

173770

AMOKSİSİLİN 'İN SÜREKLİ AKIŞ
İNJEKSİYON ANALİZİ,
UV-SPEKTROFOTOMETRİK
VE TİTRİMETRİK YÖNTEMLER İLE
MİKTAR TAYİNİ

ZEHRA BÜLBÜL
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Şubat-2004

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zehra BÜLBÜL'ün "AMOKSİSİLİN 'İN SÜREKLİ AKIŞ İNJEKSİYON ANALİZİ, UV-SPEKTROFOTOMETRİK VE TİTRİMETRİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ" başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 25.02.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:.Doç. Dr. Göksel Altıokka	
Üye	: Doç. Dr. Zeki Atkoşar	
Üye	: Yrd. Doç. Dr.Erol Açikkalp	
Üye	:	
Üye	:	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
13.02.2004..... tarih ve 05/4..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AMOKSİSİLİN 'İN SÜREKLİ AKIŞ İNJEKSİYON ANALİZİ, UV-SPEKTROFOTOMETRİK VE TİTRİMETRİK YÖNTEMLER İLE MİKTAR TAYİNİ

ZEHRA BÜLBÜL

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA

2004

Geniş spektrumlu penisilin türevlerinden ampisilin ve amoksisilin uzun yıllardan beri antibakteriyel tedavide kullanılmaktadır. Amoksisilin oral yoldan absorbe edilen yarı sentetik bir antimikrobiyal ilaç olup gastric *Helicobacter pylori* infeksiyonlarının tedavisinde bir başka antibiyotik ve antiasit ilaçla birlikte geniş şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Amoksisilin'in UV spektrofotometrik, potansiyometrik, kondüktometrik ve sürekli akış injeksiyon analizi (FIA) yöntemleri ile miktar tayinlerinin yapılabilirliği araştırılmıştır. Sonuçta kondüktometri hariç diğer üç yöntem ile amoksisilin'in tabletlerdeki miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler amoksisilin içeren tabletlere uygulanmış sonuçların farmakopelere uygunluğu tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Amoksisilin, Akış İnjesiyon Analizi, UV-Spektrofotometri, Potansiyometri, Kondüktometri, Miktar Tayini.

SUMMARY

Master of Science Thesis

THE DETERMINATION OF AMOXICILLIN BY FLOW INJECTION ANALYSIS, UV-SPECTROPHOTOMETRIC AND TITRIMETRIC METHODS

ZEHRA BÜLBÜL

University of Anadolu, Institute of Health Sciences
Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA

2004

Extended spectrum penicillins-ampicillin and amoxicillin have been used in antibacterial therapy for many years. Amoxicillin is an orally absorbed, semi-synthetic broad-spectrum antimicrobial drug. It is now widely used in a standard eradication treatment of gastric *Helicobacter pylori* infections, where it is combined with a second antibiotic and an acid suppressing agent.

In this study, quantitative determination of amoxicillin was carried out with UV- spectrophotometric, conductometric, potentiometric and continuous flow injection method. As a result with three methods out of conductometric method the quantitative determination of amoxicillin was performed in tablets. The development method were applied amoxicillin tablets and the results were discussed as a suitable for pharmacopoeiae.

Keywords: Amoxicillin, Flow Injection Analysis, UV-Spectrophotometry, Potentiometry, Conductometry, Determination.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince değerli fikirleri ve hoőgörüsüyle beni destekleyen ve yönlendiren danıőmanım ve çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA'ya;

Bilgi ve tecrübesinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR'a

Çalıőmalarımın her aşamasında sonsuz sabır ve özveriyle bana yardımcı olan Eczacılık Fakültesi analitik kimya anabilim dalı Araő. Gör. Kevser KIRCALI'ya;

Araőtirmalarım sırasında beni destekleyen ve yardımcı olan arkadaşlarım Ahmet ERTAŐ, Aylın GÜLTEN ve Yasemin TURAN'a beni yetiőtiren ve bugünlere gelmemde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili anneme ve babama;

En içten teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. AMS ile İlgili Genel Bilgi.....	2
Tedavide Kullanımları.....	3
Üst Solunum Yolu Enfeksiyonları.....	3
İdrar Yolu Enfeksiyonları.....	3
Menenjit.....	3
Tifo ve Sigelloziste Kullanılışı.....	4
2.2. AMS'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.3. AMS ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	5
3. DENEYSEL BÖLÜM.....	13
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	13
3.2. Kullanılan Aletler.....	13
3.3. Uygulanan Yöntemlerde Standart Çözeltilerin Hazırlanması...	14
3.3.1. UV - Spektrofotometrik Yöntem.....	14
3.3.2. Titrimetrik Yöntemler.....	14
3.3.3. Akış Enjeksiyon Analizi Yöntemi (AEA).....	15
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	15
4.1. AMS'in UV Spektral Karakteristiklerinin İncelenmesi.....	15

4.2. AMS'in Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyonu.....	16
4.3. AMS'in Akış Enjeksiyon Analizi (AEA) ile Yapılan Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	18
4.4. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasotik Preparatlara Uygulanması...	22
4.4.1. UV Spektrofotometrik Yöntem ile Farmasotik Preparatlardaki AMS Tayini.....	22
4.4.2. Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemi ile Farmasotik Preparatlardaki AMS Tayini.....	23
4.4.3. AEA yöntemi ile Farmasotik Preparatlardaki AMS Tayini	25
4.5. Yöntemlerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	25
5. KAYNAKLAR.....	27
ÖZGEÇMİŞ.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. AMS'in molekül yapısı	4
4.1. AMS'in UV spektrumu (5.00×10^{-5} M derişimde, %60 metanol içerisinde)	16
4.2. AMS'e ait kondüktometrik titrasyon eğrisi	17
4.3. AMS'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi	18
4.4. 2.0×10^{-6} M derişimdeki AMS çözeltisinin pH'a karşı pik alanları	19
4.5. AMS'in 1.0×10^{-6} - 5.0×10^{-6} M derişimler arasındaki çözeltilerinin optimum koşullarda elde edilen AEA sinyalleri	20
4.6. Amoklavin'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi	24
4.7. Remoxil'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1. AMS'in AEA ile 1.0×10^{-6} – 5.0×10^{-6} M derişimindeki çözeltilerinin optimum koşullarda elde edilen sinyallerinin doğruluk ve kesinlik incelemesi	21
4.2. AMS'in AEA ile gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları	21
4.3. AMS içeren tabletlerin(AMOKLAVIN®) analiz sonuçları (n=8)	26
4.4. AMS içeren tabletlerin(REMOXIL®) analiz sonuçları (n=8)	26

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amoksisilin (AMS), bir aminopenisilin türevi olup ampisilin ile benzer kullanıma sahiptir. Mide-bağırsak sistemindeki emilim oranı ampisiline göre daha fazladır ve besinlerden daha az etkilenir. Yan etkileri ampisiline benzemekle birlikte, ishal olasılığı AMS'de daha düşüktür. Spektrum aralığı beta-laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ile geniş bir aralığa yayılmaktadır [1].

AMS tayini için; başta yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) olmak üzere, spektrofotometri, kapiler elektroforez (CE), infrared spektroskopisi (IR) gibi yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmada AMS'in tayini için literatürlerde yer almayan sürekli akış enjeksiyon analizi (AEA), UV spektrofotometrik yöntem ve potansiyometrik yöntemler geliştirilerek bu yöntemlerin farmasötik preparatlara (etken maddesi AMS olan çeşitli tabletler) uygulanabilirliği araştırılmıştır. Yöntem geliştirilirken analitik açıdan tümüyle bilimsel bir yol izlenmiş, ilgili validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 AMS İle İlgili Genel Bilgi

AMS %95 ten daha az ve % 105'ten daha fazla (2S, 5R, 6R)-6-[(R) -2-amino -2- (4 - hidrosifenil) asetamido] - 3,3 - dimetil -7- okso -4-tiya-1-azabisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilik asit içermez [2]. AMS, ampisilinin fenil yan zinciri üzerine bir hidroksil grubu ilavesi ile elde edilen türevidir. Ampisilin'den en önemli farkı mide-bağırsak kanalından yaklaşık iki kez daha fazla oranda (%90) ve daha hızlı emilmesi, aynı dozda oluşturduğu maksimum kan düzeyinin ampisiline oranla yaklaşık iki kat olması ve daha uzun sürmesidir. Besinlerin, AMS'in mide ve bağırsaktan emilimi üzerine çok az etkisi vardır.

AMS vücutta ampisiline dönüşmez. Plazma proteinlerine, penisilin G ve V' ye (%80 veya daha fazla) göre çok az, ampisilinininkine yaklaşık olarak eşit oranda (ortalama %20) bağlanır. Absorbe edilen dozun yaklaşık %50-70'i değişmeden böbreklerden (özellikle tübüler salgılanma suretiyle) atılır. Kalan kısmının büyük bölümü, ampisilin ile olduğu gibi, karaciğerden elimine edilir. Bu iki antibiyotik eşit dozda alındıklarında AMS'in safra içindeki konsantrasyonu, ampisiline oranla daha yüksektir. AMS' in yarılanma ömrü 1-1.5 saat kadardır; bu değer ağır böbrek yetmezliğinde 8 saate kadar çıkar. AMS interstisyel sıvıya, balgama, orta kulak sıvısına ve nazal sinus salgısına, ampisiline göre daha fazla geçer ve daha fazla konsantre olur. Balgamdaki konsantrasyonunun, aynı dozda ampisilin ile olanın beş katına kadar çıkabildiği bildirilmiştir. Ancak balgamdaki konsantrasyonu, yine de kandakinden önemli ölçüde düşük kalır. Örneğin AMS'in balgamdaki konsantrasyonu ortalama olarak kandakinin 1/5'i iken ampisilin için bu oran 1/20 dolayındadır.

AMS, duyarlı bakterilere bağlı solunum yolu infeksiyonları, akut otitis media, üriner infeksiyonlar ile diğer indikasyonlarda ampisilin kadar etkinlik gösterir. Çocuklarda orta kulak iltihabı tedavisinde, penisilin V ve eritromisin'den daha etkili bulunmuştur. Grup A streptokoklara karşı etki gücü penisilin V'ninkine yaklaşık olarak eşittir.

AMS'in tavsiye edilen optimal günlük dozu 25-50 mg/kg'dır; genellikle 8 saatte bir uygulanarak oral olarak verilir. İntravenöz veya intramusküler enjeksiyonla veya i.v. infüzyonla da uygulanabilir.

Üriner enfeksiyonlarda erişkinlerde 10-12 saat ara ile günde iki kez 3 g, bel soğukluğunda 1 g probenesid ile tek doz halinde 2-3 g ve orta kulak iltihabı olan çocuklarda (3-10 yaş) iki gün boyunca günde iki kez 750 mg olarak verilir.

Yan etkileri bakımından ampisiline benzer ve onun gibi sıklıkla cilt dökülmelerine neden olabilir. Ancak bu ilacı alanlarda ishal, ampisilin alanlara göre daha seyrek görülür. Bunun nedeni AMS'in absorpsiyonunun çok fazla olması feçeste fazla kalmaması ve kolona fazla erişmemesidir [3].

AMS bir aminopenisilin'dir. Bu grup penisilinlerin en önemli özellikleri *E.coli*, *H. influenzae*, *Shigella* ve *Salmonella* türleri gibi bazı Gram negatif basilleri kapsayacak şekilde genişlemesidir. Bu grupta AMS'in yanında ampisilin, siklasilin ve episilin ile ampisilin'in ön-ilaç şeklinde esterleri bulunur.

Tedavide Kullanımları

Üst Solunum Yolu Enfeksiyonları

Bu enfeksiyonlardan genellikle streptokoklar ve *H. influenzae* sorumlu olduğu için aminopenisilinler, ampirik tedavide iyi bir seçenek olarak görünmektedir. Yalnız çeşitli ülkelerde aminopenisilinlere karşı direnç gösteren *H. influenzae* suşlarının sayısında artış olduğu için, bu husus tedavide göz önünde bulundurulmalıdır. Duyarlı bakterilerin neden olduğu orta kulak iltihabı, sinüzit, epiglotit, kronik bronşitin akut krizlerinde ve farenjit tedavisinde kullanılırlar.

İdrar Yolu Enfeksiyonları

Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının çoğunda sorumlu etken Gram pozitif basiller ve özellikle *E.coli* olduğu için, aminopenisilinler bu amaçla kullanılır. Ayrıca enterokokların neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarında da bu grup ilaçlar etkilidir. Tedavide son yıllarda bu grup ilaçların *E.coli*'ye karşı direnç gösterdiği bilinmektedir.

Menenjit

Çocuklarda gelişen menenjitlerin büyük kısmında etken *H.influenzae*, pnömokoklar, (*Strep. pneumoniae*) ve meningokoklar (*N. meningitidis*) olduğu

için, bu endikasyonda aminopenisilinler kullanılabilir. Özellikle *H. influenzae*'ya karşı rezistans bildirdiği için, tedavide tek başına değil fakat 3. kuşak sefalosporinler veya kloramfenikolle kombine edilerek kullanılması önerilir. *L. monocytogenes*'in neden olduğu menenjitlerde, aminopenisilinler oldukça iyi etkinlik göstermektedir. Menejit tedavisinde aminopenisilinlerin yüksek dozda ve parenteral olarak kullanılması önerilmektedir.

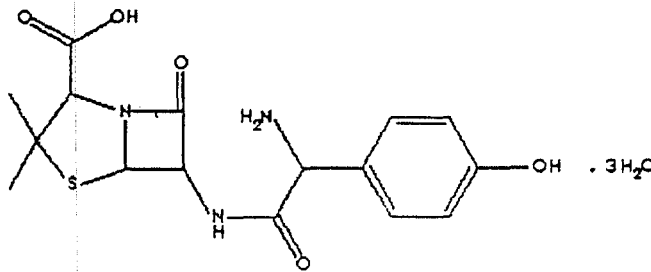
Tifo ve Şigelloziste Kullanılışı

Bahsedilen durumlarda aminopenisilinler florokinolonlar, kloramfenikol v.b. ilaçların yanında ikinci seçenektir. Tifo haricindeki Salmonella infeksiyonlarında aminopenisilinler kullanılmamalıdır. Şigelloziste kullanım söz konusu olduğu zaman, ampisilin AMS'e tercih edilmesi gerektiği bilinmektedir [4].

2.2. AMS'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Çalışmada üç su molekülü içeren AMS kullanılmıştır. AMS'in kimyasal yapı formülü (2S , 5R , 6R) – 6 – [(R) – 2 – amino - 2 – (4 – hidroksifenil) asetamido] – 3 , 3 – dimetil - 7 – okso - 4 – tiya - 1 – azobisiklo [3.2.0] – heptan – 2 – karboksilik asittir.

Açık formülü aşağıdaki şekilde verilmektedir.



Şekil.2.1. AMS'in molekül yapısı

Kapalı formülü $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3 H_2O$ olup, molekül ağırlığı 419.4'tür. Beyaz veya beyaza yakın renkte, kristalize toz görünümündedir. Alkol ve suda az çözünür, eter ve ağır yağlarda hemen hemen hiç çözünmez. Seyreltik asitler ve seyreltik alkali hidroksit çözeltilerinde çözünür [2].

2.3. AMS İle Yapılan Çalışmalar

Abounassif ve ark. [5] farmasötik preparatlarda AMS ve klavulanik asitin sıvı kromatografisiyle tayinini gerçekleştirmişlerdir. Metotta ters faz sıvı kromatografisi kullanılmış ve hareketli faz olarak ($\text{CH}_3\text{OH} : \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6) : H_2O) (15:1:84) seçilmiştir. İzokratik sistemde 235 nm dalga boyunda çalışılmış akış hızı 1.0 ml/dk olarak belirlenmiştir. Optimum çalışma koşulları belirlendikten sonra standardın ve tabletlerin enjeksiyonları yapılmış ve relatif standart sapmalar %2 civarında bulunmuştur.

Tabletlerdeki ve süspansiyon halindeki AMS için deney sonuçları $\%101.51 \pm 1.72$ (n:6) ve $\%101.22 \pm 1.93$ (n:6) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde klavulanik asitin tablet içindeki ve süspansiyon halindeki deney sonuçları 100.33 ± 1.90 (n:6) ve 99.61 ± 1.32 (n:6) olarak saptanmıştır. Önerilen yöntem ile farmakopedeki yöntem karşılaştırılarak güvenilirliği kontrol edilmiş ve istatistiksel olarak F ve t testleri gerçekleştirilmiştir. Teorik olarak iki metot arasında doğruluk ve hassasiyet bakımından önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Belal ve ark. [6] ampisilin ve AMS tayini için kinetik spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem antibiyotiklerin 1 M HCl ile hidrolizi ve 1 M NaOH ile nötralize edilmesine dayanmaktadır. Daha sonra 2 M KCl içerisine palladyum ilavesi sonucunda oluşan renkli çözeltinin absorbansı 335 nm'de ölçülmüştür. Önerilen metot sırasıyla ampisillin ve AMS için 8-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve 10-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralıklarında 0.73 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tayin limiti saptanmıştır. Önerilen metot ticari dozaj formlarına uygulanmış ve elde edilen sonuçların farmakopede belirlenen yöntemle karşılaştırması yapılmıştır. Sonuçların birbiriyle uyum içerisinde olduğu saptanmıştır.

Yuan ve ark. [7] ters faz sıvı kromatografisi kullanarak insan plazması, orta kulak sıvısı ve çinçilya plazması içerisindeki AMS'in miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. İç standart olarak sefadroksil kullanılan bu çalışmada analizler UV dedektör ile 210 nm de yapılmıştır. Hareketli faz 5 mM fosfat tamponu içinde %6 asetonitril içeren (PH:6.5) ve 5mM tetrabutylamonyum içermektedir. Çinçilya plazması için değişim katsayısı 2.7-9.9 (n= 4) ve 1.7-7.2 %

(n=3), insan ve çinçilya kanı için değişim katsayısı 2.8-8.1 % (n=3) ve 2.9-4.7 % (n=3) olarak bulunmuştur. Alternatif bir hareketli fazın çinçilya plazması ve orta kulak sıvısı için analiz süresini önemli ölçüde azaltabileceği gözlenmiştir.

Lyle ve Yassin [8] ampisilin ve AMS'in metal iyonu komplekslerini polarografik olarak tayin etmişlerdir. Özellikle ampisilin ve AMS'in Nikel(II) ile oluşturdukları komplekslerin damlayan civa elektrot yüzeyinde indirgenmelerine bağlı olarak diferensiyel puls polarografisiyle tayin edilebilirliğini araştırmışlardır. Ampisilin ve AMS için piklerin sırasıyla -0.865 V ve 0.840 V'ta geldiği gözlenmiştir. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu kullanılmış ve KCl ile 25 °C de fazla metal iyonlarından tam olarak ayrılma sağlanmıştır. Nikel (II) komplekslerinde tek elektron ile tersinir indirgenme meydana geldiği görülmüştür. Kantitatif tayinler için diferansiyel pulse tekniğinde ampisilin ve AMS için doğrusal kalibrasyon grafiği konsantrasyon aralığı $3.0 \times 10^{-7} - 3.0 \times 10^{-5}$ M ve 4.0×10^{-7} - 2.0×10^{-5} M olarak bulunmuştur.

Qureshi ve ark. [9] farmasötik preparatlar içindeki AMS, ampisilin ve kloksilinin eş zamanlı spektrofotometrik ve redoks volumetrik yöntemleri ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Reaksiyon mekanizmasında katalizlenmiş hidrolizi, seyreltik asit çözeltisi içindeki iyodat ile yükseltgenme takip etmektedir. Yöntemde ilaç içindeki AMS, ampisilin ve kloksilinin hidrolizleri söz konusudur. Bu çalışmada pH 2'de seyreltik hidroklorik asit ile indirgenen ürünlerin nötralizasyonu söz konusudur. Redoks titrasyonunda titrant olarak potasyum iyodat kullanılmıştır. Oluşan kırmızı-mor rengin absorbansı spektrofotometrede 520 nm de ölçülmüştür.

El Walily ve ark. [10] fenolik β -laktam antibiyotiklerinin kumarin türevlerinden oluşumunu seçici spektroflorimetrik tayin metodu ile belirlemeye çalışmışlardır. AMS, sefadroksil ve sefoperazonun tayini için kolay, duyarlı ve seçici spektroflorimetrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem bu ilacın etil asetoasetat ile arasında asidik bir ortamda gerçekleşen reaksiyona dayanır. Bu reaksiyon sonucu oluşan sarı floresans renkli ürünün eksitasyon dalga boyu aralığı 401-467 nm ve emisyon dalga boyu aralığı 465-503 nm olarak bulunmuştur. Çalışma aralığı AMS, sefadroksil ve sefoperazon için sırasıyla 10.0-20.0, 1.5-1.0 ve 50.0-100.0 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Reaksiyonun Beer Kanunu'na uygun

olduğu gözlenmiştir. Önerilen metodun sonuçlarının aynı şekilde doğru, kesin ve tekrar edilebilirliği farmakope sonuçları ile karşılaştırılmış ve sonuçların farmakope sonuçları ile uyum sağladığı bulunmuştur.

Krauwinkel ve ark. [11] insan plazmasındaki AMS'in YBSK ve katı faz ekstraksiyonu ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. YBSK analizinde ters faz sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Hareketli faz olarak metanol-0.01 M tetrabutilamonyum dihidrojen fosfat içeren 0.08 M fosfat tamponu (pH : 7.6) (20 : 80) kullanılmıştır. Kolondan çıkan maddeler 234 nm'de UV dedektör ile saptanmıştır. Bu metodun güvenilirliği denenmiş ve yeni AMS formülasyonları için biyolojik uygunluk çalışmalarında kullanılabilceği kanıtlanmıştır.

Ezzat M. Abdel-Moety ve ark. [12] kapsül içindeki AMS ve diklokasilinin potansiyometrik titrasyon ve YBSK ile eş zamanlı tayinini geliştirmişlerdir. Potansiyometrik titrasyon ile 0.05 M asetat ve perklorik asitten yararlanılarak her iki madenin de kantitatif tayininin mümkün olduğu saptanmıştır. YBSK'de ayırma işlemi ters faz ile yapılmış olup 5 ve 10 µm çapındaki kolonlar kullanılmıştır. Hareketli faz olarak % 1 asetonitril:asetik asit 47:53 veya 39:61 (h/h) oranında seçilmiştir. UV dedektör ile 240 nm dalga boyunda çalışılan bu sistemde akış hızı olarak 1.5 ml / dk seçilmiştir.

Ventura ve ark. [13] luminol- iyodin reaksiyonuna dayanan penisilinin durdurulmuş akış kemolüminesans spektrofotometresiyle tayininin geliştirilmesi için çalışmışlardır. İyodin ve lüminol arasındaki reaksiyon, penisilinlerin bu reaksiyondaki önleyici etkilerine bağlı olarak dolaylı durdurulmuş akış kemolüminesans spektrofotometrik tayininde kullanılır. Reaksiyon oluşum hızının doğrudan ölçülmesiyle ve kemolüminesans sürecindeki bozulma adımlarını, buna ilave olarak karşılaştırma amacıyla yapılan pik yükseklikleri görüntülenmiştir. Önerilen metot penisilinin 1.0×10^{-6} - 1.2×10^{-4} M arasındaki tayininin % 2 standart sapma ile 120 h^{-1} frekansta tayinini sağlamaktadır. Bu yöntem farmasötik örneklerdeki penisilinleri tek başına analiz etmek için kullanılır. Hesaplamalar (kesinlik, hız, örnek tüketimi) uygun kemolüminesans titrasyon değerleriyle karşılaştırılmıştır.

Wibava ve ark. [14] hızlı, seçici ve duyarlı olarak fare plazmasında mide suyunda ve mide dokusunda YBSK ile AMS'in rutin tayini için bir analiz

yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde AMS çok düşük konsantrasyonlarda (<1 µg/mL) veya çok küçük örnek hacimlerinde kullanılmıştır. Bu çalışmada Chromasil ODS 3 µm (150 x 3.2 mm I.D) kolon kullanmışlardır. Kolon sıcaklığı için 40°C uygun olarak görülmüştür. Hareketli faz olarak metanol-su (55:45, h/h) ve florimetrik dedektörde eksitasyon dalga boyu için 365 nm ve emisyon dalga boyu 445 nm olarak belirlenmiştir. AMS'in sınır miktar değerleri; mide suyu için 0.1µg/ml (500 µL), plazma için 0.5 µg/ml (50 µL) ve mide dokusu için 0,075 µg/g (250mg) olarak bulunmuştur. Metodun mide suyu için; 15 µg/ml, plazma için; 200 µg/ml ve mide dokusu için; 100 µg/g'a kadar doğrusallık verdiği saptanmıştır. Gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri %19'dan daha az olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile fare plazması, mide suyu ve mide dokusundaki AMS'in miktarı bulunmaya çalışılmıştır.

Pasamontes ve Callao [15] farmasötik preparatlardaki AMS'in ardışık enjeksiyon analizi (SIA) metoduyla ve foto diyot dizisi detektör kullanarak analizini gerçekleştirmişlerdir. AMS'i tayin etmeden önce herhangi bir engelleyici madde olup olmadığının anlaşılması için çok değişkenli eğri kullanmışlardır. Uygun analitik işlemler ve pH gradiyentini oluşturmak ve her bir örnek için data matrisini elde edebilmek için SIA kullanmışlardır. Bu çalışma ile örnek içindeki türlerin spektrumları ve konsantrasyon profilleri elde edilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada AMS içeren altı çeşit preparat ile çalışılmıştır. Bu preparatlardan ikisi girişim yapan herhangi bir madde içermezken, dört tanesi içermektedir. Fakat AMS'in ona göre seçici bir spektrum alanı vardır. İlk üç örnek için pahalı olmayan alet ve reaktifler kullanılarak tek çeşit kalibrasyon sistemiyle AMS'in hızlı bir şekilde (saatte 20 örnek analizi) tayini yapılmıştır.

Qi ML ve ark. [16] kolay ve doğruluğu yüksek sıvı kromatografisi (LC) ile AMS ve sulbaktam pivoksil kombinasyonunu eş zamanlı olarak tayin etmeye çalışmışlardır. İki ilacın kromatografik ayrılması için Hypersil C₁₈ kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) ve hareketli faz olarak metanol-asetonitril-su karışımı (60:1:39, h/h/h) kullanmışlardır. Hareketli fazın pH'ını 4.5 olarak belirlemişlerdir. Kullanılan dalga boyu 220 nm'dir. Ayırma işlemi 10 dakikadan daha kısa sürede gerçekleşmiştir. Metodun doğrusal, kesin ve seçici olduğu bulunmuştur. Bu metot

için doğrularlık, kesinlik ve doğruluk değerleri AMS için; 50.95-509.5 µg/ml ve sulbaktam pivoksil için; 46.63-466.3 µg/ml değerleri arasında kabul edilebilir olduğu görülmüştür. Kolaylık ve kesinliğinden dolayı, AMS ve sulbaktam pivoksil kombinasyonlarının rutin kalite kontrol analizlerinde kullanmak için uygun olduğu görülmüştür.

Muth ve ark. [17] insan plazmasındaki AMS miktarını tayin edebilmek için yüksek duyarlılıkta ve seçicilikte YBSK metodu geliştirmişlerdir. UV dedektör 230 nm dalga boyuna ayarlanmış, tampon ve iç standart eklendikten sonra örnek ultrafiltrede süzülerek n kolona verilmiştir. AMS için saptama limiti %4.2 hata ile 0.25 ml plazma kullanılarak 50.1 ng/ml olarak bulunmuştur. Tüm kalibrasyon için doğrularlık aralığı (25.4-0.0501 µg/ml) değerindedir ve gün içi değişim miktarı %2.0 ile %4.5 aralığındadır. Metodun geçerliliği kontrol edilmiş ve yüzlerce çeşitli örnek analiz edilmiştir. Ayrıca bu metot insanda 500 mg'lık oral doz alındıktan sonraki farmakokinetik parametrelerin belirlenmesinde de kullanılabilir.

Pajchel ve ark.[18] farmasötik preparatlardaki AMS / klavulanik asit ve ampisilin / sulbaktam'ın eş zamanlı tayinini, sıvı kromatografisine (LC) karşı kapiler elektroforez (CE) ile tayin etmeye çalışmışlardır. Hızlı bir kapiler elektroforez metodu AUGMENTIN® içindeki AMS ve klavulanik asit, UNASYN® içindeki ampisilin ve sulbaktam tayini için geliştirilmiştir. Hareketli faz olarak %14.4 sodyum dodesil sülfat içeren pH:8.66 olan fosfat-borat tamponu kullanmışlardır.

Metodun geçerliliği kontrol edilmiş tekrar edilebilirlik, doğruluk, kesinlik ve doğrularlık değerleri AMS için; 0.05-3.03 mg/ml, ampisilin için; 0.05-3.08 mg/ml, klavulanik asit için; 0.02-2.02 mg/ml ve sulbaktam için; 0.05-2.08 mg/ml bulunmuştur. Bu yeni metot ilaç analizleri için kullanılan YBSK ile karşılaştırıldığında, CE'nin daha hızlı, ucuz ve organik çözücü harcama açısından daha ekonomik olduğu görülmüştür. İstatistiksel analizde t-testi her iki metottan elde edilen sonuçlar arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir. t testinde AMS ve klavulanik asit için; 0.32 ve 1.69, ampisilin ve sulbaktam için; 0.67 ve 1.93 değerleri bulunmuştur. Bu değerlerin çizelgede hesaplanan değerden daha küçük olduğu gözlenmiştir.

Salem ve Saleh [19], fenolik β -laktam antibiyotiklerinin seçici spektrofotometrik tayinini yapmaya çalışmışlardır. Sefoperazon sodyum, sefadroksil monohidrat, sefoperozil ve AMS'in farmasötik preparatlardaki saf formlarının miktar tayinleri için iki basit ve seçici spektrofotometrik metot geliştirmişlerdir.

Metot bu ilaçlardan herhangi birisinin Ce (IV) veya Fe (III) oksidasyonuna bağlıdır. Bu yükseltgenme asidik ortamda gerçekleşir ve 397 nm'de maksimum absorbans veren koyu sarı renkte bir ürün meydana gelir. Konsantrasyon aralığı (5-30 $\mu\text{g/ml}$) olarak belirlenerek Beer Kanunu'na uyduğu gözlenmiş ve korelasyon katsayısı her dört ilaç için en az 0.9979 olarak gözlenmiştir. AMS içeren farmasötik formülasyonlar, yalın halde veya bileşik halindeki potasyum klavulanat, flukloksasillin veya dikloksasillin analizleri için bu metoda başvurulabilir. Diğer üç ilacın vialde, kapsülde, tablette ve süspansiyon halindeki çalışmaları içinde yararlanılabilir. Yüzde değerler Ce(IV) için; 99.7 (± 0.46) ile 100.32 (± 1.05) arasında ve Fe (III) için; 99.6 (± 0.50) ile 100.3 (± 1.32) arasındadır. Diğer antibiyotiklerin engelleyici etkileri de araştırılmıştır.

De la Torre ve ark. [20] AMS'in chitosan ve poli akrilik asitin poliyonik komplekslerinden ayrılması çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada polimer/polimer ve polimer/ilac arasındaki etkileşimler yer almaktadır. Chitosan (CS) ve poli akrilik asit (PAA)'nın poli iyonik kompleksleri geniş bir kopolimer kompozisyonundan ve iki çeşit ilacın hazırlanmıştır.

AMS ve AMS sodyumun farklı komplekslerden ayrılması çalışmaları yapılmıştır. Hidrojellerin şişebilme ve geçirgenlik özelliği araştırılmış ve polimer/polimer ve polimer/ilac etkileşimleri kontrol edilmiştir. Elektrostatik polimer/polimer etkileşimleri CS'nin katyonik grupları ile PAA'nın anyonik grubu arasında gerçekleşmektedir. AMS difüzyonu, poli iyonik komplekslerin şişme/aşınma oranına bakılarak kontrol edilmiştir. AMS sodyum hidrojellerinin şişme derecesinin, AMS formülasyonlarının şişme derecesine göre çok daha fazla olduğu gözlenmiştir. AMS sodyumun difüzyon sınırlaması polimer/iyonize-ilac etkileşimleriyle ortadan kaldırılmıştır.

Fernandez-Gonzalez ve ark. [21], β -laktam antibiyotiklerin spektrofotometrik tayininin değerinin artırılabilmesi için batch ve akış enjeksiyon

yöntemlerini karşılaştırmışlardır. β -laktam antibiyotikleri, AMS ve ampisilin miselsi ortam kullanılarak Cu iyonlarının katalizörlüğüyle spektrofotometrik tayini yapılmıştır. Batch ve akış enjeksiyon yöntemlerinin yaklaşımı karşılaştırılmıştır. Akış enjeksiyon analizi (AEA) için optimal değerler bulunmuştur. Kimyasal (tampon, pH ve Cu(II) konsantrasyonu) ve fiziksel (akış hızı, sıcaklık ve reaksiyon süresi) gibi değerler göz önünde tutulmuştur. Batch ve akış enjeksiyon sistemleri için saptama limitleri sırasıyla 2.5×10^{-7} ve 2.0×10^{-6} M bulunmuştur. Ayrıca her iki metot için bağıl standart sapmanın %1'den daha az olduğu gözlenmiştir. Önerilen akış enjeksiyon analiz metodu farmasötik preparatlardaki antibiyotiklerin tayini için güvenle başvurulabilecek bir metottur.

Hoizey ve ark. [22] insan plazmasındaki AMS ve klavulanik asidi eş zamanlı tayin edebilmek için, basit ve kesinliği yüksek YBSK metodunu kullanarak bir çalışma yapmışlardır. 220 nm dalga boyunda UV detektör ile çalışmışlar ve plazma örneklerini ilk olarak metanolla muamele etmişlerdir. Her iki bileşik içinde iyi bir kromatografik ayırma sağlayabilmek için ters faz C_8 kolon ve hareketli faz olarak da asetronitril-fosfat çözeltisi-tetrametil amonyum klorit çözeltisi kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığı AMS için 0.625-20 mg/l ve klavulanik asit için 0.3125-10 mg/l bulunmuştur. Korelasyon katsayısının 0.9980'den daha büyük olduğu gözlenmiştir. Metodun tekrar edilebilirliği (gün içi ve günler arası R.S.D < %15) olarak bulunmuştur. AMS ve klavulanik asit için miktar limitleri sırasıyla 0.625 ve 0.3125 mg/l'dir.

İnsan plazmasından her iki numunenin analitik olarak geri kazanım yüzdeleri 91 ile 102 arasında bulunmuştur. Geçerliliği kontrol edilmiş olan ve biyolojik örneklerdeki AMS ve klavulanik asidin eş zamanlı olarak tayinine uygun olan bu metot oldukça hızlı bir analiz yapılmasına (analiz süresi 10 dakikadan daha kısa) ve sadece 100 μ l örnekle çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Bu deneyde, biyomedikal uygulamalar ve farmakokinetik çalışmalar, sağlıklı bir insana bir oral-doza AMS/klavulanik asit karışımı (500/125 mg) verildikten sonra yapılacak çalışmalar için uygun olduğu bulunmuştur.

Shan-Ying ve ark. [23] AMS içinde bulunan yüksek molekül ağırlıklı safsızlıkları kromatografik olarak tayin etmeye çalışmışlardır. Yüksek molekül

ağırlıklı safsızlıkların AMS'den ayrılması için jel filtrasyon kromatografisinin (GFC) üç metodu ve ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) ile çalışılmıştır. Özellikle jel kromatografisi metodu AMS tayini için denenmiştir. Elde edilen sonuçlar polimer tayinleri için jel filtrasyon kromatografisinin RPLC'ye oranla daha kolay bir ayırma yöntemi olduğunu göstermiştir. Üç jel filtrasyon kromatografisinin yanı sıra ayırma işleminde Superdex peptit kolon kullanılması diğer metotlara göre AMS polimerlerinin tayin edilmesinde avantaj sağladığı saptanmıştır.

Amin ve ark. [24] ampisilin ve AMS'in pikrik asit ve pikramik asit ile spektrofotometrik mikro tayini üzerinde çalışmışlardır. Ampisilin (12.5-575 µg) ve AMS (10-400 µg), toplam hacim 25 ml olacak şekilde alınmış ve π -akseptör kullanılarak pH 9'da pikrik ve pikramik asit ile spektrofotometrik olarak tayin edilmeye çalışılmıştır. Bu metot oldukça kesin ($100 \pm \%1.67$) ve doğru (RSD: $\%1.7$) sonuçlar verdiği için kapsüllerde, ampüllerde ve şurup formülasyonlarında başarıyla uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır.

Gasheva ve ark. [25] AMS'in IR spektroskopik incelemesini yapmışlardır. Kullanılan IR spektroskopisinde AMS ile birlikte etil-metil-karboksimetil ve metilhidroksietil-selüloz ile çalışılmıştır. Fakat sadece AMS ile etil selüloz arasında etkileşim olması sağlanmıştır. IR absorpsiyon spektrumunda etil selüloz molekülünün hidroksil gruplarıyla H-bağı yaptığı gözlenmiştir. IR spektral farklılıkların polimorfik transformasyondan kaynaklanmadığı X ışını difraksiyonu ile ispatlamışlardır.

Pourcq ve ark. [26], YBSK ile AMS ve onun ayrışma ürünlerinin kantitatif tayinini geliştirmişlerdir. AMS, amoksisilat, AMS oligomerleri ve AMS piperazin-2,5-dion, ters faz (C₈) kolon kullanılarak YBSK ile ayrılmıştır. AMS'in safsızlık olarak daha çok amoksisilat içerdiği gözlenmiştir. Sodyum tuzu örnekleri aynı zamanda piperazin-2,5-dione ve dimerlerini içermektedir. Trimer, tetramer gibi büyük oligomerlerin önemli miktarda olmadığı gözlenmiştir. Bazı örnekler merkürimetrik titrasyon metodu ile analiz edilmiştir.

Chulavatnatol ve Charles [27], idrar içindeki AMS'yi YBSK kullanılarak, katı faz, iyon değişimi ekstraksiyonu ve ultraviyole detektör kullanılarak tayin etmeye çalışmışlardır. İdrar içindeki AMS'nin tayini için YBSK güçlü ve basit bir yöntemdir. Örnek katı faz ve iyon değişimi ekstraksiyonu ile Sep-pak C₁₈ kolon

kullanılarak hazırlanmıştır. Yıkama çözeltisi olarak pH:4.85 tamponu içinde asetonitril (%3 h/h) kullanılmıştır. Ayırma işleminde Ultrasphere C₁₈ kolon ve hareketli faz olarak ise asetonitril (32.5 ml) ve pH 7.1'de fosfat tamponu (0.01 M, 1000 ml) kullanılmıştır. Pikler 229 nm'de okunmuş ve geri kazanımın %94'ten daha fazla olduğu bulunmuştur. Pik alanına karşı idrar içindeki AMS miktarlarının grafiğe geçirilmesiyle oluşan konsantrasyon eğrisinin doğrusallığı (r >0.9990) 5 ile 500 mg/l arasında olduğu bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin (varyasyon katsayısı) %3.0 ile %15.5 arasında olduğu gözlenmiştir.

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Standart madde olarak kullanılan AMS Fako ilaçları Ltd.Şti. (İstanbul-Türkiye) den sağlanmıştır. Sertifikalarda %99.0 saf olduğu belirtildiğinden ayrıca saflaştırma işlemine gerek duyulmamıştır. AMS içeren farmasötik preparatlar yerel eczanelerden sağlanmıştır. Ayrıca deneyler sürecinde kullanılan gradient metanol, sodyum asetat, potasyum hidrojen fosfat, sodyum hidroksit analitik saflıkta olup Merck (Almanya) firmasının üretimidir. Kullanılan bidistile su tümüyle camdan oluşan sistem ile laboratuvarımızda hazırlanmıştır.

3.2. Kullanılan Aletler

Maddenin spektrofotometrik analizi Shimadzu marka UV – 2401 PC model çift ışık yollu UV – Spektrofotometre ile yapılmıştır. Veriler UV PC Personal Spectroscopy Software Version 3.7 programı ile işlenmiştir.

Tampon çözeltilerin hazırlanması aşamasında, çözeltilerin hedeflenen pH'a ayarlanması sürecinde WTW marka Multiline P4 model pH-metre kullanılmıştır.

Tablet analizleri sırasında çözeltilerin içerdiği çözünmemiş safsızlıkların çöktürülmesi amacıyla Sigma marka 1.6 model santrifüj aleti kullanılmıştır.

AEA için Rheodyne (Cotati) enjeksiyon tablası üzerinde 20 µl'lik loop taşıyan Shimadzu marka LC – 6A M model pompa kullanılmıştır. Maddeye ait sinyaller Shimadzu marka SPD – 10A UV – VIS detektör ile detekte edilmiş ve sonuçlar yine Shimadzu C – R 7A Chromatopac integratör ile hesaplanmıştır.

Potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon işlemi WTW Sen-Tix 97 T marka pH elektrodu ve WTW Tetracon marka kondüktometrik elektrot ile kombine edilmiş WTW Multiline marka P4-Universal model pH metre-kondüktometre ile yapılmıştır.

3.3. Uygulanan Yöntemlerde Standart Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. UV – Spektrofotometrik Yöntem

UV – spektrofotometrik çalışmalar için 210,7 mg standart AMS tartılmış ve 60 ml metanolde çözünerek su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece stok çözelti 5.02×10^{-3} M olarak hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 1 ml alınıp , 50 ml'ye tamamlanmış ve böylece çözelti $1,00 \times 10^{-4}$ M'a seyreltilmiştir. Bu çözeltilerden alınarak 2.01×10^{-5} – 1.00×10^{-4} M derişim aralığında bir seri çözelti hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler bidistile su ile yapılarak maddenin UV bölgedeki davranışı incelenmiş ve regresyon analizi yapılmıştır.

3.3.2. Titrimetrik Yöntemler

Potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon işlemi uygulanmadan önce titrant olarak kullanılan NaOH çözeltisinin ayarlanmasında normalitesi belli HCl çözeltisi kullanılmıştır. 6 kez yapılan potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyonlar sonucunda NaOH'in derişimi 0.0988 M olarak belirlenmiştir. Standart madde çözeltisinden AMS 0,2920 g tartılarak 30 ml metanol ve 40 ml su ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır.

3.3.3. Akış Enjeksiyon Analizi Yöntemi (AEA)

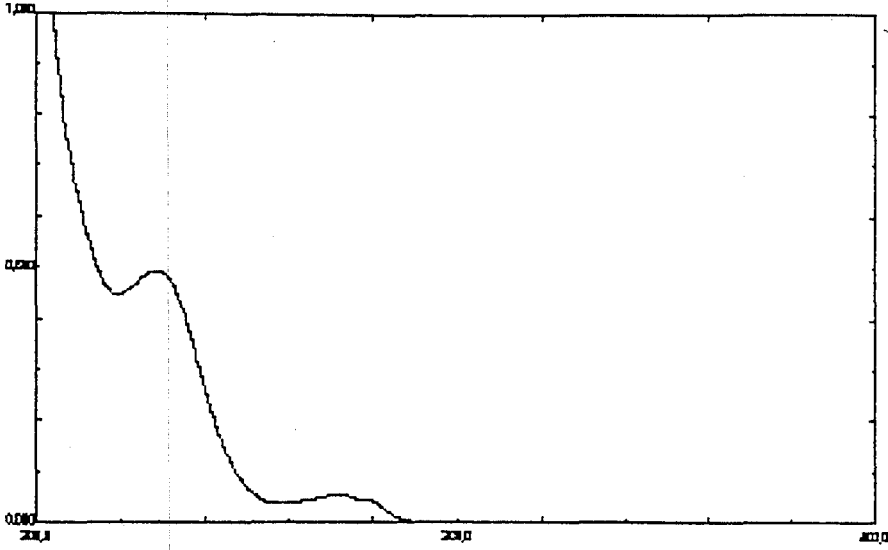
AEA yönteminde AMS trihidrat üzerine pH'ın etkisini araştırmak üzere bir seri tampon çözelti hazırlanmıştır. Bunun için asetat ve fosfat tamponlarından yararlanılmıştır. 1 M asetat tamponu için CH_3COONa . H_2O 'dan 68 g tartılıp su ile 500 ml'ye tamamlanmış ve pH 2-6 aralığında çözeltiler hazırlanmıştır. 1 M fosfat tamponu için K_2HPO_4 den 87 g tartılıp 500 ml'ye su ile tamamlanarak pH 7-12 aralığında çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerden 100 ml alınarak pH'ları istenilen değere ayarlanmıştır. 210.7 mg AMS 100 ml'lik balon jöjeye alınarak 60 ml metanolde çözülmüş ve su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Gerekli seyreltmeler bu stoktan bidistile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AMS'in AEA ile yapılan çalışmalarında en uygun analiz koşullarının belirlenebilmesi için kullanılan AMS çözeltisi, başlangıçtaki stok çözeltinin seyreltilmesi ile elde edilen 3.00×10^{-6} M derişimdeki çözelti ile yapılmıştır.

AMS'in AEA yöntemiyle analizi süresince kullanılacak analitik ve aletsel parametrelerin belirlenebilmesi amacıyla bir dizi inceleme yapılmıştır. Bu aşamada kullanılmak üzere 3.00×10^{-6} M derişimde AMS çözeltisi hazırlanmış ve deneyler bu çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AMS'in AEA yöntemiyle analizi süresince kullanılacak hareketli fazın belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda %10 - %40 oranında metanol içeren metanol : su sistemleri denenmiş ve %10 luk metanol çözeltisinin en uygun hareketli faz olduğuna karar verilmiştir.

4.SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. AMS'in UV Spektral Karakteristiklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada UV – spektrofotometrik yöntem bir karşılaştırma yöntemi olarak seçilmiştir. AMS'in 5.00×10^{-5} M derişimdeki bir spektrumu şekil 4.1. de verilmektedir.



Şekil 4.1. AMS'in UV Spektrumu (5.00×10^{-5} M derişimde %60 metanol içerisinde)

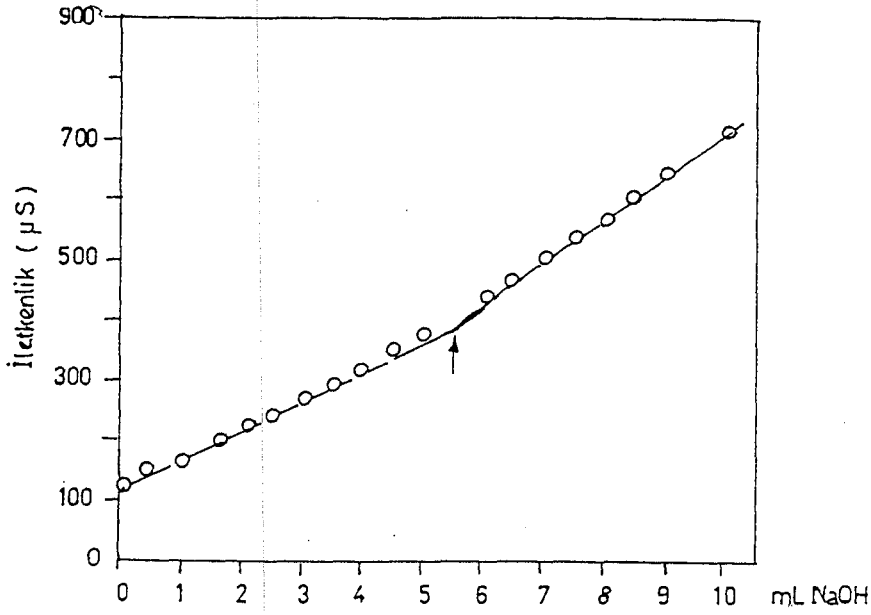
Spektrumdan da görüldüğü gibi AMS en yüksek absorbanı 228.4 nm de vermektedir. $2.0 \times 10^{-5} - 10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında bir dizi çözeltinin 228.4 nm'deki derişim-absorbans ilişkisi incelenmiştir. Bu derişim aralığında

$A=10039.8 C (M) - 4.79 \times 10^{-3}$, ($r=0.9999$) denkleminde uyan oldukça iyi bir doğrusallık bulunmuştur.

4.2. AMS'in Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyonu

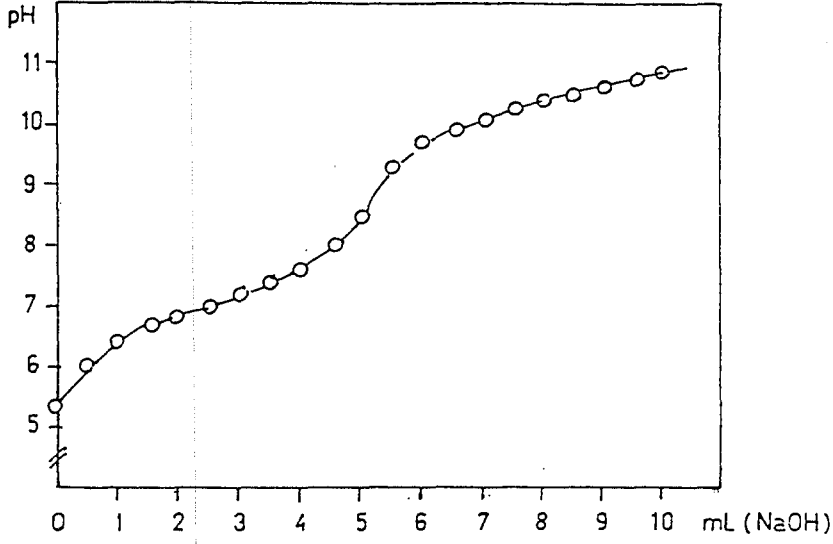
AMS'nin sudaki çözünürlüğü oldukça azdır bu nedenle %60 metanolde çözülmüştür. Bu koşullarda AMS'in potansiyometrik ve kondüktometrik olarak titre edilebilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla bölüm 3.3.2'de belirtilen koşullarda AMS çözeltisi analize hazırlanmıştır. pH metrenin ve kondüktometrinin kalibrasyonundan sonra hem pH ölçüm elektrodu hem de iletkenlik hücresi birlikte titrasyon kabına batırılarak aynı anda her iki sinyal birlikte okunmuştur. Böylece aynı koşullarda yapılmış bu iki titrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçların birbirini tutarlılığı da incelenmiştir. Madde miktarı, alkol yüzdesi, çözelti hacmi, ortam sıcaklığı gibi hem pH'ı hem de iletkenliği etkileyebilecek parametrelerin sabit tutulması sağlanmış ve sonuçların karşılaştırılmasında bu işlemin daha güvenli olduğu saptanmıştır.

Analize hazırlanan AMS çözeltisi normalitesi belli HCl ile ayarlanmış 0.0988 N NaOH ile titre edilmiştir. Titrasyon sürecinde eklenen baz hacmine karşı aynı anda hem pH hem de iletkenlik değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Kondüktometrik yöntemin değerlendirilebilmesi içinde titrasyon sürecinde okunan iletkenlik değeri üzerinde hacim düzeltmesi yapıldıktan sonra eklenen baz hacmine karşı grafiğe geçirilmiştir. AMS'ye ait kondüktometrik titrasyon eğrisi şekil 4.2.de verilmektedir.



Şekil 4.2. AMS'e ait kondüktometrik titrasyon eğrisi

Potansiyometrik yöntem için, eklenen baz hacmine karşı pH değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.3. de görülen sigmoid biçimli tipik bir titrasyon eğrisi elde edilmiştir. Dönüm noktası I ve II türevleri yardımıyla hesaplanmıştır. Kondüktometrik titrasyondaki farklı iki doğrunun kesiştikleri nokta olan dönüm noktasıyla potansiyometrik titrasyonda elde edilen dönüm noktalarının birbirine çok yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. AMS'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi

Bu şekilde yapılan potansiyometrik titrasyonlarda 292 mg dolayında AMS ve 0.0988 N dolayında NaOH çözeltisi kullanılarak %101 değerinde, aynı koşullarda gerçekleştirilmiş kondüktometrik yöntemde, dönüm noktalarının beklenen değere yakın bir değer olması nedeniyle % 97 olarak bulunmuştur. Bu bulgulara dayanarak AMS'in miktar tayininde potansiyometrik yöntemin son derece duyarlı kondüktometrik yöntemin ise sınırlı koşullarda kullanılabileceği saptanmıştır.

4.3. AMS'in Akış Enjeksiyon Analizi (AEA) ile Yapılan Çalışmalarının Değerlendirilmesi

AEA sistemleri, uygulama ve kullanım kolaylığı, yüksek örnekleme frekansı ve çok az örnek ve çözelti harcamasıyla ön plana çıkan ve günümüzde geniş uygulama alanı bulabilen bir yöntemdir. Ayrıca analiz süresinin kısa ve duyarlılığın yüksek oluşu da yöntemin üstünlüklerindedir. Ayırma işlemine gerek görülmeyen analizler için sinyaller çok kısa sürede alınabilmektedir.

Çalışmaların bu bölümünde AMS'in miktar tayini için AEA yöntemi kullanılmıştır. Sinyaller UV dedektörde 228.4 nm'de kaydedilmiştir. Taşıyıcı

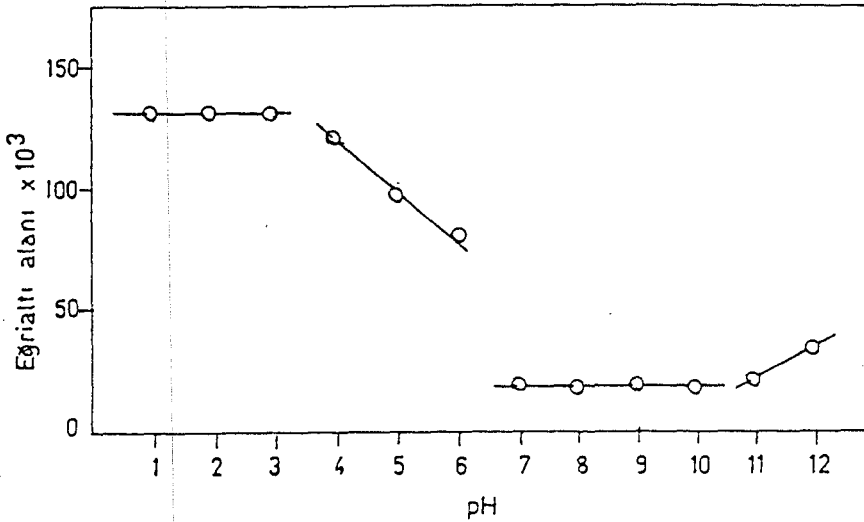
fazın bileşimi, akış hızı ve pH değişimi gibi faktörlerin sinyal morfolojileri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Bölüm 3.3.3'de belirtilen koşullarda yapılan çalışmalarda %10 - %40 metanol içeren sulu taşıyıcı fazın pik morfolojileri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Metanol yüzdesinin artmasının pik alanları ve pik yükseklikleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu durumda çözücü harcanmasının en azda tutulması amacıyla metanol : su (10 : 90) sistemi taşıyıcı faz olarak belirlenmiştir.

Akış hızının saptanmasında da aynı düşünce ile hareket edilmiş ve en uygun akış hızının 1.0 ml / dk olduğuna karar verilmiştir.

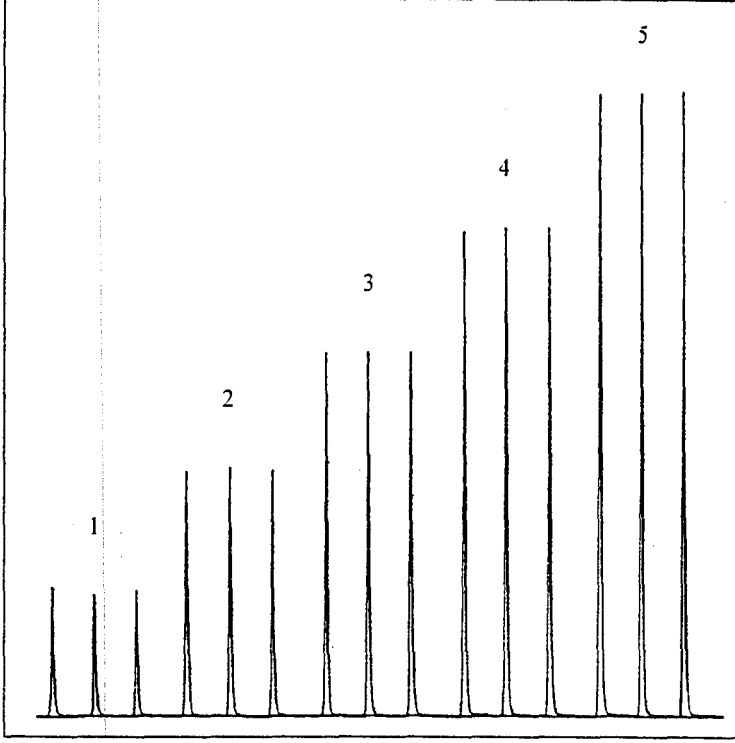
pH'in sinyaller üzerine etkisini incelemek amacıyla, pH 1.0 – 12.0 aralığında hazırlanan 2.0×10^{-6} M derişimdeki AMS çözeltilerinin 16 kez enjeksiyonu yapılmış ve pH'a karşı pik alanları grafiğe geçirilmiştir. pH'a bağımlı olarak sinyal alanlarında önemli ölçüde değişimler gözlenmiştir.

Şekil 4.4'den de görüldüğü gibi bu değişimlerin en az olduğu bölge pH : 9.0 aralığındadır. Bu nedenle pH 9.0'un çalışma pH'ı olarak seçilmesi uygun görülmüştür. Ayrıca literatürde maddenin stabilitesinin pH 8-9 aralığında en iyi olduğu saptanmıştır. Bizim çalışma pH'ı olarak belirlediğimiz pH 9 değeri de literatür verileriyle uyumaktadır [18].



Şekil 4.4. 2.0×10^{-6} M derişimdeki AMS çözeltilerinin pH'a karşı pik alanları

AMS derişiminin pik sinyalleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla $1.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-6}$ M aralığında bir seri standart çözeltileri hazırlanmıştır. Derişim ile sinyal alanları arasındaki ilişki Şekil 4.5.'de verilmektedir.



Şekil.4.5. AMS'in $1.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-6}$ M derişimler arasındaki çözeltilerinin optimum koşullarda elde edilen AEA sinyalleri

AMS ile sinyal alanları arasında;

$$A = 2.79 \times 10^{10} C (M) + 18803.1, (r = 0.9999)$$

denklemine uyan çok iyi bir korelasyon olduğu bulunmuştur.

Ayrıca yöntemin validasyonu amacıyla 3 gün boyunca gün içi ve günler arası doğrusallık ve kesinlik hesapları yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.1.de toplanmıştır.

Yöntemin tekrar edilebilirliğini ölçmek için 3 ayrı gün 3×10^{-6} M derişimindeki AMS çözeltileri AEA sistemine enjekte edilmiş ve elde edilen sinyaller istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.2. de verilmektedir.

Çizelge 4.1. AMS'in AEA ile $1.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-6}$ M derişimindeki çözeltilerinin optimum koşullarda elde edilen sinyallerinin doğruluk ve kesinlik incelemesi

Parametreler	Gün İçi Kalibrasyon			Günler Arası Kalibrasyon
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	
Eğim ± Standart sapma	$3.61 \times 10^{10} \pm 5.41 \times 10^8$	$3.54 \times 10^{10} \pm 7.52 \times 10^8$	$3.52 \times 10^{10} \pm 8.31 \times 10^8$	$3.56 \times 10^{10} \pm 4.65 \times 10^8$
Kesim	10454.4	10643.5	9341.9	10146.4
Korelasyon katsayısı (r)	0.9999	0.9998	0.9997	0.9999
Eğim ± Güven aralığı	$3.61 \times 10^{10} \pm 5.15 \times 10^8$	$3.54 \times 10^{10} \pm 7.16 \times 10^8$	$3.52 \times 10^{10} \pm 7.92 \times 10^8$	$3.56 \times 10^{10} \pm 4.43 \times 10^8$

GA:Güven Aralığı (%95 olasılık düzeyinde)

Çizelge 4.2. AMS'in AEA ile pik alanlarına göre gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları

Parametreler	Gün İçi			Günler Arası
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	
Ortalama	118943.6	117297.3	117872.9	118037.9
Standart Sapma	1320.05	1358.13	1183.03	1417.93
Bağıl Standart Sapma	1.11	1.16	1.00	1.20
Güven Aralığı (p=0.05)	1101.43	1133.20	987.10	606.10

GA:Güven Aralığı (%95 olasılık seviyesinde)

Yönteme ait LOD (S / N : 3.3) ve LOQ (S / N : 10) değerleri sırasıyla, 3.3×10^{-7} M ve 1.0×10^{-7} M olarak bulunmuştur.

4.4. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Bu bölümde yerel eczanelerden sağlanan AMS içeren farklı farmasötik preparatlar kullanılmıştır. Tabletlerde 250-1000 mg AMS olduğu bilinmektedir.

Farmakopelerde belirtildiği gibi 625 mg aktif madde içeren (AMOKLAVIN®) 1000 mg aktif madde içeren (REMOXIL®) 10 adet tablet tam olarak tartılarak bir tabletin ortalama ağırlığı hesaplanmıştır. Daha sonra toz edilen bu tabletler tayinlerde kullanılmıştır.

4.4.1. UV Spektrofotometrik Yöntem ile Farmasötik Preparatlardaki AMS Tayini

UV spektrofotometrik yöntem ile çalışılmak üzere tablet çözeltisini hazırlamak için yaklaşık 1 tablet ağırlığına karşılık gelen AMS içeren toz edilmiş tablet tartılarak 60 ml metanolde çözülmüş ve 100 ml ye su ile tamamlanmıştır Süzme işleminden sonra 5600 rpm. devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Farklı iki tablet çözeltisinden hazırlanan çözeltilerden 1 ml alınıp 100 ml ye tamamlanmış ve hazırlanan stok çözeltilerin derişimleri remoksil için 2.38×10^{-4} M amoklavın için 1.54×10^{-4} M olarak hesaplanmıştır. Bu iki stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak her iki çözeltinin de derişimi 6.0×10^{-5} M olacak şekilde hazırlanmıştır.

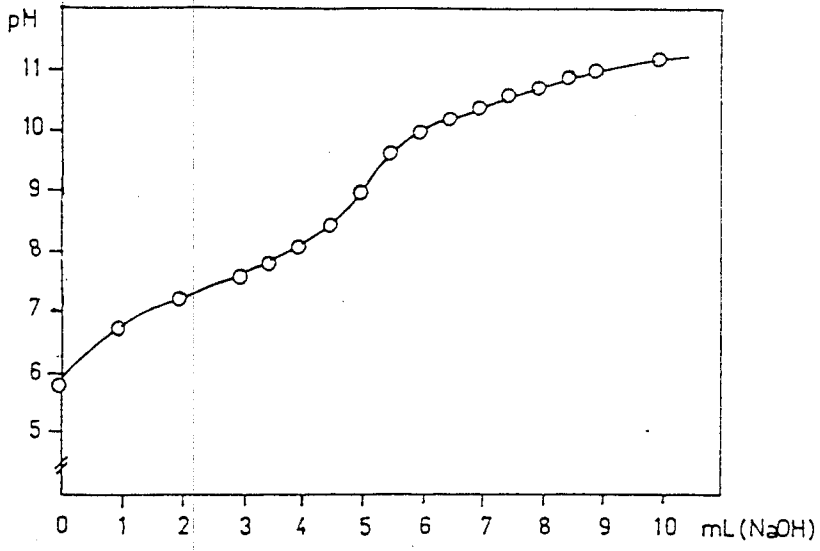
Hazırlanan tablet çözeltileriyle UV spektrofotometrede 8'er ölçüm gerçekleştirilmiştir, ölçümler belirlenen dalga boyunda yapılmıştır. Okunan absorbans değerlerinden hareketle bölüm 4.1 de verilen kalibrasyon denklemi kullanılarak preparatlar içerisindeki AMS'in yüzde miktarları hesaplanmıştır. İki farklı tablet için elde edilen değerler çizelge 4.3 ve çizelge 4.4 de verilmektedir.

4.4.2. Potansiyometrik ve Kondüktometrik Titrasyon Yöntemiyle Farmasötik Preparatlardaki AMS Tayini

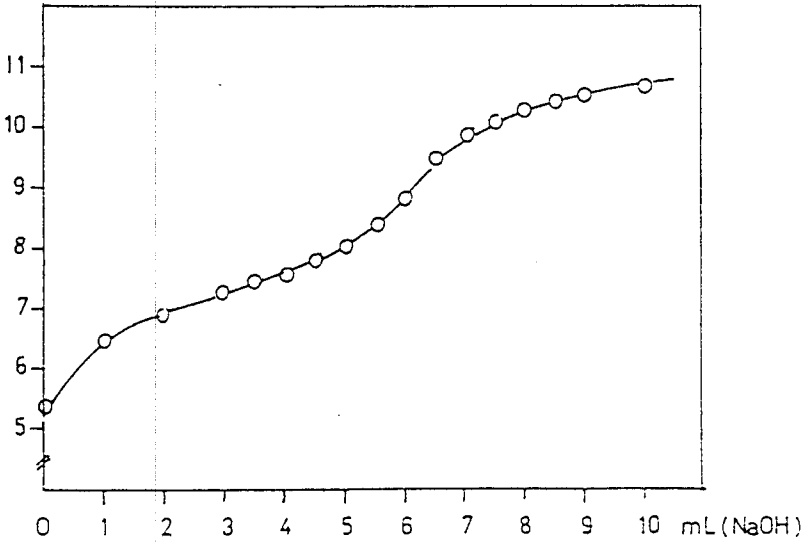
Potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyonda kullanılmak üzere tablet çözeltisini hazırlamak için yaklaşık 1 tablet ağırlığına karşılık gelen AMS içeren toz edilmiş tablet tartılarak % 60'lık metanolde çözülmüştür. Bölüm 4.2 de belirtilen standart AMS çözeltisine uygulanan koşullar altında tablet çözeltilerine potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon yöntemi uygulanmıştır. Yöntemin güvenilirliğini ölçmek açısından titrasyonlar 8'er kez tekrarlanmıştır. Bölüm 4.2'de belirtildiği şekilde potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Potansiyometrik yöntem için, eklenen asit hacmine karşı pH değeri grafiğe geçirildiğinde şekil 4.6 ve şekil 4.7'de farklı iki tablete ait sigmoid biçimli tipik titrasyon eğrileri elde edilmiştir. Tabletlere ait dönüm noktaları ayrı ayrı her iki eğrinin I. ve II. türevleri yardımıyla hesaplanmıştır.

Kondüktometrik titrasyonlar için farklı iki doğrunun kesiştikleri nokta tam olarak belirlenememiştir. Bazı deneylerde ise bu iki doğru parçası birbirine paralel yada birbirinin uzantısıymış gibi sonuçlar elde edilmiştir. Aynı zamanda kondüktometrik yöntem tablete uygulandığında da benzer sonuçlar gözlemlendiğinden dönüm noktasının gösterdiği farklılık nedeniyle verilerin hassas ve güvenilir olamayacağı düşüncesiyle bu veriler dikkate alınmamıştır.

Potansiyometrik titrasyon sonucunda çizelge 4.3 ve çizelge 4.4 de görüldüğü gibi sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, tabletler için sırasıyla %99-103 aralığında ve %98-102 aralığında değişen değerler elde edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, preparatlardaki AMS tayininde potansiyometrik titrasyonun tabletler içerisindeki AMS miktarını belirlemek için uygun bir yöntem olduğu söylenilebilir.



Şekil 4.6. Amoklavim'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi



Şekil 4.7. Remoxil'e ait potansiyometrik titrasyon eğrisi

4.4.3. AEA Yöntemi ile Farmasötik Preparatlardaki AMS Tayini

AEA yöntemi ile çalışılmak üzere tablet çözeltisini hazırlamak için bölüm 4.4.1'de UV spektrofotometrik yöntem ile tablette AMS tayini için uygulanan tartım ve seyreltme işlemleri yapılmıştır. 6.0×10^{-5} M derişimindeki tablet çözeltileri 8'er kez enjekte edilmiştir. Standart çözelti ile yapılan tekraredilebilirlik testinde elde edilen pik alanları tablet çözeltileri ile çalışıldığında elde edilen pik alanları oranlanarak yüzde değerleri hesaplanmış ve bu değerler çizelge 4.3 ve çizelge 4.4. de verilmiştir.

4.4.4. Yöntemlerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Farmakopelerde AMS için YBSK yöntemi önerilmektedir. Çalışmalarımızda UV spektrofotometrik yöntem karşılaştırma yöntemi olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.3 ve çizelge 4.4. incelendiğinde, potansiyometrik ve AEA yöntemlerinden elde edilen tüm sonuçların UV spektrofotometrik yöntem sonuçları ile uyum içerisinde oldukları görülmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler de bunu kanıtlar niteliktedir.

İstatistiksel değerlendirmeler, tek yönlü, $\alpha = 0.05$ önem ve %95 olasılık düzeyinde yapılmıştır. $n-1 = 7$ serbestlik derecesine göre, istatistiksel tablolarda, F testi için 3.79, t testi için 2.36 kritik değerleri verilmektedir. Her iki test içinde hesaplanmış olan değerler, bu kritik değerlerden düşük çıkmıştır. Bu sonuçta potansiyometrik ve AEA yöntemleri ile elde edilen sonuçlar ile UV spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasındaki farkın anlamsız olduğunu açıklamaktadır.

Sonuç olarak, çalışmalarımızda geliştirilen ve uygulanan potansiyometrik, AEA ve UV spektrofotometrik yöntemlerin, farmasötik preparatlar içerisindeki AMS tayini için kullanışlı ve geçerli yöntemler olduğu söylenilebilir. Sonuçlar uygulanan yöntemlerin British Pharmacopoeiae (BP) [2] tarafından kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğunu da belirtmektedir.

Çizelge 4.3. AMS içeren tabletlerin (AMOKLAVIN®) analiz sonuçları (n=8)

Deney No	%AMOKLAVIN® FIA	%AMOKLAVIN® Pot.	%AMOKLAVIN® UV
1	99.23	102.77	100.28
2	101.17	101.56	99.96
3	97.86	100.63	98.81
4	100.43	99.62	101.12
5	99.78	101.78	102.34
6	101.85	99.75	99.11
7	98.27	102.17	101.44
8	99.76	99.83	100.53
n	n=8	n=8	n=8
X _{ort}	99.79	101.01	100.45
% Ortalama	19.96	20.20	20.09
Standart Sapma	1.358	1.219	1.183
Bağıl standart sapma	1.36	1.21	1.18
Güven Aralığı	0.23	0.20	0.20
F-test	1.844	1.485	F _{0.05} =3.79(tablo)
t-test	-1.362	1.314	t _{0.05} =2.36(tablo)

Çizelge 4.4. AMS içeren tabletlerin (REMOXIL®) analiz sonuçları(n=8)

Deney No	%REMOXIL® FIA	%REMOXIL® Pot.	%REMOXIL® UV
1	99.64	98.70	99.32
2	98.77	99.22	97.65
3	97.93	97.55	98.42
4	101.18	98.79	100.32
5	99.52	100.25	99.14
6	100.92	99.13	98.44
7	98.82	101.45	98.96
8	99.74	99.63	101.19
N	N=8	N=8	N=8
X _{ort}	99.57	99.34	99.18
% Ortalama	19.91	19.87	19.84
Standart Sapma	1.092	1.155	1.126
Bağıl standart sapma	1.10	1.16	1.14
Güven Aralığı	0.18	0.19	0.19
F-test	1.192	1.334	F _{0.05} =3.79(tablo)
t-test	0.997	0.392	t _{0.05} =2.36(tablo)

KAYNAKLAR

1. HOFFMAN, A., HAIM, D., KATZHENDLER, I., SHUVAL GILHAR, D., FRIEDMAN, M., *Journal of Controlled Release*, **54**, 29–37 1998.
2. European Pharmacopoeiae, Third Edition, Supplement 1999, Council of Europe, Strasbourg, 1999
3. KAYAALP, S.O., *Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji*, **223**, 2002.
4. BOKESOY, T.A., ÇAKICI, I. and MELLI, M., *Farmakoloji Ders Kitabı*, 536-537, 2000.
5. ABOUNASSIF, M.A., ABDEL-MOETY, E.M., MOHAMMED, M.E. and GAD-KARIEM, R.A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **9**, (9), 731-735, 1991.
6. BELAL, F., EL-KERDAWY, M.M., EL-ASHRY, S.M. and EL-WASSEEF, D.R., *II Farmaco*, **55**, 680-686, 2000.
7. YUAN, Z., RUSSELLIE, H.Q. and CANAFAX, D.M., *Journal of Chromatography B*, **692**, 361-366, 1997
8. LYLE, S.J. and YASSIN, S.S., *Analytica Chimica Acta*, **274**, (2), 225-230, 1993.
9. QURESHI, S.Z., QAYOOM, T. and HELALET, M.I., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **21**, 473-482, 1999.
10. EL WALILY, A.F.M., GAZY, A.A.K., BELAL, S.F. and KHAMIS, E.F., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **20**, 643-653, 1999.
11. KRAUWINKEL, W.J.J., VOLKERS-KAMERMANS, N.J. and VAN ZIJTVELD, J., *Journal of Chromatography : Biomedical Applications*, **617**, (2), 334-338, 1993.
12. ABDEL-MOETY, E.M., ABOUNASSIF, M.A., GAD-KARIEM, E.R.A. and KHATTAB, N.A., *Talanta*, **40**, (6), 811-817, 1993.
13. VENTURA, S., SILVA, M. and PEREZ-BENDITO, D., *Analytica Chimica Acta*, **266**, (2), 301-307, 1992.
14. WIBAWA, J.J.D., FOWKES, D., SHAW, P.N. and BARRETT, D.A., *Journal of Chromatography B*, **774**, 141-148, 2002.
15. PASAMONTES, A. and CALLAO, M.P., *Analytica Chimica Acta*, **485**, (2), 195-204, 2003.

16. QI, ML., WANG, P., SUN, YJ. and WANG, J., *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **26**, (12), 1927-1936, 2003.
17. MUTH, P., METZ, R., BECK, H., BOLTEN, W.W. and VERGIN, H., *Journal of Chromatography A*, **729**, (1-2), 259-266, 1996.
18. PAJCHEL, G., PAWLOWSKI, K. and TYSKI, S., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29**, 75-81, 2002.
19. SALEM, H. and SALEH, G.A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **28**, 1205-1213, 2002.
20. DE LA TORRE, P.M., ENOBAXHARE, Y., TORRADO, G. and TORRADO, S., *Biomaterials*, **24**, (8), 1499-1506, 2003.
21. FERNANDEZ-GONZALEZ, A., BADIA, R. and DIAZ-GARCIA, M.E., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29**, 669-679, 2002.
22. HOIZEY, G., LAMIABLE, D., FRANCES, C., TRENQUE, T., KALTENBACH, M., DENIS, J. and MILLART, H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30**, 661-666, 2002.
23. SHAN-YING, C., CHANG-QIN, H. and MING-ZHE, X., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **31**, 589-596, 2003.
24. AMIN, A.S., MOUSTAFA, M.E. and ISSA, Y.M., *Microchemical Journal*, **50**, (1), 6-13, 1994.
25. GASHEVA, L.M., KALINKOVA, G., MINKOV, E. and KRESTEV, V., *Journal of Molecular Structure*, **115**, 323-326, 1984.
26. DE POURCQ, P., HOEBUS, J., ROETS, E., HOOGMARTENS, J. and VANDERHAEGHE, H., *Journal of Chromatography A*, **321**, 441-449, 1985.
27. CHULAVATNATOL, S. and CHARLES, B.G., *Journal of Chromatography : Biomedical Applications*, **615**, (1), 91-96, 1993.