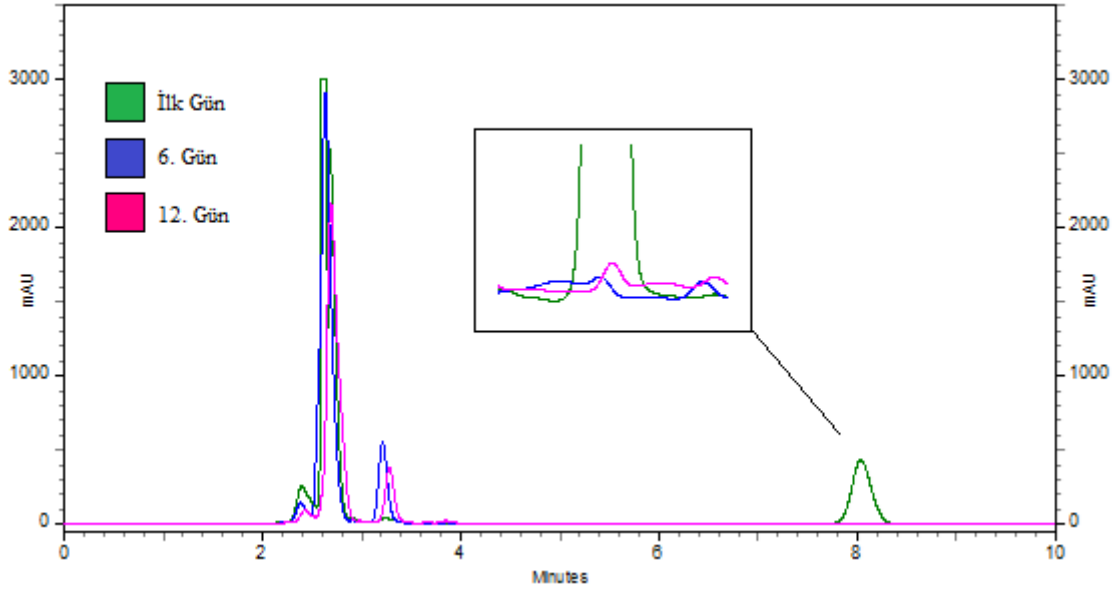
Şekil 6.31 Kereviz için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için elde edilen kromatogramlar



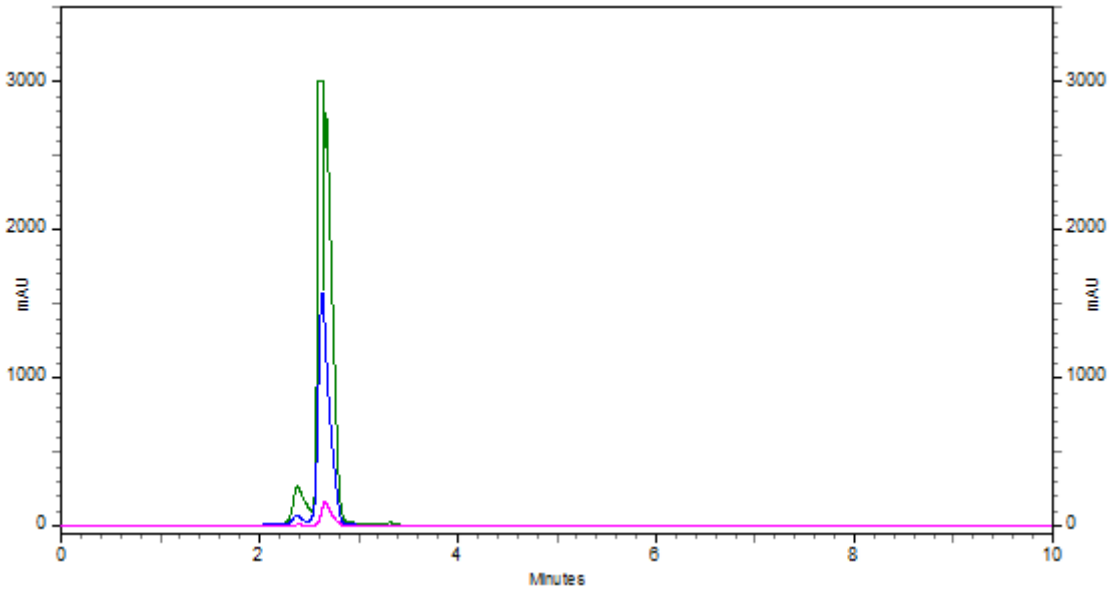
Şekil 6.32 Marul için amoksisilin içeren besiyerden 0., 6. ve 12. günlerde elde edilen kromatogramlar



Şekil 6.33 Marul için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için elde edilen kromatogramlar



Şekil 6.34 Nane için amoksisilin içeren besiyerin 0., 6. ve 12. Günlerde elde edilen kromatogramlar



Şekil 6.35 Nane için blank besiyerin 0., 6. ve 12. günlerdeki blank çalışma için elde edilen kromatogramlar

Şekillerde görüldüğü gibi, amoksisilin davranışı her bitki için aynıdır. Besiyerde amoksisilin pikleri besi yerleri hazırlandığı ilk gün tespit edilirken zaman ilerledikçe amoksisilin sinyalinde belirgin bir değişiklik tespit edilmiştir. Bitkilerin 6. günlerinin sonunda amoksisilin pik alan ve yüksekliklerinde büyük bir azalma olduğu görülmüştür. Buna bağlı olarak yaklaşım 3.2 min alıkonma süreli tanımlanmayan bir pikin aynı oranda alan ve yükseklikçe arttığı gözlemlendi. Bu durumu açıklığa kavuşturmak için

yapılan blank çalışmalarda ise bu tanımlanamayan pik tespit edilememiştir. Buna dayanarak, bitkinin amoksisilini bünyesine alamadığı, amoksisilinin fide besini ve fide tozu ile bileşiminden etkileşip bozunmuş olabileceği, aynı zamanda bitki yetiştirme koşulları gereğince bitkilerin güneş işığına ihtiyaç duymasıyla birlikte amoksisilinin yoğun sıcaklık altında bozunma sürecinin hızlanmış olduğu dűřünölmektedir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında birçok ilaç yapısında yer alan ve birçok sağlık probleminin üstesinden gelmede aktif bileşen olarak sıklıkla başvurulan bir kimyasal olan amoksisilinin farklı matrislerde tayini için hassas ve analitik bir HPLC metodu geliştirilmiştir. Analitin düşük tayin limitlerinde doğruluğu yüksek bir şekilde tayin edilmesine yönelik sistemin tüm değişken parametreleri tez kapsamında optimize edilmiştir. Optimum şartlar altında HPLC-UV sisteminde kullanılan Phenomenex ve Inertsil kolonları için hesaplanan LOQ/LOQ değerleri sırasıyla $0.016 \text{ mg L}^{-1}/0.052 \text{ mg L}^{-1}$ ve $0.016 \text{ mg L}^{-1}/0.054 \text{ mg L}^{-1}$ olarak bulunmuştur..

Farklı ortamlarda amoksisilinin davranışının tespitine yönelik yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarına göre, amoksisilinin buzdolabı ve derin dondurucuda, oda koşuluna kıyasla daha uzun süre yapısı bozunmadan saklanabileceği tespit edilmiştir.

Günümüzde en çok kullanılan ilaçlar arasında olan antibiyotiklerin kullanım doğruluğu açısından bu ilaçların prospektüslerinde söylenen miktarlarda vücuda alınıp alınmadığı antibiyotik direnci için önem arz etmektedir. Bu sebeple ilaç endüstrisinde kullanımda bulunan dört farklı ilaç için geliştirilen analitik tayin yöntemi ile yapılan miktar analizleri sonucunda, iddia edilen miktarlar ile analiz sonucunda elde edilen miktarların birbirinden çok farklı olmadığı görülmüştür.

Amoksisilinin vücuda alındıktan sonra midede bulunduğu süre içerisindeki davranışını inceleme amacıyla analiz edilen ticari ilaçlardan rastgele seçilen bir tabletin mide ortamındaki davranışı incelenmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre kromatogramda amoksisilinle birlikte tanımlanamayan bir pik gözlenmiştir. Bu iki pikin zaman içerisindeki değişimleri göz önüne alınarak amoksisilinin zaman içerisinde bozunduğu ortaya konulmuştur.

İnsanın hayati ihtiyaçlarından biri olan suyun talepleri karşılaması için atıksu arıtım sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Atıksu örneklerinde farklı analitlerin yüksek doğruluk ve duyarlılıkta tayinleri atıksu arıtma stratejilerinin geliştirilmesi açısından son derece önem taşımaktadır. Atıksu arıtım sistemlerinde bir kirleticinin arıtılıp arıtılmadığı, arıtılıyorsa hangi oranda arıtılabildiğı geliştirilecek analitik tayin yöntemlerinin uygulanması ile kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu sebeple matriksi yoğun olan atıksularda amoksisilin analitinin kantitatif tayininin yapılp yapılamayacağı bu tez kapsamında belirlenmek istenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda yüksek geri kazanım verimleri elde edilmiş ve amoksisilin matriks etkilerinden uzak, geliştirilen analitik yöntem ile tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.

Antibiyotikler kapsül ve süspansiyon gibi farklı formlarda çeşitli dolgu maddeleri ile birlikte vücuda alınmaktadır ve bazı yan etkilere yol açmaktadır. İlaç etken maddelerinin saf olarak doğal yollarla vücuda alınmasının daha sağlıklı olacağı düşünülmektedir. Bu sebeple amoksisilin çeşitli bitkilerin topraksız tarım ile bünyesine alınması amaçlanmıştır. Bitkinin yetişme koşullarına bağılı olarak amoksisilin bozunma hızının artmasından dolayı istenilen sonuçlar elde edilmemiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Boxall, A.B.A, Johnson P. ve Smith E.J, (2006). “Uptane of Veterinary Medicines from Soils into Plants”, J. Agric. Food Chem., 54(6): 2288-2297.
- [2] Geyik, M.F., (2006). “Antibiyotik Kullanma Kalitesi Nasıl Değerlendirilir ve İyileştirilir?”, Ankem Derg., 20(2):188-190.
- [3] Akan, H., (2006). “Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Türk Hematoloji Derneği”, Ankem Derg., 20(1):65-7.
- [4] Yıldız, T., (2014). Tavuk Etinde Antibiyotik Kalıntılarının HPLC Yöntemiyle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [5] Akçam, F.Z., Gönen, İ., Kaya, O. ve Yaylı, G., (2004). “Hastane İnfeksiyonu Etkeni Çeşitli Gram-Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Yapımının İki Yöntemle Araştırılması”, Klimik Derg., 17(1): 47-49.
- [6] Bao, D.M., Barreiro, R., Miranda, J.M., Cepeda, A. ve Regal, P., (2015). “Fast HPLC-MS/MS Method for Determining Penicillin Antibiotics in Infant Formulas Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction”, Journal of Analytical Methods in Chemistry, 959675.
- [7] Evaggelopoulou, E.N. ve Samanidou, V.F., (2013). “Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Six Penicillin and Three Amphenicol Antibiotics in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Tissue According to the European Union Decision 2002/657/EC”, Food Chem., 136(3-4):1322-1329.
- [8] Beg, S., Kohli, K., Swain, S. ve Hasnain M.S., (2012). “Development and Validation Of RP-HPLC Method for Quantitation Of Amoxicillin Trihydrate in Bulk and Pharmaceutical Formulations using Box-Behnken Experimental Design”, J. Liq. Chromatogr., 35(1-4):393-406.
- [9] Raju, C.B.V.N., Sharma, H.K., Rao, C.S. ve Rao, G.N., (2009). “RP-HPLC Method for Analysis of Related Substances in Amoxicillin Drug Substance”, Acta Chromatogr., 21(1):57-70.
- [10] Sherwood, P.V., Wibawa, J.I., Atherton, J.C., Jordan, N., Jenkins, D., Barrett, D.A., Shaw, P.N. ve Spiller, R.C., (2002). “Impact of Acid Secretion, Gastritis, and Mucus Thickness on Gastric Transfer of Antibiotics in Rats”, Gut, 51(4), 490-495.

- [11] Joshi, S., (2002). "HPLC Separation of Antibiotics Present in Formulated and Unformulated Samples", J. Pharm. Biomed. Anal., 28(5): 795-809.
- [12] Sahu, K.P. ve Patro, C.S., (2014). "Application of Chemometric Response Surface Methodology in Development and Optimization of a RP-HPLC Method for the Separation of Metaxalone and Its Base Hydrolytic Impurities", J. Liq. Chromatogr., 37(17):2444-2464.
- [13] Ashnagar, A. ve Naseri N.G., (2007). "Analysis of Three Penicillin Antibiotics (Ampicillin, Amoxicillin and Cloxacillin) of Several Iranian Pharmaceutical Companies by HPLC", J. Chem., 4(4): 536-545.
- [14] Samandiou, V.F., Evaggelopoulos, E.N. ve Papadoyannis, I.N., (2006). "Development of A Validated HPLC Method for the Determination of Four Penicillin Antibiotics in Pharmaceuticals and Human Biological Fluids", J. Sep. Sci., 29(11):1150-1160.
- [15] Dousa, M. ve Hasmanova, R., (2005). "Rapid Determination of Amoxicillin in Premixes by HPLC", J. Pharm. Biomed. Anal., 37(2): 373-377.
- [16] Koyuncu, G., (2012). Sulu Çözeltilerde Amoksisilin ve Sefalotin Antibiyotiklerinin İleri Oksidasyon Teknikleri ile Artırılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- [17] Aydemir, M., (2014). Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri.
- [18] Aktuğlu Y., (2002). "Geçmişten Günümüze Antibiyotikler" Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, Kasım 2002, 31: 9-22.
- [19] Çelik, H.D., (2007). Amoksisilin'in İnsan Plazmasında HPLC ile Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [20] Ertan, M., (2004). Antibiyotikler, Farmasötik Kimya, 2. Baskı, 1096-1173, Ankara.
- [21] Aktuğlu, Y., (1997). "Giriş ve Genel Bilgiler", Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, 2 - 3 Mayıs 1997, İstanbul, 11-25.
- [22] Topal, M., Şenel, G.U., Topal, E.I.A. ve Öbek, E., (2015). "Antibiyotikler ve Kullanım Alanları", Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(3):121-127.
- [23] Türkoğlu, F.K., (2008). Pediatri Kliniğine Başvuran Annelerin Çocuklarda Antibiyotik Kullanımı Konusundaki Bilgi ve Tutumlarının Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği, İstanbul.
- [24] Akkan, A.G., (1997). "Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları", Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, 2-3 Mayıs 1997, İstanbul, 53-62.
- [25] Tekpetek, T., (2014). Amoksisilin Molekülünün Moleküler Modellenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

- [26] Sevimli, F.F., (2011). Surface Functionalization of SBA-15 Particles for Amoxicillin Delivery, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [27] Ozturk R., (2002). “Geçmişten Günümüze Antibiyotikler” Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, Kasım 2002, 31:83-100.
- [28] Ergönül, Ö., (2005). “Antibiyotik Kullanımı ve Direnç İlişkisi”, International Journal of Medical Sciences, 1(11):1-6.
- [29] El-Kalek, H.H.A. ve Mohamed, E.A., (2012). “Synergistic Effect of Certain Medicinal Plants and Amoxicillin Against Some Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)”, International Journal of Pharmaceutical Applications, 3(3): 387-398.
- [30] Parlak, E., Çayır, Y. ve Ertürk, A., (2013). “Aile Hekimlerinin Akılcı Antibiyotik Kullanımı Açısından Durumları: Erzurum’dan Kesitsel Bir Çalışma”, Euras. J. Fam. Med., 2(1):27-32.
- [31] Demircan, N., (2012). Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Antibiyotik Profilaksi Rehberi, Bursa İli Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği Yüksek İhtisas Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Bursa.
- [32] Acartürk, F., (1989). “Amoksisilin Soydam’un Katı Hal Stabilitesi Üzerine Bir Çalışma”, J. Pharm. Univ. Mar., 5(1):31-41.
- [33] Mohammadi, M., Najafpour, G.D. ve Ghoreyshi, A.A., (2009). “Chemical Extraction and Separation from the Amoxicillin Plant’s Waste-Stream”, Pertanika J. Sci. & Technol., 17(1): 183-189.
- [34] Gonçalves, L.R.B., Giordano, R.L.C. ve Giordano, R.C., (2005). “Mathematical Modelling of Batch and Semi Batch Reactors for the Enzymic Synthesis of Amoxicillin”, Process Biochem., 40(1):247-256.
- [35] Considine, D.M., (1974). Chemical and Process Technology Encyclopaedia, McGraw Hill, New York.
- [36] Gonçalves, L.R.B., Lafuente, R.F., Guisán, J.M. ve Giordano, R.L.C. (2002). ”The Role of 6-aminopenicillanic Acid on the Kinetics of Amoxicillin Enzymatic Synthesis Catalyzed by Penicillin G Acylase Immobilized onto Glyoxyl-agarose”, Enzyme Microb. Technol., 31(4):464-471.
- [37] Katzung, B.G., (1998). Basic and Clinical Pharmacology, 7th Edition, Appleton & Lange.
- [38] Zayed, M.A. ve Abdallah, S.M. (2005). “Synthesis and Structure Investigation of the Antibiotic Amoxicillin Complexes of d-block Elements”, Spectrochim. Acta, Part A, 61(9):2231-2238.
- [39] Jager, S.A.W., Jekel, P.A. ve Janssen, D.B., (2007). “Hybrid Penicillin Acylases with Improved Properties for Synthesis of β -lactam Antibiotics”, Enzyme Microb. Technol., 40(5):1335-1344.
- [40] Öncül, O., (2002). “Antibiyotikler I”, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, Kasım 2002, 23-38.

- [41] Ullah, M.A., Azad, M.A.K., Sultana, R., Kabir, E.R., Latif, A.H.M.M. ve Hasnat, A., (2009). "Pharmacokinetic Study of Amoxicillin Capsule in Healthy Bangladeshi Subjects using Urinary Excretion Data", J. Pharm. Sci., 8(1):53-59.
- [42] Nathwani, D. ve Wood M.J., (1993). "Penicillins: a Current Review of Their Clinical Pharmacology and Therapeutic Use", Drugs, 45:866-894.
- [43] Paintaud, G., Alvan, G., Dahl, M.L., Grahnen, A., Sjoval, J. ve Svenson, J.O., (1992). "Nonlinearity of Amoxicillin Absorption Kinetics in Human", Eur. J. Clin. Pharmacol, 43(3):283-288.
- [44] Simon, C. ve Stille, W., (1985). Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis, Schattaur, New York.
- [45] Barr, W., Zola, E.M. ve Candle, E.L., (1994). "Differential Absorption of Amoxicillin from the Human Small and Large Intestine", Clin. Pharmacol. Ther., 56(3):279-285.
- [46] Saptarini, N.M. ve Rusniyanti, (2012). "Evaluation of Content and Dissolution Profile of Generic Amoxicillin Tablets Marketed in Indonesia", International Research Journal of Pharmacy, 3(12):64-66.
- [47] GATA, (2000). Antibiyotik Kullanımı, Yayın No:3, Ankara.
- [48] Tavakoli, N., Varshosaz, J., Dorkoosh, F. ve Zargarzadeh, M.R., (2007). "Development and Validation of a Simple HPLC Method for Simultaneous in vitro Determination of Amoxicillin and Metronidazole at Single Wavelength", J. Pharm. Biomed. Anal., 43(1):325-329.
- [49] T.C. Sağlık Bakanlığı Türk İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, E-Reçete İlaç Listesi, <http://www.titck.gov.tr/DisplayDynamicModule.aspx?mld=a/0Tp/ovYIU=>, 25 Şubat 2016.
- [50] Sakar, M.K. ve Tanker, M., (1991). Fotokimyasal Analizler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 67, Ankara.
- [51] Yılmaz, B., (2014). Diklofenak Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [52] Holler, J.F., Skoog, D.A. ve West, D.M., (1999). Analitik Kimya Temelleri, Bilim Matbaa, 497-597, Ankara.
- [53] Holler, J.F., Skoog, D.A. ve Nieman, T., (1998). Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Matbaa, 116-137, Ankara.
- [54] Gülcan, M., (2012). Anorganik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- [55] Ahmadi, M., Madrakian, T. ve Afkhami, A., (2016). "Solid Phase Extraction of Amoxicillin using Dibenzo-18-crown-6 Modified Magnetic-multiwalled Carbon Nanotubes Prior to Its Spectrophotometric Determination", Talanta, 148:122-128.
- [56] Zorluoğlu, S.L., (2012). Metoprolol ile Hidroklorazit İçeren İlaçlarda Etkin Maddelerin Tayini İçin Voltametrik Yöntem Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- [57] Erdoğan, D.A., (2011). Bazı Antidepresan İlaç Etken Maddelerinin Tayini İçin Elektrokimyasal Yöntemler Geliştirilmesi ve Bunların Analitik Uygulamaları, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [58] Zoski, C.G., (2007). Handbook of Electrochemistry, First edition, Elsevier, 892, Netherlands.
- [59] Kissinger, P.T. ve Heineman, W.R., (1996). Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Second Edition, Marcel Dekker, Inc., 983, New York.
- [60] Wang, J., (2006). Analytical Electrochemistry, Third edition, John Wiley, 250, New Jersey.
- [61] Brahman, P.K., Dar, R.A. ve Pitre, K.S., (2013). "Conducting Polymer Film Based Electrochemical Sensor for the Determination of Amoxicillin in Micellar Media", Sens. Actuators, B, 176:307-314.
- [62] Beşergil, B., (2015). Enstrümantal Analiz, 1. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara.
- [63] Öncel, I., Üstün, A.S. ve Keleş, Y., (2004). Bitki Fizyolojisi Laboratuvar Klavuzu, A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletme Yayınları, 48, Ankara.
- [64] Emekdaş, G., Güngör, S., Güni H. ve Kocabeyoğlu, Ö., (1990). "Kromatografik Yöntemler", Gaziantep Üni. Tıp Fak. Derg., 1:108-118.
- [65] Şener, B., Orbey, M.T. ve Temizer, A., (1986). Modern Analiz Yöntemleri, Seldem Ofset Matbaası, 20-56, Ankara.
- [66] Ball, A.P., Davey, P.G., Geddes, A.M., Farrei, I.D. ve Brookes G., (1980). "Lancet I", 8169:620-623.
- [67] Cullmann, W. ve Dick, W., (1986). Immun Infect., 14:188-190.
- [68] Davidson, D.F., (1976). "Clinical Chemistry", 69:67-71.
- [69] Barhaiya, R.H., Turner, P. ve Shaw, E. (1977). "Clinical Chemistry", 77: 373-377.
- [70] Izquierdo, P., Gomez-Hens, A., ve Perez-bendito, D., (1993). "Stopped-Flow Photometric-Determination of Clavulanic Acid in Pharmaceutical and Serum Samples", J. Pharmaceut. Biomed., 11(10):927-931.
- [71] Bird, A. E., Bellis, J.M. ve Gasson, B.C., (1982). "Analyst", 107:1241-1245.
- [72] Pajchel, G., Pawlowski, K., ve Tyski, S., (2002). "CE versus LC for Simultaneous Determination of Amoxicillin/Clavulanic Acid and Ampicillin/Sulbactam in Pharmaceutical Formulations for Injections", J. Pharmaceut. Biomed., 29(1-2):75-81.
- [73] Yeo, S.K., Lee, H.K. ve Li, S.F.Y., (1991). "Separation of Antibiotics by High-Performance Capillary Electrophoresis with Photodiode-Array Detection", J. Chromatogr., 585(1):133-137.
- [74] Lott, A.F., Smither, D.R. ve Vaughan, J., (1985). "Antibiotic Identification by High-Voltage Electrophoresis Bioautography", J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68(5):1018-1020.

- [75] Cutting, J.H., Hurlbut, J.A. ve Sofos, J.N., (1997). "Quantitation of Penicillin G in Medicated Premix Feeds by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography", *J. AOAC Int.*, 80(5):951-955.
- [76] Cutting, J.H., Kiessling, W.M., Bond, F.L., McCarron, J.E., Kreuzer, K.S., Hurlbut, J.A. ve Sofos, J.N., (1995). "Agarose-Gel Electrophoretic Detection of 6 Beta-Lactam Antibiotic Residues in Milk", *J. AOAC Int.*, 78(3):663-667.
- [77] Perez, C.G., Martin, I.G. ve De Aldana, B.R.V., (1991). "Polarographic-Determination of Clavulanic Acid", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9(5):383-386.
- [78] Astigarraga, R.E.B., (2004). Galeno Research Unit.
- [79] Aghazadeh, A. ve Kazemifard, G., (2001). "Simultaneous Determination of Amoxicillin and Clavulanic Acid in Pharmaceutical Dosage Forms by LC with Amperometric Detection", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25(2):325-329.
- [80] Kupiec, T., (2004). "Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography", *Int. J. Pharm. Compd.*, 8(3):223-227.
- [81] Kılıç, E. ve Köseoğlu, F., (1997). *Enstrümental Analiz İlkeleri, Birinci Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.*
- [82] Imer, O., (2014). *Kodeinin HPLC Tayini ve Optimizasyon Sürecinin Yapay Sinir Ağları ile Modellenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Soğuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.*
- [83] Skoog, D., Holler, F.J. ve Nieman, T., (1998). *Principles of Instrumental Analysis, 5th Edition, Saunders College Publishing, Philadelphia.*
- [84] Snyder, L.R. ve Kirkland, J.J., (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2. Baskı, Amerika Birleşik Devletleri.*
- [85] Skoog, D., Holler, F.J. ve Neiman, T.A., (1999). *Enstrümental Analiz İlkeleri, 5. Basım, Bilim Yayıncılık, 739-741.*
- [86] Korkmaz, A., (2006). *Çoklu İlaç Karışımlarında Etken Maddelerin Kantitatif Tayinleri İçin Metod Geliştirme, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.*
- [87] Gündüz, T., (1999). *İnstrümental Analiz, Gazi Kitabevi, 1225-1273, Ankara.*
- [88] Dibek, H., (2014). "Analitik Laboratuvarlarda HPLC Kolonu Seçimi", *Turkchem Derg.*, 60-61.
- [89] Mavi, E.E., (2013). *Bazı Antidepresanların Vücut Sıvılarında Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Yöntemi ile Tayini İçin Metod Optimizasyonu, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.*
- [90] Kromidas, S. (2005). *More Practical Problem Solving in HPLC, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*
- [91] Snyder, L.R., Kirkland, J.J. ve Dolan, J.W., (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd edition, John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey.*
- [92] Teixeira, S., Delerue-Matos, C., Alves, A. ve Santos, L., (2008). "Fast Screening Procedure for Antibiotics in Wastewaters by Direct HPLC-DAD Analysis", *J. Sep. Sci.*, 31(16-17):2924:2931.

- [93] Ahmed, M., Suresh babu, G. ve Shetty, A.S.K., (2011). "Development and Validation of Amoxicillin by RP-HPLC Method in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Forms", *International Journal of ChemTech Research*, 3(3): 1037-1041.
- [94] Tokumura, T., Nagaoka, M. ve Machida, Y., (2012). "Effect of Doses and Dosage Forms on the Bioavailability of Amoxicillin in Non-fasted Rats", *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 22(6):568-570.
- [95] Matar, K.M., (2006). "Simple and Rapid LC Method for the Determination of Amoxicillin in Plasma", *Chromatographia*, 64(5-6):255-260.
- [96] Tippa, D.M.R. ve Singh, N., (2010). "Development and Validation of Stability Indicating HPLC Method for Simultaneous Estimation of Amoxicillin and Clavulanic Acid in Injection", *American Journal of Analytical Chemistry*, 1(3):95-101.
- [97] Dhoka, M., Gawande, V. ve Joshi, P., (2010). "High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Amoxicillin Trihydrate and Bromhexine Hydrochloride in Oral Dosage Forms", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2:129-133.
- [98] Ghassempour, A., Rafati, H., Adlnasab, L., Bashour, Y., Ebrahimzadeh, H. ve Erfan, M., (2007). "Investigation of the Solid State Properties of Amoxicillin Trihydrate and the Effect of Powder pH", *AAPS Pharmscitech*, 8(4):E93.
- [99] Galia, E., Nicolaidis, E., Hörter, D., Löbenberg, R., Reppas, C. ve Dressman, J.B., (1998). "Evaluation of Various Dissolution Media for Predicting in vivo Performance of Class I and II Drugs", *Pharmaceutical Research*, 15(5):698-705.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Tuğçe UNUTKAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.11.1989 / İSTANBUL
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : tugceunutkan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2009
Lise	Sayısal	Şehremini Anadolu Lisesi	2003

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014	Bureau Veritas Consumer Product Services	Part-Time Kalite Güvence Uzman Yardımcısı
2012	Organik Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş.	Stajyer
2010	Organik Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş.	Stajyer

ÖDÜLLERİ

1. Kimya Mühendisliği Laboratuar Poster Çalışması Başarı Ödülü

