

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

AMOKSİSİLİN' İN İNSAN PLAZMASINDA
HPLC İLE MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMİ VE
VALİDASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ecz. Hatice Demet ÇELİK

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Tuncel ÖZDEN

ANKARA-2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : DEMET YARU
ANABİLİM DALI : FARMASÖTİK KİMYA
SINAV TARİHİ : 15 ŞUBAT 2007
TEZ KONUSU : Amoksisillinin insan plazmasında
HPLC ile miktar tayini yöntemi ve
validasyonu
KARAR : BAŞARILI

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : (+)
Reddine :

OYBİRLİĞİ / ~~MEKURU~~ ile karar verilmiştir.

GEREKCE :


Prof. Dr. Nurgur Noyan
JÜRI BAŞKANI


Prof. Dr. Tuncel Özden
ÜYE


Prof. Dr. Hakan Göker
ÜYE

ÜYE

ÜYE

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Tuncel ÖZDEN' e,

Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik konularında kendilerinden çok şeyler öğrendiğim, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Levent ÖNER' e;

Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı' nda yüksek lisans programında bana güven ve cesaret veren bilimsel yaklaşımı kendilerinden öğrenmeye çalıştığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Ningur NOYANALPAN ve Sayın Prof. Dr. Fethi ŞAHİN' e,

Yüksek lisans programımda yardımlarından dolayı başta Sayın Prof. Dr. Ali Ulvi TOSUN olmak üzere diğer Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

Yüksek lisans programım için izin veren ve imkan sağlayan, deneylerimi yapmam için laboratuvar olanaklarını sunan bir okul gibi eğitim aldığım Novagenix Biyoanalitik İlaç Ar-Ge Merkezi' ne, değerli amirlerime ve çalışmalarım sırasında destek olan çalışma arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi tüm imkânları sunan, beni yüreklendiren ve bu günlere getiren canım anne, babama ve tüm aile fertlerime,

Çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek beni destekleyen biricik eşime;

en derin duygularla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
TABLolar DİZİNİ	iii
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	4
II.1. ANTİBİYOTİKLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	4
II.1.1. Antibiyotik Tanımı ve Tarihçesi.....	4
II.1.2. Kemoterapinin Ana İlkesi ve Antibakteriyel Etki Derecesi.....	5
II.1.3. Antimikrobik Etki Spektrumu.....	6
II.1.4. Etki Mekanizmaları.....	7
II.1.5. Rezistans Oluşumu.....	8
II.1.6. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma.....	8
II.2. AMOKSİSİLİN İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	8
II.2.1. Kimyasal Özellikleri.....	8
II.2.2. Fiziksel Özellikleri.....	9
II.2.3. Amoksisilin'in Antibiyotik İlaçlardaki Yeri ve Önemi.....	9
II.2.4. Elde Edilişi.....	11
II.2.5. Farmakokinetik Özelliği.....	12
II.2.6. Klinik Kullanımı.....	13
II.2.7. Amoksisilinin İlaç Piyasasındaki Yeri.....	14
II.3. AMOKSİSİLİN İLE İLGİLİ KİMYASAL ÇALIŞMALAR	17
II.3.1. Amoksisilinin Miktar Tayini ile İlgili Yöntemler.....	17
II.4. UYGULANAN YÖNTEMLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	24
II.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini.....	24
II.4.1.1. Bileşiklerin Numunedeki Yüzde Miktarlarının Tayini.....	25
II.4.1.2. Dış Standart Yöntemi.....	26
II.4.1.3. İç Standart Yöntemi.....	27
II.4.2. Analitik Metot Geliştirme ile İlgili Genel Bilgiler.....	28
II.4.2.1. Optimizasyon.....	30
II.4.3. Analitik Metot Validasyonu ile İlgili Genel Bilgiler.....	32
II.4.3.1. Tanımlar.....	32
II.4.3.2. Analitik Metot Validasyonu.....	34
II.4.3.2.1. Tam Validasyon.....	35

II.4.3.2.2. Kısmi Validasyon	35
II.4.3.2.3. Çapraz Validasyon	36
II.4.3.3. Metot Validasyonunun Değerlendirilmesinde Kullanılan Parametreler	37
II.4.3.3.1.Özgünlük	38
II.4.3.3.2. Seçicilik	39
II.4.3.3.3. Doğruluk	39
II.4.3.3.4. Kesinlik	39
II.4.3.3.5. Geri Kazanım	40
II.4.3.3.6. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık	40
II.4.3.3.6.1. Tespit Limiti (LOD)	41
II.4.3.3.6.2. Kantitatif Alt Limit (LOQ)	41
II.4.3.3.6.3. Kalibrasyon Eğrisi ile Konsantrasyon-Cevap İlişkisi	42
II.4.3.3.7. Stabilite	43
II.4.3.3.7.1. Dondurma, Çözme Stabilitesi	45
II.4.3.3.7.2. Hızlandırılmış Stabilite	44
II.4.3.3.7.3. Uzun Süreli Stabilite	44
II.4.3.3.7.4. Stok Çözelti Stabilitesi	44
II.4.3.3.7.5. Hazırlama Sonrası Stabilite (Oto Örnekleyici Stabilitesi)	44
II.4.3.3.8. Tutarlılık	45
II.4.3.3.9. Sağlamlık	45
III. MATERYAL VE YÖNTEM	46
III.1. KULLANILAN CİHAZLAR VE EKİPMANLAR	46
III.1.1. Enstrumental Kısım	46
III.1.2. Kolon	46
III.1.3. Diğer Ekipmanlar	47
III.2. KULLANILAN KİMYASALLAR	47
III.3. SİSTEMİN KURULUMU	48
III.4. ANALİZİ YAPILAN MADDELERİN ANALİZ SERTİFİKALARI	49
III.4.1. Referans Standart Olarak Kullanılan Amoksisilin Trihidrat' ın Analiz Sertifikası	50
III.4.2. İç Standart Olarak Kullanılan Ampisilin Sodyum' un Analiz Sertifikası	51
III.5. YÖNTEMİN KROMATOĞRAFİK ŞARTLARI	52
III.6. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	52

III.6.1. Standart Stok Çözeltisi	52
III.6.2. Dilüe Standart Stok Çözeltisi	52
III.6.3. Kalibrasyon Standartları	53
III.6.4. Kalite Kontrol Numuneleri	54
III.6.5.1. İç Standart Stok Çözeltisi	55
III.6.5.2. İç Standart Çalışma Çözeltisi	56
III.6.6. HPLC Hareketli Faz	56
III.6.7. 5 M Hidroklorik Asit Çözeltisi	56
III.6.8. 5 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi	57
III.6.9. % 50' lik Perklorik Asit Çözeltisi	57
III.6.10. Civa II Klorür Stok Çözeltisi	57
III.6.11. 0.5 M Disodyum Hidrojen Fosfat Tamponu	57
III.6.12. Türevlendirme Çözeltisi	58
III.7. NUMUNE HAZIRLAMA YÖNTEMİ	58
IV. BULGULAR	61
IV.1. AMOKSİSİLİNİN İNSAN PLAZMASINDA HPLC İLE MİKTAR TAYİNİ YÖNTEM VALİDASYONUNUN SONUÇLARI	61
IV.1.1. Yöntem Validasyonunun Özeti	62
IV.1.2. Özgünlük ve Seçicilik	62
IV.1.3. Kantitatif Alt Limit (LOQ)	65
IV.1.4. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık	65
IV.1.5. Doğruluk ve Kesinlik	68
IV.1.6. Stabilité	77
IV.1.7. Geri Kazanım	79
V. TARTIŞMA	80
VI. SONUÇ	83
VII. ÖZET	84
VIII. SUMMARY	85
IX. KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGELER DİZİNİ

ELISA	Enzim Bağlı İmmün Assay
FDA	Food and Drug Administration
FLD	Floresans Dedektör
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICH	International Conferance on Harmonisation
LC-MS/MS	Sıvı Kromatograf Ardışık Kütle Spektroskopisi
LOQ	Kantitatif alt limit
LOD	Tespit limiti
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun ters logaritması
pKa	Bir bileşikten hidrojen iyonu ayrılması denge sabitinin negatif logaritması
rpm	Karıştırma hızı (devir/dakika)
RSD	Bağıl standart sapma
TCA	Trikloro asetik asit
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Mor ötesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Amoksisilin elde ediliş yöntemi.....	12
Şekil 2: HPLC sisteminin şematik gösterimi.....	24
Şekil 3: HPLC cihazının ayrıntılı görünümü.....	25
Şekil 4: Kör numune kromatogramı.....	63
Şekil 5: 0.1 µg/mL konsantrasyondaki LOQ numunesinin kromatogramı.....	64
Şekil 6: 1. Validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği.....	66
Şekil 7: 2. Validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği.....	66
Şekil 8: 3. Validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği.....	67
Şekil 9: 4. Validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği.....	67
Şekil 10: 5. Validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği.....	68

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Amoksisilin içeren ilaçlar.....	15
Tablo 2: Amoksisilin ve potasyum klavulanat içeren kombine ilaçlar.....	16
Tablo 3: Validasyon için istenen parametreler.....	38
Tablo 4: Amoksisilin Trihidrat Analiz Sertifikası.....	50
Tablo 5: Ampisilin Sodyum Analiz Sertifikası.....	51
Tablo 6: Kalibrasyon standartlarının hazırlanması.....	54
Tablo 7: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanması.....	55
Tablo 8: Yöntem Validasyonunun özeti.....	62
Tablo 9: Kalibrasyon standartları için kabul limitleri.....	68
Tablo 10: Kalibrasyon standartları için hesaplanan kabul aralıkları.....	69
Tablo 11: Kalite kontrol numuneleri için kabul limitleri.....	69
Tablo 12: Kalite kontrol numuneleri için hesaplanan kabul aralıkları.....	69
Tablo 13: 1. Validasyon serisinin sonuç raporu.....	71
Tablo 14: 2. Validasyon serisinin sonuç raporu.....	72
Tablo 15: 3. Validasyon serisinin sonuç raporu.....	73
Tablo 16: 4. Validasyon serisinin sonuç raporu.....	74
Tablo 17: 5. Validasyon serisinin sonuç raporu.....	75
Tablo 18: Kalite kontrol numunelerinin tüm kalibrasyon serilerine karşın seri-içi istatistiksel değerleri.....	76
Tablo 19: Kalibrasyon standartlarının beş gün boyunca seriden seriye istatistiksel değerleri.....	76
Tablo 20: Kalite kontrol numunelerinin beş gün boyunca seriden seriye istatistiksel değerleri.....	77
Tablo 21: Oda sıcaklığında 72 saat bekleyen numunelerin stabilite verileri.....	78
Tablo 22: Stabilite serisinin sonuç raporu.....	78

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Orijinal bir ilacın tasarımından piyasaya sürülmesine kadar geçirdiği pek çok evre vardır. Bunların en başında ilaç etkin maddesinin sentezi ve klinik öncesi araştırmalar gelir. Etkin madde üzerinde ön analitik çalışmalar, fizikokimyasal araştırmalar, biyolojik etkinliğin incelenmesi ve toksisite deneyleri gibi araştırmaların yapıldığı “Faz 0” olarak adlandırılan evreden sonra sağlıklı gönüllülerde tolerans deneyleri ve insanın ilaca karşı dayanıklılığının saptanması, uygun farmasötik dozaj şeklinin, dozunun, dozlama aralığının seçilmesi için çalışmalar ve ilacın absorpsiyonunun, dağılmasının, biyotransformasyonunun ve eliminasyonunun saptanması, metabolik yolların araştırılması, metabolitlerinin tayininin analitik yoldan araştırılması, endüstriyel üretime uygunluk araştırması ve pazar araştırması gibi çalışmaların yapıldığı “Faz I” evresi gelir. Daha sonra seçilen hasta popülasyonunda farmakolojik etkinin klinik kontrolünün gerçekleştirilmesi, formülasyon deneyleri ve farmasötik ürün üzerinde çalışmaların gerçekleştiği “Faz II” evresi ve çok sayıda hastada klinik çalışmanın yapıldığı, yan etkilerin ve olası ilaç etkileşimlerinin değerlendirildiği, raf ömrünün tayin edildiği, pazar araştırmalarının tamamlandığı “Faz III” evresi ve son olarak da istenmeyen etkilerin belirlenmesi için projelendirilmiş çalışmaların yapıldığı ve elde edilen analitik, üretim, klinik ve pazarlama verilerinin değerlendirildiği

“Faz IV” evresi vardır. Hiç şüphesiz ki bütün bu çalışmaların yapılması yüksek maliyet gerektirir ve patent ve veri koruma süresi tamamlanan orijinal ilacın eşdeğeri olan müstahzarların üretimi başlar.

Bir ilacın kaliteli, güvenilir ve etkinlik gibi üç temel şartı sağlaması gerekmektedir. Ancak aynı etkin maddenin, aynı miktar, aynı dozaj şekli ve aynı uygulama yolu ile verilmesi etkinlik için yeterli değildir. Bu durum farmasötik eşdeğer olarak tanımlanır. Farmasötik bakımdan eşdeğer olan müstahzarların biyoyararlanımlarının farklılık göstermesini ve bu durumun tedavinin yetersizliği veya toksisite artması sonucu oluşturabileceği sakıncaları önlemek için biyoeşdeğerlik şartı aranmaktadır. Biyoeşdeğerlik; farmasötik eşdeğer olan iki müstahzarın, aynı molar dozda uygulanmasından sonra biyoyararlanımların, yani absorpsiyon hız ve derecelerinin ve böylece etkilerinin hem etkinlik, hem güvenlik bakımından esas olarak aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olması durumudur.

Biyoyararlanım incelemelerinde, ilacın veya etkin metabolitlerinin esas olarak plazma konsantrasyon-zaman eğrisi belirlenmektedir. Bu eğrinin altında kalan alan en az üç yarılanma ömrüne eşit zaman diliminde bu eğri ile ilgili olan doruk plazma konsantrasyonu ile bu konsantrasyona erişme süresi ölçülmek suretiyle değerlendirme yapılmaktadır. Gerektiğinde renal kümülatif ıtrah edilen miktar, ıtrah hızı ve tümüyle absorbe edilip ıtrah edilme süresi ölçülerek de değerlendirme yapılabilmektedir.

Bu değerlendirilmelerin yapılabilmesi için uygun bir miktar tayini yöntemi geliştirilmesi, yöntemin FDA (Food and Drug Administration) ve ICH’ in (International Conferance on Harmonisation) belirlediği kurallara göre geçerliliğinin kanıtlanması, diğer bir ifade ile valide edilmesi gerekmektedir.

Plazma, serum, kan ve idrar veya uygun olan diğer ortamda etkin maddenin ve/veya biyotransformasyon ürünlerinin tayini için kullanılan biyoanalitik yöntemler özgünlük, doğruluk, duyarlılık ve kesinlik ile ilgili gereklere uymalıdır ve validasyon bulguları bildirilmelidir. Etkin maddenin ve/veya biyotransformasyon ürünlerinin stabilitesinin bilinmesi güvenilir

bulgular elde etmek için ön şarttır. Biyoeşdeğerliğin değerlendirilmesi, etkin maddenin ölçülen konsantrasyonlarına dayanılarak yapılır.

Bu çalışmada insan plazmasında amoksisilin miktar tayini için yöntem geliştirilmesi ve yöntemin validasyonu amaçlanmıştır. Hassas ve uygun yöntemin belirlenmesinden sonra validasyonun da geçerli kurallara göre gerçekleştirilmesi ve böylece yöntemin farmakokinetik, farmakodinamik ve biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılabilirliğinin sağlanması öngörülmüştür.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. ANTİBİYOTİKLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

II.1.1. Antibiyotik Tanımı ve Tarihçesi

Antibiyotikler, antibakteriyel ilaçlar içinde önemli yer tutan ilaç grubunu oluştururlar. Bakteriler, funguslar ve aktinomisetler gibi çeşitli mikroorganizma türleri tarafından biyosentez yoluyla oluşan ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini önleyen ya da onları öldüren kimyasal maddelerdir. Eskiden antibiyotikler, genellikle sentezlenerek elde edilen kemoterapötiklerden ayrı bir ilaç grubu olarak görülmekteyken bazı antibiyotiklerin de kemoterapötikler gibi sentetik veya yarı sentetik elde edilebilmesi nedeniyle günümüzde antibiyotikler ve antibakteriyel kemoterapötikler eşanlamlı sözcükler olarak kullanılmaktadır¹.

Yazılı tarihin, 4000-5000 yıl öncesindeki Çin kaynaklarında, bazı çürük bitkisel materyalin çeşitli yaraları iyi ettiği kayıtlıdır. Ancak Pasteur ve Joubert, 1877 yılında bilimsel anlamda, iki farklı mikroorganizmanın aynı ortamda diğerine zarar verdiğini göstermiştir. 1889 yılında Vuillemin, antibios (bir canlının başka canlıyı yok etmesi) deyimini tanımlamış ve böylece antibiyotik kavramı ortaya çıkmıştır. Bu kavram günümüz modern tıbbında da halen kullanılmaktadır².

Weckman' ın daha bilimsel tanımına göre antibiyotik; bakteri, fungus ve aktinomisetlerin metabolizmaları sonucu oluşan sekonder hücre metabolitleri olup, küçük konsantrasyonlarında bile patojen mikroorganizmaların gelişimini önlerler. Ancak günümüzde klinikte kullanılan çok sayıda antibiyotik mantar veya bakteri gibi bir mikroorganizmanın sekonder metaboliti olarak fermantasyon ortamından kazanılarak tedaviye sunulmasından çok, biyosentetik ve sentetik yolla daha ekonomik şekilde üretilmekte ve tedaviye sunulmaktadır.

Antibiyotikler tıpta enfeksiyon hastalıklarla mücadeledeki önemi yanında, ayrıca veteriner hekimlikte, hayvancılıkta et, süt, yumurta veriminin artırılmasında önemli maddeler olarak öne çıkarlar².

II.1.2. Kemoterapinin Ana İlkesi ve Antibakteriyel Etki Derecesi

Kemoterapide ana ilke, konakçıda hiç veya çok az toksik etki yapan bir kimyasal madde ile hastalık etkeni organizma üzerinde yeteri kadar toksik ya da letal etki oluşturmaktır. Kemoterapötik ilaçlar, vücutta kimyasal maddelerin selektif etkisi için tipik birer örnektir. Bu selektif etki, patojen mikroorganizma hücresi ile insan veya genel olarak memeli hücresi arasında, yapı ve biyokimyasal mekanizmalar bakımından varolan farklar sayesinde mümkün olmaktadır. Selektifliğin derecesi çeşitli kemoterapötik ilaç gruplarında farklılık gösterir.

Kemoterapötikler, vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda mikroorganizmalar üzerinde yaptıkları etkinin derecesine göre iki gruba ayrılırlar:

1. Bakteriyostatik olanlar: Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini ve üremesini önlerler, bakteriyi doğrudan doğruya öldürmezler. Gelişme ve üremesi duran bakteriler vücudun hümmoral ve hüccresel savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilebilirler. Bu gruptaki ilaç örneklerinden bazıları; tetrasiklinler, sülfonamidler, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, metranidazol ve fungusitatik etki gösteren mikanazoldür.

2. Bakterisit olanlar: Bunlar bakteri hücrelerini dolaysız olarak öldürürler. Bu gruptaki ilaç örneklerinden bazıları; penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozidler, vankomisin, amfoterisin B (fungisit), rifampin, fluorokinolonlardır.

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bakterisit aktiviteye sahip olan kemoterapötikler tercih edilir.

Antimikrobik ilaçların bakteriyostatik etki gücünün kantitatif göstergesi, sıvı kültür ortamında yapılan duyarlılık testleri ile ölçülen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeridir ve bakteri türüne özgüdür. Bu değer ne kadar küçükse ilacın bakteriyostatik etki gücü o kadar fazladır. MİK değeri, antimikrobik ilacın bir bakteri veya mikroorganizma türünün çok sayıda duyarlı suşları üzerinde yapılan deneylerde bu suşların % 90' ını inhibe eden ilaç konsantrasyonu olan MİK₉₀ şeklinde standartlaştırılmıştır. Bakterisit etki gücünün göstergesi ise minimum bakterisit konsantrasyon (MBK)' dur. Bu değer sıvı kültür ortamında standart koşullarda bakterilerin % 100' e yakınını öldüren minimum ilaç konsantrasyonudur. Bakterisit ilaçlar için de MİK değeri vardır; bu değer MBK' dan küçüktür. Başka bir deyişle bakterisit ilaçlar, bakterisit etkinlik için yeterli olmayan düşük konsantrasyonlarda bakterileri öldürmeksizin onların üremesini inhibe ederler¹.

II.1.3. Antimikrobik Etki Spektrumu

Belirli bir kemoterapötik ilaca duyarlı olan mikroorganizma türlerinin tümüne o ilacın antimikrobik spektrumu adı verilir. Bir kısım kemoterapötik ilaçlar sadece bir bakteri türüne veya birkaçına karşı etkili olup bunlara dar spektrumlu kemoterapötikler denilir. Örnekleri sadece mikobakterilere karşı etkili olan izoniazid, sadece maya mantarlarına karşı etkili olan nistatin, sadece kısıtlı sayıda gram-negatif veya gram-pozitif kokuslar, gram-pozitif bazı basiller ve spiroketler üzerine etkili olan penisilin G ve benzeri doğal penisilinlerdir. Diğer bazı kemoterapötikler ise fazla sayıda bakteri ve diğer mikroorganizma türlerine karşı etkilidirler. Bunlara geniş

spektrumlu kemoterapötikler adı verilir. Örneğin tetrasiklinler, kloramfenikol, üreidopenisilinler ve imipenem gibi. Antimikrobik ilaçların spektrumu ortamdaki ilaç konsantrasyonuna ve bakteri suşuna göre değişkenlik gösterir¹.

II.1.4. Etki Mekanizmaları

Antibakteriyel kemoterapötiklerin etki mekanizmaları beş ana başlık altında incelenir¹:

1. Bakteri hücre duvarının sentezini inhibe etmek ve litik enzimleri aktive etmek suretiyle etki (Penisilinler, sefalosporinler, aztreonam, imipenem, vankomisin, basitrasin, teikoplanin).
2. Sitoplazma membranının permeabilitesini artırmak suretiyle etki (Polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, ketokonazol ve diğer antifungal imidazollar, flukonazol ve diğer antifungaltriazollar).
3. Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle etki (Kloramfenikol, eritromisin ve diğer makrolidler, tetrasiklinler, kuinupristin-dalfopristin, linezolid, aminoglikozidler).
4. Genetik materyal sentezinin bozulması ile oluşan etki (Rifampisin ve diğer rifamisinler, nalidiksik asit, fluorokinolonlar, metranidazol).
5. İntermediyer metabolizmayı bozmak suretiyle etki (Sulfonamidler, trimetoprim, sulfonlar, izoniazid, etambutol).

II.1.5. Rezistans Oluşumu

Rezistans (direnç), bakteri ve diğer mikroorganizmaların bir özelliği olup genel anlamıyla onların kemoterapötik ilaç tarafından etkilenmemesi demektir. Klinikte kullanılan anlamıyla, patojen mikroorganizma veya süşunun, kemoterapötik ilacın kullanıldığı doz aralığında serumda meydana getirdiği konsantrasyon düzeyinde, ilaç tarafından etkilenmemesi demektir. Doğal rezistans, kazanılmış rezistans, çapraz rezistans ve çoklu rezistans gibi çeşitleri vardır.

II.1.6. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma

Antibiyotikler kimyasal yapılarına göre sekiz grupta incelenebilirler²:

1. β -Laktam antibiyotikleri
2. Aminoglikozit antibiyotikleri
3. Tetrasiklinler
4. Makrolit antibiyotikler
5. Polipeptit antibiyotikler
6. Linkomisin grubu antibiyotikler
7. Kloramfenikol grubu antibiyotikler
8. Çeşitli yapılardaki antibiyotikler

Amoksisilin β -Laktam antibiyotikleri başlığı altında yer almaktadır.

II.2. AMOKSİSİLİN İLE İGİLİ GENEL BİLGİLER

II.2.1. Kimyasal Özellikleri

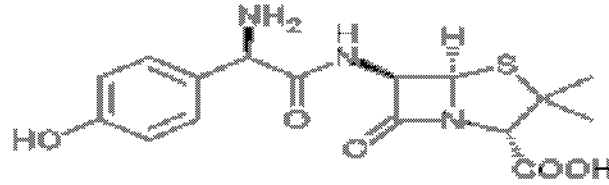
Amoksisilin; kirli beyaz renkte hafif aromatik kokulu, tadı acı olan kristal tozdur. Bileşiğin trihidrat veya susuz formu hazırlanabilir. Sodyum

tuzu paranteral uygulamalarda kullanılır. Kimyasal sentez veya 6-Aminopenisillanik asit (6-APA)' ten semisentetik yolla elde edilebilir^{3,4}.

Amoksisilin kapalı formülü: C₁₆H₁₉N₃O₅S

Kimyasal okunuşu: 6-[2-Amino-2-(4-hidroksifenil)] asetamino-3,3-dimetil-7-okso-4-tiya-1- azabisiklo [3,2,0] heptan-2-karboksilik asit

Molekül ağırlığı: 365.4 g/mol



Amoksisilinin kimyasal yapısı

II.2.2. Fiziksel Özellikleri

Molekül ağırlığı: 365.4 g/mol (trihidrat formu için: 419.5 g/mol)

pKa (fenol grubu, amino grubu): 7.4, 9.6

Çözünürlük: Suda ve alkolde az çözünür. Kloroform ve eterde çözünmez^{3,4}.

II.2.3. Amoksisilin'in Antibiyotik İlaçlardaki Yeri ve Önemi

Amoksisilin esas olarak bir β -Laktam antibiyotığıdır. Yapısında biri azot, üçü karbon olan dört üyeli heterosiklik β -Laktam halkası içeren antibiyotiklere β -Laktam antibiyotikleri ya da β -Laktamlar adı verilir. β -Laktamlar beş ana başlık altında incelenirler¹:

1. Penisilinler
2. Karbapenemler
3. Sefalosporinler
4. Monobaktamlar
5. β -Laktamaz inhibitörleri

Penisilinler, güçlü bakterisit etkilerinin yanında toksisiteleri oldukça düşük olan ve sık kullanılan doğal veya yarı-sentetik antibiyotiklerdir.

Penisilinler seçicilik gösteren ilaçlardır. Penisilinler; hücre duvarının esasını oluşturan uzun polimer molekül zincirlerinin yan dallarla birbirine kenetlenmelerini engellerler; böylece hücre duvarının oluşmasını önler ve sonuçta bakterinin ölümüne yol açarlar. Memeli hücresinde hücre duvarı bulunmadığından penisilinlerin belirgin bir toksisitesi yoktur. İlk bulunan ve kısa aralıklarla yeni türevlerinin tıbbi kullanıma sunulması nedeniyle en hızlı gelişme göstermiş antibiyotik grubu olup birçok enfeksiyon türünde tercih edilmektedir. Başta *Penicillium notatum* ve *chrysogenum* olmak üzere çeşitli *Penicillium* (yeşil renkli küf mantarları) türlerinden ekstraksiyon ve saflaştırma suretiyle elde edilirler. Penisilinler, esas olarak β -Laktam halkasının amino grubu üzerindeki yan zincirin türüne göre yedi başlık altında incelenmektedir¹:

- a) Benzilpenisilin (penisilin G), tuzları ve esterleri
- b) Fenoksipenisilinler
- c) Stafilokokal β -Laktamazlara dayanıklı penisilinler
- d) Aminopenisilinler
- e) Karboksipenisilinler
- f) Açılüracidopenisilinler
- g) Diğer penisilinler

Amoksisilin; penisilinlerin aminopenisilinler başlığı altında kendine yer bulmaktadır. Bu gruptaki penisilinler, benzilpenisilin yan zincirinin α -karbonu üzerine amino grubu getirilmesi sonucu oluşan türevlerdir. Bu gruptaki amoksisilin haricindeki diğer örnekler ampisilin ve ampisilin esterleri olan bakampisilin ve pivampisilin'dir.

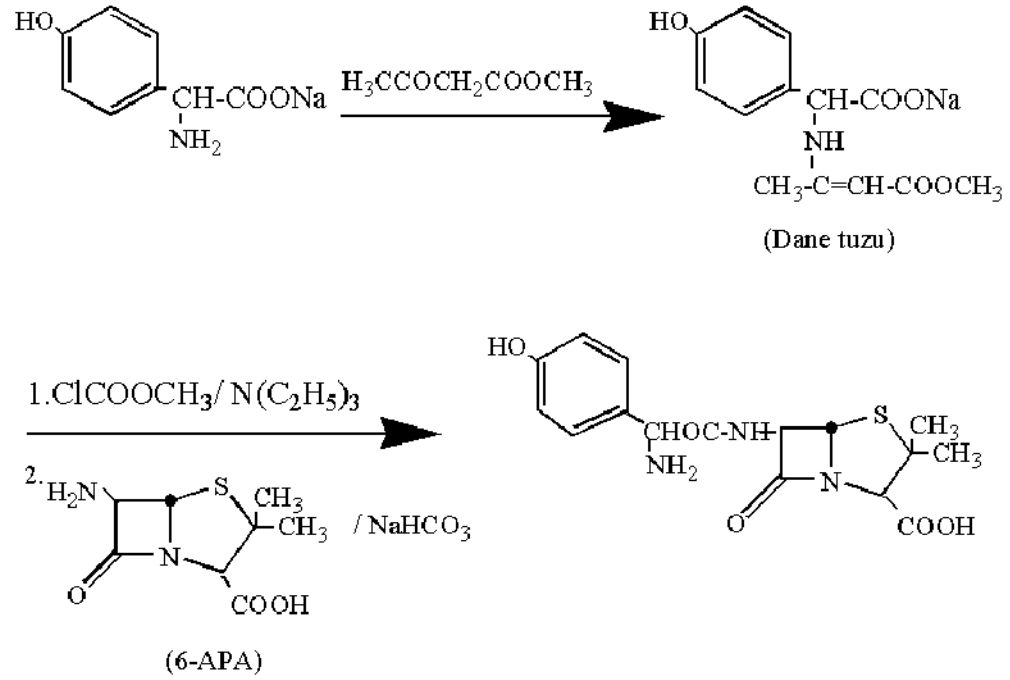
Günümüzde tıpta kullanılan penisilin türleri antimikrobik spektrumları, farmakokinetik ve kimyasal özellikleri bakımından beş grupta toplanabilir:

- a) Penisilin G ve depo türevleri
- b) Aside dayanıklı penisilinler
- c) Antistafilokokal penisilinler
- d) Geniş spektrumlu penisilinler
- e) Antipsödomonal penisilinler

Amoksisilin bu sınıflandırmada geniş spektrumlu penisilinler grubunda yer almaktadır. Genel olarak, bu penisilinler, gram-pozitif ve gram-negatif koklara karşı, penisilin G' ye eşit veya yakın derecede etkin fakat antistafilokokal penisilinlere göre çok daha fazla etkin olan ilaçlardır. β -Laktamaz enzimlerinin bazı türlerine karşı dayanıksızdırlar. Ampisilin ve amoksisilin arasındaki fark esas olarak absorpsiyonla ilgili farmakokinetik özelliklerinden kaynaklanır. Bu gruptaki ilaçların hepsi yarı-sentetiktirler. Aside dayanıklıdırlar. Bağırsakta basit difüzyonla değil, muhtemelen aktif transportla, kısıtlı kapasite gösteren bir mekanizma ile absorbe olurlar. Oral yoldan aşırı dozda alınırlarsa, absorpsiyon kapasitesi doyurulmuş olacağı için absorbe edilen miktar artmaz, absorbe edilmeyip kalın barsağa geçen miktar artar; bu da oradaki yan tesirleri (ishal gibi) artırır. Amoksisilin mide-bağırsak kanalından yeterli derecede absorbe edilir ve absorpsiyon derecesi besinler tarafından pek etkilenmez⁵⁻⁷. Oral verilen aminopenisilinler kandaki en yüksek konsantrasyonlarını genellikle veriliştikten 1-2 saat sonra oluştururlar. Penisilinlerin parenteral uygulaması i.m. veya i.v. olarak yapılır. Ancak sadece oral verilen türler (fenoksipenisilinler, kloksasilinler) olduğu gibi sadece parenteral verilen türler (prokain-penisilin G, benzatin-penisilin G, metisilin, tikarsilin ve açilüreidopenisilinler) de vardır. Penisilinler asidik iritan bileşikler oldukları için, i.m. enjeksiyon yerinde ağrı oluştururlar¹.

II.2.4. Elde Edilişi

Amoksisilin de içinde bulunduğu aminopenisilinlerin elde edilebilmesi için asit komponentinin taşıdığı amin gruplarının öncelikle korunması sonra da 6-aminopenisillanik asit (6-APA) ile bağlanması gerekir. Bunun için de D-fenilglisin, D-(4-hidroksifenil) glisin ve D-(1,4-dihidrofenil) glisinin amin grupları, metil asetil asetat ile reaksiyona sokularak korunur. Oluşan bu ürünün sodyum tuzuna *Dane* tuzu denir. Sonra metil kloroformat ve trietilamin varlığında 6-APA ile reaksiyona sokulur².



Şekil 1: Amoksisilin elde ediliş yöntemi

II.2.4. Farmakokinetik Özelliği

Parenteral uygulamadan sonra penisilinlerin çoğu tam ve hızlı emilirler. İntramusküler uygulandığında oluşan irritasyon ve bunu izleyen yerel ağrı nedeniyle intravenöz (damara bağlı düzenekler içine aralıklı ve bolus biçiminde) uygulama tercih edilir. Oral yoldan yapılan uygulamadan sonra emilim aside dayanıklılık ve proteine bağlanma oranına göre değişik penisilinlerde büyük farklılıklar gösterir. Yiyeceklere bağlanmalarını en aza indirmek için oral penisilin uygulaması yemekten en az bir saat önce veya sonra yapılmalıdır. Emilimden sonra penisilinler vücut doku ve sıvılarına yaygın bir biçimde dağılırlar. Pek çok dokudaki penisilin yoğunluğu ile serum yoğunluğu eşit görülür. Prostat, göz ve santral sinir sisteminde ise daha düşük düzeyde bulunur. Penisilin serum düzeylerinin % 3-15 kadarı balgam ve sütte de bulunur. Bu durum hem insanlarda hem de sığırlarda geçerlidir⁷.

Amoksisilinin plazma proteinlerine bağlanma oranı düşüktür (%17). Eliminasyon yarılanma ömrü ise 1 saattir^{6,7,9,10}.

II.2.5. Klinik Kullanımı

Penisilinler, güçlü bakterisit ilaçlar olmaları, allerjik olmayan kimselerde toksisitelerinin çok düşük olması ve yeni çıkanlar hariç, düşük fiyatlı olmaları nedeniyle enfeksiyonların tedavisinde en sık kullanılan antibiyotiklerdir¹. Oral kullanılacaksa yiyeceklerle bağlanma ve asitle oluşabilecek parçalanmayı azaltmak için yemeklerle birlikte verilmemelidir (yemekten 1 saat önce veya 1-2 saat sonra verilmelidir.)⁸. Amoksisilin, gram-negatif koliform bakterilerle oluşan üriner sistem enfeksiyonları veya solunum sisteminin sekonder enfeksiyonlarla karışık (sinüzitis, otitis media, bronşitis) durumların tedavisinde kullanılır. Çocuklarda otitis media tedavisinde, penisilin V ve eritromisinden daha etkili bulunmuştur. Grup A streptokoklara karşı etki gücü penisilin V' ninkine yaklaşık olarak eşittir. Absorpsiyonun fazla olması sonucu, feçeste kalan miktarı ampisilininkine göre az olduğu için Shigella dizanterisinde etkinliği düşüktür ve kullanılması tavsiye edilmez. Tifoda, ikinci sıra alternatif ilaçlardan biridir. Çocuklarda Lyme hastalığı tedavisinde de kullanılır^{1,3,8,11}. Yaygın bir kullanım alanı da gastric Helicobacter pyloriye bağlı enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde, başka bir antibiyotik ile kombine halde veya asit baskılayıcı ajanlarla birlikte kullanılmasıdır^{12,13}. Klavulanik asit ile birlikte kullanılması durumunda β -laktamazların yaptığı parçalanmadan korunabilirler. Bu tür karışımlar β -laktamaz üreten Haemophilus influenzae ve koliform organizmalara karşı kullanılmaktadır⁸.

Amoksisilinin tavsiye edilen optimal günlük dozu 25-50 mg/kg' dır ve bölünerek 8 saatte bir uygulanır. Genellikle oral yolla verilir; i.v. veya i.m. enjeksiyonla veya i.v. infüzyonla da uygulanabilir. Üriner enfeksiyonlarda erişkinde 10-12 saat ara ile 2 kez 3 g, gonorede 1 g, probenesid ile tek doz

halinde 2-3 g ve akut otitis mediaı çocuklarda (3-10 yaşı) iki gün süreyle günde 2 kez 750 mg verilir¹.

II.2.6. Amoksisilinin İlaç Piyasasındaki Yeri

Amoksisilinin tek başına veya da potasyum klavulanat ile kombine halde bulunduğu pek çok ilaç vardır. Bunlar tablet, film tablet, flakon, süspansiyon, kapsül gibi farklı dozaj formlarındadır. Ülkemiz ilaç piyasasındaki bu ilaçlar Tablo 1 ve Tablo 2’ de verilmiştir¹⁴.

Tablo 1: Amoksisilin içeren ilaçlar

İsim	Firma	Farm. Dozaj Formu	Dozaj
Alfoxil	Abfar	Tablet Flakon Süspansiyon	500-1000 mg 500-1000 mg 125-250 mg/5mL
Amoksilin	Nobel	Kapsül	500 mg
Amoksina	Mustafa Nevzat	Tablet Kapsül Süspansiyon	500-1000 mg 250 mg 125-250 mg/5mL
Amosin	Şanlı	Tablet Süspansiyon	500 mg 125-250 mg/5mL
Amoxicil	Biosel	Tablet Süspansiyon	500 mg 250 mg/5mL
Atoksilin	Atabay	Tablet Süspansiyon	500-1000 mg 250 mg/5mL
Demoksil	Deva	Tablet Süspansiyon	500-1000 mg 125-250 mg/5mL
Helipak	Abbott	Tablet	1000 mg
Largopen Largopen –BID Largopen-BID fort	Bilim	Tablet Flakon Süspansiyon Süspansiyon Süspansiyon	500-1000 mg 500-1000 mg 125-250 mg/5 mL 200 mg/5 mL 400 mg/5 mL
Moksilin	Sandoz	Tablet Süspansiyon	500 mg 250 mg/5 mL
Remoxil	İ.E.Ulagay	Tablet Süspansiyon Flakon	500-1000 mg 250 mg/5mL 250-500-1000 mg
Topramoxin	Toprak	Film tablet Süspansiyon	500-1000 mg 250 mg/5mL
Trio	Deva	Tablet	1000 mg

Tablo 2: Amoksisilin ve potasyum klavulanat içeren kombine ilaçlar

İsim	Firma	Farm. Dozaj Formu	Dozaj
Amoklavın	Deva	i.v. Flakon	1200 mg
Amoklavın-BID		Film tablet	625-1000 mg
Amoklavın-BID ped		Süspansiyon	228.5 mg/5mL
Amoklavın-BID fort		Süspansiyon	457 mg/5mL
Amoksilav-BID	Sandoz	Film tablet	625-1000 mg
Amoksilav-BID ped		Süspansiyon	228.5 mg/5mL
Amoksilav-BID fort		Süspansiyon	457 mg/5mL
Agumentin-BID	GSK	Film tablet	625-1000 mg
Agumentin-BID		Süspansiyon	228.5 mg/5mL
Agumentin-BID		Flakon	1200 mg
Agumentin-BID fort		Süspansiyon	457 mg/5mL
Bioment-BID	Fako	Film tablet	625-1000 mg
Bioment-BID		Süspansiyon	228.5 mg/5mL
Bioment-BID fort		Süspansiyon	457.5 mg/5mL
Croxilex-BID	İ.E. Ulagay	Film tablet	625-1000 mg
Croxilex-BID		Süspansiyon	228.5 mg/5mL
Croxilex-BID		Süspansiyon	457 mg/5mL
Klamoks	Bilim	Film tablet	625 mg
Klamoks-BID		Film tablet	1000 mg
Klamoks-BID ped		Süspansiyon	228.5 mg/5mL
Klamoks-BID fort		Süspansiyon	457 mg/5mL
Klavunat	Atabay	Film tablet	625 mg
Klavunat ped		Süspansiyon	156.25 mg/5mL
Klavunat fort		Süspansiyon	312.5 mg/5mL
Klavupen	Toprak	Film tablet	625 mg
Klavupen-BID		Film tablet	1000 mg
Klavupen ped		Süspansiyon	156.25 mg/5mL
Klavupen fort		Süspansiyon	312.5 mg/5mL

II.3. AMOKSİSİLİN İLE İLGİLİ KİMYASAL ÇALIŞMALAR

II.3.1. Amoksisilinin Miktar Tayini ile İlgili Yöntemler

Amoksisilinin gerek farmasötik dozaj formlarında gerekse biyolojik matrislerde birçok analiz yöntemi mevcuttur. Bunlar mikrobiyolojik tekniklerle ölçme¹⁵, enzimatik ölçüm¹⁶, iyodometrik titrasyon¹⁷, spektrofotometrik^{18,19}, UV spektrofotometrik^{20,21}, polarografik²², kapiller elektroforez²³, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)²⁴⁻³⁹ ve Sıvı Kromatograf Ardışık Kütle Spektroskopisi LC-MS/MS⁴⁰ gibi yöntemlerdir. Verilen yöntemlerin içinde en hassas ve uygun olanın HPLC yöntemi olduğu belirtilmiştir³⁵.

Amoksisilin, ampisilin, sefalekssin ve sefadrinin plazmadan ekstre edilip HPLC yöntemi ile floresans dedektör kullanılarak miktar tayini üzerine yapılan bir çalışma Miyazaki ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Amoksisilinin miktar tayini için, 0.5 mL plazma alınarak 4 mL distile su ile seyreltilmiştir. Üzerine 3 mL %10'luk trikloroasetik asit (TCA) eklendikten sonra karışım 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üst fazdan alınan 3 mL çözelti, 0.5 mL 2 N NaOH çözeltisi içeren tüpe alınarak 5 dakika süreyle beklemeye bırakılmış daha sonra üzerine 0.5 mL 2 N HCl çözeltisi eklenmiştir. Bu karışıma 0.5 M disodyum hidrojenfosfat tamponunda hazırlanan %0.002 (a/h)' lik civa II klorür çözeltisinden 2 mL eklenerek çözeltinin pH' sı 6' ya ayarlanmıştır. 50 °C sıcaklıkta 25 dakika bekletilip soğutulduktan sonra suyla doyurulmuş etil asetat 6 mL eklenerek, 5 dakika çalkalanması sağlanmıştır. Santrifüj edilen karışımın üst kısmından 5 mL alınarak azot gazı altında uçurulmuştur. Çeperlerdeki maddeler, iç standart olarak metil antranilat içeren 100 µL metanol ile çözülerek alınmıştır. HPLC sistemine 20 µL enjekte edilmiştir. Bu çalışmada analitik kolon olarak Nucleosil C₁₈ (25cm x 4mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 55 °C olarak ayarlanmıştır. Amoksisilin miktar tayininde floresans dedektör dalga

boyları eksitasyon için 355 nm, emisyon için de 435 nm' dir. Hareketli faz olarak da metanol:su (55:45, h:h) kullanılmıştır²⁵.

Mascher ve arkadaşları, amoksisilinin HPLC yöntemiyle floresans dedektör kullanarak insan plazmada miktar tayinini yapmışlardır. Nucleosil 3C₁₈ (80 x 4 mm) kolon kullanılarak, 0.02 M metansülfonik asit:asetonitril (92.5:7.5, h:h) hareketli fazı ile analiz gerçekleştirilmiştir. Floresans dedektörde emisyon dalga boyu 400 nm, eksitasyon dalga boyu da 255 nm' dir. 1 mL plazmaya 150 µL, %20' lik perklorik asit çözeltisi eklenmiş ve 4 dakika santrifüjlenerek proteinlerinden arındırılmıştır. Alınan üst faz HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Amoksisilinin alınan bu üst fazda stabil kalma süresinin çok kısa olduğu vurgulanmıştır²⁶.

Charles ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma da amoksisilinin plazmada HPLC yöntemiyle UV dedektör kullanılarak miktar tayininin yapılması üzerinedir. 229 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Plazma proteinlerinin perklorik asit ile çöktürülmesinin ardından alınan üst faz pH' sı 4.9 olacak şekilde ayarlanarak C₁₈ kolona 0.45 µm filtre düzeneğinden süzöldükten sonra enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril ve 0.01 M pH' sı 7.4 olan fosfat tamponu (1:25, h:h) kullanılmıştır. İç standart olarak kullanılan sefadroksil 12. dakikada, amoksisilin ise 23. dakikada pik vermişlerdir. Analizde gözlenen interferansların amoksisilinin bilinen iki metabolitine ait olduğu (amoksilloik asit ve amoksisilin (2R)-piperazin-2', 5' dion) belirtilmiştir. Toplam analiz süresi 24 dakikadır. 0.25-16 mg/L konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Enjeksiyona hazır olan numunelerin oda ısısındaki stabilitesinin 24 saat, mutlak geri kazanımının da %82 olduğu belirtilmiştir²⁷.

Yuan ve arkadaşlarının Minnesota Üniversitesi Otitis Media Araştırma merkezinde yaptıkları bir çalışma da amoksisilinin insan plazmasında ve orta kulak sıvısında katı faz ekstraksiyon ile miktar tayini yöntemidir. Çalışma HPLC sisteminde UV dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 210 nm dalga boyunda çalışılması ile optimum sonuç

alınmıştır. C₈ Hypersil kolon (15 cm x 2 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Kolon kompartman sıcaklığı 40 °C' dir. Hareketli faz 5 mM fosfat tamponu ve 5 mM tetrabutylamonyum klorür içerisinde %6' lık asetonitril çözeltisi olup çözeltinin pH'sı 6.5' tir. İç standart olarak sefadroksil kullanılmıştır. 200 µL plazma kullanılarak yapılan çalışmada kantitatif alt limit değeri (LOQ) 0.125 µg/mL' dir. Çalışılan konsantrasyon aralığı 0.125-35 µg/mL' dir. pH' sı 6.8 olan 0.05 M fosfat tamponu ve metanol kullanılarak vakuma tabi tutulmuş, maddelerin metanol:su (40:60, h:h) karışımı ile kartuştan geçirilmesi sağlanmıştır. Azot gazı altında kuruluğa kadar uçurulan ekstrenin, 35 µL %5' lik metanol (su içerisinde) ile çözülmesi sağlanmıştır. Yöntemin hassas, güvenilir ve kolay uygulanabilir olduğu ayrıca türevlendirmeye gerek olmadan ekstraksiyon yapılmasının avantajlı olduğu belirtilmiştir²⁸.

Muth ve arkadaşlarının bir çalışması da amoksisilinin insan plazmasında HPLC yöntemi ile kolon değiştirmeli sistem ile miktar tayininin yapılması üzerinedir. UV dedektör kullanılmış olup 230 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Çalışmadaki ölçümü yapılan en küçük konsantrasyon 50 ng/mL' dir. İç standart olarak sefadroksil kullanılmıştır. İki farklı hareketli fazla kolon değiştirmeli sistem kullanılarak çalışılmış ancak amoksisiline ait pikin 38. dakikada geldiği gözlenmiş bu sebeple de analiz süresi çok uzun tutulmak zorunda kalınmıştır²⁹.

Yuan ve arkadaşları amoksisilinin insan ve çinçilla (sincaba benzer güney amerika hayvanı) plazması, orta kulak sıvısı ve tam kanda HPLC ile analizini yapmışlardır. Üç büyük matriksin karşılaştırmasını, insan ve çinçilla farkını belirlemişlerdir. 0.25-20 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışmışlardır. İç standart olarak sefadroksil kullanmışlardır. Katı faz yöntemiyle ekstarksiyon yapılmış olup UV dedektörde 210 nm' de dedekte edilmiştir. Hypersil C₈ kolon ile hareketli faz olarak da pH' sı 6.5 olan 5 mM fosfat tamponu ve 5 mM tetrabutylamonyum klorür içinde %6' lık asetonitril kullanılmıştır. Çalışılan farklı biyolojik matrikslerin sonuçlarının benzerlik gösterdiği, farklı biyolojik matrikslerle de uygulanabileceği, seftriakson ve

sefotaksim gibi antibiyotikler için de bu ekstraksiyon metodunun çalışılabileceği belirtilmiştir³⁰.

Mascher ve arkadaşları amoksisilinin insan serum ve plazmasında HPLC yöntemiyle miktar tayininin yapılması üzerine çalışmışlardır. Plazma proteinlerinin çöktürülmesi için perklorik asit kullanılmış, daha sonra da sodyum asetat çözeltisiyle nötralize edilmiştir. HPLC sistemine enjeksiyonu yapılan numune C₁₈ kolon kullanılarak floresans dedektörde dedekte edilmiştir. Bu çalışmada amoksisilinin stabilitesi üzerinde durulmuş olup; serum ve plazmadaki amoksisilinin stabilitesi -70 °C' de 50 gün olarak belirtilmiştir. -20 °C' de aynı sonuçların alınmadığı, ayrıca amoksisilin içeren plazma numunelerinin üç kereden fazla eritilmemesi halinde stabil olduğu vurgulanmaktadır³¹.

Sorensen ve arkadaşları sığır ve domuzların kas, karaciğer ve böbrek dokularından amoksisilin, penisilin G, ampisilin, oksasilin, kloksasilin, nafsilin, dikloksasilin olmak üzere yedi farklı penisilin türevinin HPLC yöntemiyle miktar tayinini yapmışlardır. Katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. C₁₈ kolon kullanılarak UV dedektörde 323 nm dalga boyunda analiz gerçekleştirilmiştir. Diklosasilin hariç diğer penisilinlerin dedekte edilebilen alt limitleri (LOD) 8.9-11.1 µg/kg arasındadır³².

Zijtveld ve arkadaşları HPLC yöntemiyle değişmeli kolon sistemi kullanarak insan plazmasında amoksisilinin miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. UV dedektör dalga boyu 234 nm olan çalışmada değişmeli kolon sistemi yarı geçirgen yüzeyli kolon (SPS) ve C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolondan oluşmaktadır. Sistemde SPS guard kolon da kullanılmaktadır. Toplam analiz süresi 15 dakika olup çalışılan konsantrasyon aralığı 0.35-21 µg/mL' dir³³.

Menelaou ve arkadaşları da plazmada amoksisilin ve metranidazol' ün miktar tayini için HPLC sisteminde DAD dedektör kullanmışlardır. Amoksisilin için dalga boyu 230 nm, metranidazol için 313 nm' dir. Çalışılan konsantrasyon aralığı 1-50 mg/L' dir. ODS (150 x 4.6 mm)

kolonla çalışılmıştır. Sonradan gelen piklerden kurtulabilmek için analiz süresi 35 dakika tutulmak zorunda kalınmıştır. Hareketli faz olarak ortofosforik asitle pH 2.1' e ayarlanan sodyum dihidrojenortofosfat tamponu içinde %24 asetonitril ve 0.8 mM sodyum dodesilsülfat çözeltisi kullanılmıştır. 100 µL plazma numunesine 150 µL metanol eklenerek proteinler çöktürülmüştür. 0.1 M pH' sı 2 olan sodyum dihidrojenortofosfat tamponundan 50 µL eklenmiş, vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra 20 dakika boyunca beklenmiş ve santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen numunelerden üst faz alınarak HPLC sistemine 25 µL enjekte edilmiştir³⁴.

Elektroaktif β-laktam antibiyotiklerinin farmasötik dozaj formlarından analizi için bir metot da Aghazadeh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Amoksisilin ve klavulanik asitin farmasötik dozaj formlarından HPLC yöntemiyle analizi amperometrik dedektör kullanılarak çalışılmıştır. Çalışmada inilen en düşük konsantrasyon 0.8 ng/mL' dir. C₁₈ kolon (150 x 4.6 mm) ve hareketli faz olarak pH' sı 3.2-3.4 aralığında olan metanol:fosfat tamponu (5:95, h:h) kullanılmıştır³⁵.

Hoizey ve arkadaşları amoksisilin ve klavulanik asitin insan plazmasından HPLC yöntemiyle UV dedektör kullanılarak miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. UV dedektörün dalga boyu 220 nm' dir. Plazma numunelerinden metanol ile proteinler çöktürülerek ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. C₈ (250 x 4 mm, 5 µm) kolon kullanılarak yapılan çalışmada amoksisilin için çalışılan konsantrasyon aralığı 0.625-20 mg/L, klavulanik asit için ise 0.3125-10 mg/L' dir. Toplam analiz süresi 10 dakikadır. Hareketli faz olarak 0,02 M tetrametilamonyum klorür içeren pH' sı o-fosforik asit ile 2.5' a ayarlanmış 0.01 M potasyum dihidrojenfosfat çözeltisi ve asetonitril kullanılmıştır. Hareketli fazın akışı, analiz süresi boyunca değişen oranlarda gradient sistemli akış ile sağlanmıştır. İnterferans problemi olmadığı, tekrarlanabilir, güvenilir ve başarılı bir yöntem olduğu vurgulanmıştır³⁶.

Wibawa ve arkadaşları amoksisilinin plazmadaki miktar tayinini HPLC yöntemi ile floresans dedektör kullanarak yapmışlardır. Çalışmada

floresans dedektörün eksitasyon dalga boyu 365 nm, emisyon dalga boyu da 445 nm' dir. Analitik kolon olarak Kromasil ODS (3 µm, 15 cm x 3.2 mm) kolon, guard kolon olarak da ODS (20 x 20 mm) kolon kullanılmıştır. Akış hızı 0.4 mL/dak'dır. Kolon sıcaklığı 40 °C olarak ayarlanmış olup hareketli faz olarak da metanol:su (55:45, h:h) kullanılmıştır. Çalışmanın konsantrasyon aralığı 5-200 µg/mL' dir. 50 µL plasmaya 450 µL distile su eklenerek hacmin artırılması sağlanmıştır. İç standart olarak 10 µL 0.2 µg/mL konsantrasyondaki ampisilin çözeltisi eklenmiştir. 5 µL buz soğukluğunda % 50 (a/h) perklorik asit çözeltisi de eklendikten sonra vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üst fazdan alınan 450 µL çözeltinin üzerine 50 µL, 5 M NaOH eklenmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra da 50 µL 5 M HCl eklenerek çözelti nötralize edilmiştir. % 0.1 (a/h) Civa II klorür içeren 0.5 M fosfat tamponundan 250 µL eklenmiştir. Çözelti vortekslendikten sonra 50 °C sıcaklıkta 40 dakika ısıtılmıştır. 5 dakika suda bekletilerek soğutulan numunelere 800 µL etil asetat eklenmiştir. 5 dakika süreyle santrifüj edilen karışımdan 600 µL organik faz alınarak kuruluğa kadar 50 °C sıcaklıkta evaporatörde uçurulmuştur. 100 µL metanol ve 100 µL su eklenerek çeperlerdeki maddeler çözülerek alınmıştır. Çözünmeyen partiküllerden kurtulmak için de 0.45 µm filtre düzeneğinden geçirilip 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. HPLC sistemine 20 µL enjekte edilmiştir³⁷.

Abreu ve arkadaşları sağlıklı 24 gönüllü üzerinde amoksisilinin biyoyararlanım çalışmasını yapmış ve HPLC yöntemiyle analiz etmişlerdir. Çalışılan konsantrasyon aralığı 1-50 µg/L arasındadır. İç standart olarak sefadroksil kullanılmıştır. Plazma proteinlerinin çöktürülmesi için buz içinde bekletilen soğuk metanol kullanılmış, 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Alınan üst fazdan C₁₈ kolona 20 µL enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak pH' sı 4.8 olan 0.01 M fosfat tamponu ve asetonitril (95:5, h:h) kullanılmıştır³⁸.

Matar ve arkadaşları da amoksisilinin plazmada HPLC yöntemiyle analizini yapmışlardır. İç standart olarak sefadroksilin kullandığı çalışmada C₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 µ) kolon seçilmiştir. Hareketli faz olarak

metanol:75 mM potasyum dihidrojenfosfat tamponu (10:90, h:h) pH' ısı fosforik asit ile 3' e ayarlanarak kullanılmış olup akış hızı 1.5 mL/dak' dır. UV dalga boyu 228 nm' dir. 0.5-12 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Bağlı geri kazanımın %99,67; mutlak geri kazanımın ise %86.68 olduğu yöntemin hızlı ve hassas olduğu belirtilmiştir³⁹.

Astigarraga' nın Galena Research Unit' de yaptığı bir çalışma da amoksisilin ve klavulanik asitin insan plazmasında sıvı kromatograf ardışık kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) ile miktar tayininin yapılması üzerinedir. İç standart olarak sefaleksın kullanılmıştır. Ekstraksiyonda plazma proteinlerini çöktürmek için asetonitril ve 0.1 M sitrik asit çözeltisi kullanılmıştır. Alınan üst faza distile su ve diklorometan eklendikten sonra alınan üst faz negatif iyon modu ve MRM (Multiple Reaction Monitoring) modunda LC-MS/MS sistemine 10 µL enjekte edilmiştir. Çalışılan konsantrasyon aralığı 0.05-20 µg/mL' dir. Genesis C₁₈ (150 x 4.6 mm, 4 µm) kolon kullanılmıştır. Oda ısısında çalışılmış olup analiz süresi 5.5 dakikadır⁴⁰.

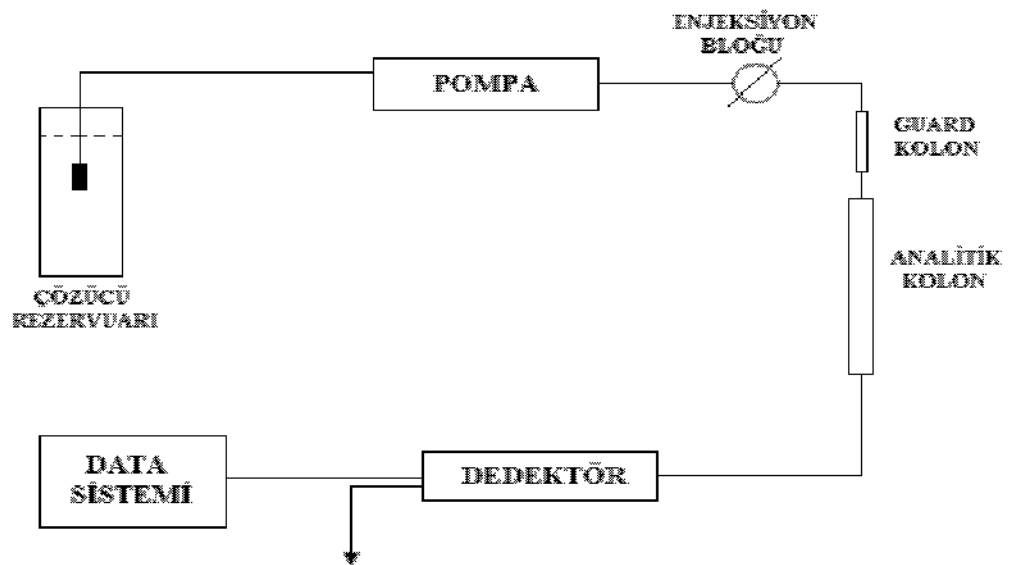
Yapılan bu literatür araştırmalarının ardından insan plazmasında amoksisilinin HPLC yöntemiyle miktar tayini yöntemleri yeniden uyarlanarak denendikten sonra çalışmalarımıza yön verecek şu noktalar farkedilmiştir:

Kantitatif alt limit değerinin, floresans dedektör kullanılarak yapılan çalışmalarda UV dedektör kullanılarak yapılan çalışmalara nazaran daha düşük değerde olduğu gözlenmiştir. UV dedektör kullanılarak yapılan çalışmalarda düzgün ve tekrarlanabilir sonuçlar alınamamıştır. İnterferans problemi oluşmakta ve probleminin çözüldüğü durumlarda ise analiz süresi çok uzun olmaktadır. Katı faz kartuşlarının pahalı olması nedeniyle katı faz ekstraksiyon yöntemi uygun görülmemiştir. Amoksisilinin, türevlendirme yöntemiyle sıvı sıvı ekstraksiyonunun HPLC sisteminde floresans dedektör kullanılarak analizinin yapılması ile kısa analiz süresinde tekrarlanabilir, kesin sonuçlar elde edilebileceği düşünülmüştür.

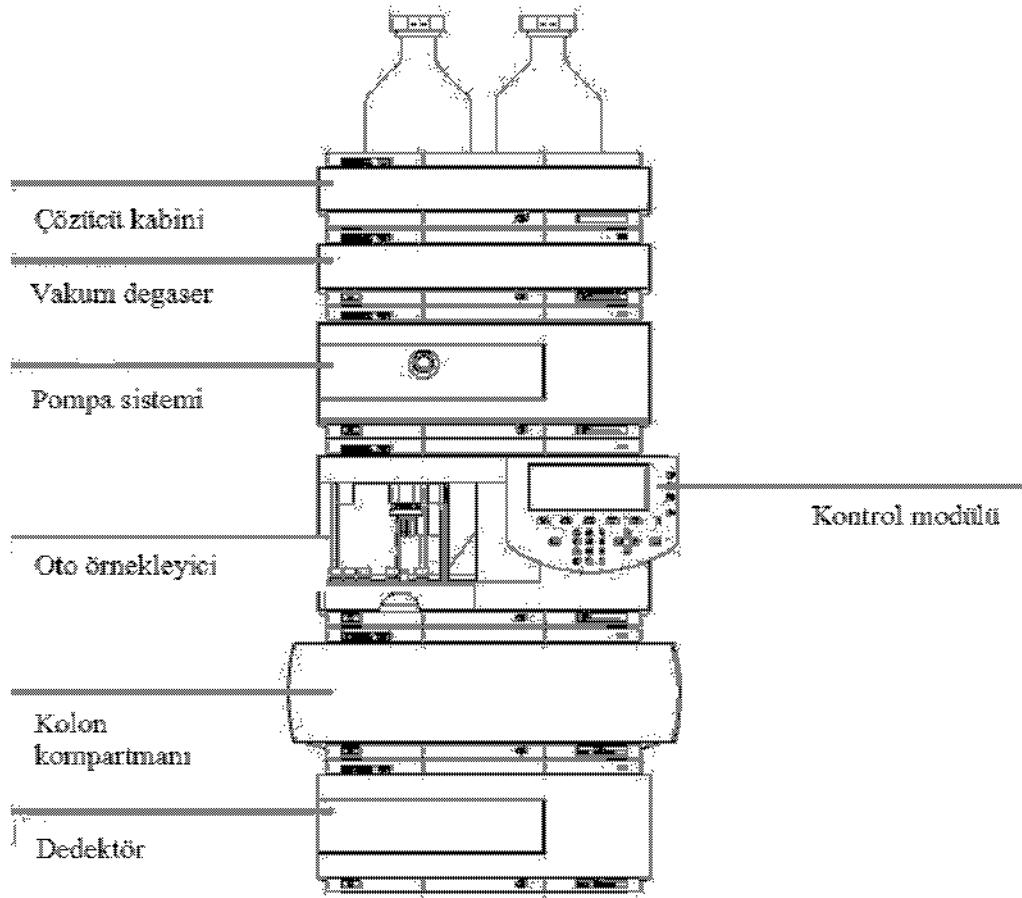
II.4. UYGULANAN YÖNTEMLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

II.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) bileşiklerin sabit faz ile sıvı hareketli faz arasındaki ayrılma tekniğidir. Ayrılma; sabit fazın tipine bağlı olarak dağılma, adsorpsiyon veya iyon-değiştirme işlemi ile meydana gelmektedir. Organik bileşiklerin ve ilaç etkin maddelerinin analizinde HPLC'nin gaz kromatografisi yöntemine göre üstünlükleri vardır. Özellikle ilaç etkin maddelerinin çoğu uçucu özelliğe sahip değildir veya yüksek sıcaklıkta parçalanabilirler. HPLC ile çalışırken oda sıcaklığında çalışmanın mümkün olması ve uçucu türevlerinin hazırlanmasına gerek duyulmaması sebebiyle yöntem üstünlük sağlar. Yöntem, ilaç etkin maddelerinin farmasötik preparatlarda ve vücut sıvılarında miktar tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle etkin madde miktarı az olan preparatlarda hassas sonuç vermesi, analizin kısa sürede tamamlanabilmesi ve analistten kaynaklanabilen hataların düşük düzeyde tutulabilmesi nedeniyle de çok kullanılan ve birçok farmakopede yer alan bir yöntemdir.



Şekil 2: HPLC sisteminin şematik gösterimi



Şekil 3: HPLC cihazının ayrıntılı görünümü

HPLC ile kantitatif analiz üç farklı yöntemle gerçekleştirilebilir⁴¹.

II.4.1.1. Bileşiklerin Numunedeki Yüzde Miktarlarının Tayini

Bu yöntemde, bileşiklerin ayrı ayrı miktarları tayin edilmemekte ancak piklerin alanlarına veya yüksekliklerine göre % oranları bulunabilmektedir. Bir kromatogramda piklerin alanları veya yükseklikleri bulunarak tüm piklerin toplam alanlarına veya yüksekliklerine göre % oranları kolayca hesaplanabilir.

Yöntemde, özellikle her bileşiğe dedektör yanıtının aynı olması gerekmektedir. Bu durum az rastlanan bir olaydır. Ayrıca, her bileşiğin

kromatogramda ayrı bir pik vermesi gerekmektedir. Bileşikler kolanda kalabilir veya dedektör tarafından tespit edilemez. Bu durum bileşiklerin %' lerinin yanlış hesaplanmasına sebep olabilir. Bu sorunlardan ötürü sık kullanılan bir yöntem değildir.

II.4.1.2. Dış Standart Yöntemi

Bu yöntemde tayini yapılacak bileşik veya bileşikleri taşıyan standart hazırlanır. İdeal olarak numune ve standartın aynı miktarlarda hazırlanması istenmektedir. Ancak numunedeki miktar bilinmiyorsa tahmini konsantrasyon hazırlanabilir. Standartın kromatogramında ilgili pikler için ayrı ayrı cevap faktörü (dedektör cevap birimini oluşturan componentin konsantrasyonu) aşağıda verilen denklemle hesaplanır:

$$\text{Cevap Faktörü} = \text{Bileşiğin Konsantrasyonu} / \text{Pik yüksekliği veya alanı}$$

Buradan hareketle bilinmeyen konsantrasyondaki aynı bileşiğin miktarı numune kromatogramından cevap faktörü ile pik yüksekliğinin veya alanının çarpımı ile elde edilir. Farmakopelerde de benzer tip miktar tayini yöntemi yer almakta ve hesaplamalar benzer bir denklemle yapılmaktadır.

$$C_{\text{numune}} = C_{\text{standart}} (A_{\text{numune}} / A_{\text{standart}})$$

Yöntemde, kullanılan konsantrasyonlarda her bileşik için cevap faktörü lincer olmalıdır. Ayrıca her iki çalışmada da aynı miktarlarda enjeksiyon yapılmalıdır. Özellikle ilaç analizlerinde numunenin konsantrasyonu bilindiğinden ve formülasyona uygunluğu araştırıldığından tercih edilmektedir.

II.4.1.3. İç Standart Yöntemi

Bu yöntemde, standart ve numune çözeltilerinin her birisine dikkatle ölçülmüş miktarda bir iç standart eklenir. Analit pik alan veya yükseklik değerinin iç standart pik alanı ve yükseklik değerine oranı analitik parametredir. Yöntemin başarılı olabilmesi için, iç standart piki numunedeki diğer bileşenlerin piklerinden belirgin şekilde ayrılmalı, ancak analite de yakın olmalıdır. Numunenin belirli derişimindeki numune standartı ve iç standarttan oluşan karışımın kromatogramında:

$$\text{Bağıl Cevap Faktörü (r)} = (C / A) / (C_s / A_s)$$

Denklemden;

C: Numune standartının derişimi

A: Numune standartının pik yüksekliği veya alanı

C_s: İç standartın konsantrasyonu

A_s: İç standartın pik yüksekliği veya alanı

Bilinmeyen miktarı taşıyan bileşiğin konsantrasyonunu hesaplamak için ise aşağıda verilen formül kullanılır:

$$C_U = A_U \cdot r (C_s^1 / A_s^1)$$

Denklemden;

C_U: Numunenin konsantrasyonu

A_U: Numunenin pik yüksekliği veya alanı

C_s¹: İç standart konsantrasyonu

A_s¹: İç standardın pik yüksekliği veya alanı

r : Bağıl cevap faktörü

Uygun bir iç standart ile %0.5 ile %1 kadar düşük kesinlik değerleri bulunabilir. Yöntem, dış standart yönteminin tüm avantajlarını taşımaktadır. Ayrıca enjeksiyon hacimlerinden meydana gelebilecek küçük farklılıklar veya dedektör hassasiyetinde oluşabilecek farklılıkların yok edilmesi sebebiyle dış standart yöntemine göre daha hassastır⁴¹.

II.4.2. Analitik Metot Geliştirme ile İlgili Genel Bilgiler

Yöntem performansı esas olarak işlemin kendi kalitesi ile saptanır. Bir yöntemin kalitesinin saptanmasında en önemli iki faktör seçici geri kazanım ve standardizasyondur⁴².

Bir yöntemin analitik geri kazanımı, bir analitik yöntemin bir örnekteki tüm analit için yanıt oluşturup oluşturmadığını ifade eder⁴³. Analitin geri kazanımı, biyolojik matrikse eklenen ve ekstre edilen bir miktar analitin teşhis cevabı ile gerçek konsantrasyondaki saf standarttan elde edilen teşhis cevabının karşılaştırılmasıdır. Geri kazanım çeşitlilik limitleri dahilinde analitik metodun ekstraksiyon etkinliğine bağlıdır⁴⁴. Matriks ve saf çözücünün deney sonuçları bağlı geri kazanımı; gerçek geri kazanım testlerinin sonuçları ise mutlak geri kazanımı gösterir⁴².

Mutlak geri kazanım, işlenmiş matriks standardına verilen yanıt olarak ölçülür ve önceden işlem görmemiş saf standarda yanıtın yüzdesi olarak ifade edilir. Birkaç konsantrasyon noktasında ölçülen eğimin oranı ya da bireysel yüzdelere olarak da ifade edilir. Eğri yönteminin ağırlıklı etkisi nedeniyle bunların eşit bulunmadığı belirtilmelidir.

Eğer bir iç standart kullanılmış ise; iç standardın geri kazanımı bağımsız olarak saptanmalıdır. %50' den düşük olmayan geri kazanım değerleri sayısal kabul sınırları olarak kullanılmıştır. Elbette ki %100'e yakın geri kazanım istenmektedir. Yeterli saptama yapılabildiğinde doğruluk ve kesinliğin saptanması gerekmez⁴².

İç ve dış standardizasyon yöntem geliştirmede diğer önemli noktadır. Dış standardizasyonda kalibrasyon eğrisi oluşturmak için sadece

analit yanıtı ile konsantrasyon ilişkisinin grafiği oluşturulur. İç standardizasyonda ise, standart ve işlem yapılmamış örneklerle eklenen analitin işlevsel ya da izotropik analogu gerekir. Yanıt analit sinyalinin iç standartın sinyaline oranı olarak elde edilir⁴⁵.

İç standart yöntemi, kromatografik işlemler başta olmak üzere biyoanalitik metotlarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu tekniğin kullanımı, analitin ve iç standardın ayrışma özelliklerinin çok benzer olduğu kabulüne dayanır. Ancak bu yanlış bir kabul de olabilir⁴². İç standart tekniğine genellikle klasik alet kullanımında ve el ile numune hazırlanması durumunda başvurulur. Bununla birlikte, modern aletler ve otomasyon son derece tekrarlanabilir yanıt ölçümleri sunabilir. Bu sebeple de analiz sonuçları eklenen iç standart değişkeni nedeniyle iç standart kullanımından olumsuz etkilenebilir. Bu durum deneysel olarak hata çoğalma yasası ile gösterilmiştir⁴⁵. İç standart tekniği kaçınılmaz olarak gelişmek zorundadır. Aksi takdirde bir analitik yöntemin kesinliğini olumsuz yönde etkileyecektir⁴².

Bir analitik metotun geliştirilmesinde atılan ilk adım, aynı veya benzer ekipmanı kullanan var olan metot veya literatür araştırması yapmaktır. Var olan veya literatüre dayalı yaklaşım ile karşılaştırılmayan veya ilişkili olmayan HPLC temelli bir metodun geliştirilmesi seyrekler. Yeni veya ileri bir metodun geliştirilmesinde genellikle var olan yaklaşım; ekipmana, çalışılacak analite, hedeflere ve metodun gerekliliklerine göre uyarlanır. Metot gerekliliklerinin seçilmesi ve ne tür ekipmanın ve neden seçileceğine karar verilmesi metot geliştirmedeki ana ilkelerdir. Bunun yanında kolon, hareketli faz, dedektör ve miktar tayini yöntemi de karar verilmesi gereken olgulardır⁴⁷.

Var olan metotlardan, literatürlere dayalı yaklaşımlardan her zaman beklenen sonuçlar alınamayabilir. Var olan metotlar hatalı olabilir veya da güvenilirliği düşük olabilir. Pahalı, uzun zaman ve enerji isteyen veya rutin kullanıma uygun olmayan metotlar olabildiği gibi söz konusu örneklerde yeterli duyarlılık veya analit seçiciliği göstermeyebilir. Analitik verilerin doğruluğunun ve kesinliğinin yeni ekipman ve tekniklerin ortaya çıkması ile artırılabilir düşüldüğünde kısacası daha duyarlı, hassas, kesin,

tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu, ekonomik ve kısa süren, uygulanabilirliği kolay ve sorunsuz yeni metot geliştirme arayışı her zaman var olacaktır.

Gerekli ekipmanlar hazırlandıktan ve analitik parametreler düşünüldükten sonra metodun geliştirilmesinde optimizasyonun sağlanabilmesi için standartlar kullanılmalıdır. Duyarlılık dâhil olmak üzere ilk analitik sonuçlar araştırılmalı ve enjekte edilen miktara karşılık alınan cevaplar ölçülmelidir. Bunlar teşhis sınırı, tayin sınırı, kalibrasyon noktalarının doğrusallığı, varsa çoklu dedektör oranlarıdır. Metot geliştirmenin yalnızca iyi saptanmış, özellikleri tanımlanmış ve saflığı bilinen analitik standartlar kullanılarak yapılması önemlidir⁴⁷.

II.4.2.1. Optimizasyon

Optimizasyon evresinde metot geliştirmenin ilk döneminde elde edilen koşullar geliştirilir ve rezolüsyon, pik şekli, plak sayısı, asimetri, kapasite, arınma zamanı, teşhis sınırı, tayin sınırı ve analiti bütün olarak saptama yeteneği açısından geliştirilir. Bir metodun optimizasyonunda metot geliştirmenin ilk evrelerindeki gereklilikleri karşılamak için teşhis sınırı, tayin sınırı, doğruluk, kesinlik ve özgünlük saptanmalıdır.

İlk analitik sonuçları elde edip sonrasını düşünmek önemlidir. Yeni metodun üstünlüklerinin olduğu gözlenirse, geliştirilmesi ek zaman ve çaba isteyecektir. Eğer üstünlük görülmez ise tüm yaklaşımı gerektirdiği ek zaman ve çaba açısından tekrar değerlendirmek gerekecektir.

Yeni metoda ait başlangıçtaki analitik veriler uygun görülüyorsa metot performansının nicel olarak değerlendirilmesi çok önemlidir. Başlangıçta metot geliştirme ve optimizasyon çalışmalarının çoğu analitik standartlarla yapılır. Genellikle metodu değerlendirmek için kullanılan ilk analitik sonuçlar da standart kullanılarak elde edilir. Metot optimizasyonu duyarlılığı ve simetriyi en yüksek noktaya çıkarmalı, teşhis sınırı ve tayin sınırlarını düşürmeli, geniş bir doğrusal dinamik aralık oluşturmalı ve doğruluk ve kesinlik derecelerini yükseltmelidir. Optimizasyonu diğer potansiyel hedefleri

analitin diğer bileşiklerden başlangıçtaki rezolüsyonu, pik yerinin belirlenmesi, saflığın gösterilmesi, rutin örnek analizleri için bilgisayar verilerinin ara yüzünün hazırlanmasıdır. Optimizasyon kriterleri analizin zamanı ve maliyetinin düşürülmesi ve analitin doğru biçimde belirlenmesi gibi herhangi bir metot için gereken hedeflere dayanarak saptanmalıdır.

Metot optimizasyonu iki genel yaklaşımla yapılabilir. Bunlardan ilki el ile diğeri ise bilgisayarla yapılmasıdır. El ile yapılan optimizasyonda diğer değişkenler sabit tutulurken bir zamanda tek bir değişken kullanılır ve yanıtta ki değişim kaydedilir. Değişkenler hareketli ya da sabit faz bileşimi, akış hızı, sıcaklık, dalga boyu ve pH olabilir. Bu tek değişkenli sistem optimizasyonu yavaş, zaman alıcı ve pahalıdır. Bununla birlikte, kullanılan ilke, kuram ve değişkenler arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. İkinci yaklaşım, bilgisayarlı metot geliştirmede deneysel girdi en aza indirilirken etkinlik en üst düzeydedir. Bu yaklaşım birçok uygulamada kullanılabilir. Ek olarak, tüm araçlı metot geliştirmelerde zaman, enerji ve maliyeti önemli derecede düşürebilir.

İlk analiz sonuçlarını elde etmek için, metot seçicilik, doğruluk, kesinlik, teşhis ve tayin sınırları, doğrusalılık ve aralık açısından optimal düzeye getirilmelidir. Karşılanması gereken başka optimizasyon parametreleri de (dayanıklılık gibi) vardır fakat ölçüm ve değerlendirilmeleri metot validasyonunda daha iyi yapılabilir.

Sistem optimizasyonu, metot geliştirme işlemi içinde en fazla zaman ve enerji isteyen bölümdür. Tekrarlayıcı işlemler, sabit tekrarlar ve çok sayıda nicel veri toplanmasını gerektirir. Sıklıkla optimizasyon sonuçları o dönemdeki gereklilikleri karşılar fakat gelecekte ortaya çıkabilecek gereklilikleri ihmal eder. İdeal olarak analist metodu geniş bir ölçekte kullanabilmek ve gelecekte metot geliştirmek için deneyleri tekrarlamak zorunda kalmamak için, her yeni metodun optimizasyonu tüm uygulamaları düşünerek yapılmalıdır⁴⁷.

II.4.3. Analitik Metot Validasyonu İle İlgili Genel Bilgiler

II.4.3.1. Tanımlar

FDA Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001)' de analitik metot validasyonunda kullanılan terimler için aşağıdaki tanımlar yapılmıştır⁴⁴.

Analit: Biyolojik matrikste ölçülen; bozulmadan kalan ilaç, biyomolekül veya bunun türevleri, metabolit ve/veya degradasyon ürünleri gibi spesifik kimyasal yapı.

Analiz Scrisi: Analitik ve çalışma örneklerinin validasyonu için gereken yeterli sayıda standart ve kalite kontrol örneğinin tamamı. Seriler bir günde veya birkaç günde tamamlanabilir.

Biyolojik Matriks: Biyolojik kökenli, örneklenebilir ve verimli biçimde işleme tabi tutulabilen bir materyaldir. Kan, idrar, serum, plazma, feçes, salya ve çeşitli dokular buna örnektir.

Doğrusallık: Tanımlanan koşullarda tespit edilen değerin, nominal veya bilinen gerçek değerlere yakınlık derecesidir.

Geri Kazanım: Numune ekstraksiyonu ve metot proses basamakları ile bulunan, bilinen analit miktarının yüzdesi şeklinde ifade edilen, analitik prosesin ekstraksiyon etkinliği.

İç Standart: Analitin tespitini kolaylaştırmak için kalibrasyon standartı ve numunelere eklenen test bileşikleri (örn: yapısı benzer analoglar, işaretli stabil bileşikler).

Kalibrasyon Standardı: Bilinen miktarda analitin eklendiği biyolojik matrikstir. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılırlar ve kalite kontrol numunelerinin ve bilinmeyen çalışma numunelerinin analitik konsantrasyonu tespit edilir.

Kalibrasyon Eğrisi: Deneysel cevap değeri ve analitik konsantrasyon arasındaki ilişki.

Kalite Kontrol Numunesi: Biyoanalitik metodun performansını değerlendirmek ve farklı serilerde analiz edilen bilinmeyen numunelerin doğruluk ve validasyon sonuçlarını belirlemek için kullanılan numune.

Kesinlik: Aynı homojen numunenin tanımlanan koşullarda çoklu örneklem sonucu elde edilen bir seri ölçümünün yakınlık derecesidir.

Kör: Biyolojik matriksin analitler eklenmemiş numunesidir, biyoanalitik metodun özgünlüğünü belirlemek için kullanılır.

Matriks Etkisi: Analizi yapılması hedeflenen analit dışında bir analitin varlığına veya numunedeki diğer girişim maddelerinin varlığına yanıt olarak doğrudan veya dolaylı değişim, girişim.

Metot: Numune analizinde kullanılan tüm prosedürlerin detaylı anlatımı.

Numune: Kontroller, körler, bilinmeyenler ve işlem görmüş maddeleri temsil eden jenerik bir terimdir.

Kantitatif Alt Limit (LOQ): Uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktarıdır.

Seçicilik: Başka bileşenlerin de olduğu ortamda biyoanalitik metodun, analiti ölçme ve ayırt etme özelliği. Bunlar metabolitler, impüriteler, degradanlar veya matriks bileşenleridir.

Stabilite: Belirlenen zaman aralığında, spesifik koşullar altında, analitin matriksteki kimyasal kararlılığı, stabilitesi.

Sistem Uygunluğu: Analize başlamadan önce referans standartın analiziyle enstrümental performansın (örn: hassaslık, kromatografik alıkonma) tespiti.

Tespit Aralığı: Konsantrasyon-cevap ilişkisi kullanılarak doğruluk ve kesinlik parametrelerine uygun güvenli ve verimli şekilde tespit edilen konsantrasyon aralığı.

Tespit Limiti (LOD): Biyoanalitik prosedürün analiti arka plandan tamamen ayırabildiği en düşük konsantrasyon.

Verimlilik: İki laboratuvar arası kesinlik. Ayrıca kısa bir periyotta aynı koşullar altında metodun kesinliğini temsil eder.

Validasyon:

Tam Validasyon: Numune analizinde uygulanmak üzere her analitin biyoanalitik metod için tüm validasyon parametrelerini oluşturmak.

Kısmi Validasyon: Biyoanalitik metod validasyonunda değişiklikler yapmak.

Çapraz Validasyon: Biyoanalitik iki metodun validasyon parametrelerinin karşılaştırılması.

II.4.3.2. Analitik Metod Validasyonu

Bir biyoanalitik metodun validasyonunun yapılmasındaki sebep, metodun performans ve güvenilirliğini göstermektir. Eğer biyoanalitik metodların sonuçları yeni ilaç başvurusunda veya formülasyon yenilemede kullanılacak ise mutlaka validasyon yapılmalıdır. Biyoanalitik metod validasyonu, bir analitin ya da analit serisinin konsantrasyonunun özel bir biyolojik matrikste nicel olarak saptanması için kullanılan metodun bu amaç için güvenilir olduğunun gösterilmesi için gerekli işlemlerin tümünü içerir. Geleneksel kromatografik yöntemler (GC ve HPLC), kütle spektrometresi (doğrudan MS, MS/MS) ve birleşik teknikler (GS-MS, LC-MS), sıvı kromatograf ardışık kütle spektrometresi yöntemi (LC-MS/MS) ve bağlanma temelli tayinler (RIA ve ELISA) gibi farklı analitik metodların tümü için; ilkelerin, işlemlerin ve gerekliliklerin çoğu ortaktır^{42,48}.

Analitik yöntem geliştirilirken; analitin sentez yöntemi, saflaştırma yöntemi, çeşitli pH değerlerindeki davranışı, ekstraksiyon çözeltileri ile geçimsizliği, stabilitesi, fonksiyonel grupların reaksiyonları, çözünürlüğü, molekül ağırlığı ve yapısı, spektrumu, benzer yapıda ve özelliklerdeki diğer maddeler, impüritesi, parçalanma ürünleri, metabolitleri, depolama şartları gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerinin, farmakokinetiğinin iyi bilinmesi gerekir.

Bir ilaç geliştirme sürecinde tanımlanmış biyoanalitik metodun birçok değişime uğrayacağı kabul edilir. Bu değişimler (örn: bir metabolitin eklenmesi, LOQ düşürülmesi gibi) özel çalışmaları desteklemek için gerekir ve tayin performansının sürekli validasyonunun gösterilmesi için farklı düzeylerde validasyon gerektirir. Tayin değişikliklerine ek olarak, örnek sayısının birden fazla laboratuvar gerektirecek kadar büyümesi gibi, tanımlanmış bir tayinin kullanımı da değişecektir. Bu durum farklı laboratuvarlarda tayin karşılaştırılmasını ve farklı laboratuvarların kalifikasyonu için hangi tip validasyon verilerinin gerekli olduğu sorusunu gündeme getirir. Ayrıca bir metod, validasyonun sürmesini sağlayacak düzenli bir temelde uygulanmadığında örnek analizi öncesinde yöntemin geçerliliğini koruduğunun belgelenmesi gerekecektir. Tam, kısmi ve çapraz validasyon tanımlamaları aşağıda ayrıntılı olarak yapılmıştır⁴².

II.4.3.2.1. Tam Validasyon

- Tam validasyon, ilk olarak bir biyoanalitik metod geliştirilmesi ve uygulanmasında gereklidir.
- Var olan nicelik tayinine metabolit eklenirse, ölçülen tüm analitler için gözden geçirilen tayinin tam validasyonu gereklidir.

II.4.3.2.2. Kısmi Validasyon

Kısmi validasyon, tam validasyon gerektirmeyen validasyonu yapılmış biyoanalitik metodların değiştirilmesidir. Tayin için doğruluk ve kesinlik saptanması kadar küçük bir validasyondan “neredeyse” tam validasyona dek bir aralığı kapsar. Bu kategoriye giren tipik biyoanalitik metod değişiklikleri aşağıda olup bu liste ile de sınırlı değildir:

- Biyoanalitik metodun valide edildiği laboratuvar ya da analistin değişmesi.

- Alet ve/veya yazılım ortamı değişikliği.
- Matriks içindeki türün değişmesi (örn. sıçan plazmasından fare plazmasına).
- Tür içindeki matriksin değişmesi (örn. insan plazmasından insan idrarına).
- Özgün metabolitlerin varlığında bir analitin seçiciliğinin gösterilmesi.
- Eşzamanlı ilaçlar varlığında bir analitin seçiciliğinin gösterilmesi.
- Analitik yöntem değişiklikleri (örn. belirleme sistemi değişiklikleri).
- Örnek işleme değişiklikleri.
- Nadir kullanılan matriksler.
- Biyolojik sıvı alınmasındaki antikoagülan değişiklikleri.
- Sınırlı hacim değişiklikleri (örn. pediatrik çalışma planlanması).

II.4.3.2.3. Çapraz Validasyon

Çapraz validasyon, iki biyoanalitik metodun karşılaştırılmasıdır. Aynı çalışmada iki veya daha fazla biyoanalitik metod kullanılacağı zaman gerekir. Örneğin validasyonu yapılmış orijinal metod “referans” metod olur ve gözden geçirilecek metod ile karşılaştırılır. Her iki yönde de karşılaştırma yapılır. Matriks ve örneklerle yapılan çapraz validasyon:

- Tek bir çalışmadaki örnek analizi birden fazla laboratuvarda çalışılacak ise, laboratuvarlar arası güvenilirlik için her laboratuvarda yapılmalıdır.
- Farklı çalışmalarda farklı analitik teknikler (örneğin LC-MS-MS’a karşı ELISA) kullanılarak veri üretildiğinde yapılmalıdır¹¹.

Spesifik analitik metot validasyonu gelişimi süreci 3 gruba ayrılabilir;

- 1) Referans standart hazırlanması
- 2) Analitik metot gelişimi ve yürütülmesi için ön-çalışma validasyonu
- 3) Çalışma performansı, ilaç analizi ve kabul kriterlerini kapsayan çalışma-içi validasyon⁴⁹.

II.4.3.3. Metot Validasyonunun Değerlendirilmesinde Kullanılan Parametreler

Metot validasyonu analitik metot gelişimi ve dökümantasyonunu içerir. Biyolojik matriste ölçülecek her analit için validasyon yapılmalıdır. Ek olarak analitlerin stabilitesi katım yapılmış numuneler üzerinden saptanmalıdır⁴⁶. Validasyon için istenen parametreler ve hangi kurumlar tarafından hangi parametrelerin istendiği aşağıdaki tabloda verilmiştir^{44,50}.

Tablo 3: Validasyon için istenen parametreler

Özgünlük(Specificity)/Seçicilik (Selectivity)	FDA, USP, ICH
Doğruluk (Accuracy)	FDA, USP, ICH
Kesinlik (Precision): Tekrarlanabilirlik (Repeatability) Ara kesinlik (Intermediate precision) Yenilenebilirlik (Reproducibility)	FDA, USP, ICH ICH ICH ICH*
Tespit limiti (LOD)	USP, ICH
Kantitatif alt limiti (LOQ)	FDA, USP, ICH
Doğrusallık (Linearity)	FDA, USP, ICH
Arahk (Range)	USP, ICH
Tutarlılık (Ruggedness)	USP
Sağlamlık (Robustness)	FDA, USP, ICH*
Stabilite (Stability)	FDA
Gerikazanım (Recovery)	FDA

(*): Mutlak gereklilik değildir.

FDA: Food and Drug Administration

ICH: International Conference on Harmonisation

USP: Amerikan Farmakopesi

II.4.3.3.1.Özgünlük

Tüm potansiyel örnek bileşenlerinin mevcudiyetinde (plasebo, sentez ve degradasyon ürünleri, proses impüriteleri v.s.) analit cevabını doğru olarak ölçebilme kapasitesidir. Özgünlüğün radyoimmunoassay ile belgelendirilmesi, özellikle bir ilacın metabolizması yeterince tanımlanmamışsa, zor olabilir⁴⁶.

II.4.3.3.2. Seçicilik

Analitik metodun, numunede başka bileşenlerin varlığında analitin ayrımı ve tespitini sağlayabilme ve doğrudan tek analit için cevap verebilme kabiliyetine seçicilik denir. Seçicilik için, uygun biyolojik matriksin (plazma, idrar veya diğer matriksler) kör çözeltilerinin analizinin en az 6 farklı kaynaktan kontrollü koşullarda eldesi gerekir. Her kör çözeltisi önerilen ekstraksiyon prosedürü ve kromatografik veya spektroskopik şartlar ile girişim açısından test edilmelidir. Sonuçlar kantitatif alt limit değeri ile karşılaştırılmalıdır.

Bir biyolojik matrikste potansiyel girişim maddeleri; endojen matriks bileşenleri, metabolitler, ayrışma ürünleri ve gerçek çalışmada ilaçların birlikte uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Eğer bir metot birden fazla analiti tespit etmek üzere belirlendiyse, her bir analitin birbirinden etkilenen interferans problemi olmadığı gösterilmelidir⁴⁴.

II.4.3.3.3. Doğruluk

Bir analitik metodun doğruluğu metot ile elde edilen ortalama test sonuçlarının analitin gerçek değerine (konsantrasyon) yakınlığı ile tanımlanır. Doğruluk, bilinen konsantrasyonda analit içeren numunenin tekrarlanan analizleri ile tespit edilir. Doğruluk her konsantrasyon için en az beş ölçüm ile belirlenir. Belirlenen aralıkta en az üç konsantrasyon gerekir. Ortalama değer gerçek değer $\pm$ %15 sınırı içinde olmalıdır. Ölçülebilen en düşük limit için %20' den fazla sapma göstermemelidir. Ortalama değer gerçek değerden sapma oranı doğruluk ölçütüdür⁴⁴.

II.4.3.3.4. Kesinlik

Kesinlik, prosedürün tek homojen hacimli biyolojik matrikste çoklu tekrarlanan uygulamalarında analitin ayrı ölçümlerinin yakınlığını

tanımlar. Her konsantrasyon için en az beş ölçüm ile belirlenir. Belirlenen aralıkta en az üç konsantrasyon gerekir. Her konsantrasyon düzeyinde saptanan kesinlik varyasyon katsayısının %15' ini, ölçülebilen en düşük limit için % 20' sini geçmemelidir. Kesinlik; tek analiz işleyişi sırasında kesinlik tespitinde gün içi, seriler arası kesinlik ve verimlilik, kesinliğin zamanla belirlenmesi durumunda günler arası, seriler arası kesinlik ve verimlilik gibi alt gruplara ayrılır ve değişik analistler, ekipmanlar, reajanlar ve laboratuvarlar içerebilir⁴⁴.

II.4.3.3.5. Geri Kazanım

Analitin geri kazanımı, biyolojik matrikse eklenen ve ekstre edilen bir miktar analitin teşhis cevabı ile gerçek konsantrasyondaki saf standarttan elde edilen teşhis cevabının karşılaştırılmasıdır. Geri kazanım çeşitlilik limitleri dahilinde analitik metodun ekstraksiyon etkinliğine bağlıdır. Analitin geri kazanımı %100 olması istenmekle birlikte, analitin ve iç standartın geri kazanım miktar %50-60 ise geri kazanım kesin, doğru ve verimli olmalıdır. Geri kazanım deneyleri 3 farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek) analitik cevapların, %100 geri kazanımı temsil eden ekstre edilmemiş standartlar ile karşılaştırılması şeklinde yapılandırılabilir⁴⁴.

II.4.3.3.6. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

Kalibrasyon (standart) eğrisi aletsel cevap ile analitin bilinen konsantrasyonu arasındaki ilişkidir. Kalibrasyon eğrisi numunedeki her analit için oluşturulmalıdır. Konsantrasyon-cevap ilişkisini tam olarak tanımlamak için yeterli sayıda standart kullanılmalıdır. Kalibrasyon eğrisi belirlenen çalışmada matriksi analitin bilinen konsantrasyonu ile katım yapılmış numuneler ile aynı biyolojik matrikste hazırlanmalıdır. Bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılan standartların sayısı analitik değerlerin beklenen aralığın ve analit/cevap ilişkisinin yapısının bir fonksiyonudur. Standartların konsantrasyonları belirli bir çalışmada konsantrasyon aralığı baz alınarak

seçilmelidir. Kalibrasyon eğrisi kör numune (iç standart içermeyen matriks numunesi), zero olarak adlandırılan iç standart içeren matriks numunesi ve beklenen aralıkta kantitatif alt limiti (LOQ) de içeren en az beş adet sıfır dışında değerden oluşmalıdır. Kör ve iç standart içeren matriks numunesi kalibrasyon fonksiyonunda kullanılmaz, sadece girişimi değerlendirmek için kullanılır⁴⁴.

Doğrusallık; yöntemin verilen aralıkta analit konsantrasyonlarının doğrusal olduğu test sonuçlarına yol açma yeteneğidir. Gencl olarak regresyon eğrisinin eğiminin varyasyonu olarak gösterilir. Çalışma aralığı; doğruluk, kesinlik ve doğrusallık ile saptandığı gösterilmiş en yüksek ve en alt düzeydeki analit konsantrasyonları arasında kalan parçadır ve normalde test sonuçları ile aynı birimlerde ifade edilir⁴⁶.

II.4.3.3.6.1. Tespit Limiti (LOD)

Zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilen fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit konsantrasyonudur. Kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olarak sinyal/gürültü oranından faydalanılır. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu değer LOD değeridir. Ancak aletlere, lambaya, matrikse (idrar, plasma v.s.) göre değişir. ICH' in de tanıdığı kurala göre kromatografik olmayan miktar tayini yöntemlerinde (örneğin titrasyon) alınan cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 3.3 katı LOD değeridir⁴⁶.

II.4.3.3.6.2. Kantitatif Alt Limit (LOQ)

Uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktarı LOQ değeri olarak tanımlanır. LOQ değerini belirlemek için teşhis limiti (LOD) değerinde de olduğu gibi sinyal/gürültü oranından faydalanılır. Pratik bir kural olarak sinyal/gürültü oranı kullanılıyor ise de LOQ konsantrasyonunun doğruluk ve

kesinlik sınırlarıyla uzlaşma içinde olması gerektiği unutulmamalıdır. Şöyle ki; LOQ konsantrasyon değeri düşerse kesinlik de düşecektir. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu değer LOQ değeridir. ICH' in de tanıdığı kurala göre kromatografik olmayan miktar tayini yöntemlerinde alınan cevabın standart sapmasının (SD), kalibrasyon eğrisinin eğimine (S) oranının 10 katı LOQ değeridir⁴⁶.

Kalibrasyon eğrisi üzerindeki en düşük standart aşağıdaki koşullara uygunsa kantitatif alt limit olarak kabul edilebilir.

- Kantitatif alt limit olan analitin cevap faktörü eğer körde bir girişim oluyorsa bu girişim en az 5 katı büyüklüğünde olmalıdır.
- Analit cevabı tanımlanabilir, ayrı, tekrarlanabilir, %20 kesinlik ve %80-120 doğruluk limitleri ile uygun olmalıdır⁴⁴.

II.4.3.3.6.3. Kalibrasyon Eğrisi ile Konsantrasyon-Cevap İlişkisi

Konsantrasyon-cevap ilişkisini en iyi tanımlayabilen model seçilmelidir. Ağırlıklı seçimi ve karmaşık regresyon çeşitliği kullanımı gerçekleştirilmelidir. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken aşağıdaki koşullar göz önünde bulundurulmalıdır.

- LOQ' nun nominal konsantrasyondan en fazla %20 sapması,
- LOQ dışında standartların nominal konsantrasyondan en fazla %15 sapması.

Kalibrasyon eğrisi beklenen aralık içinde, sıfır hariç, kantitatif alt limiti (LOQ) de içermek koşulu ile en az 5 noktalı olmalıdır. Kalibrasyon standartları aynı matrikse, bilinen konsantrasyonda referans standart ve internal standart eklenmesi ile hazırlanır⁴⁴.

II.4.3.3.7. Stabilite

İlacın biyolojik bir sıvıdaki stabilitesi ilacın kimyasal özelliklerinin, saklama koşullarının, matriksin ve ambalaj sisteminin bir fonksiyonudur. Bir analitin belirli bir matrikste ve ambalaj sisteminde stabilitesi sadece o ambalaj sistemi ve o matriks için geçerlidir; diğer matriksler ve ambalaj sistemleri için tahmin yürütülemez. Stabilite prosedürleri numune toplama ve ambalajlama, uzun süreli (belirlenen saklama sıcaklığında dondurulan) ve kısa süreli (banko, oda sıcaklığında) saklanması ve sonrasında dondurma-çözme döngüsü ve analitik proses süresince analitin stabilitesini ölçer. Prosedür ayrıca analitin stok çözeltideki stabilitesinin değerlendirilmesini de içermektedir.

Tüm stabilite çalışmalarında taze stok çözeltisinden, analit içermeyen, girişim yapmayan uygun biyolojik matriks kullanılarak hazırlanan bir takım standart numune kullanılır. Stabilite değerlendirmesinde kullanılan analitin stok çözeltisi uygun çözücüde bilinen konsantrasyona hazırlanmalıdır⁴⁴.

II.4.3.3.7.1. Dondurma, Çözme Stabilitesi

Analit stabilitesi 3 dondurma-çözme döngüsü sonunda tespit edilmelidir. En az üçer düşük ve yüksek konsantrasyonda analit -20°C ' de veya belirlenen saklama sıcaklığında 24 saat boyunca tutulmalıdır ve oda sıcaklığında müdahalesiz çözülmalıdır. Örnekler tamamen çözündüğünde tekrar aynı koşullarda 12-24 saat süresince dondurulmalıdır. Dondurma çözme döngüsü 2 kez daha tekrarlanmalıdır, üçüncü günde analiz edilmelidir. Eğer analit -20°C ' de stabil değilse, stabilite numunesi 3 dondurma-çözme süresince -70°C ' de dondurulmalıdır⁴⁴.

II.4.3.3.7.2. Hızlandırılmış Stabilité

Düşük ve yüksek konsantrasyonlu üçer analit oda sıcaklığında çözüldükten sonra bu sıcaklıkta 4-24 saat tutulmalıdır (Çalışmada oda sıcaklığında bekletilen tahmini süreye bağlı olarak) ve analiz edilmelidir⁴⁴.

II.4.3.3.7.3. Uzun Süreli Stabilité

Uzun süreli stabilité değerlendirilmesi, ilk numune alınması ile son numunenin analizi arasında geçen saklama süresini aşmalıdır. Uzun süreli stabilité en az üçer düşük ve yüksek konsantrasyonlu analitin çalışma örnekleri ile aynı koşullar altında saklanması ile saptanmalıdır. Örneklerin hacmi üç ayrı analize yetecek miktarda olmalıdır. Tüm stabilité örneklerinin konsantrasyonları uzun süreli stabilité denemenin ilk gününden itibaren uygun konsantrasyondaki standartların geri-hesaplanmış değerlerinin ortalamaları ile karşılaştırılmalıdır⁴⁴.

II.4.3.3.7.4. Stok Çözelti Stabilitesi

İlaç ve iç standartların stok çözeltilerinin stabilitesi oda sıcaklığında en az altı saat takip edilmelidir. Eğer stok çözeltileri belirli bir süre buzdolabında bekletilip veya da dondurulursa bu süre kaydedilmelidir. İstenen saklama süresinin tamamlanmasının ardından, taze hazırlanmış çözeltinin aletsel cevabı ile karşılaştırarak stabilité test edilmelidir⁴⁴.

II.4.3.3.7.5. Hazırlama Sonrası Stabilité (Oto Örnekleyici Stabilitesi)

İşlenmiş örneklerin oto örnekleyicideki stabilitesi için oto örnekleyicide geçirdiği süre de göz önüne alınarak tanımlanmalıdır. İlaç ve iç standartın stabilitesi, validasyon numunelerinde beklenen çalışma süresince aynı koşullar altında orjinal kalibrasyon standartındaki konsantrasyonlar baz

alınarak değerlendirilmelidir. Her ne kadar geleneksel yaklaşıma göre, saklanan numuneler ile bunlara ait taze hazırlanmış numunelerin analitik sonuçlarının karşılaştırılması anlatılsa da analitin biyolojik matriks içindeki stabilite ölçüm sonuçlarının güven aralıklarına dayanan diğer istatistiki yaklaşımlar kullanılabilir⁴⁴.

II.4.3.3.8. Tutarlılık

USP' ye göre tutarlılık değişken koşullar altında elde edilen sonuçların % bağıl standart sapmalarının yenilenebilirlik derecesidir. Bu koşullar analist, alet, reaktif ve deney periyotlarıdır.

II.4.3.3.9. Sağlamlık

Sağlamlık değerlendirilmesi, daha çok metot geliştirme safhasında göz önünde bulundurulur ve çalışmada kullanılan prosedüre bağlıdır. Bu durum metot parametrelerindeki bilinen varyasyonlara göre analizin güvenilirliğini gösterir.

Analitik koşullardaki ölçümler varyasyonlara duyarlı ise, analitik koşullar uygun şekilde kontrol edilmeli veya prosedürde önlemler yer almalıdır. Sağlamlığın değerlendirilmesinin tek amacı sistem uygunluk parametrelerinin incelenerek analitik yöntem her uygulandığında valide olduğunun kanıtlanmasıdır. Tipik varyasyon örnekleri analitik çözeltilerin stabilitesi ve ekstraksiyon süresidir. Sıvı kromatografide tipik varyasyon örnekleri ise mobil faz bileşimi, pH etkisi, farklı kolonlar, ısı ve akış hızıdır⁵⁰.

III. MATERİYAL VE YÖNTEM

III.1. KULLANILAN CİHAZLAR ve EKİPMANLAR

III.1.1. Enstrumental Kısım

Kısımları aşağıda belirtilen Agilent HP 1100 Serisi HPLC kullanıldı:

1. G 1379A Degasser modul
2. G 1311A Pompa sistemi
3. G 1313A ALS Otomatik Örnekleyici
4. G 1321A FLD Dedektör
5. G 1316A Termostatlı Kolon Kompartmanı
6. Software HP Chemstation

III.1.2. Kolon

Analitik Kolon: Waters Spherisorb ODS2; 250 x 4.6 mm, 5µm

Guard Kolon: Waters Sentry Symmetry C18 3.9 x 20 mm, 5 µm

III.1.3. Diğer Ekipmanlar

1. Mikro Pipet: Eppendorf AG (100, 200, 1000, 5000 µL)
2. Hassas Terazî: Mettler Toledo AG204
3. Vorteks: Vorteks Genie 2
4. Santrifüj: Sigma 3-16K
5. pH Metre: Mettler Toledo MP220
6. Ultrasonik Banyo: Sonorex RK 255H
7. Manyetik Karıştırıcı: CAT M26
8. Derin Dondurucu: Uğur derin dondurucu UDD 400 BK
9. Vialler ve Microvialler: Agilent
10. 15 mL polipropilen santrifüj tüpleri: LP Italiana
11. Cam malzemeler (balon joje, mezür, amber)

III.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

Analizde kullanılan kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir:

1. Referans standart: Amoksisilin trihidrat (Mustafa Nevzat)
Lot#: B3561815 Son kullanma tarihi: 11. 2008
2. İç standart: Ampicillin sodyum (Mustafa Nevzat)
Lot#: 33032000294 Son kullanma tarihi: 05. 2007
3. İnsan plazması: İbni Sina Hastanesi, Ankara
4. 18 MΩ deiyonize su
5. Metanol: (Merck) Lot#: K34528807514
6. Etil asetat: (Merck) Lot#: I210568506
7. Periklorik asit (% 70-72): Lot#: B332019848
8. Formaldehit: (Merck) Lot#: K33068002414
9. Hidroklorik asit (% 37): (Merck) Lot#: K32164014324
10. Civa II klorür: (Merck) Lot#: A436919413
11. Sodyum hidroksit: B366382946
12. Disodyum hidrojen fosfat: (Merck) Lot#: F1313186414

III.3. SİSTEMİN KURULUMU

Windows masa üstünden, “Instrument 1 On-line” ikonuna çift tıklanıp kontrol panel ekranının yüklenmesi sağlandı. Bilgisayarda açılan bir klasöre, ‘Method’, ‘Data’ ve ‘Sequence’ adlandırmaları ile alt klasörler açıldı. “Method” menüsünden, kromatografik şartlarının yüklü olduğu metot çağrıldı. Metodun toplam analiz süresi 10 dakikadır.

Analiz için hazırlanan mobil faz, HPLC sisteminin hareketli faz akış kısmına takıldı. Akışın sağlandığı kılcaldaki hava kabarcıklarından kurtulmak için kolona akış gitmesi engellenerek 5 mL/dak akış hızı ile akış sağlandı. Kolon kompartmanının sıcaklığı 40 °C’ ye ayarlandı ve kolon ve guard kolon uygun bağlantılar ile birleştirilip kolon kompartmanına yerleştirildi. Hareketli faz akış hızı 1 mL/dak olarak ayarlanarak analizden önce kolonun hareketli faz ile doyurulmasını ve sistem basıncın sabitlenmesini sağlamak üzere sistem bırakıldı.

FLD sinyalleri; eksitasyon için 355 nm, emisyon için de 435 nm’ ye ayarlandı. “On-line plot” penceresinden baseline olarak adlandırılan taban çizgisi kontrol edildi. Y skalasının yaklaşık -0.0004 ile 0.004 LU aralığında olması sağlandı. Sistem basıncının 350 bar’ dan yüksek olmamasına dikkat edilerek çalışma için tüm şartlar hazırlandı.

III.4. ANALİZİ YAPILAN MADDELERİN ANALİZ SERTİFİKALARI

Biyolojik matrikste ilaç ve metabolitlerinin analizi, kalibrasyon standartı ve kalite kontrol numunelerinin kullanımı ile gerçekleştirilir. Bu numunelerin hazırlanmasında kullanılan referans standartın saflığı çalışma sonuçlarını etkileyebilir. Bu yüzden, bilinen konsantrasyonda çözelti hazırlamak için bilinen yapıda ve saflıkta onaylanmış analitik referans standart kullanılmalıdır. Mümkünse referans standart analite benzer olmalıdır. Mümkün değilse de, bilinen saflıkta ispatlanmış kimyasal formda (serbest yapı veya asit, tuz veya ester) maddeler kullanılabilir. Genellikle üç tip referans standart kullanılır:

1. Sertifikalı referans standartlar (ör. USP standartı)
2. Ünlü ticari kaynaklardan elde edilen ticari kaynaklı referans standartlar
3. Analitik bir laboratuvar veya ticari olmayan kurumlar tarafından özel sentezlenen bilinen saflıktaki diğer materyaller.

Her referans standart için kaynak ve lot numarası, son kullanma tarihi varsa analiz sertifikaları ve/veya dahilen ve haricen üretilmiş saflık ve yapı kanıtları bulunmaktadır⁴⁴.

III.4.1. Referans Standart Olarak Kullanılan Amoksisilin Trihidrat' ın Analiz Sertifikası

Çalışmalar Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş.' den temin edilen amoksisilin trihidrat ile yapılmıştır. Aşağıdaki tabloda Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş tarafından onay verilen analiz sonuçları görülmektedir.

Tablo 4: Amoksisilin Trihidrat Analiz Sertifikası

 <i>Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş.</i>		
ANALİZ SERTİFİKASI		
Ürünün adı	: AMOKSİSİLİN TRİHİDRAT, POWDER	
Lot no.	: B3561815	
Kontrol no.	: B4E/3525	
Kontrol tarihi	: 13.05.2004	
Üretim tarihi	: Kasım 2003	
Son kullanma tarihi	: Kasım 2008	
TESTLER	SPESİFİKASYONLAR	SONUÇLAR
Görünüş	Beyaz ya da beyazımsı, kristalize toz.	Uygun
Çözünürlük	Su ve alkolde biraz çözünür. Eter ve sabit yağlarda pratik olarak çözünmez. Seyreltik asit ve alkali hidroksitlerin seyreltik çözeltilerinde çözünür.	Uygun
Tatıma	Uygun olmalıdır.	Uygun
pH	3,5 - 5,5 arasında olmalıdır.	4,68
Nem	% 11,5 - % 14,5	% 13,34
Spesifik optik çevirme	(+ 290°) - (+ 315°) "KB" arasında olmalıdır.	+ 297,64°
Çözelti görünüşü	Referans çözelti II' den daha bulanık olmamalıdır.	0,5 M HCl: 1,13 NTU Dilüe NH ₄ : 2,02 NTU
Sülfat külü	% 1,0' den fazla olmamalıdır.	% 0,04
Miktar kaybı	Kuru baz üzerinden hesaplandığında. % 95,0' den az ve % 100,5' den fazla Amoksisilin içermemelidir.	% 98,76
İmpüriteler	% 1' den fazla olmamalıdır.	% 0,5
Kim.Müh. Sibel MURATUĞLU Kalite Müdürü		
 İlaç Sanayi Anonim Şirketi		

II.4.2. İç Standart Olarak Kullanılan Ampisilin Sodyum' un Analiz Sertifikası

Çalışmalar Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş.' den temin edilen ampisilin sodyum ile yapılmıştır. Aşağıdaki tabloda Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş tarafından onay verilen analiz sonuçları görülmektedir.

Tablo 5: Ampisilin Sodyum Analiz Sertifikası

 <i>Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş.</i>		
ANALİZ SERTİFİKASI		
Ürünün adı	: STERİL AMPİSİLİN SODYUM	
Lot no.	: 33033000294	
Kontrol no.	: B-11/4627	
Kontrol tarihi	: 23.06.2001	
Üretim tarihi	: Nisan 2004	
Son kullanma tarihi	: Nisan 2007	
TESTLER	SPESİFİKASYONLAR	SONUÇLAR
Görünüş	Beyaz, higroskopik toz.	Uygun
Çözünürlük	Suda kolayca, aseronda kısmen çözünür. Eter, konsantrik yağ ve likit parafinde pratik olarak çözünmez.	Uygun
Tanuma	Uygun olmalıdır.	Uygun
pH	8.0 – 10.0 arasında olmalıdır.	9.05
Nem	% 2.0'den fazla olmamalıdır.	% 0.18
Ağır metaller	20 ppm'den fazla olmamalıdır.	Uygun
Spektifik optik çevirme	(+258°) - (+28°) "KB" arasında olmalıdır.	+275.4°
Çözelti görünürlüğü (1M HCl)	Referans çözelti II'den daha bulanık olmamalıdır.	2.70 NTU
Çözelti görünürlüğü (Su)	Referans çözelti II'den daha bulanık olmamalıdır.	0.61 NTU
Absorbans (430nm)	0.15'den fazla olmamalıdır.	0.0148
Miktar tayini	Kuru maddeden hesaplandığında % 91.0'den az ve % 100.5'den fazla Ampisilin Sodyum içermemelidir.	% 96.86
İmpürite		
Dimer	% 4.5'den fazla olmamalıdır.	% 0.38
Diğer impürite (tek tek)	% 2.0'den fazla olmamalıdır.	% 0.21
Sterilite	Steril olmalıdır.	Steril
Bakteriyel Endotoksin	1 mg Ampisilin'de 0.15 IU Endotoksin limitinden fazla olmamalıdır.	Uygun
Kontrol: Sibel MURATOĞLU Kalite Müdürü  İlaç Sanayi Anonim Şirketi		

III.5. YÖNTEMİN KROMATOĞRAFİK ŞARTLARI

Analitik Kolon: Waters Spherisorb ODS2; 250 x 4.6 mm, 5µm
Guard Kolon: Waters Sentry Symmetry C18 3.9 x 20 mm, 5 µm
Hareketli Faz: Metanol : Su (55 : 45, h:h)
Akış Hızı: 1 mL/dak
Analiz Süresi: 10 dakika
Dedektör: FLD dedektör Ex: 355 nm, Em: 435 nm
Kolon Sıcaklığı: 40 °C
Enjeksiyon Hacmi: 30 µL

III.6. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

III.6.1. Standart Stok Çözeltisi (AMO-ST1)

Amoksisilin standart stok çözeltisi için 11.5 mg amoksisilin trihidrat (10 mg amoksisiline eşdeğer) 10 mL' lik balon jöjeye tartıldı. Bir miktar deiyonize su ile çözülüp 10 mL' ye deiyonize su ile tamamlandı. 20 saniye vorteks yardımıyla karıştırıldı. 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan bu çözelti hazırlanma tarihi de eklenerek "AMO-ST1" ismiyle etiketlendi. Çözeltinin bozulmasını önlemek için kullanılmadığı süre boyunca 0-4 °C sıcaklıkta ışıktan uzak kalması sağlanarak saklandı.

III.6.2. Dilüe Standart Stok Çözeltisi (AMO-DS1)

Standart stok çözeltisinden gerekli dilüsyon yapılarak kalibrasyon standartlarını ve kalite kontrol numunelerini hazırlama işleminde kullanılacak dilüe stok çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin de bozulmasını önlemek için kullanılmadığı süre boyunca 0-4 °C sıcaklıkta ışıktan uzak kalması sağlanarak saklandı. 100 µg/mL konsantrasyondaki dilüe stok çözeltisi (AMO-DS1) için 1 mg/mL konsantrasyondaki AMO-ST1 stok çözeltisinden

kalibre pipet yardımı ile 1 mL çözelti 10 mL' lik balon jojeye aktarıldı. 10 mL' lik hacme deiyonize su ile tamamlandıktan sonra vorteks yardımıyla karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti "AMO-DS1" ismiyle hazırlanma tarihi de eklenerek etiketlendi.

III.6.3. Kalibrasyon Standartları

Çalışma süresince kullanılacak olan kalibrasyon standartları için standart stok çözeltisi ve dilüe standart stok çözeltisinden hesaplanan miktarlarda çözelti alınarak plazma ile belirtilen hacme tamamlandı. Homojen dağılımını sağlamak için bir süre vorteks yardımı ile karıştırıldı. Her standart AMO-ST ibaresini ve plazmadaki amaoksisilin konsantrasyonunu yansıtacak şekilde (Örn: AMO-ST0010) hazırlanma tarihi de eklenerek etiketlendi. Standartlar kullanılmadığı süre boyunca -20 °C sıcaklığındaki dondurucuda ışıktan korunması sağlanarak saklandı. Masher ve arkadaşlarının yaptığı çalışma göz önüne alınarak plazma ile hazırlanan bu standartların 3 kereden fazla eritilmemesine dikkat edildi³¹. Bu sebeple hazırlanan plazmalar validasyon boyunca 3 kereden fazla eritilmemesi için uygun hacimlere bölündü. Tablo 6' da kalibrasyon standartlarını hazırlamak için gerekli olan stok çözelti miktarları görülmektedir.

Tablo 6: Kalibrasyon standartlarının hazırlanması

10 mL' lik Balon Jojeye Aktarılan Stok Çözelti Miktarı	Kalibrasyon Standartının Plazma Konsantrasyonu (µg/mL)
100 µg/mL Dilüe stoktan (AMO-DS1) 10 µL	0.1
100 µg/mL Dilüe stoktan (AMO-DS1) 50 µL	0.5
100 µg/mL Dilüe stoktan (AMO-DS1) 100 µL	1
1 mg/mL Stoktan (AMO-ST1) 25 µL	2.5
1 mg/mL Stoktan (AMO-ST1) 50 µL	5
1 mg/mL Stoktan (AMO-ST1) 100 µL	10
1 mg/mL Stoktan (AMO-ST1) 200 µL	20

III.6.4. Kalite Kontrol Numuneleri

Kalite kontrol numuneleri, kalibrasyon standartlarının en alt değeri ile en üst değerini içermek kaydıyla bunların arasında 3 adet, toplamda ise 5 adet değer içerir. İkinci kalite kontrol numunesin konsantrasyonu LOQ' nun üç katı; üçüncü kalite kontrol numunesi konsantrasyonu çalışma aralığının ortasında bir değer; dördüncü kalite kontrol numunesi konsantrasyonu da üst limite yakın bir değer olacak şekilde belirlenmiştir⁴⁴.

Çalışma süresince kullanılacak olan kalite kontrol numuneleri için standart stok çözeltisi ve dilüe standart stok çözeltisinden hesaplanan miktarlarda çözelti alınarak plazma ile belirtilen hacme tamamlandı. Homojen dağılımını sağlamak için bir süre vorteks yardımı ile karıştırıldı. Her numune AMO-QC ibaresini ve plazmadaki amaoksisilin konsantrasyonunu yansıtacak şekilde (Örn: AMO-QC0010) hazırlanma tarihi de eklenerek etiketlendi. Standartlar kullanılmadığı süre boyunca -20 °C sıcaklığındaki dondurucuda ışıktan korunması sağlanarak saklandı. Plazma ile hazırlanan bu numunelerin

de 3 kereden fazla eritilmemesine dikkat edildi³⁴. Bu sebeple hazırlanan plazmalar validasyon boyunca 3 kereden fazla eritilmemesi için uygun hacimlere bölündü. Tablo 7’ de kalite kontrol numunelerini hazırlamak için gerekli olan stok çözelti miktarları görülmektedir.

Tablo 7: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanması

20 mL’ lik Balon Jojeye Aktarılan Stok Çözelti Miktarı	Kalite Kontrol Numunelerinin Plazma Konsantrasyonu (µg/mL)
100 µg/mL Dilüe stoktan (AMO-DS1) 20 µL	0.1
100 µg/mL Dilüe stoktan (AMO-DS1) 60 µL	0.3
1 mg/mL Stoktan (AMO-ST1) 150 µL	7.5
1 mg/mL Stoktan (AMO-ST1) 300 µL	15
1 mg/mL Stoktan (AMO-ST1) 400 µL	20

III.6.5. İç Standart Çözeltisi

III.6.5.1. İç Standart Stok Çözeltisi (AMP-ST1)

İç standart stok çözeltisi için 10.7 mg ampicilin sodyum (10 mg ampisiline eşdeğer) 10 mL’ lik balon jojeye tartıldı. Bir miktar deiyonize su ile çözünüp 10 mL’ye deiyonize su ile tamamlandı. 20 saniye süreyle vorteks yapıldı. 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan bu çözelti hazırlanma tarihi de eklenerek “AMP-ST1” ismiyle etiketlendi. Çözeltinin bozulmasını önlemek için kullanılmadığı süre boyunca 0-4 °C sıcaklıkta ışıktan uzak kalması sağlanarak saklandı.

III.6.5.2. İç Standart Çalışma Çözeltisi (AMP-IS)

Çalışma süresince kullanılacak olan iç standart çözeltisini hazırlamak için iç standart stok çözeltisinden (AMP-ST1) kalibre pipet yardımı ile 20 µL çözelti 20 mL' lik balon jojeye alındı. Uygun hacme deiyonize su ile tamamlandı. Vorteks yardımıyla karıştırıldı. 1 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan bu çözelti hazırlanma tarihi de eklenerek "AMP-IS" ismiyle etiketlendi. Bu çözelti kullanılmadığı süre boyunca ışıktan da uzak kalması sağlanarak 0-4 °C' lik sıcaklıkta tutulmuştur. Çalışma esnasında farkedilen bir nokta da bu çözeltinin haftalık hazırlanması gerektiği ve günlük kullanım için yeterli hacmin oda ısısına çıkarılması gerektiğidir.

III.6.6. HPLC Hareketli Faz

Metanol : Su (55 : 45, h:h)

Tekrarlanabilirliğin sağlanabilmesi için daha hassas olacağı düşünülererek hareketli faz 2 litrelik balon jodede hazırlandı. 900 mL deiyonize su 2 litrelik balon jojeye aktarıldıktan sonra metanol ile 2 litreye tamamlandı. Ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. HPLC için uygun 2 litrelik şişeye aktarıldı. Hazırlanma tarihi de eklenerek "HPLC Hareketli Faz" ismiyle etiketlendi.

III.6.7. 5 M Hidroklorik Asit Çözeltisi

% 37' lik Hidroklorik asit çözeltisinden 41.46 mL çözelti alınarak içinde bir miktar deiyonize su bulunan 100 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Uygun hacme deiyonize su ile tamamlandı. Ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Hazırlanan çözelti, hazırlanma tarihi eklenerek "5 M Hidroklorik Asit Çözeltisi" ismiyle etiketlendi. Kullanılmadığı süre boyunca 0-4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

III.6.8. 5 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi

Sodyum hidroksit pelletlerinden 20 g tartılarak 100 mL' lik balon jöjeye aktarıldı. Bir miktar deiyonize su ile çözülmesi sağlanarak uygun hacme tamamlandı. Ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Hazırlanan çözelti, hazırlanma tarihi eklenerek "5 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi" ismiyle etiketlendi. Kullanılmadığı süre boyunca 0-4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

III.6.9. %50' lik Perklorik Asit Çözeltisi

%70' lik perklorik asit çözeltisinden 14.28 mL çözelti alınarak içinde bir miktar deiyonize su bulunan 20 mL' lik balon jöjeye aktarıldı. Uygun hacme deiyonize su ile tamamlandı. Ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Hazırlanan çözelti, hazırlanma tarihi eklenerek "%50' lik Perklorik Asit Çözeltisi" ismiyle etiketlendi. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı süre boyunca 0-4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Çalışmaya başlamadan önce bir saat süreyle -20 °C sıcaklıkta tutulması gerektiği belirlendi.

III.6.10. Civa II Klorür Stok Çözeltisi

10 mg civa II klorür 10 mL' lik balon jöjeye hassas bir şekilde tartıldı. Bir miktar deiyonize su ile çözülmesi sağlanarak uygun hacme tamamlandı. Ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondaki bu çözelti, hazırlanma tarihi eklenerek "Civa II Klorür Stok Çözeltisi" ismiyle etiketlendi. Kullanılmadığı süre boyunca 0-4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Bu çözeltinin haftalık hazırlanması gerektiği belirlendi.

III.6.11. 0.5 M Disodyum Hidrojen Fosfat Tamponu

71 g disodyum hidrojen fosfat 1 L' lik balon jöjeye tartıldı. Bir miktar deiyonize su ile çözülmesi sağlanarak uygun hacme tamamlandı.

Ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Hazırlanan bu çözelti, hazırlanma tarihi eklenerek “0.5 M Disodyum Hidrojen Fosfat Tamponu” ismiyle etiketlendi. 0-4 °C sıcaklıkta çöktürünün oluştuğu, çözünmesinin zaman aldığı gözlemlendiği için kullanılmadığı süre boyunca oda sıcaklığında muhafaza edildi.

III.6.12. Türevlendirme Çözeltisi

Bu çözelti iki aşamada hazırlandı.

A Çözeltisi: Hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondaki civa II klorür stok çözeltisinden 2 mL alınarak 100 mL’ lik balon jojeye aktarıldı. Uygun hacme 0.5 M disodyum hidrojenfosfat tamponu ile tamamlandı. Ultrasonik banyoda 15 dakika sonike edildi. Karışıklığa sebebiyet vermemek için “A Çözeltisi” adıyla etiketlendi. Bu çözeltinin günlük hazırlanmasına dikkat edildi.

Türevlendirme Çözeltisi: 2.7 mL %37’ lik formaldehit çözeltisi 100 mL’ lik balon jojeye aktarıldı. Uygun hacme hazırlanan A çözeltisi (%0.002 civa II klorür içeren 0.5 M disodyum hidrojen fosfat tamponu) ile tamamlandı. Bu çözelti % 1 formaldehit ve %0.002 civa II klorür içeren 0.5 M disodyum hidrojen fosfat tamponudur. Bu çözeltinin günlük hazırlanmasına ve ışıktan koruyarak oda ısında tutulmasına dikkat edildi.

III.7. NUMUNE HAZIRLAMA YÖNTEMİ

Bir analiz serisinde üç kör numunesi, iki tane iç standart içeren matriks numunesi, yedi farklı konsantrasyondaki kalibrasyon standardı numunesi, beş farklı konsantrasyondaki kalite kontrol numunelerinden de altışar kere olmak üzere toplam kırk iki adet numune hazırlandı.

1. Plazma numuneleri -20°C dondurucudan alınarak su banyosunda oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Daha sonra da 20 saniye süreyle vorteks yardımı ile karıştırıldı.
2. 15 mL' lik polipropilen konik santrifüj tüplerinden zero ve kör yazılı olanlara kalibrasyon standartlarını ve kalite kontrol numunelerini hazırlarken kullanılan insan plazmasından 0.25 mL plazma kalibre pipet ile aktarıldı.
3. Kalibrasyon standartları ve kalite kontrol numuneleri de kalibre pipet yardımı ile 15 mL' lik polipropilen konik santrifüj tüplerine 0.25 mL aktarıldı.
4. Hacmi artırmak için bütün numunelere otomatik kalibre pipet yardımı ile 150 μL deiyonize su eklendi. Kör numune içeren tüpler hariç diğerlerine iç standart çalışma çözeltisi olarak hazırlanan 1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki ampisilin çözeltisinden 100 μL eklendi. Kör numunelerine de ampisilin çözeltisini hazırlamada kullanılan çözelti olan deiyonize sudan yine 100 μL eklendi.
5. 5 saniye süreyle 10. kademe hızda vorteks yardımı ile karıştırıldı.
6. Bütün tüplere, kullanımdan önce 1 saat süreyle -20°C sıcaklıkta tutulan %50' lik perklorik asit çözeltisinden 50 μL otomatik kalibre pipet yardımı ile eklendi.
7. 10 saniye süreyle 10. kademe hızda vorteks yardımı ile karıştırıldı.
8. 4°C sıcaklığa ayarlanan santrifüjde 5500 rpm devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi.
9. Santrifüjden alınan numunelerin üst fazlarından 350 μL kalibre pipet ile alınarak hazırlanan diğer bir tüp serisine aktarıldı.

10. Bütün tüplere otomatik kalibre pipet ile 250 µL 5 M NaOH çözeltisi eklendi.
11. 20 saniye süreyle 10. kademe hızda vorteks yardımı ile karıştırıldı ve 10 dakika bekletildi.
12. Bütün tüplere otomatik kalibre pipet ile 250 µL 5 M HCl çözeltisi eklenerek nötralize edildi.
13. Bütün tüplere otomatik kalibre pipet ile 1.5 mL türevlendirme çözeltisi eklendi.
14. 20 saniye süreyle 10. kademe hızda vorteks yardımı ile karıştırıldı.
15. Numuneler türevlenmenin sağlanması için 50 °C sıcaklığa ayarlanan inkübatörde 40 dakika bekletildi.
16. Numunelerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
17. Bütün tüplere otomatik kalibre pipet yardımı ile 4 mL su ile doyurulmuş etil asetat çözeltisi eklendi.
18. 30 saniye süreyle 10. kademe hızda vorteks yardımı ile karıştırıldı.
19. 4 °C sıcaklığa ayarlanan santrifüjde 5500 rpm devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi.
20. Santrifüjden alınan numunelerin üst fazlarından (organik fazdan) 3.6 mL kalibre pipet ile alınarak hazırlanan diğer bir tüp serisine aktarıldı.
21. Organik faz 50 °C sıcaklığa ayarlanan evaporatörde azot gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu.
22. Alınan tüplere 100 µL hareketli faz eklendi ve çeperlerdeki maddeler çözünerek hareketli faza alındı.
23. 30 saniye süreyle 10. kademe hızda vorteks yardımı ile karıştırıldı.
24. Kalibre pipet yardımı ile viallere aktarılan çözelti HPLC/FLD sistemine 30 µL enjekte edildi.

IV. BULGULAR

IV.1. AMOKSİSİLİNİN İNSAN PLAZMASINDA HPLC İLE MİKTAR TAYİNİ YÖNTEM VALİDASYONUNUN SONUÇLARI

Analitik yöntem validasyonu 0.1-20 µg/mL konsantrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir. Yedi adet kalibrasyon standardı (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ve 20 µg/mL) ve her seri için altı kez hazırlanan beş farklı konsantrasyondaki kalite kontrol numuneleri (0.1, 0.3, 7.5, 15, 20 µg/mL) toplam beş seri boyunca analiz edildi. Birinci ve sonuncu sıradaki kalite kontrol numunelerinin konsantrasyonları en düşük ve en yüksek kalibrasyon standardının konsantrasyonu ile aynı seçilmiştir. Diğer kalite kontrol numunelerinin konsantrasyonları kalibrasyon standartlarından farklı ancak aralığa uyumlu seçilmiştir. İkinci kalite kontrol numunesin konsantrasyonu LOQ değerinin üç katı; üçüncü kalite kontrol numunesi konsantrasyonu çalışma aralığının ortasında bir değer; dördüncü kalite kontrol numunesi konsantrasyonu da üst limite yakın bir değer olacak şekilde belirlenmiştir. 1/x ağırlıklı ve doğrusal regresyon analizi sonrası kalibrasyon doğruları elde edilmiştir. Regresyon katsayıları, analit ve iç standardın pik alanları oranı ile en küçük kareler regresyonuna dayalı hesaplamalar HP Chemstation software programı ile yapılmıştır.

IV.1.1. Yöntem Validasyonunun Özeti

Tablo 8: Yöntem Validasyonunun Özeti

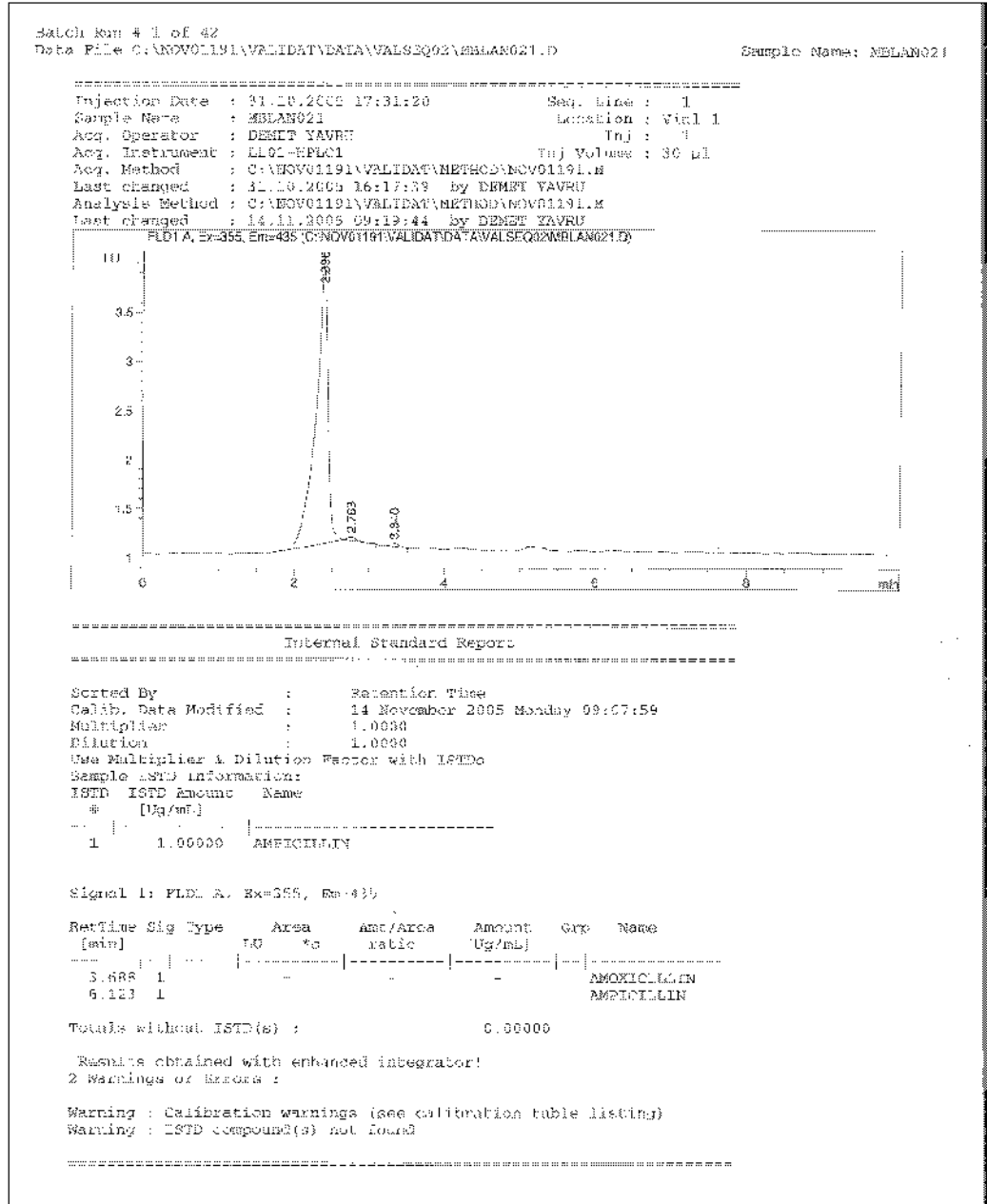
	Arahk
Kalibrasyon Aralığı	0.1-20 µg/mL
Miktar Tayini Limiti	0.1 µg/mL
Doğruluk (Kalite kontrol numunelerinin günler arası ortalama (%) doğrulukları)	99.19-105.86
Kesinlik (%RSD) (Kalite kontrol numunelerinin günler arası kesinlikleri)	5.24-12.09
Doğruluk (Kalibrasyon standardı numunelerinin günler arası ortalama (%) doğrulukları)	93.97-106.09
Kesinlik (%RSD) (Kalibrasyon standardı numunelerinin günler arası kesinlikleri)	1.17-13.32
Bağıl Geri Kazanım (%)	77.33

Sonuçlar FDA Guidance (2001) kılavuzundaki doğruluk ve kesinlik limitlerine uygun bulundu.

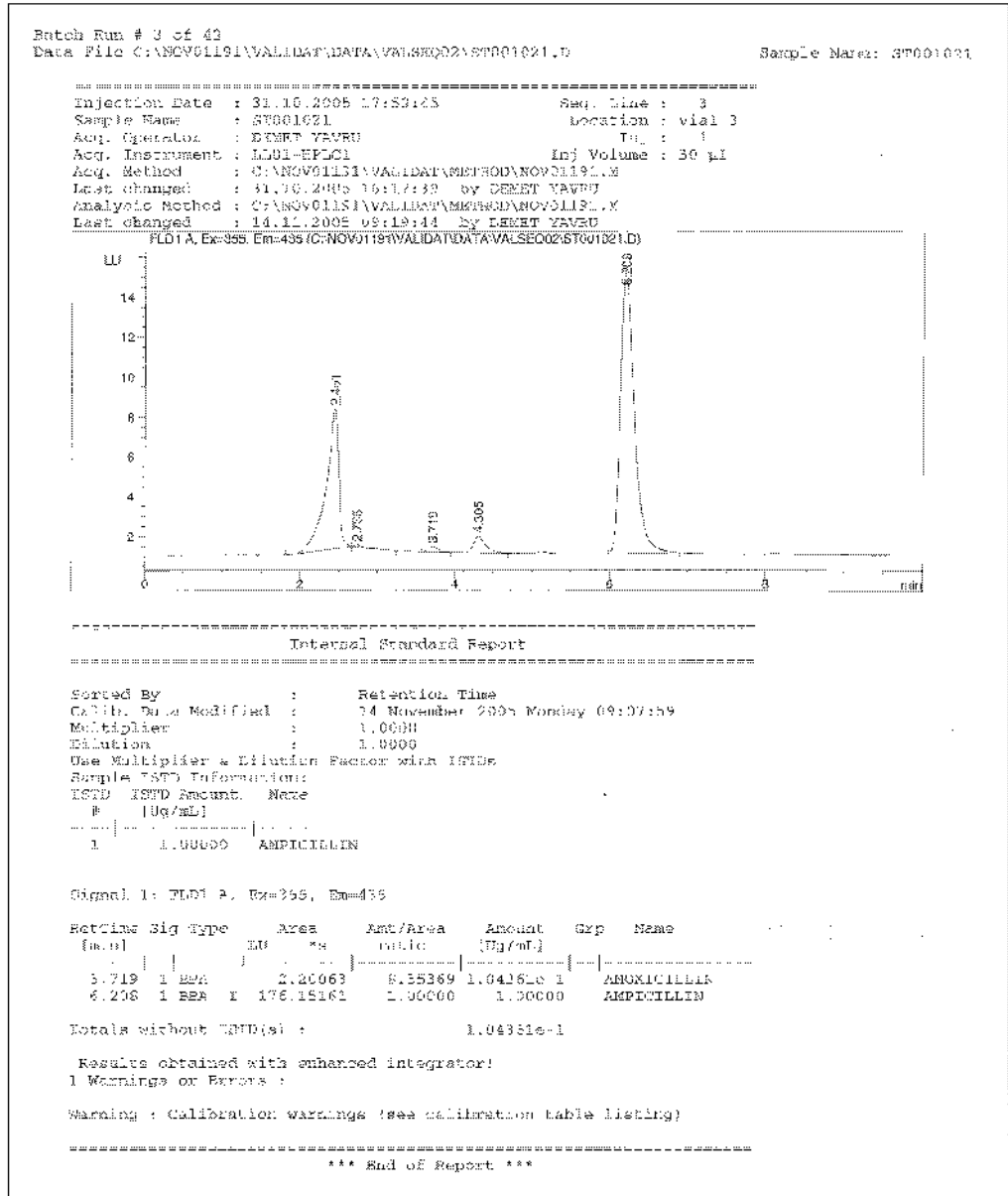
IV.1.2. Özgünlük ve Seçicilik

Amoksisilin ve iç standart olan ampisilinin alıkonma zamanları sırasıyla 3.7 ve 6.1 dakika olarak bulunmuştur. Altı farklı plazma boş olarak ekstraksiyona tabi tutuldu ve bu alıkonma zamanlarında herhangi bir kirlilik ve yabancı pik gözlenmedi. Yöntem özgünlük ve seçicilik kriterine uygun bulundu. Analit ve iç standart içermeyen kör numunesinin ve 0.1 µg/mL

konsantrasyondaki LOQ numunesinin kromatogramları Şekil 4 ve Şekil 5' de görülmektedir.



Şekil 4: Kör numune kromatogramı



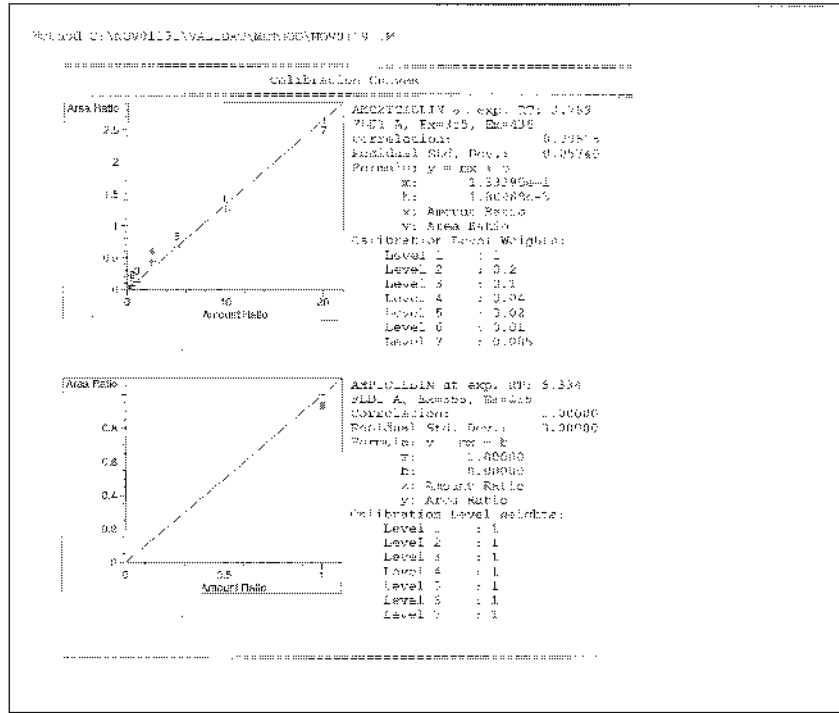
Şekil 5: 0.1 µg/mL konsantrasyondaki LOQ numunesinin kromatogramı

IV.1.3. Kantitatif Alt Limit (LOQ)

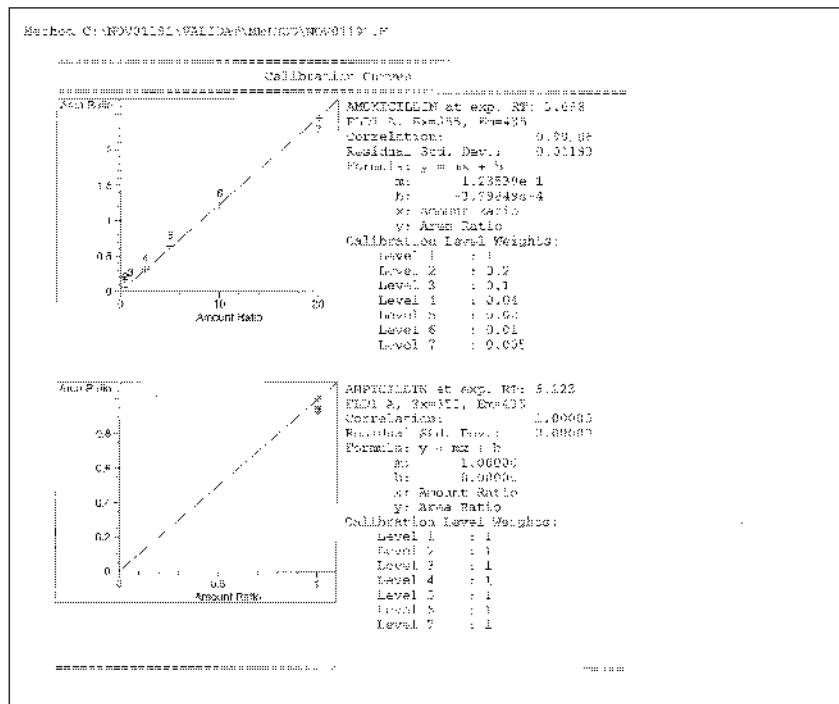
Uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içerisinde kantitatif olarak tespit edilebilen numunedeki en düşük analit miktarı olarak tanımlanan LOQ değeri insan plazmasında amoksisilinin HPLC ile miktar tayini yönteminde 0.1 µg/mL’ dir. ICH’ in (International Conference on Harmonisation) de tanıdığı kurala göre sinyal/gürültü oranının 10 olduğu değerdir. Şekil 5’ de LOQ numunesine ait kromatogram görülmektedir.

IV.1.4. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

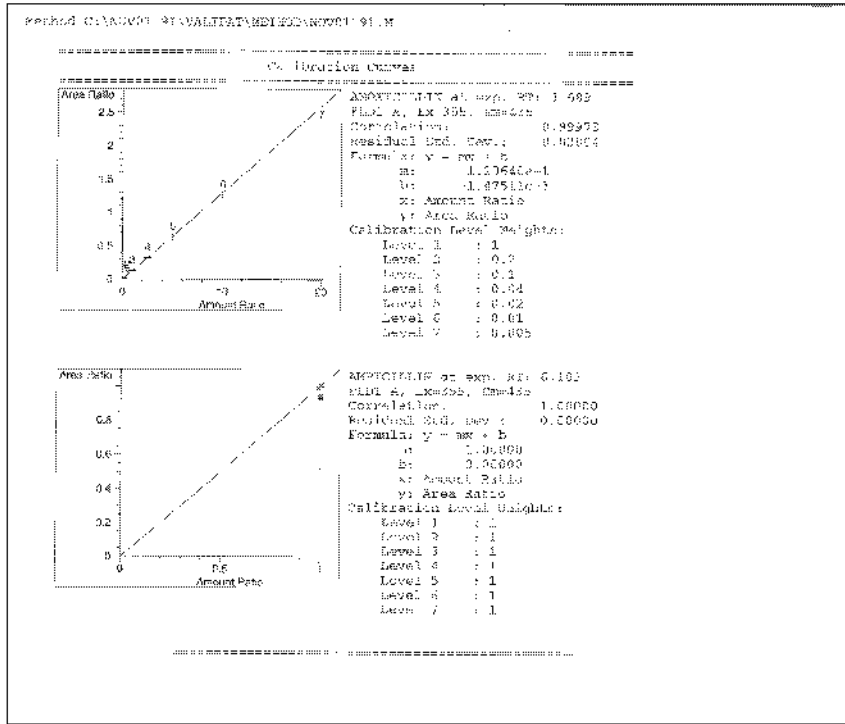
Çalışma süresi boyunca kullanılacak olan kalibrasyon standartları 0.1-20 µg/mL konsantrasyon aralığında toplam yedi adet olacak şekilde bölüm III.6.3’ de açıklandığı gibi hazırlanmıştır. Bu standartların Bölüm III.7.’ de verilen plazma numunelerinin hazırlanması yöntemiyle ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve HPLC sistemine 30 µL enjekte edilmiştir. Beş gün boyunca her validasyon serisinde bu standartların ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş olup çizilen kalibrasyon doğru grafiklerinin r^2 değerleri 0.99615 ile 0.99993 arasında olup ortalama r^2 değeri 0.99916’ dir. Geliştirilen analitik yöntemin 0.1-20 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan beş adet validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafikleri Şekil 6-10’ da verilmiştir.



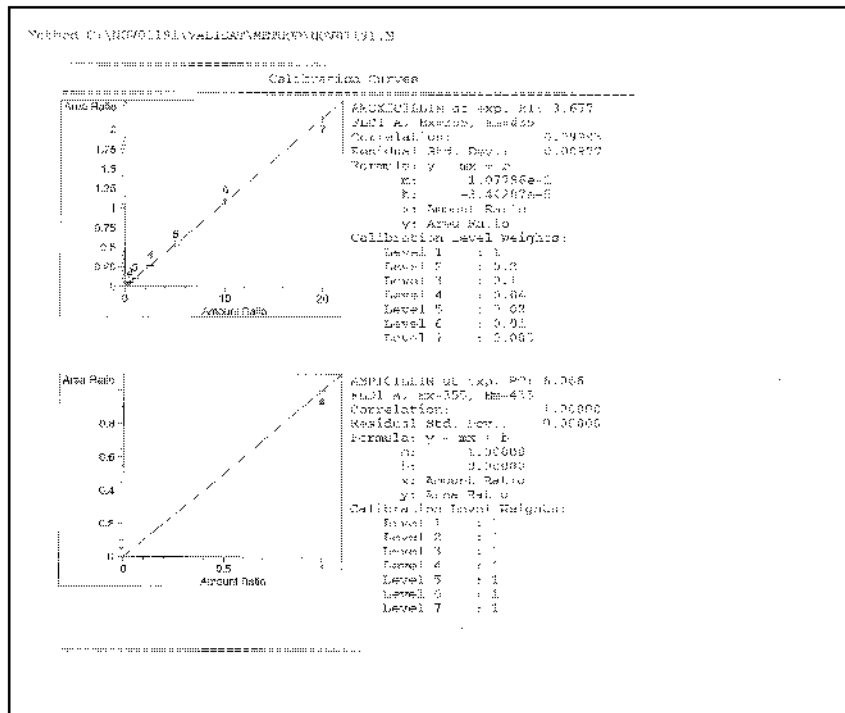
Şekil 6: Birinci validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği



Şekil 7: İkinci validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği



Şekil 8: Üçüncü validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği



Şekil 9: Dördüncü validasyon serisinin kalibrasyon doğrusu grafiği

Tablo 10: Kalibrasyon standartları için hesaplanan kabul aralıkları

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Kabul Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)
0.1	0.08-0.12
0.5	0.425-0.575
1	0.85-1.15
2.5	2.125-2.875
5	4.25-5.75
10	8.5-11.5
20	17-23

Tablo11: Kalite kontrol numuneleri için kabul limitleri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Kabul Aralığı (% Doğruluk)
0.1	80-120 (100 ± 20)
0.3, 7.5, 15, 20	85-115 (100 ± 15)

Tablo 12: Kalite kontrol numuneleri için hesaplanan kabul aralıkları

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Kabul Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)
0.1	0.08-0.12
0.3	0.255-0.345
7.5	6.375-8.625
15	12.75-17.25
20	17-23

Analiz sonunda alınan sonuçlar kabul kriterlerine göre yorumlanırken her serinin kendi içinde iç standart pik alanı ortalaması hesaplanıp; her analizin iç standart pik alanı, bu ortalama alana $\pm \%15$ aralığında benzer olduğu doğrulandı. Sonuçta kalibrasyon standartlarından en küçük ve en büyük konsantrasyonda olanı hariç diğerlerinden en fazla iki tanesi limit dışında olabilir. Her altı kalite kontrol numunesinden en az dördü kendi nominal değerinin $\pm \%15$ sınırları içinde olmalıdır. Bu kriterleri karşılayamayan numunelerin olduğu validasyon serisi tekrar analiz edilir. Yapılan 5 adet validasyon serisi sonunda kalibrasyon standartları ve kalite kontrol numuneleri her gün için aynı kesinlik ve doğruluk limitleri içinde bulundu. Kalibrasyon standartlarının günde bir kere, toplamda 5 kere; kalite kontrol numunelerinin ise her biri günde altı kere, beş gün sonunda ise toplam 30 kere olmak üzere analizi yapıldı. Sonuçlar FDA 2001 kılavuzundaki doğruluk ve kesinlik limitlerine göre uygun bulundu. 0.3 µg/mL konsantrasyondaki kalite kontrol numunesi yanlış numune pipetlenmesinden dolayı, toplamda bir kere sınırlar arasında çıkmadığı için limit dışı kabul edilmiştir. Kalite kontrol numunelerinin günler arası ortalama (%) doğrulukları 99.19-105.86; günler arası kesinlikleri (%RSD) 5.24-12.09 ve kalibrasyon standartlarının günler arası ortalama (%) doğrulukları 93.97-106.09; günler arası kesinlikleri (%RSD) 1.17-13.32 olarak bulunmuştur. Yapılan validasyon serilerinin sonuç raporları ve bunların doğrultusunda hazırlanan kalibrasyon standartları ve kalite kontrol numunelerinin seriler arası ve kalite kontrol numunelerinin seri içi istatistiksel değerleri aşağıdadır.

Tablo 13: Birinci validasyon serisinin sonuç raporu

Batch Report: C:\NOVO\191\VALIDAT\DATA\VALSEQ01\VALSEQ01.R

Batch Review Method:
C:\NOVO\191\VALIDAT\METHOD\NOVO191.M

[!* ==> Run has not been reprocessed with Batch Review Method
[** ==> Run has been saved with batch file]

Sample	AMOXICILLIN	AMOXICILLIN	AMOXICILLIN	AMPCICILLIN	AMPCICILLIN	AMPCICILLIN
N°	RT	Area	Amount	RT	Area	Amount
MBLANC11	0.000	0.00000	0.00000	0.000	0.00000	0.00000
MZEROC11	0.000	0.00000	0.00000	0.416	157.75561	1.00000
ST001011	3.818	2.51421	9.80626e-2	6.480	169.84192	1.00000
ST005011	3.826	10.51577	4.36938e-1	6.485	173.00075	1.00000
ST010011	3.807	26.57307	9.06417e-1	6.392	167.31164	1.00000
ST025011	3.812	53.12734	3.24518	6.386	222.21591	1.00000
ST050011	3.794	116.27709	5.01327	6.346	173.39835	1.00000
ST100011	3.793	217.19408	9.40205	6.346	172.92580	1.00000
ST200011	3.785	526.07745	19.93898	6.334	194.97579	1.00000
MBLANC12	0.000	0.00000	0.00000	0.000	0.00000	0.00000
MZEROC12	0.000	0.00000	0.00000	6.308	151.91245	1.00000
QC001011	3.774	1.94412	9.84638e-2	6.308	154.03430	1.00000
QC007012	3.763	2.21814	8.51798e-2	6.284	167.93706	1.00000
QC001013	3.758	2.06783	8.68316e-2	6.269	154.39868	1.00000
QC001014	3.756	2.46540	1.09431e-1	6.274	150.01688	1.00000
QC000015	3.764	7.14721	8.73884e-2	6.263	159.44189	1.00000
QC001016	3.768	1.95745	7.36960e-2	6.278	168.15793	1.00000
QC003011	3.759	3.20463e-1	2.22751e-1	6.267	9.21427	1.00000
QC003012	3.750	6.34257	2.80716e-1	6.262	176.85067	1.00000
QC003013	3.747	7.02251	3.10815e-1	6.253	162.29372	1.00000
QC003014	3.750	5.99774	2.59409e-1	6.247	143.56834	1.00000
QC003015	3.743	6.11095	3.03616e-1	6.247	144.31787	1.00000
QC003016	3.738	6.41817	3.89989e-1	6.243	158.20193	1.00000
QC075011	3.744	157.62810	7.28832	6.247	181.87450	1.00000
QC075012	3.741	154.82222	8.12805	6.245	154.10277	1.00000
QC075013	3.739	172.39630	8.89044	6.244	187.18933	1.00000
QC075014	3.742	155.53773	6.93918	6.250	146.13853	1.00000
QC075015	3.740	156.45453	8.27769	6.257	141.63919	1.00000
QC075016	3.741	148.20197	7.14735	6.252	155.14761	1.00000
QC150011	3.738	127.37223	14.08763	6.240	67.87271	1.00000
QC150012	3.736	136.74260	14.25997	6.245	176.97873	1.00000
QC150013	3.734	116.01642	14.12041	6.238	178.57915	1.00000
QC150014	3.734	168.91871	14.57733	6.246	189.54427	1.00000
QC150015	3.738	149.12297	14.38937	6.245	181.33285	1.00000
QC150016	3.747	161.02713	14.87010	6.287	191.91396	1.00000
QC200011	3.752	476.80036	18.46175	6.294	184.10301	1.00000
QC200012	3.749	535.05945	19.08822	6.285	210.01817	1.00000
QC200013	3.751	505.48611	18.85613	6.290	206.28517	1.00000
QC200014	3.746	505.44083	19.82086	6.290	191.83435	1.00000
QC200015	3.747	491.70541	19.15150	6.288	192.31364	1.00000
QC200016	3.748	537.63361	19.02780	6.284	210.88376	1.00000
MBLANC13	0.000	0.00000	0.00000	0.000	0.00000	0.00000

*** End of Report ***

Tablo 14: İkinci validasyon serisinin sonuç raporu

Batch Report: C:\NOV01191\VALID\DATA\VAL\SEQ04\VAL\SEQ04.P

Batch Review Method:
C:\NOV01191\VALID\DATA\METHOD\NOV01191.M

*** ==> Run has not been reprocessed with Batch Review Method
*** ==> Run has been saved with batch file

Sample	AMOXICILLIN	AMOXICILLIN	AMOXICILLIN	AMPICILLIN	AMPICILLIN	AMPICILLIN
#	RT	Area	Amount	RT	Area	Amount
MBLAN021	0.000	0.00000	0.00000	0.000	0.00000	0.00000
MBLAN021	0.000	0.00000	0.00000	0.223	180.37169	1.00000
ST001021	3.719	2.20063	1.04261e-1	0.208	170.15161	1.00000
ST005021	3.705	20.91209	4.73423e-1	0.160	166.66682	1.00000
ST010021	3.674	26.44061	9.58838e-1	0.113	173.14829	1.00000
ST025021	3.657	54.42592	2.55555	0.139	172.61220	1.00000
ST050021	3.693	117.55327	5.16135	0.171	184.52669	1.00000
ST100021	3.691	231.08394	9.56071	0.122	167.65242	1.00000
ST200021	3.688	551.47524	19.88284	0.123	215.40718	1.00000
MBLAN022	0.000	0.00000	0.00000	0.000	0.00000	0.00000
M2EPO022	0.000	0.00000	0.00000	0.140	172.97173	1.00000
QC001021	3.700	2.30285	1.10408e-1	0.158	166.31973	1.00000
QC001022	3.699	1.94495	9.70254e-2	0.135	167.86247	1.00000
QC001023	3.703	2.25738	1.10305e-1	0.166	170.34442	1.00000
QC001024	3.703	2.24809	1.13853e-1	0.179	164.80762	1.00000
QC001025	3.710	2.50004	1.08344e-1	0.103	173.29431	1.00000
QC001026	3.714	2.23815	1.04984e-1	0.164	173.08253	1.00000
QC003021	3.705	7.45345	3.56774e-1	0.160	170.65462	1.00000
QC003022	3.712	7.23798	3.48005e-1	0.186	169.49364	1.00000
QC003023	3.717	7.48839	3.30818e-1	0.198	181.47153	1.00000
QC003024	3.716	7.81632	3.52574e-1	0.200	181.21828	1.00000
QC003025	3.723	7.53108	3.60358e-1	0.217	170.74615	1.00000
QC003026	3.727	7.53267	3.27355e-1	0.228	188.12273	1.00000
QC075021	3.722	191.29036	7.78045	0.221	198.94418	1.00000
QC075022	3.726	181.29172	7.62601	0.227	192.51344	1.00000
QC075023	3.726	173.11592	7.45081	0.230	187.93234	1.00000
QC075024	3.730	189.98884	7.42004	0.236	204.91568	1.00000
QC075025	3.728	181.18619	7.35887	0.235	199.93259	1.00000
QC075026	3.730	179.42943	7.32892	0.242	198.26299	1.00000
QC150021	3.735	381.40391	14.29511	0.253	216.02763	1.00000
QC150022	3.735	390.28659	14.34950	0.254	220.21195	1.00000
QC150023	3.732	378.37032	14.82905	0.254	203.10087	1.00000
QC150024	3.734	354.58710	14.72241	0.263	195.00047	1.00000
QC150025	3.735	377.52341	14.49348	0.270	210.89413	1.00000
QC150026	3.735	370.41125	14.23386	0.265	210.70956	1.00000
QC200021	3.737	544.42711	20.38377	0.270	216.44481	1.00000
QC200022	3.733	476.11768	19.36287	0.275	194.36044	1.00000
QC200023	3.719	503.81921	18.35796	0.251	222.18932	1.00000
QC200024	3.734	328.57974	18.09122	0.276	225.33073	1.00000
QC200025	3.734	551.66475	20.45376	0.264	218.94916	1.00000
QC200026	3.741	493.10835	19.25515	0.267	209.46310	1.00000
MBLAN023	0.000	0.00000	0.00000	0.000	0.00000	0.00000

*** End of Report ***

Tablo 15: Üçüncü validasyon serisinin sonuç raporu

```

Batch Report: C:\NOV0119\VAL\VALDATA\VALSE006\VALS0003.E
Batch Review Method:
C:\NOV0119\VAL\VALDATA\METHOD\NOV0119.E

[?] ==> Run has not been reprocessed with Batch Review Method
[+] ==> Run has been saved with batch file.

Sample AMOXICILLIN AMOXICILLIN AMOXICILLIN AMPICILLIN AMPICILLIN
RT Area Amount RT Area Amount RT Area Amount
---
MELAN0031 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000
MZERO001 0.000 0.00000 0.00000 0.001 153.55031 1.00000
FT001001 3.570 2.27022 1.69170e-1 6.054 179.07283 1.00000
ET005001 3.674 9.89155 4.73742e-1 6.080 165.00829 1.00000
ET010001 7.677 27.06503 8.22511e-1 6.082 175.29155 1.00000
ST020001 3.682 53.85137 2.50226 6.094 152.66885 1.00000
ST060001 3.684 118.00040 4.93418 6.095 185.37630 1.00000
ST100001 3.688 242.70779 9.71469 6.103 191.73500 1.00000
S-200001 3.689 502.78647 20.38757 6.103 192.32531 1.00000
MELAN002 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000
MZERO002 0.000 0.00000 0.00000 0.124 133.35879 1.00000
QC001001 3.695 3.48153 1.14494e-1 6.127 182.63383 1.00000
QC001002 3.694 2.81679 1.13815e-1 6.122 168.92905 1.00000
QC001003 3.691 2.26680 1.24235e-1 6.120 155.01688 1.00000
QC001004 3.693 2.12912 1.32804e-1 6.121 135.19819 1.00000
QC001005 3.697 2.11440 1.14912e-1 6.123 157.53122 1.00000
QC001006 3.698 2.16414 1.17086e-1 6.134 157.95196 1.00000
QC002001 3.699 6.69506 3.39974e-1 6.137 157.21248 1.00000
QC003002 3.699 6.75201 3.27373e-1 6.142 164.82188 1.00000
QC004003 3.700 6.15660 3.18384e-1 6.144 155.74397 1.00000
QC005004 3.695 6.64307 3.15865e-1 6.089 168.23685 1.00000
QC006005 3.675 7.05637 3.06639e-1 6.052 170.48990 1.00000
QC007006 3.687 6.80918 3.11913e-1 6.098 174.76781 1.00000
QC075001 3.693 185.33870 7.87195 6.130 181.87543 1.00000
QC075002 3.696 186.75219 7.81341 6.145 184.63794 1.00000
QC075003 3.704 195.06125 8.00200 6.159 189.26628 1.00000
QC075004 3.698 214.44534 8.48209 6.154 195.22041 1.00000
QC075005 3.699 194.42451 8.02809 6.157 187.07542 1.00000
QC075006 3.700 174.35373 7.45377 6.116 180.70883 1.00000
GC150001 3.686 395.04691 14.91385 6.093 204.99841 1.00000
GC150002 3.687 338.14501 16.01042 6.134 186.16469 1.00000
GC150003 3.700 285.95909 15.26173 6.122 195.16864 1.00000
GC150004 3.694 398.93140 16.10969 6.131 191.15265 1.00000
GC150005 3.693 389.45323 15.35694 6.142 195.61780 1.00000
GC150006 3.695 413.22067 16.26332 6.140 156.12767 1.00000
QC200001 3.701 548.80115 20.52220 6.155 206.38261 1.00000
QC200002 3.702 564.78574 21.09975 6.159 206.50730 1.00000
QC200003 3.703 512.93807 19.95436 6.166 198.35915 1.00000
QC200004 3.708 471.13113 20.07824 6.172 181.19251 1.00000
QC200005 3.699 519.90879 20.52616 6.151 195.15059 1.00000
QC200006 3.703 507.47368 24.04196 6.163 162.93644 1.00000
MELAN003 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000
*** End of Report ***

```

Tablo 16: Dördüncü validasyon serisinin sonuç raporu

```

Batch Report: C:\ANOV0191\VALID\DATA\DATA\VALSEQ04\VALSEQ04.D

Batch Review Method:
C:\ANOV0191\VALID\DATA\METHOD\ANOV0191.M

[ # ] ==> Run has not been reprocessed with Batch Review Method
[ * ] ==> Run has been reseed with Batch File!

Sample AMOXICILLIN AMOXICILLIN AMOXICILLIN AMPICILLIN AMPICILLIN AMPICILLIN
-- RT Area Amount RT Area Amount
-----
E8L8N041 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000
M8R00041 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000
S8G01041 0.675 2.28964 1.03431e-1 0.660 206.87654 1.00000
S8G00041 0.681 10.28565 4.45779e-1 0.683 192.77228 1.00000
S8G10041 0.684 20.81207 9.76804e-1 0.697 197.72121 1.00000
S8G20041 0.688 55.49492 2.47921 0.696 207.68026 1.00000
S8G30041 0.684 114.12752 4.96054 0.680 213.44394 1.00000
S8T00041 0.675 240.26325 13.17431 0.665 219.07679 1.00000
S8T20041 0.677 489.52814 19.90977 0.666 228.09595 1.00000
M8L8N042 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000
M8R00042 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000
Q8G01041 0.672 2.28139 1.20654e-1 0.647 175.96958 1.00000
Q8G01041 0.674 2.30971 1.12294e-1 0.657 181.30487 1.00000
Q8G01041 0.675 2.04806 1.06616e-1 0.673 178.82797 1.00000
Q8G00041 0.678 3.08112 1.61179e-1 0.668 189.65309 1.00000
Q8G01041 0.685 2.21763 1.04902e-1 0.689 196.71091 1.00000
Q8G01041 0.688 2.19421 1.07403e-1 0.682 189.12013 1.00000
Q8G01041 0.694 0.84928 0.07487e-1 0.695 206.28253 1.00000
Q8G01042 0.692 0.50247 4.18388e-1 0.693 190.70821 1.00000
Q8G01041 0.696 6.42443 3.12856e-1 0.691 181.78168 1.00000
Q8G01041 0.696 6.61500 3.12124e-1 0.671 195.80963 1.00000
Q8G01041 0.696 7.23248 3.22671e-1 0.691 208.50788 1.00000
Q8G01041 0.696 7.23251 3.28223e-1 0.694 205.61256 1.00000
Q8G75041 0.703 1.84.06650 8.19414 0.691 196.62044 1.00000
Q8G75041 0.707 190.76216 8.78823 0.694 201.37500 1.00000
Q8G75041 0.711 185.78338 8.28398 0.695 207.66452 1.00000
Q8G75041 0.708 153.61644 8.31193 0.691 171.46184 1.00000
Q8G75041 0.717 185.16783 7.76982 0.685 221.69188 1.00000
Q8G75041 0.713 103.08656 7.73089 0.689 225.70926 1.00000
Q8L8G041 0.717 353.74524 15.38876 0.693 233.33893 1.00000
Q8L8G041 0.721 379.14481 15.20261 0.696 227.09206 1.00000
Q8L8G041 0.716 349.71880 15.40040 0.661 210.66620 1.00000
Q8L8G041 0.712 160.41416 17.50907 0.608 05.09880 1.00000
Q8L8G041 0.725 340.08180 13.97616 0.611 225.72449 1.00000
Q8L8G041 0.725 355.96519 14.97772 0.616 220.44949 1.00000
Q8Z8H041 0.723 529.83215 20.03605 0.619 165.29539 1.00000
Q8Z8H041 0.726 512.83176 19.87959 0.620 239.81692 1.00000
Q8Z00041 0.713 529.48749 20.04039 0.624 215.10695 1.00000
Q8Z00041 0.725 487.53707 20.98335 0.625 215.54255 1.00000
Q8Z00041 0.729 486.04691 20.01471 0.626 229.92140 1.00000
Q8Z00041 0.729 530.91605 20.66950 0.623 245.10562 1.00000
M8L8N041 0.000 0.00000 0.00000 0.000 0.00000 0.00000

*** End of Report ***

```

Tablo 17: Beşinci validasyon serisinin sonuç raporu

Batch Report: C:\NOV0119\VALIDAT\DATA\VALSEQ05\VALSEQ05.B

Batch Review Method:
C:\NOV0119\VALIDAT\METHOD\NOV0119.M

[**] ==> Run has not been reprocessed with Batch Review Method
[**] ==> Run has been saved with batch file]

#	Sample	AMOXICILLIN RT	AMOXICILLIN Area	AMOXICILLIN Amount	AMPICILLIN RT	AMPICILLIN Area	AMPICILLIN Amount
---	---	---	---	---	---	---	---
	MBLAN051	0.000	0.00000	0.00000	0.000	0.00000	0.00000
	MZERO051	0.000	0.00000	0.00000	0.007	191.75153	1.00000
	ST001051	3.680	1.00376	1.01340e-1	6.065	159.53110	1.00000
	ST005051	3.676	10.42356	4.67122e-1	6.065	200.87453	1.00000
	ST010051	3.676	13.63166	1.05604	6.067	116.63940	1.00000
	ST025051	3.674	52.04211	2.47902	6.055	138.85254	1.00000
	ST050051	3.673	112.82960	4.84058	6.061	231.36922	1.00000
	ST100051	3.673	250.15924	10.23992	6.060	219.73506	1.00000
	ST200051	3.677	500.04034	19.77128	6.061	227.47935	1.00000
	MBLAN052	0.000	0.00000	0.00000	6.067	3.24582	1.00000
	MZERO052	0.000	0.00000	0.00000	6.063	102.41972	1.00000
	QC001051	2.680	1.99206	1.06622e-1	6.069	158.35826	1.00000
	QC007052	3.667	2.15725	1.03357e-1	6.073	188.58215	1.00000
	QC007053	3.667	2.21270	1.07494e-1	6.084	186.31240	1.00000
	QC007054	3.691	2.04112	1.01441e-1	6.089	181.59217	1.00000
	QC007055	3.687	2.17282	1.02898e-1	6.053	194.46103	1.00000
	QC007056	3.687	2.07302	1.00401e-1	6.093	189.45050	1.00000
	QC007057	3.695	6.12064	3.07912e-1	6.118	175.02524	1.00000
	QC007058	3.697	5.75445	3.04495e-1	6.127	170.32133	1.00000
	QC007059	3.701	5.76885	2.98005e-1	6.132	212.37650	1.00000
	QC007060	3.702	6.21544	3.11188e-1	6.134	179.87878	1.00000
	QC007061	3.705	5.96468	2.86577e-1	6.143	197.46753	1.00000
	QC007062	3.704	6.15746	2.98207e-1	6.139	185.96925	1.00000
	QC075052	3.703	162.88847	7.47518	6.139	196.03544	1.00000
	QC075053	3.705	166.34024	7.34696	6.149	203.65231	1.00000
	QC075054	3.702	169.47787	7.36313	6.146	207.63922	1.00000
	QC075055	3.711	163.32057	7.43324	6.160	197.65509	1.00000
	QC075056	3.713	168.97742	7.46477	6.172	203.61899	1.00000
	QC075057	3.711	191.93484	7.36469	6.165	234.42342	1.00000
	QC150051	3.712	383.05356	14.49964	6.176	237.62600	1.00000
	QC150052	3.720	354.85358	14.32451	6.184	222.87291	1.00000
	QC150053	3.719	332.51926	14.80916	6.191	206.21675	1.00000
	QC150054	3.716	372.65666	14.58094	6.192	229.88648	1.00000
	QC150055	3.721	333.50219	14.36471	6.201	220.78934	1.00000
	QC150056	3.720	351.37830	14.16406	6.209	229.16696	1.00000
	QC200051	3.713	189.18117	24.20304	6.190	70.33618	1.00000
	QC200052	3.719	507.85846	19.25917	6.192	237.18731	1.00000
	QC200053	3.714	513.61194	18.21859	6.194	244.13530	1.00000
	QC200054	3.711	445.87534	19.51537	6.189	208.10150	1.00000
	QC200055	3.716	475.58001	19.12575	6.187	223.66316	1.00000
	QC200056	3.714	432.54365	19.35920	6.185	199.57779	1.00000
	MBLAN053	0.000	0.00000	0.00000	6.183	2.05787	1.00000

*** End of Report ***

Tablo 18: Kalite kontrol numunelerinin tüm kalibrasyon serilerine karşın seri-içi istatistiksel değerleri

Seri No.	Korelasyon Katsayısı	Ortalama % Doğruluk (LOQ $\pm$ %20, diğerleri $\pm$ %15)					Kesinlik (%RSD) (LOQ $\pm$ %20, diğerleri $\pm$ %15)				
		0.1	0.3	7.5	15	20	0.1	0.3	7.5	15	20
01	0.99615	89.90	95.43	99.26	95.87	95.76	12.13	10.9	8.08	2.00	2.40
02	0.99986	107.57	114.60	9.92	96.58	97.75	5.89	4.22	2.39	1.61	4.13
03	0.99973	119.56	108.01	105.9	104.4	105.2	7.55	3.49	4.47	3.64	7.63
04	0.99993	108.83	105.57	109.1	102.7	100.9	6.83	2.29	5.24	7.71	2.02
05	0.99981	103.42	97.02	98.77	96.40	100.2	3.06	9.14	0.75	1.47	10.3

Tablo 19: Kalibrasyon standartlarının beş gün boyunca seriden seriye istatistiksel değerleri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	n	Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama % Doğruluk (LOQ $\pm$ %20, diğerleri $\pm$ %15)	Kesinlik (%RSD) (LOQ $\pm$ %20, diğerleri $\pm$ %15)
0.1	5	0.10	103.28	4.09
0.5	5	0.47	93.97	4.34
1	5	0.97	97.49	5.16
2.5	5	2.65	106.09	13.32
5	5	5.01	100.24	1.77
10	5	9.90	98.98	3.45
20	5	19.90	99.95	1.17

Tablo 20: Kalite kontrol numunelerinin beş gün boyunca seriden seriye istatistiksel değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	n	Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama % Doğruluk (LOQ ± %20, diğerleri ± %15)	Kesinlik (% RSD) (LOQ ± %20, diğerleri ± %15)
0.1	30	0.11	105.86	12.09
0.3	29	0.31	103.76	9.59
7.5	30	7.69	102.59	6.19
15	30	14.88	99.19	5.24
20	30	19.99	99.94	6.58

IV.1.6. Stabilité

-20 °C dondurucuda, polipropilen tüplerde saklanan plazma numuneleri Masher ve arkadaşlarının yaptığı çalışma göz önüne alınarak 3 kereden fazla dondurulup eritilmedi³⁴. 3 kereye kadar dondurma-çözme stabilitesinin olduğu gözlemlendi. Stok çözeltileri ve plazma numuneleri ışıktan uzak kalması sağlanarak saklandı. İç standart çözeltisinin haftalık hazırlanması gerektiği yapılan çalışmalar sırasında belirlendi ve stok çözelti stabilitesinin 4 °C’ de 1 hafta olduğu kaydedildi. Oto örnekleyici stabilitesine bakıldı ve oto örnekleyicide 72 saat boyunca stabil olduğu kanıtlandı.

Stabilite Numunelerinin Hazırlanması:

Fazla numune sayısına sahip çalışmalarda analiz süresi boyunca stabilitesinden emin olarak doğru ve güvenilir sonuçlar aldığımızı kanıtlamak için üç farklı konsantrasyondaki kalite kontrol numunesi (0.3, 7.5, 15 µg/mL) validasyonun herhangi bir serisinde 6’şar kere ekstre edildi. Hazırlanan stabilite serisi 72 saat boyunca oda sıcaklığında oto örnekleyicide bekletildikten sonra analiz edildi. Stabilite serisinin birlikte hazırlandığı

IV.1.7. Geri Kazanım

Geri kazanım için üç farklı konsantrasyonda (düşük 0.1 µg/mL, orta 7.5 µg/mL, yüksek 20 µg/mL) suda hazırlanmış numuneler plazma numuneleri ile birlikte ekstre edildi ve bunların alanlarının ortalamaları hesaplandı. Aynı seri içinde ekstre edilen plazma numunelerinin alanlarının ortalamasına oranlanarak bağıl geri kazanım hesaplandı. Mutlak geri kazanım için gerekli ekstre edilmeyen numuneler amoksisilinin türevlendirilmesi gerçekleştirilemediği için hesaplanamamıştır. Bağıl geri kazanım %77.33' dür.

V. TARTIŞMA

Antibakteriyel ilaçlar içerisinde önemli bir yere sahip bir β -laktam antibiyotiği olan penisilin türevi amoksisilinin insan plazmasında miktar tayini yönteminin geliştirilmesi kapsamında yapılan literatür araştırmalarında pek çok yöntem olduğu gözlenmiştir. Çalışma ilaç etkin maddelerinin, farmasötik preparatlarda ve vücut sıvılarında miktar tayininde yaygın olarak kullanılan özellikle etkin madde miktarı az olan preparatlarda hassas sonuç vermesi, analizin kısa sürede tamamlanabilmesi ve analistten kaynaklanabilen hataların düşük düzeyde tutulabilmesi nedeniyle HPLC yöntemi ile yapılmıştır.

Katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleriyle çalışılmış olduğu belirlenmiş ancak katı faz kartuşlarının pahalı olması sebebiyle sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminin kullanılması uygun görülmüştür.

HPLC sisteminde çalışılacak dedektör seçiminde ise; öncelikle UV dedektör kullanılarak yapılan çalışmalar denenmiştir. Ancak plazmadan gelen kirliliklerin tam olarak uzaklaştırılamaması sebebiyle interferans problemi gözlenmiştir. Hareketli faz oranları ve hareketli faz pH' ı değiştirilerek uyarlamalar yapılmıştır. Ancak analiz süresinin çok uzun tutulması durumunda kalınmıştır. Ayrıca klinik çalışmalar için inilmesi uygun görülen 0.1 $\mu\text{g/mL}$ olan LOQ değerinin tekrarlanabilir ve özgün bir şekilde gözlenemediği ispatlanmıştır. UV dedektör kullanılarak Mascher ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da plazma proteinlerinin %20' lik perklorik

asit çözeltisi ile çöktürölüp, alınan üst fazda amoksisilinin stabil kalma süresinin çok kısa olduğu belirtilmiştir. Stabilitenin önemi düşünölerek bu yöntemden de vazgeçilmiştir. Geliştirilen miktar tayini yöntemi sırasında yine perklorik asit ile çöktürme yapılmış ancak hızlı çalışılarak amoksisilinin bir an önce organik çözücü sistemine alınmasına dikkat edilmiştir. Yüksek hassasiyet göstermesi sebebiyle floresans dedektör kullanılarak yapılan literatür çalışmaları incelenmiş ve bu miktar tayini yöntemleri üzerinde çalışılmıştır. En uygun dalga boyunun eksitasyon için 355 nm, emisyon için 435 nm olduğu belirlenmiştir.

Yöntem için hareketli faz seçiminde, yapılan denemeler sonunda, sistemin kirlenmemesi ve kolonun ömrünün daha uzun olmasını sağlama açısından metanol : su karışımından oluşan hareketli fazın daha uygun olacağı düşünülmüştür.

Kolon değışmeli sistemler veya analiz süresi boyunca zaman zaman gradient zaman zaman izokreatik pompa sistemi ile çalışmaların sürdürölüdüğü kirliliklerin bu şekilde uzaklaştırılabildiğı yapılan literatür araştırmalarında gözlenmiş ancak kolay uygulanabilir ve pratik yöntemler olmadığı için uygulanmamıştır.

Geliştirilen yöntemde 0.25 mL plazma ile çalışılmıştır. Hem kullanılan plazma hem de kullanılan çözücü miktarları açısından pek çok yöneme göre ekonomik olduğu gözlenmiştir. 0.25 mL plazma kullanılarak da plazmadan gelecek olası kirlilikler azaltılmış HPLC sisteminin kirlenmesi önlenmiştir.

Geliştirilen yöntemde kullanılan türevlendirme çözeltisinin (%0.002 (a/h) Civa II klorür ve %1 formaldehit içeren 0.5 M disodyum hidrojenfosfat tamponu) günlük hazırlanması gerektiğı yapılan çalışma boyunca fark edilmiştir. Civa II klorür miktarına karar verilirken Wibawa ve arkadaşlarının yapığı çalışmadaki gibi %0.1 (a/h) oranı denenmiş ancak uygun ve tekrarlanabilir cevapların alınamaması sebebiyle oran üzerinde değışiklikler yapılmış en uygun oranın %0.002 (a/h) olduğu tespit edilmiştir.

Miktar tayini yönteminde iç standart olarak kullanılan ampisilin sodyumun cevabının da tekrarlanabilir ve hassas sonuç verdiği gözlenmiş, geliştirilen yöntemin ampisilin sodyumun miktar tayini yönteminde de kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Günlük hazırlanması gereken çözeltiler, türevlendirme için beklenmesi gereken süre, perklorik asitin soğuk kullanılması gibi dikkat edilmesi gereken noktalar belirlenmiş ve vurgulanmıştır.

VI. SONUÇ

Amoksisilinin insan plazmasında HPLC ile miktar tayini yöntemi, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği yönünden en uygun şartlar aranarak geliştirilmiştir. Floresans dedektör kullanılmış olup en uygun dalga boyunun eksitasyon için 355 nm, emisyon için 435 nm olduğu belirlenmiştir. Yöntem insan plazmasında bulunabilecek en düşük amoksisilin miktarını rahatça tayin edilebileceği ve analizin 10 dakika gibi kısa sürede tamamlanabileceği şekilde geliştirilmiştir.

Miktar tayini yönteminin belirlenmesinden sonra 0.1-20 µg/mL konsantrasyon aralığında FDA ve ICH kuralları doğrultusunda analitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Beş validasyon serisi yapılmış olup elde edilen kalibrasyon doğru grafiklerinin r^2 değerleri 0.99615-0.99993 arasındadır. Geliştirilen analitik yöntemin 0.1-20 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu kanıtlanmıştır. Kalite kontrol numunelerinin günler arası ortalama (%) doğrulukları 99.19-105.86; günler arası kesinlikleri (% RSD) 5.24-12.09 ve kalibrasyon standartlarının günler arası ortalama (%) doğrulukları 93.97-106.09; günler arası kesinlikleri (% RSD) 1.17-13.32 olarak bulunmuştur. Bağıl geri kazanım % 77.33 olarak hesaplanmış ve hazırlanan numunelerin oda ısısında 72 saat süreyle stabil olduğu belirlenmiştir.

Valide edilen yöntemin; farmakokinetik, farmakodinamik ve biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik çalışmalarında kolaylıkla kullanılabileceği belirlenmiştir.

VII. ÖZET

Bu çalışmada, antibakteriyel ilaçlar içerisinde önemli bir yere sahip bir β -laktam antibiyotiği olan penisilin türevi amoksisilin etkin maddesinin insan plazmasında HPLC yöntemiyle miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir.

Plazmadaki amoksisilin sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile organik çözücü sistemi içine alınmış, HPLC ve floresans dedektör kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Miktar tayininde dedektör eksitasyon için 355 nm, emisyon için 435 nm' ye; kolon sıcaklığı ise 40 °C' ye ayarlanmıştır. Hareketli faz akış hızı 1 mL/dak olup toplam analiz süresi 10 dakikadır. Yöntemde iç standart olarak ampisilin kullanılmıştır. Yöntemin 0.1 ile 20 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu kanıtlanmıştır. Bağıl geri kazanım ise % 77.33 bulunmuştur.

Miktar tayini yönteminin uygunluğu belirlendikten sonra FDA kurallarına göre valide edilmiştir. Validasyon sırasında özgünlük, seçicilik, doğruluk, kesinlik, doğrusalılık, geri kazanım ve stabilite parametreleri belirlenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen yöntemin amoksisilin etkin maddesine ait farmakokinetik, farmakodinamik ve biyoyararlanım biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılabilecek hassas, tekrarlanabilir ve kolay uygulanabilir olduğu belirlenmiştir.

VIII. SUMMARY

Within the context of this study, a method was developed for quantitative determination of a β -lactam antibiotic derived from penicillin and has significant importance among antibacterial drugs designated by the name of amoxicillin.

Amoxicillin in human plasma was incorporated to solvent system via liquid-liquid extraction method, and quantitative determination was performed by using HPLC and fluorescence detector. For the purpose of quantitative determination, detector was adjusted to 335 nm for excitation, to 435 nm for emission and column temperature was arranged to 40 °C. Run time was 10 minutes whilst the mobile phase flow rate was 1 ml/min. as internal standard; ampicillin was used while implementing the method. In the scope of this study, it was proved that the methodology is linear between 0.1-20 $\mu\text{g/mL}$ concentration interval. Relative recovery was calculated at 77.33%.

What follows the determination of method suitability is the validation of method according to FDA rules. Throughout the validation procedure, parameters of specificity, selectivity, accuracy, precision, linearity, recovery and stability were determined and the results were evaluated statistically.

After the validation studies it was determined that the developed methodology is sensitive, reproducible and easy to practice in the contemplation of pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioavailability bioequivalence studies of amoxicillin.

IX. KAYNAKLAR

1. Kayaalp S.O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, (2002)
2. Ertan M.: Antibiyotikler, Farmasötik Kimya, 2. baskı, 1096-1173, Ankara, (2004)
3. Dollery C.: Therapeutic Drugs, 2nd edition, A162-165, Churchill Livingstone, United Kingdom, (1999)
4. Reynolds J.E.: Martindale The Extra Pharmacopoeia, 30th edition, 115-116, The Pharmaceutical Pres, London, (1993)
5. Neu H.C., Winshell E.B.: Pharmacological studies of 6[D8-)-amino-p-hydroxyphenylacetamidol] penicillanic acid in humans., Antimicr. Ag. Chemother, 423-426, (1972)
6. Gordon R.C., Gamey C., Kirby W.M.M.: Comparative clinical pharmacology of amoxicillin and ampicillin administered orally, Antimicr. Ag. Chemother, 1, 504-507, (1972)
7. Kosmidis J., Willians D., Andrews J.: Amoxicillin-pharmacology, bacteriology and clinical studies, Br. J. Clin. Pract., 26, 341-346, (1972)
8. Jawetz E., Penisilinler ve Sefalosporinler, Temel ve Klinik Farmakoloji, Katzung B.G., 2., 904-912, Barış Kitabevi, İstanbul, (1995)

9. Handsfield H.H., Clark H., Wallace J. F., Holmes K.K., Turck M.: Amoxicillin a new penicilin antibiotic, *Antimicr. Ag. Chemother* 3, 262-265, (1973)
10. Neu H.C.: Antimicrobial activity and human pharmacology of amoxicillin, *J. Infect Dis.*, 129 suppl, 123-131, (1974)
11. Duplay D., *Physicians' Desk Reference (PDR)*, 52th edition, 2792-2805, Medical Economics Company, (1998)
12. Bell G.D., Powell K.U., Burridge S.M, Bowden A.N., Ramch B., Bolton G., Purser K., Harrison G., Brown C., Gant P.W., Jones P.H., Trowell J.E.: *Q. J. Med.*, 86, 743, (1993)
13. Bayerdörffer E., Lonovics J., Dite P., Diete U., Domjan L., Kisfalvi I., Megraud F., Pap A., Sipponen P., Burman C.F., Zeijlon L., *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13, 1639, (1999)
14. Ommaty R.: *Vademecum Modern İlaç Rehberi*, 29. Baskı, 128-129, (2006)
15. Ball A.P., Davey P.G., Geddes A.M., Farrei I.D., Brookes G.: *Lancet* 1 620-623, (1980)
16. Cullmann W., Dick W.: *Immun Infect.* 14, 188-190, (1986)
17. *Code Federal Regulation*, Title 21, 436, 204, (1976)
18. Davidson D.F.: *Clinical Chemistry*, 69, 67-71, (1976)
19. Barhaiya R.H., Turner P., Shaw E.: *Clinical Chemistry*, 77, 373-377, (1977)
20. Izquierdo P., Gomez-Hens A., Perez-bendito D.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11, 927-931, (1993)
21. Bird A.E., Bellis J.M., Gasson B.C.: *Analyst*, 107, 1241-1245, (1982)
22. Perez C.G., Martin I.g., De Aldana B.R.V.: *Journal of Pharmaccutical and Biomedical Analysis*, 9, 383-386, (1991)
23. Pajchel G., Pawlowski K., Tyski S.: CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 75-81, (2002)

24. Foulstone M., Reading C.: Antimicrobial Agents Chemother, 22, 753-762, (1982)
25. Miyazaki K., Ohtani K., Sunada K., Arita T.: Determination of ampicillin, amoxicillin, cephalixin and cephadrine in human plasma by high-performance liquid chromatography using fluorometric detection, Journal of Chromatography, 276, 478-482, (1983)
26. Masher H., Kikuta C.: Determination of amoxicillin in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after on-line oxidation, Journal of Chromatography, 506, 417-421, (1990)
27. Charles B., Chulavatnatol S.: Simple Analysis of amoxicillin in plasma by high performance liquid chromatography with internal standardization and ultraviolet detection, Biomedical Chromatography, 204-207, (1993)
28. Yuan Z., Russlie H.O., Canafax D.M.: Sensitive assay for measuring amoxicillin in human plasma and middle ear fluid using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography B, 674, 93-99, (1995)
29. Muth P., Metz R., Beck H., Bolten W.W., Vergin H.: Improved high-performance liquid chromatographic determination of amoxicillin in human plasma by means of column switching, Journal of Chromatography A, 729, 259-266, (1996)
30. Yuan Z., Russlie H.Q.: Canafax D.M., High-performance liquid chromatographic analysis of amoxicillin in human and chinchilla plasma, middle ear fluid and whole blood, Journal of Chromatography B, 692, 361-366, (1997)
31. Mascher H.J., Kikuta C.: Determination of amoxicillin in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography and on-line postcolumn derivatisation, Journal of Chromatography A, 812, 221-226, (1998)
32. Sorensen L.K., Snor L.K., Elkaer T., Hansen H.: Simultaneous determination of seven penicillins in muscle, liver and kidney tissues from

- cattle and pigs by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method, *Journal of Chromatography B*, 734, 307-318, (1999)
33. Zijtveld J., Hoogdalem E.J.: Application of a semipermeable surface column for the determination of amoxicillin in human blood serum, *Journal of Chromatography B*, 726, 169-174, (1999)
34. Menelaou A., Somogyi A.A., Barclay M.L., Bochner F.: Simultaneous quantification of amoxycillin and metronidazole in plasma using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection, *Journal of Chromatography B*, 731, 261-266, (1999)
35. Aghazadeh A., Kazemifard G.: Simultaneous determination of amoxycillin and clavulanic acid in pharmaceutical dosage forms by LC with amperometric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 325-329, (2001)
36. Hoizey G., Lamiabie D., Frances C., Trenque T., Kaltenbach M., Denis J., Millart H.: Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 661-666, (2002)
37. Wibawa J.I.D., Fowkes D., Shaw P.N., Barrett D.A.: Measurement of amoxicillin in plasma and gastric samples using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, *Journal of Chromatography B*, 774, 141-148, (2002)
38. Abreu L.R.P., Ortiz R.A.M.: HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration, *Journal Pharm Pharmacol Sci*, 6(2), 223-230, (2003)
39. Matar K.M.: Simple and rapid LC method for the determination of amoxicillin in plasma, *Chromatographia*, 64, 255-260, (2006)
40. Astigarraga R. E. B., The Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by LC-MS/MS, Protocol assay and method validation report, Galeno Research Unit, (2004)
41. Lindsay S., Wiley J.: *High Performance Liquid Chromatography* 2nd edition., London, (1992)

42. Shah, V.P., Midha, K.K.: Bionalytical Method Validation-A revist with a Decate of Progress, Pharmaceutical Research, 17(12), (2000)
43. Taylor, J.K.: Quality Assurance of Chemical Meassurements, Lewis, Chelsa, Mich., (1987)
44. Guidance for Industry Bioanalytical method Validation, FDA, (2001)
45. Smith, R.V., Stewart, J.T.: Textbook of Biopharmaceutic Analysis, Lea and Febiger, Philadelphia, (1981)
46. Haclfinger, P.: Limits of the Internal Standard Technique in Chromatography, Journal of Chromatography, 218, 73-81, (1981)
47. Shwartz, M. E., Krull, I. S.: Analytical Method Development and Validation, (1997)
48. Shah, V.P., Midha, K.K.: Bionalytical Method Validation: Bieequivalance/Bioavalibility and Pharmacokinetics Studies, Par. Research, 9(4), (1992)
49. Guidance for Industry Bioanalytical method Validation for Human Studies, FDA, (1998)
50. ICH Harmonisation Tripartite Guidline Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, (1996)

ÖZGEÇMİŞ

1983 Konya doğumluyum. 1993-1997 yılları arasında Konya Meram Anadolu Lisesinde ortaöğretimimi tamamladıktan sonra 1997 yılında başladığım Konya Meram Fen Lisesi'nden 2000 yılında mezun oldum. Aynı yıl kazandığım Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' ni 2004 yılı haziran döneminde bitirdim. 2005 yılı Bahar döneminde Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı' nda yüksek lisans programına başladım. 2004 yılı haziran-ağustos ayları arasında Türk Eczacıları Birliği Reçete Kontrol Biriminde eczacı olarak görev yaptım. 2004 yılı Eylül ayından itibaren Novagenix Biyoanalitik İlaç AR-Ge Merkezi' nde biyoanalist olarak çalışmaktayım.