

**SEFUROKSİM AKSETİL'İN BİYOANALİTİK
YÖNTEM VALIDASYONU**

Atakan TURAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi - 2013

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEFUROKSİM AKSETİL'İN BİYOANALİTİK
YÖNTEM VALİDASYONU**

Atakan TURAN

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

**ERZURUM
2013**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

SEFUROKSİM AKSETİL'İN BİYOANALİTİK
YÖNTEM VALİDASYONU

Atakan TURAN

Tez Savunma Tarihi : 22.02.2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Ortak Danışman : Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATİLA

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zuhale GÜVENALP

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Bilal YILMAZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Kadir Özden YERDELEN

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2013

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VI
ABSTRACT	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Antibiyotik	4
2.1.1. Antibiyotik Direnç Gelişim Mekanizmaları.....	5
2.1.1.1. Fenotipik (Doğal) Direnç	6
2.1.1.2. Kalıtsal (Kazanılmış) Direnç.....	6
2.1.2. Beta - Laktam Antibiyotikler	8
2.1.2.1. Penisilinler.....	9
2.1.2.2. Sefalosporinler.....	9
2.1.2.3. Karbapenemler	12
2.1.2.4. Monabaktamlar	13
2.1.2.5. Beta – Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	14
2.2. Gen Transferi.....	17
2.2.1. Gen Transferinin Önemi	17
2.2.2. Gen Transferi.....	17
2.2.2.1. Transformasyon.....	18
2.2.2.2. Konjugasyon.....	19
2.2.2.3. Transdüksiyon	20
2.2.2.4. Elektroporasyon.....	20

2.2.2.5. Protoplast Transformasyonu.....	21
2.3. Kanın Yapısı ve Özellikleri.....	21
2.4. Sefuroksim Aksetil	22
2.4.1. Sefuroksim Aksetil'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	22
2.5. Sefuroksim Aksetil'in Farmakolojisi ve Etki Mekanizması	23
2.6. Sefuroksim Aksetil İle Gerçekleştirilen Çalışmalar	24
2.7. Spektroskopik Yöntemler	30
2.7.1. Işının Absorplanması	31
2.7.1.1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları.....	32
2.7.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi.....	33
2.7.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar	36
2.7.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri	36
2.7.3.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler	37
2.7.3.2. Çift Işınlı Spektrofotometreler	37
2.7.4. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları.....	38
2.7.4.1. Kalitatif Analiz ve Molekül Yapısını Aydınlatma	39
2.7.4.2. Kantitatif Analiz	40
2.8. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi.....	40
2.8.1. Teorik Temelleri.....	41
2.8.2. Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi	43
2.8.3.Türev Spektroskopisi Yönteminin Uygulamaları.....	44
2.9. Kromatografik Yöntemler.....	44
2.9.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması	46
2.9.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar	48
2.9.2.1. Dağılma Kromatografisi	48

2.9.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi	48
2.9.2.3. İyon Değişirme Kromatografisi.....	49
2.9.2.4. Boyut-Eleme Kromatografisi	49
2.10. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	50
2.10.1. Normal ve Ters Faz Dolguları.....	51
2.10.2. Sıvı Kromatografi Cihazları	51
2.10.3. Kromatografide Temel Kavramlar	52
2.10.4. Dedektörler	56
2.10.5. Ters-Faz Sıvı Kromatografide pH ve Seçicilik	58
2.10.6. İyonlaşma ve pH.....	58
2.10.7. Hareketli Fazda pH Standardizasyonu	59
2.11. Sıvı Kromatografik Yöntemle pKa Tayini.....	60
2.12. Geçerlilik Testi (Validasyon)	61
2.12.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik	62
2.12.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)	62
2.12.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi.....	63
2.12.4. Duyarlılık	63
2.12.5. Miktar tayin alt sınırı	63
2.12.6. Gözlenebilme (teşhis) sınırı	63
2.12.7. Tutarlılık.....	63
2.12.8. Geri Kazanım	64
3. MATERYAL ve METOD	65
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler	65
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	66
3.3. Yöntemler.....	67

3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem Koşulları	67
3.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları.....	67
3.3.3. Sefüroksim Aksetill’ in Plazmadan Ekstraksion Prosesi.....	67
3.3.4. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri	68
3.3.4.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	68
3.3.4.2. Doğruluk/Kesinlik ve Geri Kazanım	69
3.3.4.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)	69
3.4. Tabletlerin Hazırlanması.....	69
4. BULGULAR.....	71
4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi	71
4.1.1. Standart Çözelti ve Farmasötik Preparatlara Uygulanması	71
4.1.1.1. Standart ve Kalite kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	71
4.1.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	72
4.1.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	78
4.1.2. UV- Görünür Bölge Spektrofotometri Yönteminin Plazma Çalışması	79
4.1.2.1. Plazma Standart Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	79
4.1.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	80
4.2. Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi.....	84
4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	84
4.2.1.1.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu).....	85
4.2.2. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	92
4.3. HPLC Yöntemi.....	93
4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi Geliştirme	93
4.3.2. Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	94
4.3.3. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri	94

4.3.3.1. Özgünlük (Belirleyicilik)	94
4.3.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı.....	95
4.3.3.3. Doğruluk/Kesinlik	96
4.3.3.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt sınırı (LOQ).....	97
4.3.3.5. Geri Kazanım.....	98
4.3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	102
5. TARTIŞMA	104
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	110
KAYNAKLAR	111
EKLER	120
EK 1. ÖZGEÇMİŞ	120
EK 2. ETİK KURUL ONAYI.....	121

TEŞEKKÜR

Fikirlerini, çalışma azim ve kararlılığını daima örnek aldığım, bilgi ve tecrübesini her durumda rehber edindiğim, maddi ve manevi desteğini ihtiyaç duyduğum her an bana cömertçe sunan Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na, en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bilgi, tecrübe ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgmeden beni destekleyen, çalışma yaşantımın her aşamasında yanımda olan ve beni yönlendiren yardımcı danışmanım olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Alptuğ ATILA'ya, bu çalışmanın hazırlanmasında ve düzenlenmesinde bilgisi, tecrübesi ve ince fikirleri ile önemli katkılar sağlayan değerli Sayın Araş. Gör. Onur ŞENOL ve Araş. Gör. Emrah YAMAN'a, Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, akademik yaşantımın her anında yanımda ve bana destek olan, maddi ve manevi anlamda hiçbir yardımı esirgemeyen, güler yüzleri, enerjileri ve paylaşımları ile gücüme güç katan Analitik Kimya Anabilim Dalı üyesi değerli çalışanlarına, öğrencilik yıllarım da dahil olmak üzere, daima gülen yüzleri, iyi niyetli ve yardımsever tavırları ile bana ellerinden gelen her yardımı sağlayan Eczacılık Fakültesi'nin ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına, yüksek lisans yaptığım süre içerisinde bana kolaylık sağlayan Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi çalışma arkadaşlarıma, yüksek lisans çalışmam süresince sağlamış oldukları öğrenim bursu için TÜBİTAK'a, benim, tüm varlığımla bugünlere gelmemde en büyük payın sahibi olan, iyi günümde kötü günümde bana daima sahip çıkan, var olduklarını bilmenin bile bana sonsuz güç verdiği sevgili Annem ve Babam'a, varlığının önemini ve kıymetini kelimelerle ifade edemeyeceğim vefalı dostum Nusret KARDELEN'e, bana hayatımın en büyük dersini veren, zamanımı ekonomik kullanmam konusunda yardımcı olan, hayatın ne kadar lezzetli olduğunu gösteren ve sevgi kelimesinin karşılığı olan Sayın Ayşegül TURAN'a, bu vatan toprağının bağımsızlığı için kan dökmüş, bizim bu çalışmaları özgür ve korkmadan yapmamızı sağlayan aziz şehitlerimize teşekkürü bir borç bilir, en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Atakan TURAN

ÖZET

Sefuroksim Aksetil'in Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

Amaç. Sefuroksim aksetil etkin maddesinin standart çalışma çözeltilerinde ve tabletlerde miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri, Birinci Derece Türev Spektrofotometri ve HPLC yöntemleri ile plazmada sefuroksim aksetil miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot. Spektrofotometrik ölçümler 200-300 nm dalga boyu aralığında Thermospectronic çift ışıklı UV-Görünür Bölge spektrofotometresi kullanıldı. Çalışma, 1 cm kuvarz küvetlerde, 277 nm / dak dalga boyu tarama hızı ve 2 nm spektral bant genişliği kullanılarak gerçekleştirildi. HPLC çalışmasında, C₁₈ (250x4,6 mm,5µm) kolon, De-iyonize su (% 0,1'lik asetik asit)- Asetonitril (30:70; v/v) den oluşan mobil faz, 1.0 mL/dk. akış hızı, 280 nm dalga boyu, internal standart olarak etodolak ve 10 µL enjeksiyon hacminden oluşan çalışma parametreleri kullanıldı.

Bulgular. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve Birinci Derece Türev Spektrofotometri yöntemleri 1-35 µg/ mL derişim aralığında, HPLC yöntemi ise 0.3-12 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi. HPLC çalışmasında internal standart olarak 2.5 µg/mL derişimde etadolak kullanıldı. Her üç yöntemin doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, doğrusallık ve hassasiyet parametreleri belirlendi.

Sonuç. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan her üç yöntem Türkiye'de şu anda kullanılmakta olan 4 ilaç müstahzarına (Cefaks, Cefurool, Aksef ve Enfexia) başarıyla uygulandı. Sonuç olarak; geliştirilen yöntemlerin hassas, doğru, kesin ve duyarlı

olduğu, ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sefuroksim aksetil, UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi, Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi, HPLC, Tablet

ABSTRACT

Bioanalytical Method Validation of Cefuroxim Axetil

Aim. It is aimed to develop and validate the first order derivative spectrophotometry, the UV-Visible spectrophotometry and the HPLC method for cefuroxim axetil standards and pharmaceutical preparations and also UV-Visible spectrophotometry method in spiked human plasma samples.

Material and Method. Spectrophotometric determinations were done by double beamed UV-Vis spectroscopy instrument between 200 and 300 nm. wavelength. This study was performed using 1 cm. quartz cuvette and 277 nm spectral bandwidth. In HPLC-UV study, parameters were chosen as follows: C₁₈ (250x4,6 mm,5µm) column, mobile phase of %0.1 acetic acid-acetonitrile (30:70; v/v), 1.0 mL/min of flow rate, 280 nm of wavelength, 10 µL of injection volume and etodolac as internal standard.

Results. Calibration curves of UV-Visible Spectrophotometry and first-order derivative spectrophotometry methods were linear between the concentration range of 1-35 µg/mL, while the concentration range is between 0.3-12µg/ mL in HPLC. In HPLC study, 2.5 µg/mL concentration of etadolac was added as internal standard to each sample. Accuracy, precision, recovery, precsion, lineerity and sensitivity parameters were determined for each of the three methods.

Conclusion. Developed and validated methods were succesfully applied on 4 pharmaceutical forumlation which are named as Cefaks, Cefurol, Aksef ve Enfexia. As a result, it is claimed that propoesd method is sensitive, precise, accurate and succesfully used in quality control studies in drug industry.

Key Words: Cefuroxim Axetil, UV-Vis Spectrphotometry method, First-order Spectrophotometry method, HPLC, Tablet

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSS	: Bağıl Standart Sapma
CARB	: Karbenisilinazlar
ESBL	: Extended-spectrum β -lactamase
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IS	: İnternal Standart
LOD	: Gözlenebilme (teşhis) sınırı
LOQ	: Miktar tayin alt sınırı
μg	: Mikro Gram
μL	: Mikro Litre
MBK	: Minimal bakterisidal derişimi
MİK	: Minimal inhibitor derişimi
Nm	: Nanometre
OMP	: Outer Membrane Protein (Dış membran proteinlerinde)
OXA	:Oksasilinazlar
PBP	: Penisilin bağlayan protein
SFA	: Sefuroksim Aksetil
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Gen Transferinde Pilusun Bir Köprü Olarak Kullanılması	19
Şekil 2.2. Transdüksiyon	20
Şekil 2.3. Sefuroksim Aksetil'in Kimyasal Yapısı	22
Şekil 2.4. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması	31
Şekil 2.5. Bir molekül için elektronik, titreşimsel, rotasyonel enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı	34
Şekil 2.6. Absorblayan bir çözeltiye giren P_0 şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması	35
Şekil 2.7. Tek Işınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi	37
Şekil 2.8. Çift ışınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi.....	38
Şekil 2.9. Absorbans ve Türev Spektrumları.....	42
Şekil 2.10. a-) Gauss eğrisinin 1. tek tek ve 2. karışım halindeki spektrumları, b-) Gauss eğrisinin karışım halindeki 1.- 4. türev eğrileri.....	42
Şekil 2.11. Türev spektrumlarının değerlendirilmesi a) Pikten pike ölçüm, b) Pikten sıfıra ölçüm, c) Teğet ile ölçüm	44
Şekil 2.12. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi	45
Şekil 2.13. Kromatografinin fazlara göre sınıflandırması	47
Şekil 2.14. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü	52
Şekil 2.15. Sıvı kromatografide bir kromatogram	53
Şekil 2.16. Ayırma gücü (R_s) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi.....	56
Şekil 4.1. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 $\mu\text{g/mL}$ derişimdeki standart sefuroksim aksetil çözeltilerinin UV-Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları.	71

Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrisi.	72
Şekil 4.3. Cefaks tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometre absorpsiyon spektrumları.	75
Şekil 4.4. Aksef tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometri absorpsiyon spektrumları.	76
Şekil 4.5. Cefurol tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometri absorpsiyon spektrumları.	77
Şekil 4.6. Enfexia tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometri absorpsiyon spektrumları.	78
Şekil 4.7. 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 30 µg/mL derişimlerde sefuroksim aksetil plazma çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları	80
Şekil 4.8. UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemin plazmadan ekstrakte edilen sefuroksim aksetil kalibrasyon eğrisi.....	81
Şekil 4.9. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/ mL derişimlerde sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin birinci derece türev spektrumları. ...	85
Şekil 4.10. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde 298 nm dalga boyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi	86
Şekil 4.11. Cefaks tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev spektrumları	89

Şekil 4.12. Aksef tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev absorbsiyon spektrumları.....	90
Şekil 4.13. Cefurol tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev absorbsiyon spektrumları.....	91
Şekil 4.14. Eenfexia tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev absorbsiyon spektrumları.....	92
Şekil 4.15. HPLC yönteminde, 2.5 µg/mL derişimnde etodolak (IS) içeren 0.3, 0.5, 1, 3, 6 ve 12 µg/mL derişimlerde sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin kromatogramları.....	94
Şekil 4.16. 6 µg/mL derişimde standart sefuroksim aksetil çözeltilisinin HPLC kromatogramı.....	95
Şekil 4.17. HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisi	95
Şekil 4.18. Sefuroksim Aksetil' in kalite kontrol çözeltilerine ait kromatogramlar	97
Şekil 4.19. 2.5 µg/mL derişimdeki sefuroksim aksetilin standart çalışma tablet çözeltilerinin kromatogramı.....	98
Şekil 4.20. 2.5 µg/mL derişimindeki Aksef tablet çözeltilisine 0.4 µg/mL, 4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.....	99
Şekil 4.21. 2.5 µg/mL derişimindeki Enfexia tablet çözeltilisine 0.4 µg/mL, 4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.....	100
Şekil 4.22. 2.5 µg/mL derişimindeki Cefurola tablet çözeltilerine 0.4 µg/mL, 4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.....	101

Şekil 4.23. 2.5 µg/mL derişimindeki Cefaks tablet çözeltilerine 0.4 µg/mL,
4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma
çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.102

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Parentenal Kullanılan Sefalosporinler.....	11
Tablo 2.2. Oral Sefalosporinler	11
Tablo 2.3. Türkiye’de Bulunan Sefalosporinler.	12
Tablo 3.1. Sefuroksim Aksetil için HPLC-UV yöntem şartları	67
Tablo 4.1. Sefuroksim Aksetil’e ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler	73
Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometrik yöntemin günüçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri	74
Tablo 4.3. Farmasötik Preparat Cefaks tabletin analitik geri kazanım değerleri	75
Tablo 4.4. Farmasötik Preparat Aksef tabletin analitik geri kazanım değerleri.....	76
Tablo 4.5. Farmasötik Preparat Cefurox tabletin analitik geri kazanım değerleri	77
Tablo 4.6. Farmasötik preparat Enxex tabletin analitik geri kazanım değerleri	78
Tablo 4.7. Dört farklı ticari preparatta sefuroksim aksetil miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin uygulaması	79
Tablo 4.8. Plazma çalışmasında Sefuroksim aksetil’ e ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler	81
Tablo 4.9. Plazma çalışmasında yöntemin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	83
Tablo 4.10. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri.....	84
Tablo 4.11. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminin kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler	86
Tablo 4.12. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	88

Tablo 4.13. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat	
Cefaks tabletin analitik geri kazanım değerleri	89
Tablo 4.14. Birinci türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat Aksef	
tablet in analitik geri kazanım değerleri	90
Tablo 4.15. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat	
Cefuro l tablet in analitik geri kazanım değerleri	91
Tablo 4.16. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat	
Enfexia tablet in analitik geri kazanım değerleri	92
Tablo 4.17. Dört farklı ticari preparatta sefuroksim aksetil miktar tayini için Birinci	
Derece Türev Spektrofotometri yönteminin uygulaması	93
Tablo 4.18. Sefuroksim Aksetil kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	96
Tablo 4.19. HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri...	97
Tablo 4.20. HPLC yönteminde farmasötik preparat Aksef tablet in analitik geri kazanım	
değerleri.....	99
Tablo 4.21. HPLC yönteminde farmasötik preparat Enfexia tablet in analitik geri	
kazanım değerleri.....	100
Tablo 4.22. HPLC yönteminde farmasötik preparat Cefuro l tablet in analitik geri	
kazanım değerleri.....	101
Tablo 4.23. HPLC yönteminde farmasötik preparat Cefaks tablet in analitik geri	
kazanım değerleri.....	102
Tablo 4.24. Dört farklı ticari preparatta sefuroksim aksetil miktar tayini için HPLC	
yönteminin uygulaması	103

1. GİRİŞ

Mantar veya benzeri mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların ve başka canlıların gelişmesini durdurma ve hatta bunları öldürme gücü bulunan doğal ya da kimyevi maddelere "antibiyotik" denir.¹

Beta-laktam (β -laktam) antibiyotikler, gerek hastane içinde gerekse hastane dışında en sık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında gelmektedir. Yaygın olarak kullanılan β -laktam antibiyotiklere karşı direncin giderek artması kaçınılmazdır. Bakteriler, farklı mekanizmalarla β -laktam antibiyotiklere direnç geliştirmektedir.² β -laktam antibiyotiklere karşı oluşan dirençte en sık gözlenen mekanizma, Beta-laktamaz (β -laktamaz) enzimleri ile bu antibiyotiklerin inaktive edilmesidir.^{2,3} β -laktamaz sentezi bakterilerde plazmid, transpozon yada kromozom kontrolündedir.⁴ β -laktamaz plazmidleri, bakterilerin antibiyotiklere karşı direncinin hızla yayılmasına yol açmıştır. β -laktamazlara duyarlı antibiyotikler, β -laktamaz sentezleyen mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlarda kullanılmaz hale gelmiştir.⁵ β -laktamazların tiplendirilmesi, bu enzimler yoluyla oluşan direncin daha iyi anlaşılması ve bunlara karşı önlem alınması açısından gereklidir.⁶

Beta-laktam (β -laktam) antibiyotikler grubunda yer alan sefalosporinlerin 1940'lardaki keşiflerinden sonra yaygın olarak kullanılan β -laktam grubu antibiyotiklerdir. Tüm sefalosporinler 7-amino sefalosporinik asit çekirdeğinden türetilmişlerdir. Yapılan yan zincir ilaveleri ile antibakteriyel aktivite ve farmakokinetiklerinde değişimler elde edilmiştir. Sefalosporinler için çeşitli sınırlamalar yapılmış ancak bunlardan en yaygın olanı gram negatif basiller karşısındaki etki spektrumlarına göre yapılan veya jenerasyon sınıflamasıdır.⁷ Buna göre 4 kuşak vardır:

1. kuşak sefalosporinlerin spektrumu dardır ve gram pozitif koklara etkileri belirgindir. Enterekoklar ve metisiline dirençli stafilokoklar hariç gram pozitif kokların

çoğuna etkilidir. Ayrıca *E. Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* gibi bazı gram negatif basillere de etkilidirler.

2. kuşak sefalosporinlerin gram pozitif koklara etkileri değişmekle birlikte gramnegatiflere etkileri artmıştır. Özellikle *Haemophilus influenzae*'ye karşı etkilidirler.

2. kuşak içerisinde yer alan sefamisinler anaeroblara en etkili sefalosporinlerdir.

3. kuşakta yer alan sefalosporinler gram negatif bakterilere çok etkili iken stafilokoklara etkinlikleri azdır.

4. kuşak sefalosporinler *Pseudomonas aeruginosa* da dahil olmak üzere gram negatif bakterilere ve gram pozitif koklara etkilidir.

Sefalosporinler diğer bütün β -laktam antibiyotikler gibi bakteri hücre duvarı yapımını bozarak etki göstermektedir. Tüm β -laktam antibiyotiklerin hedefi hücre duvar sentezinin transpeptidasyon evresinde rol alan penisilin bağlayan proteinleri (PBP) inhibe etmektir. Gram negatif basillerde içi su dolu porinleri geçerek, gram pozitif bakterilerde ise direkt olarak bu hedefe bağlanırlar. Transpeptidasyon aşamasının gerçekleşmemesi sonucu bakteri duvarı tam olarak sentezlenemez ve iç basınçtan dolayı bakteri lizisine uğrar. Sefalosporinler bakterisidal ajanlardır.⁸

Sefalosporinlerde de yeni moleküller geliştikçe bakterilerin oluşturduğu direnç oranı ve direnç türü de artış göstermiştir. Sefalosporinlere direnç başlıca üç mekanizma ile gelişmektedir. Bunlar:

1-İlacın peptidoglikan tabakadan geçişinin engellenmesi,

2-PBP'lerin ilaca affinitelerinin azalması,

3-Beta-laktamaz enzimi ile ilacın parçalanmasıdır.

Gram-negatif bakterilerde direnç her üç mekanizma ile gelişirken, gram pozitif bakterilerde dış membran olmadığından direnç ilk iki mekanizma ile gelişir.⁹

Sefuroksim aksetil 2. kuşak sefalosporin grubuna ait ilaçlardan olup güçlü antibakteriyel etkisi nedeniyle geniş kullanım alanı bulmaktadır. Sefuroksim Aksetil ile ilgili doğrudan miktar tayinine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Çoğunlukla sefuroksim ve sefuroksim sodyum ile ilgili çalışmalara rastlanmaktadır.¹⁰

Antibiyotik olarak geniş kullanım alanına sahip sefuroksim aksetil' in yapılan literatür taramalarında plazma ve farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik bilimsel çalışmalara ulaşılmıştır. Bu çalışmada, sefuroksim aksetil etkin maddesinin standart çalışma çözeltilerinde ve tabletlerde miktar tayini için UV- Görünür Bölge Spektrofotometri, Birinci Derece Türev Spektrofotometri ve UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri ile plazmada sefuroksim aksetil miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotik

Mantar veya benzeri mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların ve başka canlıların gelişmesini durdurma ve hatta bunları öldürme gücü bulunan doğal ya da kimyevi maddelere "antibiyotik" denir.¹ Antibiyotikler tıpta kullanılan tüm ilaçlar içinde “mucize ilaç” olarak isimlendirilebilmektedirler. Kullanıma girmelerinden günümüze kadar uzun bir süreç geçmemesine rağmen bu ilaçlar ile ilgili gelişmeler hızla artmış aynı zamanda kullanımları sırasında ve sonrasında ortaya çıkan önemli sorunlar da gündeme gelmiştir. Bu sorunların başında ise antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç yer almaktadır.¹¹ Beta-laktam grubu antibiyotikler, günümüzde en yaygın kullanılan ve "betalaktam" halkası olarak adlandırılan ortak kimyasal molekülleri ile diğer antibiyotiklerden ayırdedilen antibiyotik grubudur. İlk olarak 1928 yılında besiyerine tesadüfen düşen *Penicillium notatum* türü mantarın çevresinde stafilokok türü bakterilerin üreyememesi nedeniyle dikkat çekmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu 1949 yılında penisilin G geliştirilerek klinik kullanıma sunulmuştur. Sonraki yıllarda geliştirilen yeni beta-laktam grubu antibiyotiklerin tümü, ortak molekül olan beta laktam halkasına bağlı aminoasitler üzerinde yapılan çeşitli modifikasyonlar sonucunda şekillendirilmiştir.⁷ Penisilin ve diğer antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki başarıları, bu ilacın yaygın ve de bir çok zamanlarda gereksiz ve yanlış kullanımlarına neden olmuştur. Bu şekilde ki kullanımlar, bugün bütün dünyada enfeksiyon hastalıklarının tedavisindeki en önemli sorun olan antibiyotiklere dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonları ortaya çıkarmıştır. Genelde tek veya birçok antibiyotiğin yüksek derişimlerine karşı direnç oluşumu; otonom olarak self replikasyonla ya da plazmid olarak adlandırılan ekstra kromozomal DNA yapıları aracılığı ile meydana gelmektedir. Antibiyotiklere karşı gelişen direçlilik, hücre zarı

geçirgenliğinin değişimi, metabolik yol ve enzimlerin değişim göstermesi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün kaybolması şeklinde gelişebilmektedir. Antibiyotik tedavisi sırasında kullanılan bazı antibiyotiklere hassas olan izolatların dirençli hale geçtiği bilinmektedir. Bu tamamen patojenik bakterilerin antibakteriyel tedaviye direnç göstermesi olup, çok değişik ortamlarda genetik bilgi aktarımından kaynaklandığı şeklinde açıklanabilmektedir.¹² *Entrobacteriaceae* grubundan en az 20 farklı tip bakteri türü mevcut olup bunlar plazmid alıp verebilmektedirler. Evsel ve endüstriyel atık suların, alıcı ortam olan yüzeysel sulara verilmesi neticesinde, içme sularının plazmid taşıyan bakterilerle kontaminasyona uğraması riski artarken buna bağlı olarak oluşabilecek enfeksiyonlarda tedavi başarısı da azalmaktadır. Birçok ilaca dirençli olan patojen organizmaların insan ve hayvanlarda enfeksiyon yapmaları durumunda bunların antibiyotik dozları ve süresinde edilebilirlikleri azalacak veya olanaksız bir hal alacaktır.

2.1.1. Antibiyotik Direnç Gelişim Mekanizmaları

Mikroorganizmalar kendilerini yok etmek için kullanılan antimikrobik maddelere karşı er ya da geç karşı koyma gücü yani direnç kazanmaktadır. Antimikrobiklere gelişen direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek bir düzeyde çok önemli bir sorundur. Başta hastanelerde çok ilaç dirençli izolatlar ile gelişen hastane enfeksiyonları hastanede kalışı ve ölüm oranlarını artırmakta ve oldukça fazla ek bir mali yük oluşumuna neden olmaktadır. Günümüzde sadece hastane kökenleri değil toplumdan kazanılmış kökenlerde de direnç önemli oranlarda artmakta, bu olay sorunu daha da büyütüp ciddi boyutlara taşımaktadır.⁹ Mikroorganizmaların antibiyotik maddelere karşı direnç geliştirdiklerine dair ilk önemli yayın 1907 yılında Paul Erlich tarafından arsen bileşiklerinin Trypanosomiasis'e karşı kullanımlarında tespit edilmiş ve yayınlanmıştır. Sülfonamid ve antibiyotiklerin tıp ve veterinerlikte kullanılmaya

başlamasıyla birlikte, bu ilaçlara karşı bakterilerde direnç gelişmesi de tespit edilmeye başlanmıştır. Bir antibiyotik maddeye karşı dirençli hale gelen bir mikroorganizma türünde bu kemoterapotik maddeye yapıcı veya etki tarzı bakımından yakın diğer antibiyotiklere karşı da direnç gelişebilir, bu duruma çapraz direnç (cross resistance) denir. Mikroorganizmanın yapısı ve etkisi farklı birçok antibiyotik maddeye karşı dirençli hale gelmesi durumuna ise çok ilaca dirençlilik (multiple-drug resistance) denir. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç doğal (intrinsik) ve kazanılmış (genotipik, kalıtsal) direnç olmak üzere iki ana bölümde ele alınabilir.⁹

2.1.1.1. Fenotipik (Doğal) Direnç

Kalıtsal özellikte olmayan direnç tipidir. Bir organizmanın yapısı nedeniyle dirençli oluşu anlamına gelir. Burada genellikle antibiyotik maddenin bağlanarak etkili olduğu hedef molekülün olmaması ve ilacın hedefe ulaşmasını önleyen doğal engeller bu tip dirençten sorumludur. Bir antibiyotik maddeye doğal dirençli olan türün hiç bir kökeni o antibiyotikten etkilenmez. Genellikle ilaçların etkili olması için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekmektedir. Bakteri sporları veya dormant haldeki mikobakteriler gibi metabolik olarak inaktif mikroorganizmalar ilaçlara fenotipik olarak dirençli görülebilir, ama bunlardan oluşan yeni izolatlar ilaçlara duyarlıdır. Buna benzer şekilde bakterilerin hücre duvarsız L şekilleri hücre duvarı sentezini bozarak etkili olan antibiyotiklerden etkilenmezler. L şekilleri ana şekle dönüp hücre duvarlarını yeniden kazanınca antibiyotiklere duyarlı hale gelirler.⁹

2.1.1.2. Kalıtsal (Kazanılmış) Direnç

Kazanılan bir direnç tipidir. Burada bakteri popülasyonu antibiyotik madde ile ilk temasa geldiğinde ilaç mikroorganizma üzerine etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobik maddeye

karşı direnç gelişir. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç esas olarak bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli izolatlar ortaya çıkıp yayılmaktadır. Genetik direnç kromozom, plazmid, transpozun kontrolü altındadır.

a) Kromozomal Direnç: Bu tip direnç, kromozomda spontan mutasyon oluşması sonucu ortaya çıkmaktadır. Spontan mutasyonlar, bakteri hücresinin metabolik ara ürünleri ile bazı çevresel faktörlerle oluşabilir. Bunun neticesinde bakteri hücrelerinde yapısal farklılıklar oluşabilir ve hücrelerin ilaca karşı geçirgenliği azalabilir ya da hücre içerisinde ilacın hedefinde değişiklik olabilir. Ortamda antibiyotik bulunduğunda duyarlı organizmalar baskılanacağı için ilaca dirençli olanlar yararına bir seçim oluşacaktır. Ancak spontan mutasyon oluşma olasılığı $10^{-5} - 10^{-10}$ civarındadır ve bu nedenle klinikte bu tip direnç nadir görülür.¹³

b) Tolerans: Mikroorganizmalarda belirli antimikrobiklere karşı tolerans gelişmektedir. Tolerans; bir antibiyotik maddenin in vitro testlerde minimal bakterisidal derişiminin (MBK) artması sonucu MBK/MİK (minimal inhibitor derişimi) oranının 32'nin üstüne çıkışını ifade eder; bu oran normalde 2-4'tür. Tolerans, otolizinlerin etkinliğinin azalması sonucu olup *S. aureus* ve bazı streptokoklarda görülmektedir. Otolizinler mutasyon sonucu yitirmekte veya lipotaykoik asit tarafından inhibe edilebilmektedir; ayrıca her antibiyotik otolizinleri aktive edememektedir. Sonuçta ilgili antibiyotikle bakterinin üremesi durduğu halde bakteri bu ilaçların öldürücü ve eritici etkisine direnç göstermektedir.⁹

c) Plazmidlere Bağlı Direnç: Plazmidler kromozomdan bağımsız olarak çoğalan, kromozom dışı genetik elementlerdir. Plazmidler antimikrobiklere ve ağır metallerle direnç genleri yanında değişik virulans faktörlerini de taşıyabilirler. Klinikte görülen direncin ana sorumlusu plazmide bağlı dirençtir. R-plazmidi denen direnç plazmidleri bir veya daha çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç genlerini taşımaktadır.

Direnç plazmidleri diğer duyarlı bakterilere transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olaylarıyla geçerek direnç gen paketini aktarır ve böylece direncin yayılmasına neden olur. Vücuttaki normal floranın plazmid transferine karşı bir koruma sağladığı belirtilmektedir. Normal bağırsaksak florasının çoğunluğunu anaerob organizmaların oluşturduğu ve anaerob koşullarda plazmid transferinin inhibe edildiği, bu nedenle normal sağlıklı barsak florasının R-plazmidlerine karşı en iyi savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir.

R-plazmidleri yönünden mikroorganizmalar 3 gruba ayrılmaktadırlar:

1- Hastane dışı toplumda bulunan R-plazmidi içeren nonpatojen mikroorganizmalar: Bunlar diğer mikroorganizmalar için R-plazmidi kaynağıdır.

2- *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Serratia* sp. gibi fırsatçı patojenler: Bunlar bir antibiyotik seçilimi neticesinde R-plazmidi kazanıp birden ortaya çıkmaktadır. Hastane ortamında bulunmakta ve antibiyotik kullanımı dikkatsiz bir şekilde yapılırsa hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır.

3- Esansiyel patojenler: Bunlar birkez R-plazmidi alırlarsa antibiyotik seçilimi olsun ya da olmasın yayılarak salgınlara neden olmaktadır. Örneğin Chloramphenicol'e karşı dirençli *Salmonella* sp.' lerle oluşan salgınlara bu nedenle olmaktadır.¹³ Aminoglikozitler, sefalosporinler, kloramfenikol, makrolitler, penisilinler, sulfonamidler, nitrofurantoin, fusidik aside karşı gelişen dirençten genellikle plazmidler sorumludur.⁹

2.1.2. Beta - Laktam Antibiyotikler

Beta-Laktam antibiyotikler, bakterilerde hücre duvarının yapımına engel olmaktadır. Bu antibiyotiklerin hedefi, hücre duvar sentezinin transpeptidasyon evresini katalize eden “penisilin bağlayan proteinler” dir. Beta-Laktam antibiyotikler bu enzimlerle bağlanınca enzimin kendi substratına bağlanmasına engel olmakta, böylece

duvar sentezi engellenmekte ve bakteri lize uğramaktadır. Günümüzde birçok çeşidi bulunan beta-laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapılarına bakıldığında temelde 4 grupta toplandığı görülmektedir. Bunlar:

1. Penisilin grubu beta-laktam antibiyotikler
2. Sefalosporin grubu beta-laktam antibiyotikler
3. Karbapenemler
4. Monobaktam grubu beta-laktam antibiyotikler.

2.1.2.1. Penisilinler

Tıp alanında kullanılan en eski antibiyotiklerdir. Bakterisid aktiviteye sahip olmaları, tüm vücuda dağılım gösteren iyi bir farmako kinetik özellikleri, toksisitelerinin az olması, ucuz olması ve duyarlı olan bakteriyel enfeksiyonlarda etkin sonuçlar oluşturması gibi özelliklerinden ötürü pek çok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Penisilin grubu antibiyotikler, bakterinin hücre duvar sentezi sırasında transpeptidasyon aşamasında görevli olan ve transpeptidaz ismi ile de anılan penisilin bağlayan protein (PBP)'lere bağlanarak sentez aşamasında enzimin baskılanmasına neden olur. Enzimin baskılanmış olması peptidoglikan tabakalarına sağlam peptidoglikan monomerlerinin eklenmesini engelleyerek duvar bütünlüğünün bozulmasına ve bakterinin dış ortama karşı direncinin kaybına yol açar, stoplazma zarının parçalanmasına ve hücrenin ölmesine neden olur.⁷

2.1.2.2. Sefalosporinler

İlk olarak 1940'lı yıllarda *Cephalosporicum acremonium* isimli bir mantardan elde edilen sefalosporin C'nin bulunmasından itibaren, günümüze kadar moleküler özellikleri sürekli geliştirilerek antibakteriyel tedavide yaygın kullanılan antibiyotik

türlerinden biri durumuna gelmiştir. Birbirinden farklı özellikleri ve moleküler yapıları ile günümüzde dördüncü kuşak sefalosporinlere kadar farklı grupları kullanımdadır. Birinci kuşaktakiler gram pozitif koklara daha fazla etkili iken, üçüncü kuşaktakiler gram-negatif çomaklar üzerine daha fazla etkilidir. İkinci kuşak sefalosporinler bu özellikleri ile diğer iki grup arasında yer alırlar. Dördüncü kuşak sefalosporinlerin gram pozitif bakterilere etkisi birinci kuşak sefalosporinlere gram negatiflere etkisi de üçüncü kuşak sefalosporinlere benzerlik göstermekte ve indüklenebilir beta-laktamazlara karşı da dayanıklı olmaları nedeniyle diğerlerinden ayrılmaktadır. Sefalosporinlerin artan gram negatif bakteri etkinlikleri, beta-laktam halkasının 7. pozisyonunda bulunan "methoxy" grubu yerine bir hidrojen atomunun yerleşmesi ile gerçekleşmektedir. Sefalosporinler, bakterisid etkilerini penisilinlerde olduğu gibi hücre duvar sentezinde rolü olan PBP'leri inhibe ederek ve otolitik enzimleri aktive ederek gösterirler. Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısı gram pozitif bakterilerle kıyaslandığında daha incedir. Sefalosporinler peptidoglikan sentezi esnasında gram negatif bakterinin peptidoglikan tabakayı periplazmik aralık ve lipopolisakkarid tabakadan ayırarak yapısal bütünlüğün bozulmasına neden olur. Otolitik enzimlerin aktivasyonu duvar sentezinin kısa sürede bozulmasına katkıda bulunur. Sefalosporinlerde de yeni moleküller geliştikçe bakterilerin oluşturduğu direnç oranı ve direnç türü de artış göstermiştir. Sefalosporinlere direnç başlıca üç mekanizma ile gelişmektedir. Bunlar:⁷⁻⁹

- 1- İlacın peptidoglikan tabakadan geçişinin engellenmesi,
- 2- PBP'lerin ilaca affinitelerinin azalması
- 3- Beta-laktamaz enzimi ile ilacın parçalanmasıdır.

Tablo 2.1. Parentenal Kullanılan Sefalosporinler.⁸

1.Kuşak	Kullanım Şekli	Erişkin Dozu	Pediyatrik Dozu mg/kg/gün
Sefalotin	IV	0.5-2gr4-6saat	75-125
Sefazolin	IV/IM	0.5-1.5gr6-8saat	50-10
Sefapirin	IV/IM	0.5-2gr4-6saat	40-80
Sefradin	IV/IM	0.5-2gr4-6saat	50-100
2.Kuşak			
Sefamandol	IV/IM	0.5-2gr4-6saat	100-150
Sefonisid	IV/IM	5.5-2gr24saat	40
Sefuroksim	IV/IM	0.75-1.5gr4-6s	100-240
Sefoksitin	IV/IM	1-2gr4-6saat	80-160
Sefotetan	IV/IM	1-3gr12saat	40-80
Sefmetazol	IV	2gr6-12 saat	-
3.Kuşak			
Sefoperazon	IV/IM	2-4gr8-12 saat	100-150
Seftizidim	IV/IM	0.5-2gr8-12saat	90-150
Sefotaksim	IV/IM	1-2gr4-8saat	100-180
Seftizoksim	IV/IM	1-4gr8-12 saat	150-200
Sefriakson	IV/IM	0.5-2gr12-24s	50-100
4.Kuşak			
Sefpirom	IV/IM	1-2gr12saat	-
Sefepim	IV/IM	1-2gr12saat	50

Tablo 2.2. Oral Sefalosporinler.⁸

1.Kuşak	Erişkin Doz	Pediyatrik Doz
Sefalekssin	0.25-1gr6saat	25-100
Sefadroksil	0.5-1gr12-24saat	30
Sefradin	0.25-1gr6saat	25-50
2.Kuşak		
Sefaklor	0.25-0.5gr8saat	40
Sefuroksim aksetil	0.25-0.5gr12saat	30-40
Sefprozil	0.25-0.5gr12saat	30
3.Kuşak		
Sefiksim	0.2-12gr24saat	8
Sefpodoksim proksetil	0.2-0.4gr12saat	10
Seftibuten	0.2-0.4gr12saat	9
Sefdinir	0.3-0.6gr12-24saat	7-14

Türkiye’de kullanılan sefalosporinler ise aşağıdaki Tablo 2.3’te verilmiştir.

Tablo 2.3. Türkiye’de Bulunan Sefalosporinler.

1. Kuşak	2. Kuşak	3. Kuşak
Sefalotin	Sefaklor	Sefotaksim
Sefozolin	Sefuroksim	Seftizoksim
Sefaleksim	Sefuroksim aksetil	Seftriakson
Sefradin	Sefradin	Sefoperazon
Sefadroksil	Sefoktoksin	Seftazidim
		Sefiksim
		Sefoperazon+sulbaktam

2.1.2.3. Karbapenemler

Beta laktam grubu antibiyotiklerden olan karbapenemler, bugüne kadar geliştirilen en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Hem gram pozitif hem de gram negatif aerob ve anaerob bakterilere etkilidir. Klinik kullanımda bulunan iki üyesi imipenem ve meropenemdir. *Streptomyces cattleya*’dan (bir toprak mantarı) üretilen tienamisin bu grubun ilk etken maddesidir. Karbapenemler diğer beta-laktam üyeleri gibi yapısında beta-laktam halkası içerirler. Buna karşın diğer betalaktamlardan farklı olarak 1 pozisyonundaki karbon atomu sülfür ile yer değiştirmiştir. Ayrıca beş üyeli halka yapısının 2 ve 3 numaralı karbon atomları arasında da satüre olmamış bir çift bağ içerirler. Moleküldeki hidroksietil yan zincirinin beta-laktamaz stabilitesinden sorumludur. Bu yan zincir, penisilin ve sefalosporinlerin cis konfigürasyonundan farklı olarak karbapenemlerde trans konfigürasyonundadır. Bu farklılık karbapenemlere diğer beta-laktamlara oranla daha güçlü bir beta-laktamaz aktivitesi kazandırır. Meropenem imipenemden farklı olarak renal dehidropetidaz- 1 enzimine dayanıklı olduğundan yapısında silastatin bulunmaksızın tek başına kullanılabilir.⁷ Karbapenemler böylesine geniş spektrumlarına rağmen *E.faecium* ve metisiline dirençli *S.aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P.cepacia* gibi bakterilere etkisizdir. Bunların dışında

karbapenemler hücre içine giremediklerinden hücre içi parazitlere de etkili değildir. Buna karşın enterobakterilerin çoğunu 1µg/ml'lik minimum inhibitör derişiminin altındaki bir dozda inhibe ederler. Tüm beta-laktam antibiyotiklerde olduğu gibi karbapenemler PBP'lere bağlanıp, bakteriyel peptidoglikan sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Gram negatif bakterilerde imipenem daha çok PBP 1 ve 2'ye, meropenem de PBP 2 ve 3'e bağlanarak etkili olurlar. Oysa diğer penisilinler ve sefalosporinler PBP 3'e bağlanarak antibakteriyel etkiye yol açarlar. İmipenem belirtildiği gibi gerek gram-pozitif, gerek gram-negatif bakteriler tarafından sentezlenen beta-laktamazlara karşı dayanıklıdır. Ancak *X. maltophilia*'nın sentezlediği çinko içeren beta laktamaz enzim imipenemi kolaylıkla parçalamaktadır. İmipenem beta-laktamazlar ile hidrolize dayanıklı olmasının yanı sıra, beta-laktamazlara karşı iyi bir inhibitördür.¹⁴

2.1.2.4. Monobaktamlar

Monobaktamlar içeriğinde bulunan monosiklik yapıdaki çekirdek nedeniyle diğer beta-laktamlardan farklılık gösteren beta-laktam antibiyotiklerdir. Bu monosiklik beta-laktamlar *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Gluconobacterium*, *Flexibacterium* ve *Pseudomonas* gibi toprakta yaşayan değişik bakteriler tarafından üretilir. Çoğu zayıf antibakteriyel etkinlik gösteren bu bileşikler içinde günümüzde tek kullanılan monobaktam, *Chromobacter violaceum*'dan elde edilen aztroenamdır. Aztroenam gram negatif bakterilere etkili ancak diğer bakterilere karşı etkisizdir. Etkinliğini gram negatif bakterilerdeki PBP-3'e bağlanarak gösterir. Bu bağlanma sonucunda bakterinin yaşaması mümkün olmayan uzun filamentöz yapılar ortaya çıkar. Aztroenama karşı bakterilerde gözlenen en önemli direnç mekanizması beta-laktamaz aktivitesine bağlı enzimatik inaktivasyondur. Bush sınıflamasında grup 2 beta-laktamazlardan olan ESBL enzimleri tarafından kolayca hidrolize edilir. Aztroenama karşı gelişen direnç, bunun

dışında PBP 3'teki modifikasyon ve bazı *P.aeruginosa* suşlarında ortaya çıkan dış membran geçirgenliğinin azalması şeklinde de görülebilir.⁷

2.1.2.5. Beta – Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

β -laktam antibiyotiklere direnç üç yolla gelişir:

1. β -laktamaz enzimleriyle ilacın inaktivasyonu
2. PBP'lerde oluşan değişiklik sonucu antibiyotik hedefine bağlanamaz
3. Dış membran proteinlerinde (Outer Membrane Protein, OMP) oluşan

Değişiklikler sonucu ilacın hücre içine girememesi. Gram-negatif bakterilerde direnç her üç mekanizma ile gelişirken, gram pozitif bakterilerde dış membran olmadığından direnç ilk iki mekanizma ile gelişir.⁹

a. Beta-Laktamaz Enzimleriyle İlacın İnaktivasyonu

β -laktam antibiyotiklere karşı klinikte gelişen direncin en sık nedenidir. Gram pozitif bakteriler içerisinde beta laktamaz sentezleyen en önemli patojen *S. Aureus'* dur. Bu bakterilerin beta laktamazları serolojik olarak 4 tipe ayrılmıştır. Bunlardan A, B ve C tipleri indüklenebilen enzimlerdir. D ise konstitütif olarak sentezlenmektedir. *S. aureus* enzimleri plazmid kontrolündedir ve bakteriyofajlar aracılığı ile duyarlı hücrelere geçebilmektedir.

Gram negatif bakterilerde ise beta laktamazlar dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerde beta laktamaz enzimleri kromozon ya da plazmid kontrolünde sentezlenmektedir.¹⁵

1- Kromozomal beta laktamazlar: Pek çok Gram-negatif bakteride kromozom kontrolünde sentezlenen β -laktamazlar bulunmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri sefalosporinleri, penisilinlerden daha hızlı hidrolize eden, klavulanik asit ve sulbaktam gibi β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen Richmond-Sykes sınıflandırmasına göre

Tip I olarak belirtilen enzimlerdir. *E.coli*, *P.mirabilis* ve *Shigella* türlerinde enzim sentezi yapısal olup genellikle düşük düzeydedir. *P.aeruginosa*, *Enterobacter* türleri, *Serratia* türleri, *Morganella morganii* ve *Citrobacter freundii*'de Tip I enzimleri indüklenebilmektedir (bir repressör mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenen enzimin ortamda penisilin veya sefalosporin bulunması halinde sentezinde çok fazla artış olması durumu). Tip I enzim sentezleyen bakterilerde 10^{-5} - 10^{-7} sıklığında devamlı yüksek düzeyde enzim sentezleyen mutantlar oluşmaktadır (derepressed mutant); bunlar yeni sentezlenen sefalosporinlere direncin bir kısmından sorumludur.⁹

2- Plazmid kontrolündeki beta laktamazlar: Sayıları 50'den fazla olan bu enzimler dört ana grupta toplanır:

1. Geniş (broad) spektrumlu enzimleri (TEM-1, TEM-2, SHV-1),
2. Oksasilinazlar,
3. Karbenisilinazlar,
4. Daha geniş (Extended-spectrum β -lactamase) spektrumlu β - laktamaz (ESBL)

enzimler] toplanırlar.

Gram-negatif bakterilerde β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin büyük kısmından sorumludurlar. Geniş spektrumlu (broad spectrum) enzimler içinde en sık saptanan TEM- 1 ve SHV-1 enzimleridir. Bu enzimler ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin ve sefamandole direnç oluştururken yeni sefalosporinler, monobaktamlar ve sefamisinlere etkisizdirler. β -laktamaz inhibitörlerine ise duyarlıdırlar. Oksasilinazlar (OXA) oksasilinleri, karbenisilinazlar (CARB) ise karbenisilini hidroliz eden enzimlerdir, ilk kez *Pseudomonas* bakterilerinde tanımlandıkları için bu enzimler PSE enzimleri olarak isimlendirilmiştir; diğer bakterilerde de bulunmaktadır. ESBL enzimler (TEM-3 - TEM-26) ile (SHV-3 - SHV-5) *Klebsiella*, *E.coli*, *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* gibi izolatlarda

bulunmuşlardır. Bunlar sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve aztroenama karşı direnç oluştururlar. Bu enzimler sefoksitin, seftotetan ve β -laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Bu enzimler TEM veya SHV enzimlerinden 1–4 aminoasit değişikliği ile oluşmaktadır. TEM veya SHV’ den köken almayan PER–1 gibi ESBL enzimleri de bildirilmiştir. Günümüzde ESBL enzimlerinin sayısı 30’u aşmış durumdadır.⁹

b. PBP’ lerdeki Değişikliğe Bağlı Direnç

Bu direnç kromozomal mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. Bu ya PBP’nin beta laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması yolu ile ya PBP sayısında azalma olması veya beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP ‘in sentezlenmesi yoluyla olur. Bu mekanizma ile oluşan direnç bazı gram-pozitif koklarda ve *Pseudomonas* sp.’de gözlenmiştir. *N.gonorrhoeae*, *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*’de gözlenen penisilin direnci bu mekanizma ile oluşmaktadır. PBP’lerde oluşan diğer bir değişiklik de bakterinin beta-laktamlara dirençli yeni bir PBP sentezlemesidir. Methicilline dirençli *S.aureus*’da gözlenen direnç mekanizması da bu tip bir mekanizma sınıfına girmektedir.¹⁶

c. Dış Membran Proteinlerinde (Outer Membrane Protein, OMP) Oluşan Değişikler Sonucu İlacın Hücre İçine Girememesi

Son yıllarda özellikle *P.aeruginosa* izolatlarında bildirilmiştir. Özellikle enzimatik dirençle birlikte ise önemli düzeyde bir dirence yol açmaktadır. Buna örnek olarak *P.aeruginosa*’da imipenem direncinin kromozomal β -laktamaz aktivitesi ve D2 porin kaybına bağlı olması verilebilir.⁹

2.2. Gen Transferi

2.2.1. Gen Transferinin Önemi

Antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların varlığı antibiyotiklerin kullanılmasından bu yana problem oluşturmaktadır. Doğal olmayan bazı ortamlar mikrobiyal gen aktarımının irdelenebilmesi için uygun modellerdir. Bakteri genetiğinde önemli birçok gelişme, antibiyotiklere karşı gelişen direncin saptanması neticesinde gerçekleştirilmiştir.

Tıpta daha az bir öneme sahip olan diğer bir problem ise, en başta *E. Coli* olmak üzere, enterotoksigenik organizmalardan kaynaklanmaktadır. Bu organizmalar insanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Doğal ortam ve zirai bakımdan önemli olan fenotipler, taşınabilir replikonlar tarafından kodlanmaktadır. Bazı misaller hariç tutulursa bu replikonların transferinin doğaya sağladığı yarar belirsiz bir durumdadır. Ayrıca bu tip çalışmalar antibiyotiklere dirençlilik sağlayan genlerin yayılımındaki analoglar, genlerintransmisyonunun büyük ölçüde önem arz ettiğini ortaya koymuştur. *Rhizobiaceae*'nin bir cinsi olan *Agrobacterium sp.*'den tümör indükleyici (Ti) plazmidi, virulent olmayan *A. radiobacter* izolatlarına transfer olarak bu izolatı bitkiler için patojenik izolat haline dönüştürdükleri belirlenmiştir.¹⁷

2.2.2. Gen Transferi

Mikroorganizmalar arası gerek in-vivo gerekse in-vitro koşullarda gen transferi meydana gelmektedir. *Enterobacteriaceae*'lerde bu doğal aktarım olgusuna sıkça rastlanmaktadır.

Mikroorganizmalarda doğal yollarla genetik materyal 5 şekilde aktarılmaktadır:^{17,18}

- 1- Transformasyon
- 2- Konjugasyon
- 3- Transdüksiyon
- 4- Elektroporasyon
- 5- Protoplast Transformasyonu

2.2.2.1. Transformasyon

Eğer bir mikroorganizma, kendisine DNA kompozisyonu bakımından yakın olan başka bir mikroorganizmaya ait genetik materyalleri içeren bir ortamda üretilirse, belirli bir zaman sonra sıvı ortamdan uygun katı besi yerlerine ekimler yapıldığında bazı kolonilerin değişik morfolojide oldukları ve bunların genetik materyallerinin ait olduğu mikroorganizma kolonilerine benzediği gözlenir. *Diplococcus pneumoniae* 'nin canlı II-R izolatı öldürülmüş II-S izolatının DNA materyallerini bulunduran ortamda üretilirse, belirli bir zaman geçtikten sonra buradan katı besi yerine ekimler yapıldığında katı ortamda üreyen bazı kolonilerin II-S karakterinde olduğu gözlenmiştir. Bu olayda, sıvı ortamda üretilen canlı II-R izolatı vasatta bulunan ve kendisine genetik olarak çok yakın olan ölü II-S izolatına ait DNA segmentlerinden bazılarını alarak, S-karakterine dönüşmüş ve katı ortama ekilince S görünümünde ve patojenik mikroorganizma taşıyan koloniler meydana gelmiştir. Bu deneme in-vivo olarak da ispat edilebilir. Şöyle ki fareler önce öldürülmüş II-S izolatına ait DNA segmentleri verildikten sonra aynı farelere II-R canlı izolatı şırınga edilirse, farelerden bazılarının öldüğü gözlenir. Bu olayda, in-vivo olarak, II-R izolatı ürerken, II-S'e ait bazı DNA segmentlerini alarak patojenik S haline dönüşmüş ve fareleri öldürmüştür. Kontrol olarak bırakılan öldürülmüş II-S izolatı ile canlı II-R izolatı verilmiş fareler ise canlı kalırlar.^{18,19}

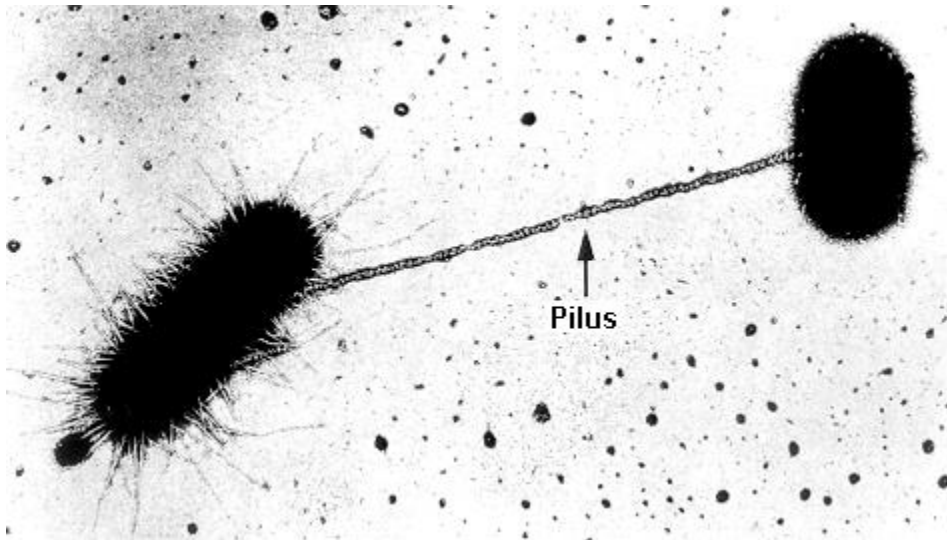
Transformasyon aşağıdaki beş aşamada gerçekleşmektedir;

- 1- Ortamda DNA 'nın var olması ya da ortama DNA verilmesi

- 2- Resipient konaklarda kompotent aşamanın indüklenmesi
- 3- DNA ile kompotent hücrenin ilişkiye geçmesi
- 4- DNA'nın hücre içresine girmesi ve aktif hale geçmesi
- 5- Yabancı DNA'nın fonksiyonel olarak integrasyonu ve hücre operonlarında ekspresyonu.²⁰

2.2.2.2. Konjugasyon

Bir bakteriye ait genetik maddenin (DNA), aynı cins içinde bulunan veya aynı türden diğer mikroorganizmaya direk temas veya seks pillusları aracılığı ile transfer edilmesine konjugasyon denir. Konjugasyon olayı bazı transfer genler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu konuda bilinen en iyi örnek *E. coli*'deki F faktörünü (fertilite faktörü) kodlayan seks pillusu gen transferinde bir köprü görevindedir.²¹



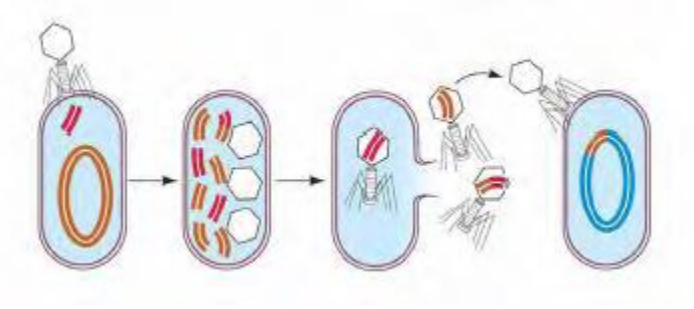
Şekil 2.1. Gen Transferinde Pilusun Bir Köprü Olarak Kullanılması

Konjugasyon plazmidle ilişkili olarak 10^{-8} 'de 1'e kadar olan bir sıklıkla değişebilmektedir. Ayrıca herhangi bir plazmidin transfer sıklığı çevresel faktörlerle de

ilişkilidir. Konjugasyon ile genlerin aktarımının doğal ortamlarda, karasal ortamlarda ve sucul ortamlarda gerçekleştiği bilinmektedir.²⁰

2.2.2.3. Transdüksiyon

Genlerin bir bakteriden diğer bakteriye fajlar yardımı ile aktarımına transdüksiyon denir. Gram-negatif (*Salmonella* sp., *E. coli*, *Shigella* sp., *Proteus* sp.vs.) ve gram-pozitif mikroorganizmalarda (*Staphylococcus* sp., basiller, vs.) bu tarz gen transferine rastlanmaktadır. Bakterilerde transdüksiyon doğal ortamlarda, karasal ortamlarda ve sucul ortamlarda gerçekleşebilmektedir.¹⁹



Şekil 2.2. Transdüksiyon

2.2.2.4. Elektroporasyon

Elektroporasyon kısa aralıklı ve yüksek voltajlı elektriksel pulslar uygulayarak hücre zarında geçici delikler oluşturmayı amaçlayan bir yöntemdir. Eğer bu porlar birbirine temas eden iki hücre arasında meydana gelmişse, bu durum hücrenin füzyonuyla gerçekleşir. Hücre zarında geçici delikler oluşturan hassas voltaj değerinin üzerine çıkılırsa, hücre zarında kalıcı hasarlar meydana gelir.²²

Elektroporasyon diğer transformasyon yöntemleriyle gen transferi gerçekleştirilememiş bakteriler için basit ve hızlı bir transformasyon yöntemidir. Transformasyon verimleri bakteriden bakteriye ve izolattan izolata da farklılıklar

göstermektedir. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin birçoğu önceden transforme olmaksızın bu yöntemle transforme olabilmektedirler.^{22,23}

2.2.2.5. Protoplast Transformasyonu

Kalın bir peptidoglikan tabakanın varlığı ile karakterize gram pozitif bakterilerde, bu kalınlıkta bir tabakaya sahip hücre duvarı DNA molekülünün hücreye girişini engelleyen potansiyel bir bariyer oluşturmaktadır. Bu nedenle başarılı transformasyon sistemleri daha çok gram-negatif bakterilerde elde edilmiştir. Bu sorunu çözmek için gen bilimciler bakteriyel protoplastları kullanarak transformasyon gerçekleştirirler. Protoplastlarla yapılan genetik manipulasyonlarda elde edilebilecek olumlu neticeler, hücre duvarını direk olarak parçalayıp daha sonrada hücreleri osmotik olarak uygun bir ortama koyarak rejenere olmalarını sağlamakla alınabilir.²²

2.3. Kanın Yapısı ve Özellikleri

Özgül ağırlığı 1.055-1.065 olan kan, sulu ortamda hareket halindeki özelleşmiş hücrelerden oluşan kompleks bir dokudur. Vizkozitesi sudan yaklaşık 5-6 kat fazladır. Hacim olarak yetişkin vücut ağırlığının %8' ini oluşturan kanın miktarı 5-6 litredir. Çocuklarda yetişkinlere göre kan/vücut ağırlığı daha fazladır.²⁴

Serum: Antikoagülan eklenmeden kanın bekletilmesi sonucu hücresel elemanlar koagüle olmakta ve üstte sarı berrak kısım olan serum kalmaktadır.

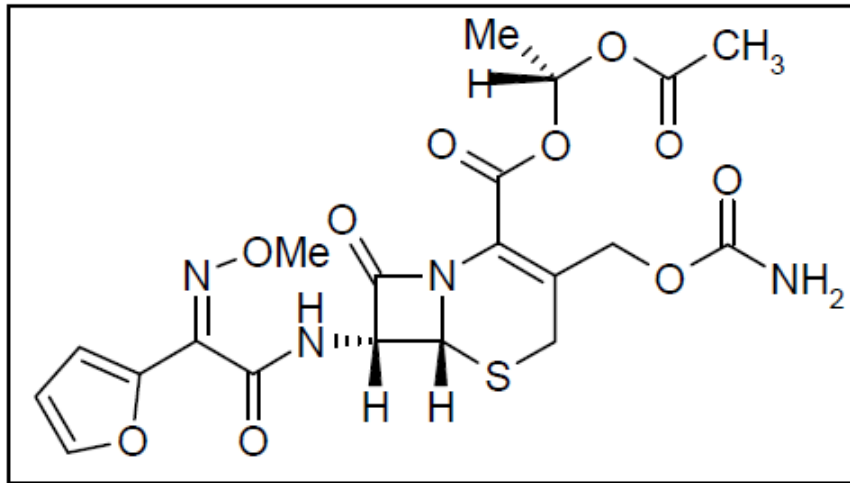
Plazma: Damardan alınan kana antikoagülan eklenerek santrifüj edilince üstteki berrak sıvı fibrinojen içeren kısım plazmadır.

Plazma Bileşimi: Plazma elektrolitler, besin maddeleri, metabolitler, proteinler vitaminler, iz elementler ve hormonları içeren sulu bir çözeltidir. Plazmada çözünmüş halde bulunan bileşiklerin derişimleri, hücre stoplazmasındaki derişimlerinden farklıdır.

Kanın Görevleri: Kanın görevleri O_2 , CO_2 , besinler, vitaminler, elektrolitler ve metabolizma ürünleri gibi birçok maddenin taşınması, homeostaz, tamponlama, sinyal taşınması (hormonlar), vücudun yabancı molekül ve hücrelerden korunması, onkotik basıncın düzenlenmesi, suda çözünmeyen maddelerin taşınması, pıhtılaşma (fibrinoliz) ve bazı maddelerin böbrekten atılmasını engelleme şeklinde özetlenebilir.²⁴

2.4. Sefuroksim Aksetil

Sefuroksim Aksetil (SFA), iki diastereoizomerden oluşan ve kimyasal yapı formülü (1RS)-1-[(asetil oksi) etil (6R,7R)-3-[(amino karbonil oksi) metil] -7- [[(Z)-2-(furan -2-il)-2-(metoksi imino) asetil] amino]-8-okso-5-tiya-1-azabisiklo-[4.2.0] okt-2-en-2-karboksilat olan bir bileşiktir. Açık formülü Şekil 2.3 'te verilmektedir.



Şekil 2.3. Sefuroksim Aksetil'in Kimyasal Yapısı

2.4.1. Sefuroksim Aksetil'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kapalı formülü $C_{20}H_{22}N_4O_{10}S$ olup molekül ağırlığı 510.48 g'dır. Beyaz renkli, acımsı tada sahip, amorf yapıda pudramsı görünümlüdür. Metanol, etil asetat ve asetonda çok; su, etanol (%96) ve eterde az çözünür. Hava geçirmeyen kaplarda, 25°C'yi geçmeyen sıcaklıkta ve ışıktan korunarak saklanmalıdır.²⁵

2.5. Sefuroksim Aksetil'in Farmakolojisi ve Etki Mekanizması

SFA, antibakteriyel etkiden sorumlu çekirdek kısmında beta-laktam halkası içeren sefalosporinlerden 2. kuşak bir antibiyotiktir. Sefuroksim'in oral olarak kullanılan ön-ilacıdır.²⁶ Barsak mukozasında ve portal dolaşım esnasında hidroliz olarak sefuroksim'e dönüşür.²⁷ Sefalosporinlerin gerek mide asidine dayanıksız olmaları gerekse emilimlerinin iyi olmaması nedeniyle parenteral kullanımlarının tercih edilmesine karşın SFA oral yolla kullanılabilmektedir.²⁶ Sefuroksim, etkisini bakteri hücre duvarı sentezini engelleyerek ve otolitik enzimleri uyararak göstermektedir. Sefuroksim, diğer sefalosporinler gibi betalaktamazlara karşı oldukça dirençlidir ve özellikle *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Moraxella subgenus*, *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* ve *Haemophilus influenzae* üzerine oldukça iyi etkinlik gösterir. Bunun yanında genel olarak ampisiline dirençli suşlar da dahil olmak üzere tüm suşlara karşı iyi etkinlik göstermektedir.²⁸ Gram pozitif koklara 1. Kuşak sefalosporinler kadar etki göstermekte ve bu nedenle özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarında tercih edilen sefalosporinler arasında yer almaktadır.²⁹ Sefuroksim plazma proteinlerine %50'ye varan oranlarda bağlanmaktadır ve böbrek yetmezliği halinde dozun ayarlanması gerekmektedir.³⁰ Yapılan çalışmalarda, sistematik dolaşımında SFA'ya rastlanmadığı, idrar örnekleri baz alınarak yapılan biyoyararlanım testlerinde yemekten önce alınan SFA'dan %30 oranında biyoyararlanım elde edilirken yemekten sonra alındığında bu oranın %40-50 dolayında olduğu tespit edilmiştir.³¹ Başka bir çalışmada, dişi bireylerdeki biyoyararlanımın erkek bireylere oranla %3-4 oranında düşük olduğu bulunmuştur.³² Yapılan başka bir çalışmada SFA'nın inflamasyon bölgesine geçişinin %92 ve serum yarılanma ömrünün 1.25 saat olduğu belirtilmiştir.³³ Bu özelliklerinin yanı sıra SFA'nın

glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon yoluyla atıldığı ve bu yolun sefalosporinlerin genel atılım prensiplerine uyduğu da belirtilmektedir.³⁴

2.6. Sefuroksim Aksetil İle Gerçekleştirilen Çalışmalar

Piva ve ark.³⁵ katı faz ekstraksiyon (C_{18} , 3 mL, 200 mg) yöntemini kullanarak plazmada sefuroksim miktar tayinini HPLC yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonunda 1 mL plazmaya 100 μ L IS (40 μ g/mL) ve 100 μ L %34 H_3PO_4 ilave edildikten sonrabu karışımın 600 μ L'si şartlanmış kartuşa verildikten sonra 3 mL su ile yıkandıktan sonra 800 μ L asetonitril: su (90:10, h/h) karışımı ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmada, internal standart (IS) olarak sefazolin, hareketli faz olarak pH 2.7 olan 20 mM KH_2PO_4 : asetonitril (80:20; h/h) çözücü karışımı, 100 μ L enjeksiyon hacmi ve 274 nm dalga boyu kullanılmıştır. Yöntemin LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 0.1 μ g/mL ve 0.05 μ g/mL olarak belirlenmiştir.

Al-Said ve ark.³⁶ HPLC yöntemiyle sefuroksim'in iki ayrı farmasötik formu olan Zinnat® ve Cefuzime®'in biyoeşdeğerlik çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. IS olarak sefaleksine, 50 μ L enjeksiyon hacmi, Supelcosil LC-18DB (5 μ m, 4.6x150 mm) kolon, 2.0 mL/dk akış hızı, 280 nm dalga boyu ve pH 3' e ayarlanmış 0.05 M KH_2PO_4 :asetonitril (90:10, h/h) den oluşan hareketli faz çalışma parametreleri kullanılmıştır. Analiz süresi ortalama 12 dakika, LOQ değeri de 0.25 μ g/mL olarak tespit edilmiştir.

Tsai ve ark.³⁷ mikrodializ ile rat beyni ve kan da sefuroksim miktar tayinini HPLC yöntemiyle belirlemişlerdir. Beyinden perfüzyon için 1 mL/dak akış hızında ringer çözeltisi (147 mM Na^+ , 2.2 mM Ca^+ , 4 mM K^+ , pH 7.0) kullanılmıştır. Kan dialisatları, kesintisiz enjeksiyon ile kromatografik sisteme gönderilmiştir. Beyin dialisatları ise biriktirildikten sonra 10 μ L'lik hacimlerde enjekte edilmiştir. Çalışmada

280 nm dalga boyu, pH 5'e ayarlanmış metanol:100 mM monosodyum fosforik asid (25:75, h/h) den oluşan hareketli faz ve 0.05 mL/dk akış hızı kullanılmıştır. Yöntemin LOD değeri 5 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Rosseel ve ark.³⁸ bronkoalveoler lavaj sıvısında HPLC yöntemiyle sefuroksimin miktarını tayin etmişlerdir. Sefuroksim ve sefaloridin (IS) nin stok çözeltileri (1 mg/mL) 0.02 M pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış ve -70 °C'de saklanmıştır. pH 3.2' ye ayarlanmış asetonitril:0.05 M amonyum fosfat tamponu (15:85, h/h) oluşan hareketli faz, 280 nm dalga boyu, 40 µL enjeksiyon hacmi ve oda sıcaklığı çalışma parametreleri kullanılmıştır. Sefuroksim'in 9.17 dakikada sefaloridin ise 6.25 dakikada pik verdiği gözlenmiştir. Yöntemin LOQ değeri 5 ng/mL, LOD değeri ise 1 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı, günde 500 mg SFA kullanan hastalardan fiberbronskopi sonrasında alınmıştır. Ters faz C₁₈ kartuşlar da katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Garrafo ve ark.³⁹ sefuroksim'in oral kullanımlı iki farklı dozaj formunun farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini HPLC yöntemini kullanarak karşılaştırmışlardır. Çalışmada, IS olarak sefaloridin, hareketli faz olarak 0.05 M fosfat tamponu: asetonitril (85:15, h/h) çözücü karışımı, 273 nm dalga boyu, ters faz C₁₈ Lichrospher kolonu, 20 µL enjeksiyon hacmi kullanılmıştır. Yöntemin, LOD değeri 0.06 mg/L olarak, 0.1-10 mg/L derişim aralığında doğrusallık gösterdiği belirlenmiştir. Güniçi ve günler arası varyasyon katsayıları %5'in altında tespit edilmiştir.

Faouzi ve ark.⁴⁰ sefaloridin, sefuroksim ve seftazidim'in %0.9 NaCl ve %5 glikoz çözeltilerine ilave edilerek hastalara verilmesi esnasındaki stabilitesini incelemişlerdir. HPLC sistemi ile yapılan çalışmada 254 nm dalga boyuna ayarlı diode-array dedektör kullanılmıştır. Yapılan analizler de asetonitril : %0.2 trietilamin (pH:2.5)

bileşenlerinden, değişik oranlarda oluşturulmuş 3 farklı hareketli faz denenmiştir. Alıkonma zamanları sefaloridin için 2.41 dk, sefuroksim için 3.38 dk, seftazidim için ise 1.93 dk olarak tespit etmişlerdir.

Lovdahl ve ark.⁴¹ sefuroksim'in chinchilla türü hayvanların ortakulak sıvısındaki miktarını HPLC yöntemiyle sefpodoksime IS kullanarak tespit etmişlerdir. Plazma ve diğer biyolojik sıvıların HPLC'ye enjekte edilebilir hale getirilmesi işlemlerinde 50 µL'lik örnek üzerine 50 µL IS (sefuroksim, 40µg/mL) ilave ederek tübe alınmış ve 2 mL asetonitril ile proteinleri çöktürülmüştür. Karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek asetonitril başka bir tüpe alınmış ve 50 °C'de azot gazı varlığında kurutulmuştur. Kalıntı 75 µL hareketli fazla çözülmüş ve 25 µL'lik porsiyonlar halinde enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak (25 mM asetat tamponu-15 mM trietilamin):asetonitril (92.5:7.5), akış hızı 0.35 mL/dk ve 254 nm dalga boyundaki UV dedektör, Hypersil C₁₈ (250 x 2.1 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Alıkonma zamanları sefpodoksime için 3.5 dk, sefuroksim için 5.9 dakika; yöntemin LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 0.05 µg/mL ve 0.02 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Lee ve ark.⁴² HPLC yöntemiyle sefuroksim, sefoksitin, sefaleksim ve sefaloridin'in plazmada miktar analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla 254 nm dalga boyu, 1.0 mL/dk akış hızı, sefotaksim iç standardı, asetonitril: asetat tamponu (pH 4.3) (15:85, h/h) hareketli fazı, 25 µL enjeksiyon hacmi, saflaştırma amacıyla Corasil RPG 18 kolon ve analizde Partisil ODS-3 kolon kullanılmıştır. Alıkonma zamanları Sefaleksim 6.2 dk, Sefotaksim 8.7 dk, Sefuroksim 10.3 dk, Sefoksitin 12.2 dk, Sefaloridin 17.3 dk olarak belirlenmiştir. Yöntemin doğrusallık aralığı 1 –100 µg/mL ve LOD değeri 0.5 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Eldingy ve ark.⁴³ sefuroksim ve sefadroksil'in idrar içindeki miktar tayininde 1. türev spektrofotometrisi ve HPLC yöntemini geliştirip geçerlilik testlerini yapmışlardır. Çalışmada sefuroksim ve sefadroksil maddelerinin 0.1 N NaOH içerisinde 2-10 µg/mL derişim aralığında sırasıyla 292.5 ve 267.3 nm dalgaboylarında 1. Türev spektrumları alınmıştır. HPLC yönteminde ise, sefuroksim için 2-10 µg/mL derişim aralığında su: asetonitril:asetik asit (85:15:0.1, h/h/h) hareketli fazı ile 1.5 mL/dk akış hızı ve 275 nm dalga boyu, sefadroksil için ise 5-20 µg/mL derişim aralığında 0.003% heksansülfonik asit sodyum tuzundan oluşmuş ve fosforik asit ile pH 3'e ayarlanmış 0.02 M potasyum dihidrojenfosfat-asetonitril (95:5; h/h) tamponu ile 2 mL/dk akış hızı ve 260 nm dalga boyu çalışma parametrelerini kullanarak analizleri gerçekleştirmişlerdir.

Ayad ve ark.⁴⁴ sefotaksim ve sefuroksim sodyumun analizleri için spektrofotometri ve atomik absorpsiyon spektrofotometrisi yöntemlerini geliştirip geçerlilik testlerini yapmışlardır. Spektrofotometrik yöntemi, maddelerin pi-donörü gibi davranarak 7,7,8,8-tetrasiyanoikiinodimetan (TSNK) ile veya pi-akseptörü gibi davranarak p-kloranilik asit (p-KA) ile renk verme yeteneği yüksek kompleksler oluşturması üzerine kuruludur. TSNK ve p-KA komplekslerinin ölçümleri sırasıyla 838 ve 529 nm dalga boylarında yapılmıştır. Sefotaksim ve sefuroksim sodyumun TSNK ile oluşturdukları kompleksler sırasıyla 7.6-15.2 ve 7.1-20.0 µg/ml, p-KA ile oluşturdukları komplekslerin ise sırasıyla 95.0-427.5 ve 89.0-400.5 µg/mL derişim aralığında Beer yasasına uyum gösterdiği gözlenmiştir. Atomik absorpsiyon spektrofotometrisi yöntemiyle analizler adı geçen maddelerin alkali hidrolizinin ardından gümüş nitrat ya da kurşun asetat ile reaksiyonlarına dayanmaktadır. Elde edilen çökeleklerin içeriği, kurşun ve gümüş miktarı üzerinden doğrudan veya reaksiyona girmeyen kurşun ve gümüş miktarı üzerinden doğrudan olmayan yöntemle tayin edilmiştir. Sefotaksim ve sefuroksim sodyumun, Ag(I) kullanılarak yapılan tayininde sırasıyla 1.9-11.4 ve 1.78-

8.90 µg/ml, Pb(II) kullanılarak yapılan tayininde ise sırasıyla 14.2-57.0 ve 13.3-53.4 µg/mL derişim aralığında Beer yasasına uyum gösterdiği belirtilmiştir.

Murillo ve ark.⁴⁵ farmasötik dozaj formlarında sefuroksim miktar tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirilmişlerdir. Yöntem, sefuroksim'in 0.1 M NaOH varlığındaki hidrolizini takiben 100 °C'de 60 dakika ısıtılması sonucu meydana gelen floresan özellik gösteren türevinin analizi üzerine kuruludur. Floresans özellik gösteren ürünün 380 nm'de eksitasyon ve 436 nm'de emisyon verdiği gözlenmiştir. Yöntemin 0.05 – 1.70 µg/mL derişim aralığında doğrusallık gösterdiği ve LOD değerin de 1.0×10^{-2} µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

Sciacchitano ve ark.⁴⁶ miselsi elektrokinetik kapiler kromatografisi (MECC) yöntemi kullanılarak beş farklı sefalosporinin (sefuroksim, sefalekssin, sefapirin, sefamandol nafat ve sefalotin) ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Analizler için 72 cm x 50 µm ID kapiler kolon, 30 °C'de hidrostatik enjeksiyon, 306 V/cm voltaj ve 5 saniye enjeksiyon zamanı ve 20 mM sodyum borat, 200mM SDS, 100 mM pentansülfonik asit karışımından oluşan çalışma çözeltisi kullanılmıştır. Analitler 210 nm dalga boyunda UV detektör ile dedekte edilmiştir. Göç zamanları sefuroksim 13.5 dk, sefalekssin 18.5 dk, sefapirin 19.5 dk, sefamandol nafat 22 dk, sefalotin 26 dakika olarak tespit edilmiştir.

Pajchel ve ark.⁴⁷ da kapiler zon elektroforez (CZE) ve miselsi elektrokinetik kapiler kromatografisi (MECC) yöntemlerini kullanarak sefuroksim sodyum, sefazolin, seftriakson sodyum, sefoperazon sodyum ve seftizidim maddelerinin ayrımını gerçekleştirmişlerdir. CZE için Na₂HPO₄ (3,12 g/L), sodyum tetraborat (7,63 g/L) ve MECC için sodyum dodesil sülfat'tan (SDS) (7, 10, 14 g/L) oluşan pH 5-8'e ayarlanmış elektrolit çözeltileri kullanılmıştır. pH çalışmasında, pH 6-7 aralığında hem CZE hem

de MECC için doğrusal bir grafik elde edilmiş ve çalışma için pH 6.5 olarak belirlenmiştir. Aletsel parametreler olarak, dedeksiyon 214 nm’de UV dedektörle, ayırım da 60 cm x 75 µm ID kapilerde, uygulanan voltaj 18 kV kullanılmıştır. Ayırımın daha iyi sağlanabilmesi için sisteme 17.4 g/L pentansülfonik asit eklenmiştir. Bu ilave, özellikle sefuroksim ve sefazolinin ayırımını kolaylaştırmıştır. Göç zamanları ise seftazidim için 7.4 dk, sefaperazon için 7.7 dk, sefotaksim için 8.0 dk, sefuroksim için 8.3 dk, sefazolin için 8.4 dk ve seftriakson için ise 11.1 dk olarak tespit edilmiştir.

Lin ve ark.⁴⁸ kapiler elektroforez yöntemiyle fosfat, sitrat, ve 2-(Nmorfolino) etansulfonat (MES) tamponları kullanarak 12 farklı sefalosporinin ayırımı üzerine tampon çözeltilerin pH’sı, derişimi ve elektrolit miktarının etkisini incelemişlerdir. Çalışmalar sonucunda tampon pH’sının belirleyici etkisinin yanında tampon derişiminin de özellikle sefuroksim ile sefazolin, sefaleksim ile sefaklor, sefotaksim ile sefapirin’in ayrılmasında önemli rolü olduğu bulunmuştur. Sefalosporinlerin sitrat ve MES tamponlarındaki elektroforetik ve elektroozmotik hareketliliğinin fosfat tamponu ile elde edilenlere göre belirgin derecede farklı olduğu bulunmuştur. Sitrat tamponu ile yapılan deneylerde en uygun derişim aralığı 35-45 mM gibi dar bir alan olarak tespit edilirken MES tamponu kullanılan deneylerde bu aralık 300 mM’a kadar çıkmaktadır. Sitrat ve MES tamponları ile gerçekleştirilen ayırımın fosfat tamponu ile gerçekleştirilenden daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Sitrat tamponu ile pH 5.0’in altında yapılan ayırımlarda elektroforetik hareketin elektroozmotik harekete büyük üstünlüğünün olmasına rağmen bazı sefalosporinler dedekte edilememiştir.

Bernacca ve ark.⁴⁹ sefuroksimin pH 1.0-10.0 aralığındaki polarografik davranışını ve asidik ortamdaki indirgenme mekanizmasını incelemişlerdir. Madde asidik ortamda kuvvetle adsorbe edilirken nötral ve alkali çözeltilerde elektrot reaksiyonu adsorpsiyondan etkilenmemiştir. Metoksiimino grubunun asidik ortamdaki

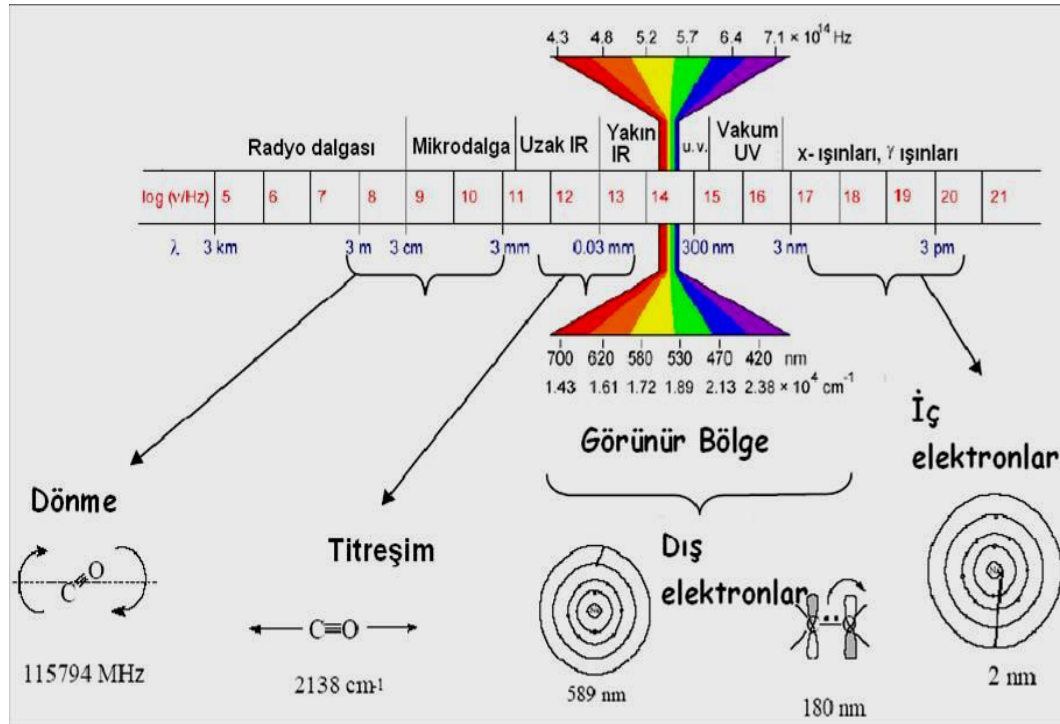
amin türevinin kinetik davranışının da incelendiği çalışmada tüm elektrot süreci heterojen bir protonlama basamağı tarafından kontrol edilmiştir. Diferansiyel puls yöntemiyle pH 2.0 dolayında yüksek adsorptivite sebebiyle 1×10^{-8} M derişimde analiz yapılmasının mümkün olduğu vurgulanmıştır.

2.7. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler; atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. İnorganik ve organik bileşiklerin kalitatif, kantitatif analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin ve moleköl yapılarının aydınlatılmasında spektroskopik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Spektroskopi kavramı önceleri görünür bölge ışınının çeşitli dalga boylarına ayrılıp spektrumlarının elde edilmesi için kullanılırken günümüzde ise elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen genel bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır.⁵⁰ Önceleri sadece elektromanyetik ışıma ile madde arasındaki etkileşimlerle ilgilenilirdi; ancak bugün için spektroskopinin kapsamı madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de içerecek şekilde genişletilmiştir. Elektromanyetik ışıma uzayda çok büyük bir hızla hareket eden dalga ve parçacık yapısında bulunan, pek çok yapıya girebilen bir enerji şeklidir.⁵¹

Elektromanyetik ışının madde (atom ya da moleküller) tarafından soğurulması veya yayılması inceleniyorsa sırasıyla, soğurma (absorpsiyon) veya yayılma (emisyon) spektroskopileri olarak adlandırılır. Işının moleküller tarafından soğurulması moleköldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. özelliklerine bağlı olduğundan spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereokimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır. Spektroskopik çalışmalarda madde üzerine dalga boyu 110 nm den 30000 nm'ye kadar değişen çeşitli ışınlar gönderilir. Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz yapmak

mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-25000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole ve Görünür (UV-Visible), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir.^{51,52} Analitik amaçlar için önemli spektral bölgelerin dalga boyu ve dalga sayısı aralıklarını gösteren diyagram Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması

2.7.1. Işının Absorplanması

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam ve şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması

denir. Absorpsiyonla ışın enerjisi, maddenin iyon, atom, moleküllerine aktarılır. Böylece ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekül 10^{-8} saniye kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayınlanır. Buna fotoluminesans olayıdır. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir.

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları genel olarak iki kısma ayrılır.⁵³

1- Atomik Absorpsiyon Spektrumları

2- Moleküler Absorpsiyon Spektrumları

2.7.1.1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları

Polikromatik UV veya Görünür Bölge ışını civa veya sodyum gazı gibi tek atomlu bir ortamdan geçirilirse demetten bazı ışınların kaybolduğu görülür. Sodyum buharından ışın geçirildiğinde sarı ışının kaybolduğu görülür. Sarı ışının sodyum atomları tarafından absorplanması, sodyum atomlarında 3s enerji seviyesinde bulunan bir elektronun sarı ışını absorplayarak 3p enerji seviyesine çıkmasıyla açıklanabilir.

Atomlarda, en dış tabaka elektronları ultraviyole ve görünür bölge ışınlarla uyarıldıkları halde, iç tabaka elektronları uyarılamaz. İç tabaka elektronlarını uyarabilmek için X-ışınları kullanılır. X-ışınları görünür bölge ışınlarından daha fazla enerjilidirler.

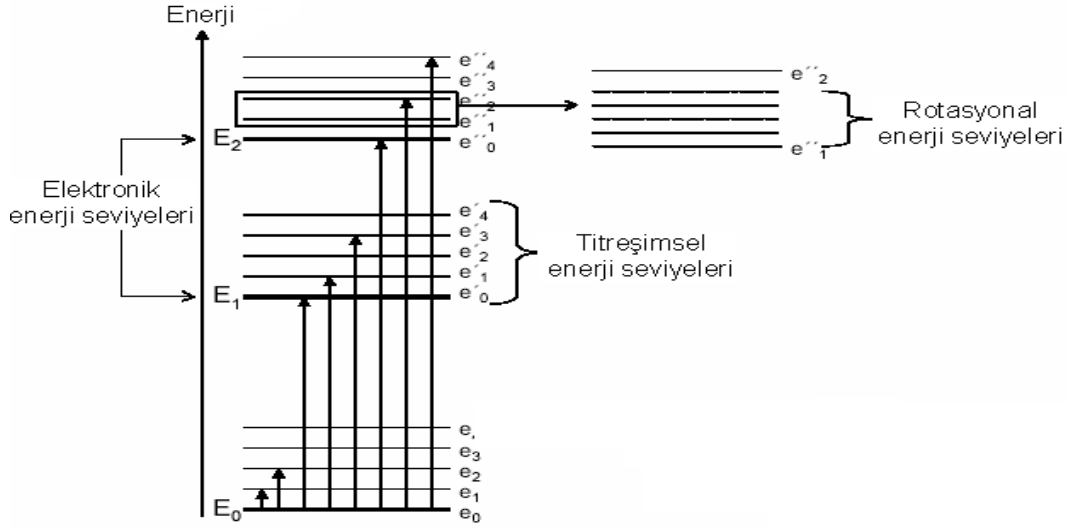
Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına da X-ışınları spektroskopisi denir.⁵³

2.7.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Moleküller, UV, görünür ve infrared ışınları ile uyarıldıkları zaman, kuantlaşmış 3 tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir. Bir molekülün toplam enerjisi E_T ;

$$E_T = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

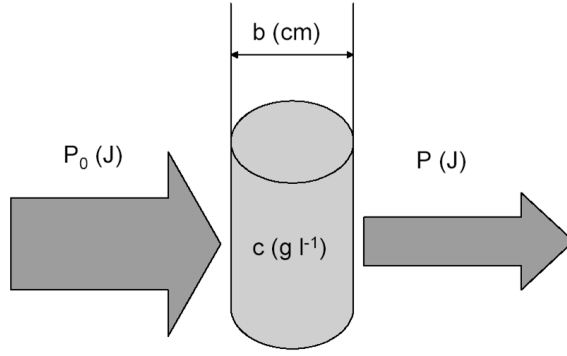
dir. Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir.²⁴⁻²⁵ Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bir molekül için elektronik, titreşimsel, rotasyonel enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı

Elektronik geçişler dalga boyları 200-800 nm arasında olan ultraviyole ve görünür alan ışınlarıyla gerçekleşir. Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden ayrılan en önemli yanı; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga boylarında keskin çizgiler meydana gelmesine karşılık, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, birçok dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının meydana gelmesidir. Bir molekülün UV-Görünür alan spektrumu, molekülün bağ elektronlarından birinin bir foton enerjisini absorplayarak bir üst elektronik seviyeye geçmesi şeklinde açıklanabilir.

Bir maddenin çözeltisinden polikromatik bir ışın demeti geçirildiğinde, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absorplanır ve ışın demeti çözeltiden şiddetinden bir miktar kaybederek çıkar⁵¹⁻⁵³ (Şekil 2.6) .



Şekil 2.6. Absorblayan bir çözeltiye giren P_0 şiddetindeki ışın demetinin P şiddetine düşmüş olarak çıkması

Çözeltiye P_0 şiddetinde giren ışın çözeltiyi P şiddetinde terk eder. Fotonlarla ışın absorblayan atom veya moleküller arasındaki etkileşimin sonucu olarak ışının gücü P_0 'dan P 'ye düşmüş olur. Buna göre ışın demetinin ortamdan geçme oranına geçirgenlik (T) adı verilir⁵¹⁻⁵³.

$$T = \frac{P}{P_0}$$

şeklinde gösterilir.

Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans (A) olarak adlandırılır ve absorbans

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0}$$

şeklinde formüle edilir. Çalışmalarda absorplanan ışın miktarı ya geçirgenlik ya da absorbans olarak verilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\%T = \frac{P}{P_0} 100$$

Bir çözeltinin absorbansı, ışının çözelti içinde aldığı yolla (b) ve çözeltide absorpsiyon yapan taneciklerin derişimiyle (c) doğru orantılıdır. Bu ilişki Lambert-Beer kanunu olarak adlandırılır:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

şeklinde verilir ve burada ϵ *molar absorbans* ya da *molar absorptivite* olarak adlandırılır.

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir.

$$P = P_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot b \cdot c}$$

2.7.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

Lambert-Beer kanunu sadece çok seyreltik çözeltilere uygulanabilen bir kanundur. Bunun nedeni yüklü taneciklerin birbirinin yük dağılımını etkilemeleri veya değiştirmeleridir. Yük dağılımı değişen bir taneciğin absorplama kabiliyeti çok değişir. Bu da derişimle absorbans arasındaki lineer bağıntının bozulmasına neden olur. Absorplayan maddenin derişimi düşük olabilir fakat yanında bulunan maddelerin derişimi yüksek olursa yine sapma gözlenebilir. Kanundan sapmalar ortamda yüklü tanecikler bulunduğu zaman daha da büyük olur. Sapmalar;⁵¹

- 1- Cihazdan gelen sapmalar
- 2- Kimyasal maddelerden gelen sapmalar
- 3- Analizci hatasından gelen sapmalar

şeklinde üçe ayrılabilir.

2.7.3. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

Spektrofotometre, elektromanyetik ışının dalga boyunun bir fonksiyonu olarak numunenin absorbans ya da geçirgenliğini ölçmek için kullanılan bir cihazdır. Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri, 110 nm' den 1000 nm arasında değişen dalga boylarında çalışırlar. Ancak 110 nm ile 200 nm dalga boyu aralığında çalışan cihazlar vakum tertibatlı ve oldukça pahalı cihazlardır. Bundan dolayı laboratuvarlarda kullanılan spektrofotometri cihazları 200 nm ile 800 nm dalga boyu aralığında çalışmaktadırlar. Spektrofotometrelerde elektromanyetik ışın kaynağı olarak

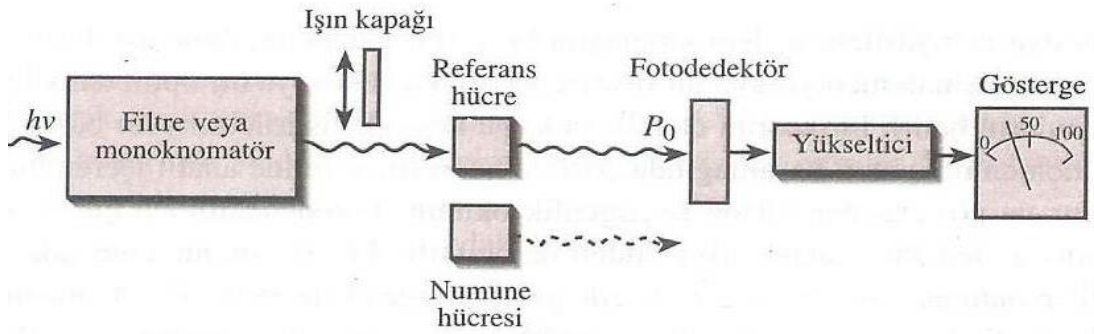
döteryum ve tungsten olmak üzere iki lamba kullanılmaktadır. 160-375 nm aralığında ışın üretmek için döteryum lambası, 350-2500 nm arasında ışın üretmek için tungsten lambası kullanılmaktadır.⁵¹⁻⁵³ Ultraviyole-Görünür Bölge spektrofotometreleri yapılarına göre iki kısma ayrılır;

1- Tek ışınlı spektrofotometreler

2- Çift ışınlı spektrofotometreler

2.7.3.1. Tek Işınlı Spektrofotometreler

Absorbsiyon ve % geçirgenlik ölçümlerinde kullanılan basit, ucuz ve bakım kolaylığı olan bir cihazdır. Tek ışınlı spektrofotometreler aşağıda gösterildiği gibi ışın kaynağı, dalga boyu seçici, filtre veya monokromatör, ışın yoluna konacak eşlenik iki hücre, dedektör, yükseltici ve bir gösterge aletinden oluşur. Absorbsiyon ve % geçirgenlik okumak için önce numune bölmesine referans madde konularak alet ve referans hücreye göre cihaz sıfırlanır. Daha sonra numune hücresi konur ve ölçüm yapılır (Şekil 2.7).

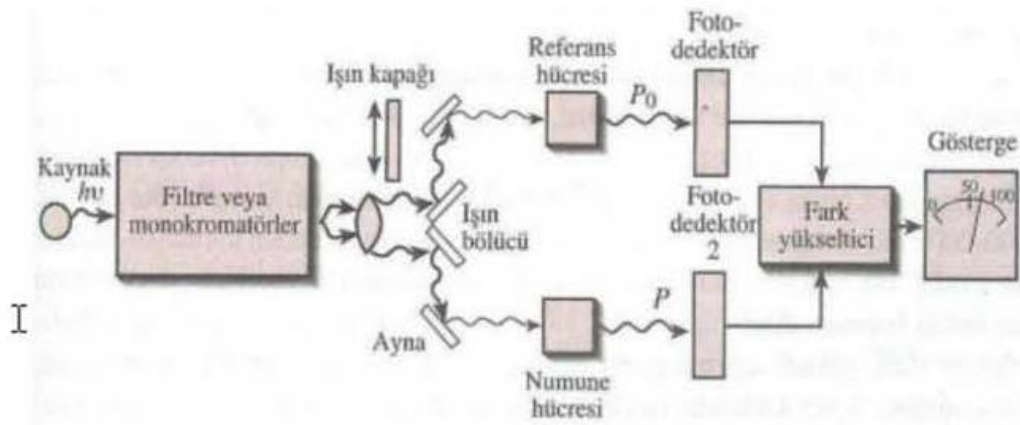


Şekil 2.7. Tek Işınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

2.7.3.2. Çift Işınlı Spektrofotometreler

Modern spektrofotometrelerin pek çoğu çift ışınlı tasarıma sahiptir. Bu cihazlar tek ışınlı cihazlara göre hem optik hem de elektronik yönden daha karmaşıktırlar. Çift ışınlı spektrofotometreler 190-800 nm aralığında çalışmak üzere tasarlanmışlardır.

Cihaz sıra ile devreye giren tungsten ve döteryum lambaları, yansıtımlı granting monokromatörü ve bir fotoçoğaltıcı dedektörü ile donatılmıştır. Bu cihazlardaki ışın bölücü, motorla dönen, üç bölmeli bir diskdir ve “çopı” adını alır. Çopırın üç bölmelerinden biri saydam, ikincisi yansıtıcı, üçüncüsü ise opakdır. Her dönüşte dedektör, üç ayrı sinyal alır. Bu sinyallerin ilki P_0 ’a, ikincisi P ’ye, üçüncüsü de karanlık akıma karşılık gelir. Üç sinyal, elektronik olarak işlenerek numunenin geçirgenliği veya absorbansı göstergeden okunur. Çift ışınlı cihazlar, ışık kaynağındaki bütün dalgalanmaları giderebilme, kaçak ışınları ve saçılan ışınlardan gelen sapmaları minimize etme ve yükselticideki voltaj değişikliklerinden fazla etkilenmeme gibi üstün özelliklere sahiptirler (Şekil 2.8). Günümüz modern optoelektronik teknolojinin ürünlerinden olan çok kanallı veya diod serili spektrofotometrelerdir. Bu cihazlar, çok kısa zamanda bütün Ultraviyole, Görünür Bölge spektrumunun kaydını mümkün kılar.



Şekil 2.8. Çift ışınlı spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

2.7.4. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazının Kullanım Amaçları

1. Kalitatif Analiz
2. Kantitatif Analiz
3. Molekül Yapısını Aydınlatma

2.7.4.1. Kalitatif Analiz ve Moleköl Yapısını Aydınlatma

Bilinmeyen bir madde saflaştırıldıktan sonra UV spektrumu alınır. Bu spektrum, her yönüyle aynı şekilde daha önce alınmış olan spektrumlarla karşılaştırılır. Bilinmeyen maddenin spektrumu daha önceki madde spektrumlarından hangisine uyuyorsa, bilinmeyen madde o maddedir. Bilinmeyen madde, bilim dünyası tarafından bilinmeyen yeni bir madde değil, sadece analizi yapan kişi tarafından bilinmeyen maddedir. Bundan başka maddenin ne olduğu biliniyor fakat saf olup olmadığı bilinmiyorsa, maddenin spektrumu alınır. Spektrumda beklenmedik piklerin görünmesi maddenin saf olmadığını gösterir. Ayrıca, ultraviyole ışınlarla yapılan spektrofotometrik ölçümlerde benzer kromofor grupların kalitatif tayininde de yararlı olur. Çok karmaşık yapıli organik moleküllerin bile, fonksiyonel gruplar dışında kalan kısımları, 180 nm' den daha uzun dalga boylarına karşı geçirgendir. Onun için, 200-400 nm aralığında bir veya daha çok pik gözleniyorsa bu, molekülde doymamış grupların veya kükürt, halojen gibi hetero atomların varlığını gösterir. Çoğu zaman, analitin spektrumu, çok sayıda kromofor grup içeren ve yapısı bilinen başka bir molekülün spektrumu ile karşılaştırılarak, analitteki fonksiyonel grup hakkında bir fikir edinilebilir. Fakat genel bir kural olarak, analitin kesin yapısını anlamak için yeterli ayrıntılı bilgileri, ultraviyole spektrumlarında bulamayız. Bu yüzden, ultraviyole spektrumlarından elde edilen kalitatif veriler, NMR, MS gibi başka fiziksel ve kimyasal verilerle desteklenmeli mümkünse çözünürlük, erime noktası, kaynama noktası gibi bilgilerle birleştirilmelidir.

Kalitatif analiz amaçlı ultraviyole spektrumları genelde analitin seyreltik çözeltileri kullanılarak elde edilir. Fakat uçucu bileşiklerin gaz halindeki spektrumları alınabilirse, daha ayrıntılı ve dolayısıyla daha yararlı spektrumlar ele geçer. Ultraviyole-Görünür Bölge spektroskopisinde kullanılacak çözücünün bu bölgedeki ışınlar için geçirgen olması ve numuneyi, belirgin pikler verebilecek derişimlerde çözmesi gerekir.

Ayrıca çözücü ile absorpsiyon yapan tür arasındaki mümkün etkileşimleri de hesaba katmak gerekir. Örneğin, su, alkol, ester ve keton gibi polar çözücüler, spektrumdaki titreşim ayrıntılarını örtme etkisi gösterirler. Polar çözücüler, hem spektrumun titreşimlerinden ileri gelen küçük piklerin kaybolmasına, hem de absorpsiyon bandlarının ve dolayısıyla piklerin esas yerlerinden kaymasına neden olurlar.⁵²

2.7.4.2. Kantitatif Analiz

Ultraviyole ve Görünür Bölge absorpsiyon spektroskopisi, kimyacıların kantitatif analizlerde en çok faydalandıkları tekniklerden biridir. Kantitatif analizde, ilk önce analizi yapılacak maddenin en iyi absorbans yaptığı dalga boyu bulunur ve bu dalga boyunda spektrumu alınır. Belirlenen dalga boyu sabit tutularak, artan derişimlerde hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunur. Derişime karşı absorbans grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur ve ayrıca seçilen dalga boyu sabit tutularak absorbtivite katsayısı da belirlenmeye çalışılır.

2.8. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi

Türev spektrofotometresi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. UV-Görünür Bölge çalışmalarından çok daha geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni UV-Görünür Bölge spektrumlarında üst üste binen, çakışan bantlar daha çok görünür ve ayırım gücü zayıftır. Bunun yanında sinyal /gürültü (S/G) oranı da düşüktür. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözümlenmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü artırmıştır.

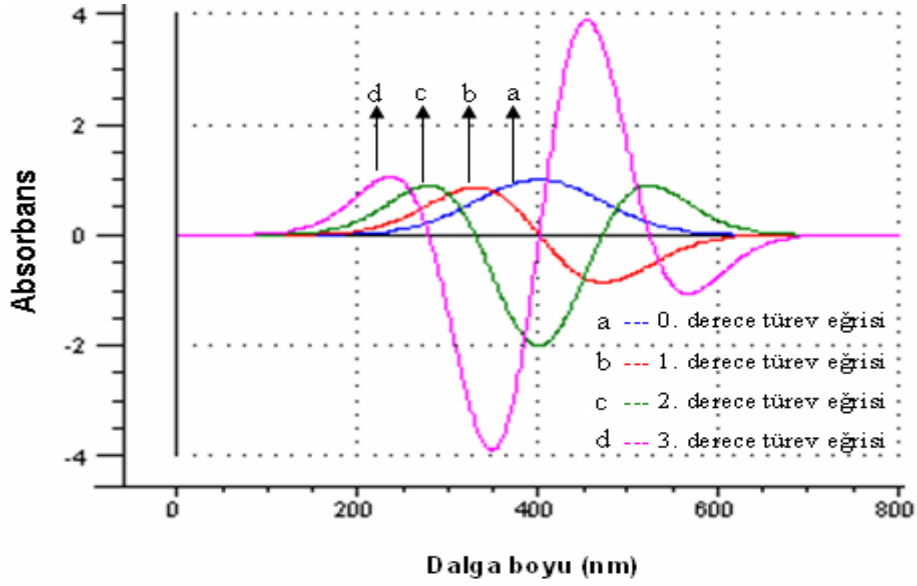
Türev tekniği orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi vererek bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir

bileşik daha kolay ve daha kesin olarak tanımlanabilir. Orijinal spektrumlarda üst üste binen çakışan bantlar varsa, bu spektrumların bantları alınarak bantların belli oranda birbirinden ayrılması sağlanır. Bu yöntemle karışımların analizleri de yapılabilir. Spektrofotometrede bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken türev alınarak bulanıklığın oluşturduğu bu etki ortadan kaldırılabilir.

Yöntemin dezavantajı ise, yüksek türev derecelerinde S/G oranının bozulması, pik şekillerinde bozulma ve dönüm noktası kaymasıdır. Bu nedenle uygulanacak türev derecesi iyi seçilmelidir.

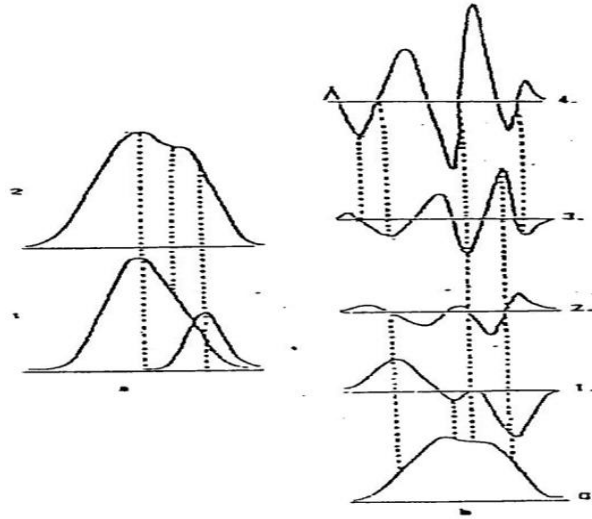
2.8.1. Teorik Temelleri

UV spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Orijinal spektrum veya sıfırıncı derece spektrum $A=f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bir fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetin eğimi, fonksiyonun bu noktadaki türevidir. Bu fonksiyonun her noktasındaki türevi $(dA/d\lambda)$ hesaplanabilir. Eğer bu türev değerleri grafiğe geçirilecek olursa "türev spektrumu" elde edilir. 1' den n' e kadar derecede olabilir.⁵⁴ Şekil2.9' da görüldüğü gibi bir çan eğrisinin 1. derece türev eğrisi orijinal spektrumdaki eğrinin teğetlerinin eğimini göstermektedir. Böylece türevlendirme ile spektrum daha ayrıntılı ve net bir görünüm kazanır.



Şekil 2.9. Absorbans ve Türev Spektrumları

Türev almanın bir diğer avantajı da türev derecesi artıkça geniş bantların dar bantlara göre daha fazla baskılanmasıdır. Bu özellikten faydalanılarak numune matriksinden ileri gelen ve bozucu etki gösteren bantlar elimine edilebilir. Bu da ikinci ve dördüncü türevde teşhis vetayine imkân sağlar (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. a-) Gauss eğrisinin 1. tek tek ve 2. karışım halindeki spektrumları, b-) Gauss eğrisinin karışım halindeki 1.- 4.türev eğrileri

Maksimum dalga boyları farklı, eşit olmayan iki Gauss eğrisinin tek tek ve karışım halindeki spektrumları Şekil 2.10.a'da görülmektedir. Maksimum dalga boyları

farklı yani merkezleri aynı olmadığından karışım halinde alınan spektrumları bir omuz verir. Bu bantların türevleri alınarak omuzlar düz noktalar haline dönüştürülür (Şekil 2.10.b).

Orijinal Gauss eğrisi tipindeki bir pike karşılık n. türevde n+1 tane maksimum ve minimuma rastlanmaktadır. Yani birinci derece türev eğrisinde iki, ikinci derece türev eğrisinde üç, üçüncü derece türev eğrisinde ise dört tane maksimum ve minimum nokta görülmektedir. Teorik olarak türev absorbans değerleri ile bileşiğin derişimi arasında aşağıdaki bağıntılar mevcuttur.

$$\begin{array}{l} \text{0. derece türev} \\ A = \epsilon b C \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{1. derece türev} \\ \frac{dA}{d\lambda} = \frac{d\epsilon}{d\lambda} \cdot bC \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{n. derece türev} \\ \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \epsilon}{d\lambda^n} \cdot bC \end{array}$$

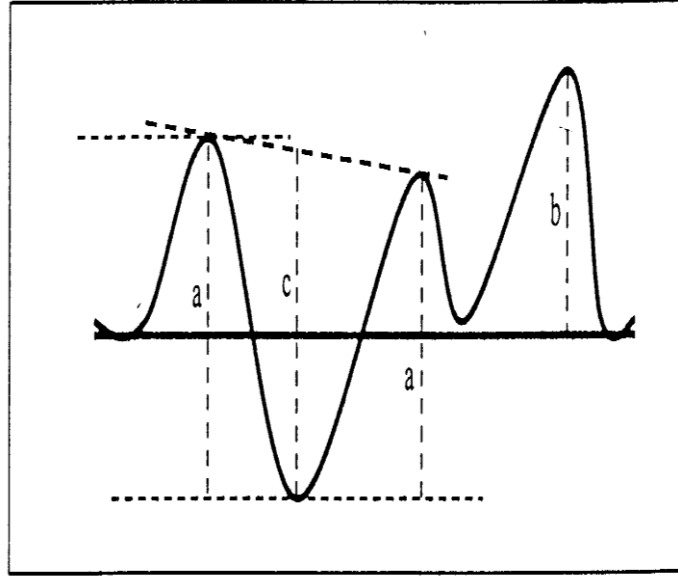
Özellikle biyokimyasal analizlerde bu işlem saflık kriteri olarak iki dalga boyundaki absorbsiyon oranının oluşması açısından önemli olup tanıma ve saflaştırma işlerinde üstünlük sağlar.^{55,56}

Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelerde bulunur ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır. Türev spektrumlarında çok sayıda uyduruk piklerde görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışırken başka bileşenlerinde varlığına bizi götürür. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da artacaktır.⁵⁶

2.8.2. Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Absorbansın türevi derişimle doğru orantılıdır. 1. ve 2. derece türev spektrumlarında ordinat değişimleri, orijinal spektrumun ordinat değerinin büyüklüğüyle değil, eğim değişimiyle ilgilidir. Bu nedenle türev eğrisinin apsisteki konumu ile dönüm noktalarının birbirine karşı durumları karakteristiktir. Spektrumlarda

yalnızca bitişik, peş peşe gelen uç noktalar (maksimum ve minimum) değerlendirilerek bu iki noktanın mutlak değer olarak farkı ölçülür. Birkaç uç noktası varsa ordinat farkının en yüksek olduğu bir çift seçilir. Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır. Bunlar, pikten pike ölçüm, pikten sıfıra ölçüm ve teğet ile ölçümdür (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Türev spektrumlarının değerlendirilmesi a) Pikten pike ölçüm, b) Pikten sıfıra ölçüm, c) Teğet ile ölçüm

2.8.3. Türev Spektroskopisi Yönteminin Uygulamaları

- İlaç analizlerinde
- Aynı spektral bölgede absorpsiyon yapan ilaç karışımlarının tayininde
- Etken maddenin bozunma ürünü varlığında tayininde
- Bozucu etki yapan matriks bileşenlerinin varlığında etken maddenin tayininde

uygulanmaktadır.⁵³

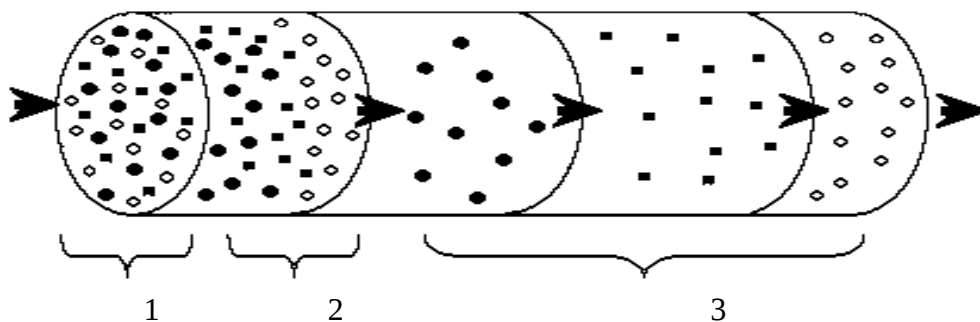
2.9. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlarda bulunan birbirine yakın özellik gösteren bileşenlerin ayrılmasında, tanınmasında ve tayininde yaygın olarak kullanılan birçok

farklı yöntemi içeren bir analitik yöntemler topluluğudur. Diğer ayırma yöntemlerinden hiç birisi kromatografik yöntemler kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmazlar. Bu nedenle de kromatografik yöntemler daha çok araştırma amacıyla kullanılır. Bu sebeple çok geniş ve verimli bir alana sahiptir.⁵⁷

Kromatografi ilk olarak yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adını kullanmıştır.

Bütün kromatografik ayırmalarda; numune gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olan hareketli faz yardımıyla ile sabit bir faz üzerinden taşınır. Taşınma esnasında bileşenlerin farklı göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi gerçekleşir. Kromatografik ayırmada seçilen sabit faz ile taşıyıcı fazın birbiri ile karışmaması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında kromatografinin genel bir tanımını yapmaya çalışırsak; bir karışımdaki bileşenler sabit bir ortama ilave edilip bunların belirli bir hareketli faz yardımıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve boyut elenme özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir.⁵²



Şekil 2.12. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi

1-Karışım kolona yüklenir.

2- Ayrılma başlar

3- Ayrılma bitmiştir, maddeler dedektöre ayrı olarak gider.

Kromatografik ayırmada örnek, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemden taşınır. Hareketli faz katı bir yüzeyde ya da kolonda sabitleştirilmiş hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinden geçirilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasını hedefler. Örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Örneğin kolon boyunca hareket etmesi sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengeleri dağılımına bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır.⁵⁸ İyonik etkileşimler,

- a) İyonlar arasında kolombik kuvvetler,
- b) İyon-indirgenmiş iyon etkileşimleri,
- c) Dipol-dipol etkileşimleri,
- d) Dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri,
- e) Nötral atom ya da moleküller arası kuvvetlerdir.

2.9.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kolon kromatografisinde sabit faz dar bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında iken bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Bunun dışında kromatografik yöntemler ayırma işlemlerinin farklılığına göre çok daha değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalar aşağıdaki şekilde verilebilir.^{52,59}

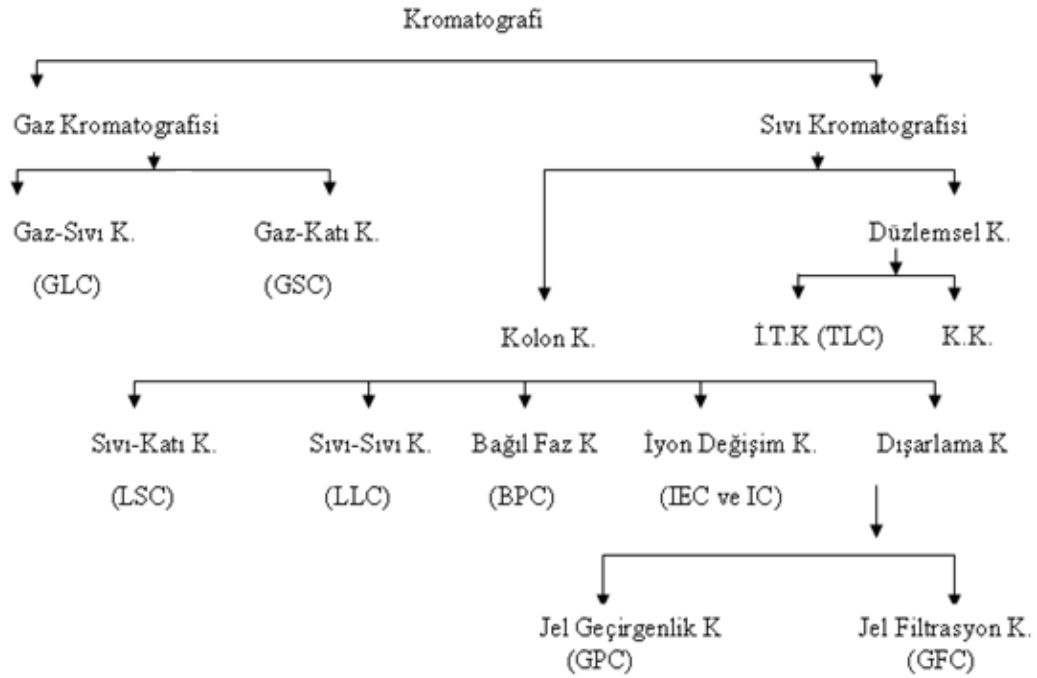
1. Teorik Sınıflandırma

- a- Paylaşım Kromatografisi
- b- Adsorpsiyon Kromatografisi
- c- Boyut Eleme Kromatografisi
- d- İyon Değişim Kromatografisi

2. Pratik Sınıflandırma

- a- Kağıt Kromatografisi
- b- İnce Tabaka Kromatografisi
- c- Kolon Kromatografisi
- d- Gaz Kromatografisi
- e- Sıvı Kromatografisi

3. Hareketli ve Durgun Fazlara Göre Sınıflandırma



Şekil 2.13. Kromatografinin fazlara göre sınıflandırması

2.9.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı mekanizma mevcuttur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir.^{52,53}

2.9.2.1. Dağılma Kromatografisi

Dört ayrı tip sıvı kromatografi içinde en yaygın kullanılanıdır. Dağılma çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğuna dayanan bir olaydır. Sıvı-Sıvı ve Bağlı-Sıvı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir.⁶⁰ Bu teknikler arasındaki fark, destek katısına durgun fazın tutunma farkına dayanır. Sıvı-Sıvı kromatografisinde, sıvı faz sabit bir dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı-Sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvı türler kimyasal olarak tutturulmuştur. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazların bağl polarlıklarına bağlı olarak iki kısma ayrılmaktadır. Sabit faz oldukça polar ve hareketli fazda apolar ise buna Normal-Faz kromatografisi, sabit faz apolar (çoğu zaman bir hidrokarbon) hareketli faz ise nispeten polar (su, asetonitril, metanol) ise buna da Ters-Faz kromatografisi denir.⁵⁰

2.9.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bir karışımdaki maddelerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi olarak adlandırılır ve ilk keşfedilen kromatografi çeşididir. Çözücü ve katı sabit fazın polarlıkları bir kolon boyunca veya bir yüzey boyunca çözünen maddenin hareketinin hızını tayin eder.⁵⁸

2.9.2.3. İyon Değiştirme Kromatografisi

Bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanan bir kromatografik yöntemdir. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük moleküllü doğal veya yapma maddelerdir. Bunlarda organik ve inorganik diye ikiye ayrılır. Organik iyon değiştiriciler (bunlara reçineler de denir) suda ve birçok organik çözücüde hiç çözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar çok anyon ve katyon taşıyan büyük moleküllü maddelerdir. Bunlar hem anyon, hem katyon değiştirmede ve hatta selektif iyon değiştirmede kullanılır. İnorganik iyon değiştiricilerde en çok bilineni zeolitlerdir. Bunlar genel olarak; $\text{Na}_2 \text{Al}_2 \text{Si}_4\text{O}_{12}$ formülündedir.

İyon değiştirme kromatografisi, ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi birçok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanabilmektedir.⁵⁰

2.9.2.4. Boyut-Elemente Kromatografisi

Jel-Geçirgenlik veya Jel-Süzme kromatografisi adı da verilen boyut-elemente kromatografisi, özellikle yüksek mol kütleli maddelere uygulanabilen önemli bir tekniktir. Boyut-elemente kromatografisi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer taneciklerinden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde küçük moleküller etkin bir şekilde yakalanabilmekte, büyük moleküllerde gözenek dışında kaldığından dolayı hareketli faz akımı ile kolondan kolaylıkla elüe edilebilmekte ve daha sonrada gözeneklerde tutulan küçük moleküllerde hareketli faz akımı ile yüzeyden kolaylıkla

uzaklaştırılabilmektedir. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülünün etkin büyüklüğüne bağlıdır.⁵⁰

2.10. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz ya da mobil faz adı verilir. Hareketli fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür ve zamana karşı y-ekseninde şaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir. Sıvı kromatografik teknikler içinde ters- faz sıvı kromatografisi en yaygın kullanılanıdır. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda tutunmaları farklı olan türlerin ayırımında kullanılır. Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesil silan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca C₈ ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Ters-faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır. HPLC’ nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır: HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir. Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir. Nitel ve nicel analiz amaçları için kullanılabilir. Analiz süresi oldukça kısadır. Duyarlık çok yüksektir. 10 µg’lık bir

örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.^{61,62}

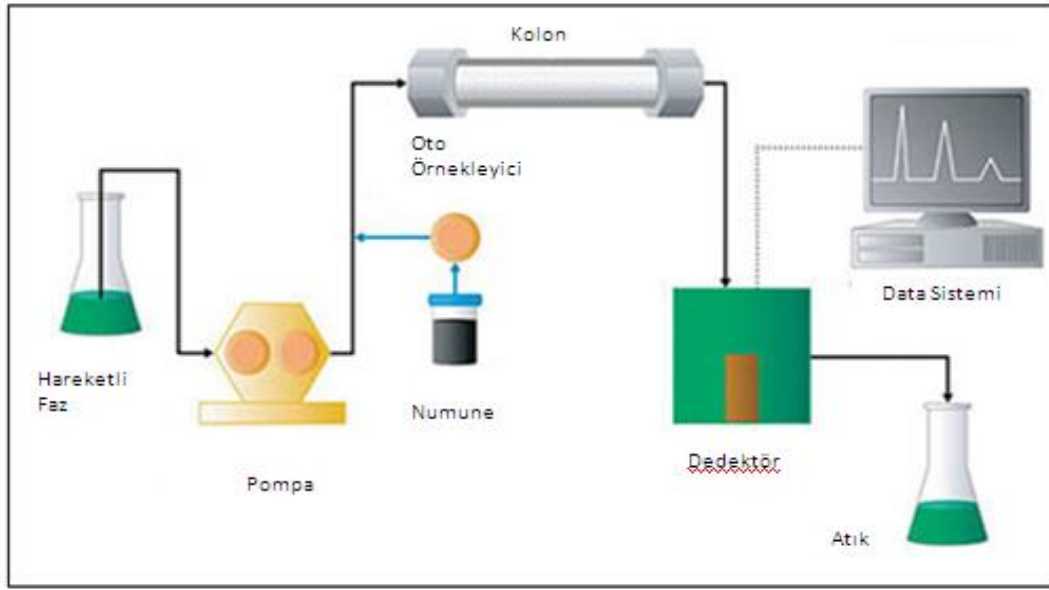
2.10.1. Normal ve Ters Faz Dolguları

Hareketli ve sabit fazların polarlıkları söz konusu olduğu zaman, dağılma kromatografisi ikiye ayrılır. Eskiden sıvı-sıvı kromatografisinde sabit faz olarak silikaya veya alüminaya bağlanmış su, trietilen glikol gibi oldukça polar, hareketli faz olarak da heksan, i-propil eter gibi daha az polar olan maddeler kullanılırdı. Geçmiş çalışmalara bir hürmetin ifadesi olarak, günümüzde bunlara normal faz kromatografisi denilmektedir. Ancak, günümüzde daha çok ters-faz kromatografisi kullanılmaktadır. Ters-faz kromatografisinde sabit faz polar olmayan bir hidrokarbon, hareketli faz ise su, metanol, asetonitril, alkilamin, gibi polar maddedir. Normal faz kromatografisinde polarlıkları $A > B > C$ olan üç maddeden önce C elüe olur. Onu B ve A takibeder. Çünkü polarlığı daha az olan C, polarlığı az olan hareketli fazda, polarlığı çok olan sabit faza göre, daha çok çözünür ve dolayısıyla kolondan daha kısa zamanda çıkar. Ters-faz kromatografisinde, normal faz kromatografisindekinin tam tersi olur. Polarlığı en yüksek olan A maddesi ilk önce elüe olur. Çünkü çözücü polardır.⁵² İlaç analizlerinde genel olarak ters-faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedeni, ilaçların genellikle daha apolar yapıda olmaları, ters-faz sıvı kromatografisinin uygulamasının ve sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücülerin daha ucuz olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulmasıdır.⁶³

2.10.2. Sıvı Kromatografi Cihazları

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 1,7 ile 10 m arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde

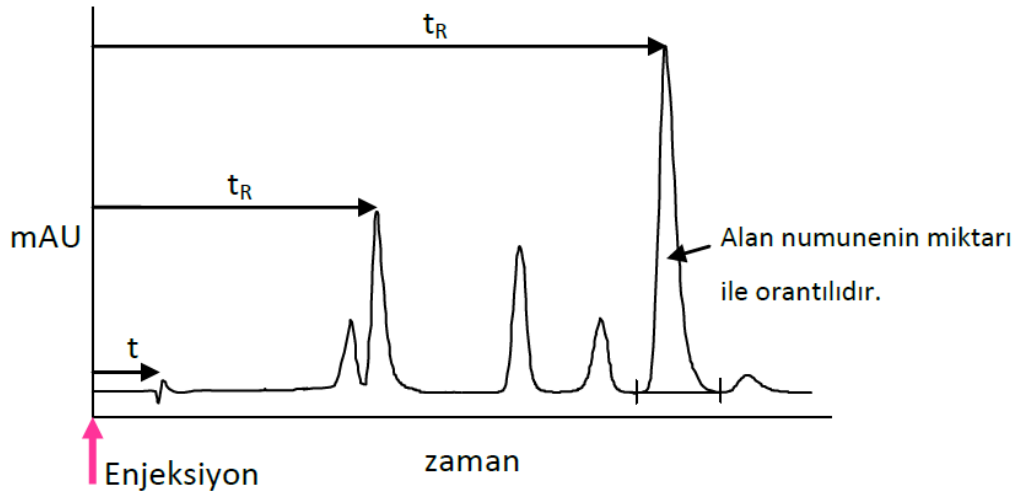
edebilmek için, yüzlerce atm'lık pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 2.17 'de tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının çeşitli kısımları şematik olarak gösterilmiştir.⁵¹



Şekil 2.14. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü

2.10.3. Kromatografide Temel Kavramlar

Bir kromatografik sistemde verilerin yorumlanmasında esas alınan kromatogramdır. Kromatogram; tayini yapılan örneğin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir detektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafikdir. Sekil 2.15'te iki bileşenli bir örneğe ait kromatogram ve kromatografik gösterimler belirtilmiştir.⁶⁴⁻⁶⁹



Şekil 2.15. Sıvı kromatografide bir kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında kullanılan başlıca parametreler şunlardır;

1. Alıkonma zamanı, t_R
2. Kapasite faktörü, k
3. Seçicilik, α
4. Etkin tabaka sayısı, N
5. Ayırma gücü, R_s

1. Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü: Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı, t_R , ile tanımlanır. Kromatografik karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen, k , yararlanılır. Kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.⁵⁰

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Burada t_R : bileşenin alıkonma zamanı, t_0 : kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanıdır. k değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini; k değerinin küçük olması, bileşenin hareketli faza ilgisinin

fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. HPLC ayırmalarında k , mümkün olduğunca 1-10 arasında tutulmalıdır. k çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayıramaz; k çok büyürse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerlerinin bu aralıkta olması, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır. Kapasite faktörü uygulanan yöntemde, her maddenin kendi fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir.⁶⁴⁻⁶⁹

2. Seçicilik (α): Seçicilik, esas olarak kullanılan sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterse de hareketli faz bileşimi de, seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden biridir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi Eşitlik 2.2’de gösterilmiştir. Burada kolonda daha uzun süre tutunan maddeye ait kapasite faktörünün kolonda daha kısa süre tutunan maddeye ait kapasite faktörüne oranlanması ile hesaplanır. Bu tanıma göre seçicilik daima 1’den büyüktür.^{68,69}

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}}$$

3. Teorik Tabaka Sayısı (N): Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N’ nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ ’dir. Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir.⁶⁷⁻⁶⁹

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2$$

Burada;

N :Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0.5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

4. Ayırma Gücü (R_s): Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) kavramıyla ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pik için R değeri 1,5 iken tam ayırım olmakta, $R=1,325$ iken maddelerden biri diğeri içine % 0,3 oranında girmiş durumda, $R = 1$ iken, maddelerden biri diğeri içine % 4 oranında girmiş durumda ve $R= 0,75$ 'de ayırım olmamaktadır. Ayırma gücü için geliştirilen bağıntı, aşağıda verilmiştir.⁶²⁻⁶⁴

$$R_s = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}}$$

Burada;

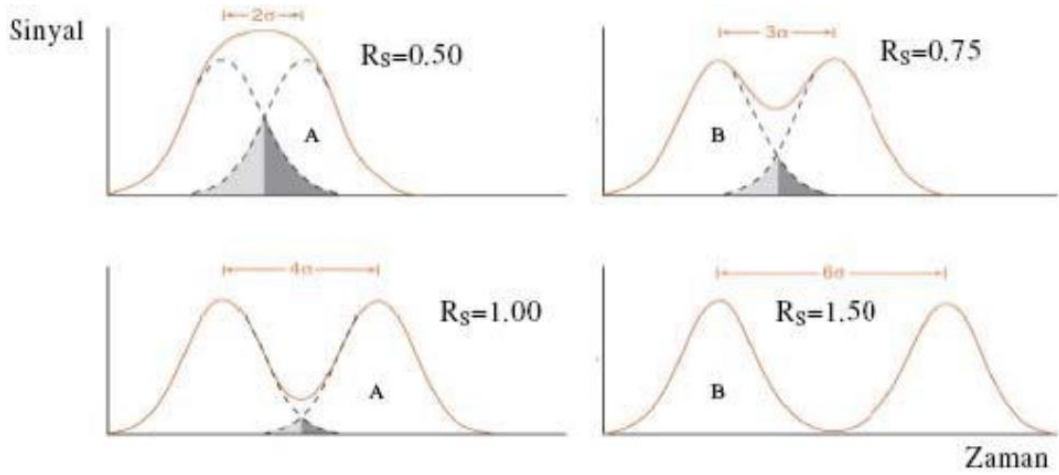
R_s :Pik çifti için ayırma gücü,

t_1 :Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

t_2 : İkinci pikin alıkonma zamanı, s,

$W_{0.5}$: Birinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği,

$W_{p0.5}$: İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişliğidir.



Şekil 2.16. Ayırma gücü (R_s) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi

2.10.4. Dedektörler

Sıvı kromatografik yöntemlerin gelişmesinde yaşanan en büyük güçlüklerden biri ideal dedektör bulabilmektedir. Bir dedektörde bulunması gerekli önemli karakteristikler;

Duyarlılık,

Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,

İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,

Üniversal ve akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı,

Doğru cevap, koşulların değişiminden etkilenmeme,

Numuneyi tahrip etmeme,

Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacim,

Ucuzluk ve kolay kullanımdır.

Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler 2 başlık altında toplanabilir.

a) Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti, yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.

b) Analit Özellikli Dedektörler: UV absarbansı, floresans şiddeti, vb. analitin sahip olduğu ama hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir.

Bu çalışmada UV esaslı Dedektörü kullanıldığından, sadece bu dedektörden bahsedilecektir.

Ultraviyole-Görünür Bölge Dedektörü: Absorbans ölçen dedektörler olup HPLC’de kullanılan dedektörlerin yaklaşık % 60’ını oluşturmaktadırlar. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Hareketli faz, UV/Görünür bölge fotometre ya da spektrofotometrenin bulunduğu Z şeklindeki küçük bir akış hücresinden geçirilir. Kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek için, bu gibi hücrelerin hacimleri mümkün olduğunca düşük tutulmaktadır. Hacimler 1-10 μ L ve hücre uzunluğu 2-10 mm arasında sınırlandırılmıştır. Bu tip hücreler, yaklaşık 600 psi’den büyük basınçlarda çalışmazlar. Bunun sonucu olarak, bir basınç düşürme düzeneği genellikle gereklidir.

Hücreden geçen analit, bir miktar UV ışınını absorblar ve dedektör tarafından bu absorbsiyona bağlı olarak bir sinyal oluşturulur Bu sinyal, analit derişimi ile orantılıdır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm’de ışıma yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörler de ise döteryum lambası kullanılır. Dalga boyunun her bir bileşene göre ayarlanabilmesi nedeni ile seçimli bir dedektör türü olan UV-görünür bölge dedektör sisteminde seçilen çözücülerin UV ışınlarını absorbladığı dalga boylarına dikkat edilmeli ve seçilen çalışma dalga boyu çözücünün absorbsiyon yaptığı dalga boyu değerinden yüksek olmalıdır. Bu durum özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için son derece önemlidir. Ayrıca elue edicinin pH

değerinin UV-görünür bölge spektrumunu etkileyeceği de göz önünde bulundurulmalıdır. İdeal UV dedektörün karakteristikleri şunlardır: ⁶⁴

Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.

Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.

Band genişletme etkisi küçüktür.

Çok güvenilirdir.

Örnek çözeltiyi bozmaz.

2.10.5. Ters-Faz Sıvı Kromatografide pH ve Seçicilik

Ters-faz sıvı kromatografi metoduyla analizi yapılan maddelerin çoğu, karboksilik asit, sülfonik asit veya amino grupları gibi, iyonlaşabilen gruplara sahiptir. Maddelerin alıkonma zamanı, büyük ölçüde fonksiyonel grupların iyonlaşmasına bağlıdır. Aynı analitin iyonlaşmış ve nötral şeklinin alıkonma zamanı arasında yaklaşık 30 kat farklılık olabilmektedir. İyonlaşma derecesi hareketli fazın pH'sıyla belirlenir. Eğer iyi bir kromatografik seçicilik ve tekrarlanabilir alıkonma isteniyorsa, iyonlaşma derecesini etkileyen faktörleri anlamak gereklidir. Bu faktörlerden en önemlilerine aşağıda değinilmiştir. ⁶⁴

2.10.6. İyonlaşma ve pH

İyonlaşan analitlerin alıkonması iyonlaşma derecesine bağlıdır. Ters-faz sıvı kromatografide, analitin iyonlaşmamış türü, iyonlaşmış türünden daha yüksek alıkonma zamanına sahiptir. Eğer analit birden fazla iyonlaşma basamağına sahipse; daha yüksek iyonlaşma derecesi basamağında, daha düşük alıkonma zamanı gösterir. Analitin iyonlaşma derecesi, çözeltinin pH'sına ve iyonlaşma basamaklarındaki pK değerine bağlıdır. Ters-faz sıvı kromatografide iyonlaşmış tür daima düşük alıkonma zamanına sahiptir. Bu yüzden, bazik türler için, asidik ortamda, asidik türler için ise bazik ortamda

alıkonma en düşüktür. Diğer yandan, yüksek alıkonma zamanı analit nötral formdayken de gözlenir. Analitlerin kapasite faktörleri ve iyonlaşma dereceleri arasındaki bağıntı,

$$k=k_0+k_1.d / 1+d$$

olarak verilmektedir. Burada k , analitin kapasite faktörünü, k_0 ve k_1 protonlanmış ve nötral formun kapasite faktörünü, d ise deprotonasyon derecesini ifade eder. d ;

$$d = 10^{pH-pK}$$

olarak ifade edilir. Bu eşitlikte pH , hareketli fazın pH değeri ve pK bileşiğin iyonlaşma basamağına ait değerdir.⁷⁰

2.10.7. Hareketli Fazda pH Standardizasyonu

Kromatografik ayırmada hareketli fazın pH 'sı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılımlarında önemli bir faktördür. Bilindiği gibi kapasite faktörü, çözünenin nötral ve iyonik formlarının kapasite faktörlerinin hareketli fazda bu formların mol kesirlerine göre ağırlıklı ortalamasıdır.

Sıvı kromatografide kullanılan hareketli fazların pH 'sı, önceleri sulu çözeltinin pH 'sı olarak alınmıştır. Oysa HPLC çalışmalarında su hiçbir şekilde tek başına hareketli faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer ile birlikte kullanılır. Bundan dolayı organik modifiyer ilavesi ile pH değişimini göz önüne almak gerekir.⁷¹⁻⁷⁴ HPLC hareketli fazında organik modifiyer olarak genellikle asetronitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur.⁷⁵⁻⁷⁷ Sulu faz pH 'sının ölçümü çok daha kolaydır, ancak su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması seçimli solvasyona çok bağımlıdır ve çözünene göre değişir. Bu nedenle HPLC hareketli fazına ve su ortamına ait pK değerleri farklıdır.⁷⁸ Organik çözücü-su karışımlarında ortamın dielektrik sabitinin azalması nedeniyle aktivite katsayıları dikkate alınmaktadır. pH 'nın sudaki pH yerine hareketli

fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir. Su-organik çözücü karışımlarında elektrot kalibrasyonu için referans değer pH standart çözeltisi (RVS) olarak 0,05 mol/kg potasyum hidrojen fitalat (KHP) çözeltisi kullanılmaktadır. Asetonitril-su ortamında (% 70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standart pH değerleri belirlenmiştir.

Asetonitril-su ve metanol-su gibi çözücü karışımlarında standart referans tampon çözeltilerinin bu ortamlara ait pH değerleri, pH_s, bilindiği için bu karışımlarda pH ölçümleri pH'nın tanımına uygun olarak aşağıdaki bağıntı dikkate alınarak yapılır.

$$pH_x = pH_s + \frac{E_s - E_x}{g}$$

Burada pH_x, X çözeltisinin pH değeri, pH_s, referans standart çözeltinin pH değeri, E_s ve E_x sırasıyla referans standart çözeltinin ve X çözeltisinin e.m.k değerleri ve g, Nerst sabitidir ($g = (\ln 10)RT/F$). Hareketli fazın pH'sı, alıkonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Hareketli faz pH'sı, çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve hareketli faz katkılarının davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. Hareketli fazın pH optimizasyonu, çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha komplikedir. Zira pH'nın değişmesi ile sadece iyonlaşan çözünen yapıların seçicilik ve alıkonma özellikleri değişmez, aynı zamanda pik genişliği ve pik simetrisi de değişir. Bu nedenle ayırmanın hesabında pik simetrisinin de göz önüne alınması gerekir.^{51,58,59}

2.11. Sıvı Kromatografik Yöntemle pKa Tayini

Yöntem, özellikle sıvı kromatografik ayırmada yararlanılan organik çözücü-su karışımlarına uygulanabilmektedir. Çalışılan bileşiklerin alıkonma davranışları ile hareketli faz pH'sı arasındaki ilişkilerden yararlanılarak iyonlaşma sabitleri tayin edilir. Kapasite faktörünün pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta

noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin pKa sabitlerinin tayininde ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir. Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır:⁷³⁻⁷⁵

Bileşiğin saf olması gerekmez.

ppm ve ppb düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.

Çalışılan ortam su-organik çözücü ikili karışımıdır.

Bu ortamlardaki pH standardizasyonunun bilinmesi gereklidir.

2.12. Geçerlilik Testi (Validasyon)

Geçerlilik Testi (Validasyon), ürünlerin değerlendirme prosesinde, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntem yada yöntemlerin bu analiz işlemlerinde uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tümüdür.^{67,76} Seçilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için kullanılan parametreler:

1. Doğruluk (Accuracy)
2. Kesinlik (Precision)
3. Saklanan örneklerin kararlılığı (Stability)
4. Doğrusallık (Linearity)
5. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
6. Seçicilik (Selectivity)
7. Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection, LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)
8. Tutarlılık (Robustness)

Biyoyararlanım çalışmalarında farmakokinetik parametrelerin ve plazma ortamında maddelerin miktarlarının belirlenmesinde uygulanan yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılmış olması gerekmektedir.

2.12.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Doğruluk, bir analitik yöntemde sonuçların gerçek değere yakınlığı olarak ifade edilir. Bu da bağıl ve mutlak hata ile verilir. Kesinlik ise, analitik bir işlemde önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen örnekten birçok örnekleme yapılır ve bu örneklerin her birinden alınan bir seri ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir ve % BSS (bağıl standart sapma) ile verilir. Tekrarlanabilirlik, farklı koşullarda aynı yöntemle hazırlanan örneklerden elde edilen sonuçların birbiriyle uyumu ifade eder. Kesinlik çalışmasından elde edilen değerler tekrarlanabilirlik çalışması olarak da kabul edilebilmektedir.

i) Güniçi kesinlik: Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin aynı gün içerisinde tekrarlayan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı ($n=6$, n : ölçüm sayısı) % BSS değeri ile verilir.

ii) Günler arası kesinlik: Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin farklı günler (en az altı gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az $n=6$) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsüdür. Bu çalışmayla elde edilen değerler aynı zamanda yöntemin uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.⁷⁰

2.12.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)

Saklanan örneklerin analiz süresince bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Saf analit, analit çözeltisi ve/veya analit içeren kan örneklerinin normal laboratuvar koşullarında nem, sıcaklık, hava ve örneklerin dondurulup-eritilmesi (-20°C bekletilmesi) gibi etkilere maruz kaldığında analitin bozunmadan sabit kaldığı süre tespit edilmeli ve aynı zamanda elde edilen bilgilerin literatür bilgileri ile de desteklenmesi gerekmektedir.^{70,79}

2.12.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi uygulanarak kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve regresyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.^{70,79}

2.12.4. Duyarlılık

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.⁶⁹

2.12.5. Miktar tayin alt sınırı

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin miktar tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir.

2.12.6. Gözlenebilme (teşhis) sınırı

Bir analitik işlemin gözlenebilme sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olmayıp sadece bir sınır değeridir.

2.12.7. Tutarlılık

Yöntemin farklı deney koşullarında, farklı alet, farklı analist, farklı laboratuvar, farklı koşullarda hazırlanan reaktiflerle ve farklı günlerde aynı yöntemle analiz sonucunda elde edilen bulguların birbiriyle uygunluk derecesidir. Analiz sonuçları

birbiriyle uyumlu ise analitik yöntemin uygulanabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini gösterir.

2.12.8. Geri Kazanım

Analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler

- Asetonitril (HPLC grade, MERCK, Almanya)
- Cefuroksim aksetil (Novagenix, Türkiye)
- Etadolak (Internal standard) (Novagenix, Türkiye)
- Cefaks (Arisİlaç Firması, İstanbul, Türkiye)
- Aksef (Devaİlaç Firması, İstanbul, Türkiye)
- Enfeksia (Drogsan İlaç Firması, Ankara, Türkiye)
- Cefurol (Bilim İlaç Firması, İstanbul, Türkiye)
- Dietil asetat
- Dietil Eter
- Deiyonize Su
- Azot gazı (N₂) (%99,9 saflıkta BOSS)
- TCA
- Fosforik asit
- Deney tüpü
- Vial ve insert (Agilent, 1,8 mL screw cap)
- Pastör pipet
- Otomatik pipet (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL)
- Kuvartz Küvet
- Balon joje
- Mezür

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Etüv (Dedeoğlu, Membert)
- Ultrasonik banyo (Transsonic T 890/H, Elma LC 30)
- Terazî (Bosch S 2000)
- Santrifüj (Hettich, RPMX100)
- Karıştırıcı (Vorteks, IKA)
- Vakum pompası (Phenomenex)
- **UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Sistemi:**
 1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi (ThermoSpectronic HeλIOS β)
 2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Thermospectronic Vision 32 Software
 3. Yazıcı (HP LaserJet 1018)
- **Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)**
 1. Agilent Technologies 1200 Series marka HPLC sistem
 2. Pompa (LC20 AD)
 3. Dedektör (Agilent Technologies)
 4. Kolon firmı (USA)
 5. Gaz giderme ünitesi (Agilent Technologies)
 6. Ters faz kolonu (C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm)
 7. Bilgisayar (HP).

3.3. Yöntemler

3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem Koşulları

Spektrofotometrik ölçümler 200-300 nm dalga boyu aralığında, 1 cm kuvarz küvetlerde, 280 nm/dak tarama hızı ve 2 nm spektral bant genişliği kullanılarak gerçekleştirildi. UV–Görünür Bölge spektrumlar, 277 nm dalga boyunda ışının madde üzerine gönderilmesi sonrası elde edilen absorbans değerlerinin ışının dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edildi.

3.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları

HPLC yöntem şartları Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. Sefuroksim Aksetil için HPLC-UV yöntem şartları

Yöntem Şartları	Sefuroksim Aksetil
Kolon	C ₁₈ (250x4,6 mm,5µm)
Dedektör	UV
Dalga Boyu	280 nm
Hareketli Faz	De-iyonize su (% 0.1’lik asetik asit)- Asetonitril (30:70; h/h)
Kolon Sıcaklığı	25 ° C
Kolon Akış Hızı	1.0 mL/dk.
Enjeksiyon Hacmi	10 µL

3.3.3. Sefuroksim Aksetill’ in Plazmadan Ekstraksiyon Prosesi

1. 0.5 mL boş insan plazması santrifüj tüplerine koyuldu ve bu tüplerin herbirine 0.5 mL 1 M Fosforik Asit eklendi.
2. 1 dakika vortekslendi
3. 5 mL dietil eter eklendi.

4. 3 dakika vortekslendi
5. Santrifüjlendi (3000 rpm, 10 dakika)
6. Organik faz alındı
7. Oda koşullarında azot gazı altında buharlaştırıldı
8. 4 mL Asetonitrille çözüldü.

3.3.4. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri

Analitik alanda farklı amaçlara göre düzenlenen kurallar dünyanın farklı bölgeleri ve farklı amaçlara göre farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada, Sefuroksim Aksetil analizinde kullanılan HPLC yönteminin geçerlilik testi, ICH (The International Conference on Harmonization) rehberinde kabul edilen analitiksel yöntem geçerlilik parametreleri esas alınarak gerçekleştirildi.

3.3.4.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Yöntemin doğrusallığı, 0.3-12 µg/mL derişim aralığında altı standardın her derişimdeki tekrarlanan analizleri ile belirlendi. Çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği derişim aralığı olarak seçildi. Belirtilen derişim aralığında UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve Birinci Derece Spektrofotometri çalışmaları için çözeltilerin derişimine karşı okunan absorbans değerleri ve HPLC çalışmasında ise çözeltilerin derişimine karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (n=3). Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları elde edildi.

3.3.4.2. Doğruluk/Kesinlik ve Geri Kazanım

Doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kalibrasyon eğrisi içerisinde yer alan üç farklı derişimde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) analizleri yapılarak elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla [% BH: (bulunan-eklenen/eklenen) x 100] ve kesinlik ise bağıl standart sapma [% BSS: (SS/ortalama değeri) x 100] ile verildi.

Analitik geri kazanım, farmasötik preparat çalışmaları için standart ekleme yöntemine göre plazma çalışmaları ise etkin maddenin boş plazmaya eklenip karıştırılıp ekstraksiyon sonrasında elde edilen değerin aynı derişimdeki standart çözelti için elde edilen değere oranlanması ile belirlendi.

3.3.4.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Spektrofotometri çalışmaları için kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimlerde hazırlanan sefuroksim aksetil çözeltilerinin absorbans değerleri okundu ve % Bağıl Standart Sapma (% BSS) değerleri belirlendi. % BSS değeri % 10'dan küçük olan değeri miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20'den küçük olan değeri ise gözlenebilme sınırı (LOD) değeri olarak kabul edildi.

HPLC çalışmasında ise alınan kromatogramlardan sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve bu oranın 10 olduğu değerde miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak kabul edildi.

3.4. Tabletlerin Hazırlanması

Sefuroksim Aksetil etkin maddesini içeren Cefurol, Enfexia, Cefaks ve Aksef tabletleri Eczanelerden temin edildi. Bu tabletlerin herbirinden 10 tablet alındı tartıldı

ve ortalama bir tabletin kütlesi belirlendi. Tabletler öğütölerek iyice toz haline getirildi ve harmanlanarak homojen bir karışım haline getirildi. Örnekleme yöntemine göre ortalama 1 tabletin kütlesi kadar miktarda toz karışımından alınarak 100 mL’lik balon jojeye koyuldu bir miktar asetonitril ile çözöldü ve hacmi asetonitril ile 100 mL’ye tamamlandı. Elde edilen tablet çözeltisi süzöldü ve herbir yöntem için gerekli derişimde çözeltileri hazırlanıp analizleri yapıldı.

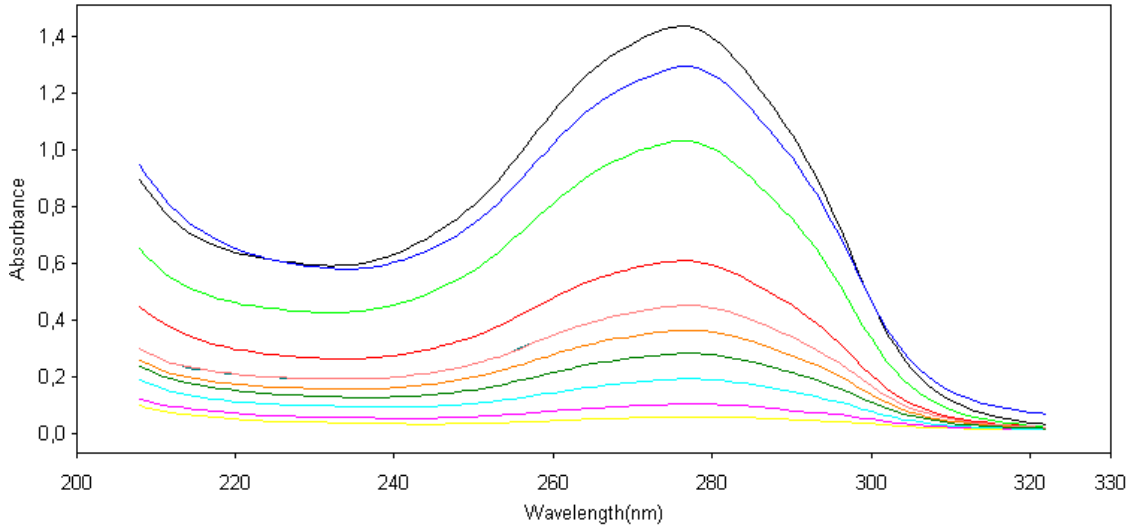
4.BULGULAR

4.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi

4.1.1. Standart Çözelti ve Farmasötik Preparatlara Uygulanması

4.1.1.1. Standart ve Kalite kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sefuroksim Aksetil‘ in 100 µg/mL derişimde stok çözeltisi analitik grade acetonitrilde hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp analitik grade asetonitril ile seyreltilerek 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/ mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve dört farklı derişimde (1.5, 4.5, 9.5 ve 30 µg/mL) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler 277 nm dalga boyunda UV-Görünür Bölge absorpsanları okunarak spektrumları elde edildi (Şekil 4.1).

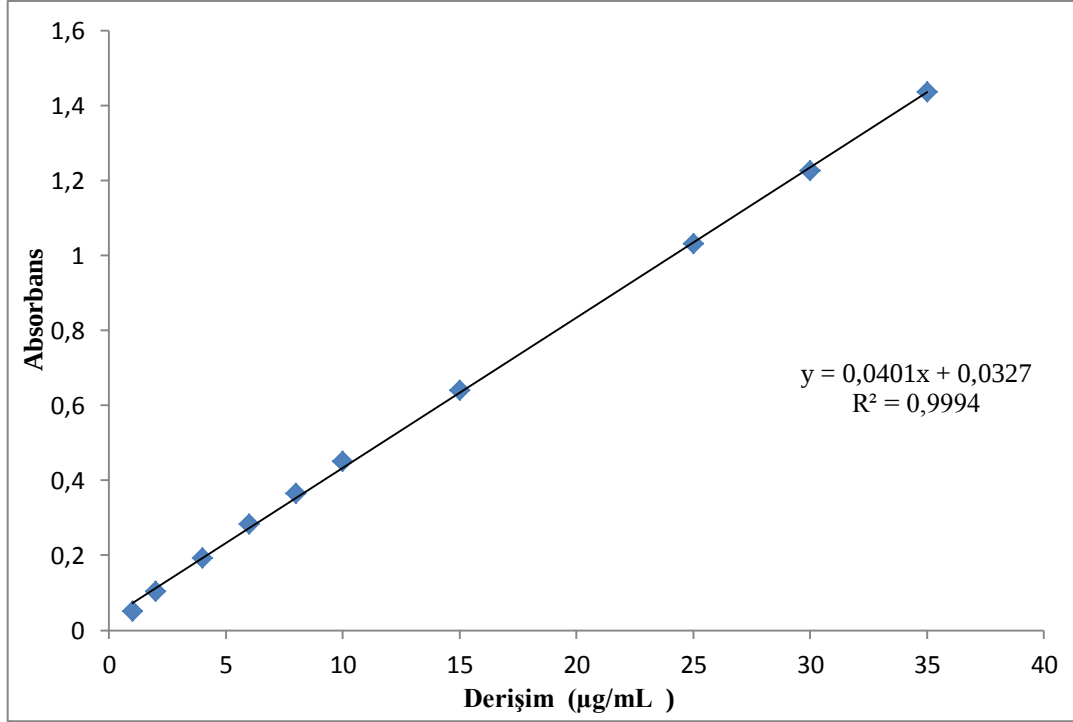


Şekil 4.1. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL derişimdeki standart sefuroksim aksetil çözeltilerinin UV-Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları.

4.1.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

a. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

1-35 µg/mL derişim aralığında hazırlanan sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin derişimlerine (1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL) karşı okunan absorbens değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrisi.

UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1' de verildi.

Tablo 4.1. Sefuroksim Aksetil’e ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler

Parametreler	UV-Görünür Bölge Spektrofotomeri Yöntemi
Dalga Boyu (λ : nm)	277
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g/ mL}$)	1-35
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$A = 0,0401x + 0,0327$
S_a : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	2.4×10^{-3}
S_b : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması	8.3×10^{-2}
R: Korelasyon katsayısı	0.9997

b. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan 1 $\mu\text{g/mL}$ ’den daha küçük derişimlerde bir seri çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin absorbans değerleri altı kez okundu ve % Bağıl Standart Sapma (% BSS) değerleri belirlendi. % BSS değeri % 10’dan küçük olan değer miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20’den küçük olan değer ise gözlenebilme sınırı (LOD) değeri olarak kabul edildi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ve 1 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.

c. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Günüçi ve günler arası deney sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen dört farklı derişimde (1.5, 4.5, 9.5 ve 30 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan sefuroksim aksetil çözeltileri için elde edilen değerlerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hataları belirlendi. Doğruluk % Bağıl Hata (% BH) kesinlik ise % Bağıl Standart Sapma (% BSS) ile verildi. Deney sonuçları Tablo 4.2’de verildi.

Tablo 4.2. UV-Görünür Bölge Spektrofotometrik yöntemin günüçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

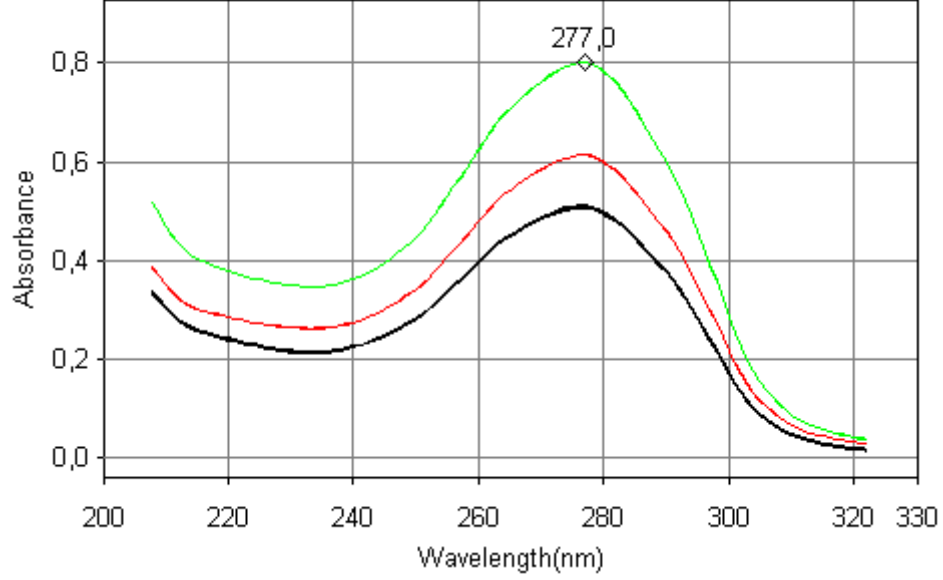
Eklenen (µg/mL)	Bulunan Değer (µg/mL)	Günüçi			Bulunan Değer (µg/mL)	Günler Arası		
		X± SS (µg/mL)	% BSS	% BH		X±SS (µg/mL)	% BSS	% BH
1.5	1.40	1.40±0.018	1.28	-6.66	1.40	1.41±0.021	1.49	-6.00
	1.42				1.43			
	1.38				1.38			
	1.40				1.40			
	1.42				1.43			
	1.38				1.43			
4.5	4.35	4.37±0.016	0.37	-2.89	4.40	4.42±0.019	0.43	-1.78
	4.37				4.42			
	4.37				4.45			
	4.37				4.40			
	4.37				4.42			
	4.40				4.40			
9.5	9.21	9.22±0.011	0.12	-2.95	9.43	9.43±0.016	0.17	-0.74
	9.21				9.46			
	9.21				9.43			
	9.23				9.41			
	9.23				9.43			
	9.23				9.43			
30	30.85	31.02±0.089	0.29	3.40	29.98	30.1±0.086	0.29	0.33
	31.02				30.03			
	31.05				30.08			
	31.10				30.13			
	31.07				30.18			
	31.05				30.20			

X: Ortalama Değer, SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

d. Analitik Geri Kazanım

Framasötik preparatlarda analitik geri kazanım standart ekleme yöntemine göre yapıldı. 500 mg sefuroksim aksetil etkin maddesi içeren Cefaks, Aksef, Cefurol ve Enfexia tabletlerden Bölüm 3.4.'de anlatıldığı şekilde 10 µg/mL derişimde tablet çözeltisi hazırlandı. UV-Görünür Bölge spektrumları alındı ve absorbansları belirlendi. Table çözeltisine 1.5, 4.5 ve 9.5 µg/mL derişimde sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltisi eklendi, karıştırıldı ve son elde edilen çözeltilerin günüçi ve günler arası UV-Görünür Bölge spektrumları alındı (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) ve absorbansları belirlendi. Yöntemin yüzde analitik geri kazanımı [% GK= (toplam

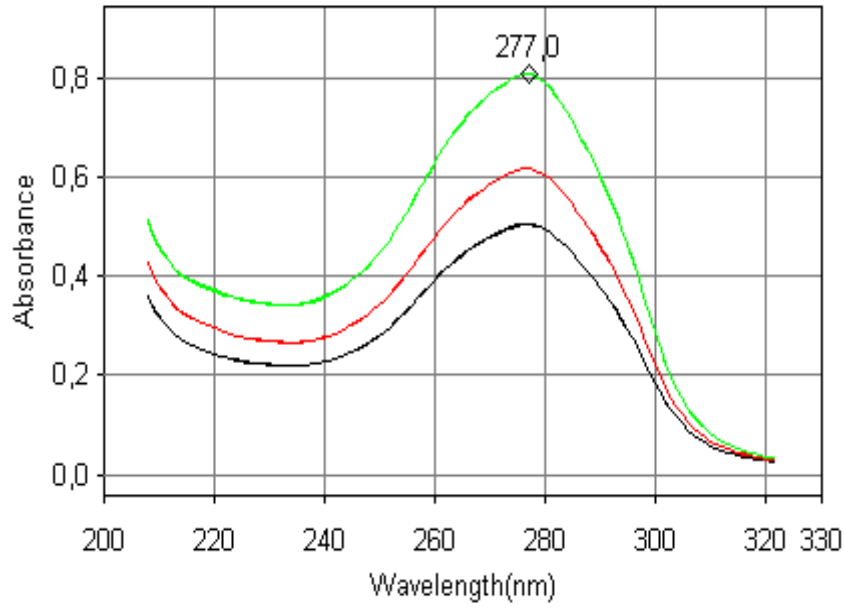
değer-eklenen değer/tablet çözeltisi)x100] formülü kullanılarak tespit edildi. Herbir tablet için elde edilen sonuçlar Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5. ve Tablo 4.6’da verildi.



Şekil 4.3. Cefaks tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometre absorpsiyon spektrumları.

Tablo 4.3. Farmasötik Preparat Cefaks tabletin analitik geri kazanım değerleri

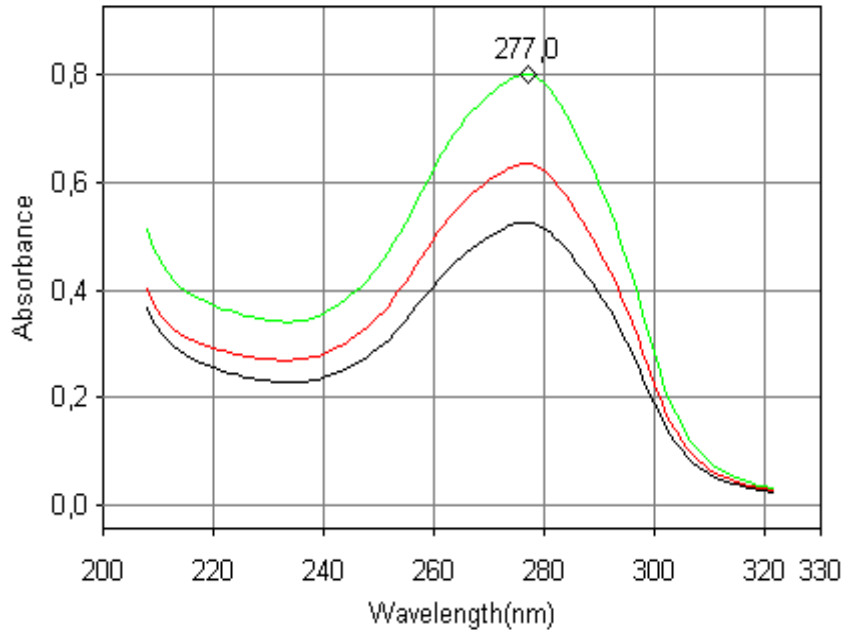
Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.75 ± 0.15	102.17	1.28
4.5		14.57 ± 0.07	100.48	0.48
9.5		19.33 ± 0.10	99.13	0.52
Günler Arası Geri Kazınım				
1.5	10	11.56 ± 0.16	100.52	1.38
4.5		14.45 ± 0.18	99.65	1.24
9.5		19.58 ± 0.20	100.54	1.02



Şekil 4.4. Aksef tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometri absorpsiyon spektrumları.

Tablo 4.4. Farmasötik Preparat Aksef tabletin analitik geri kazanım değerleri

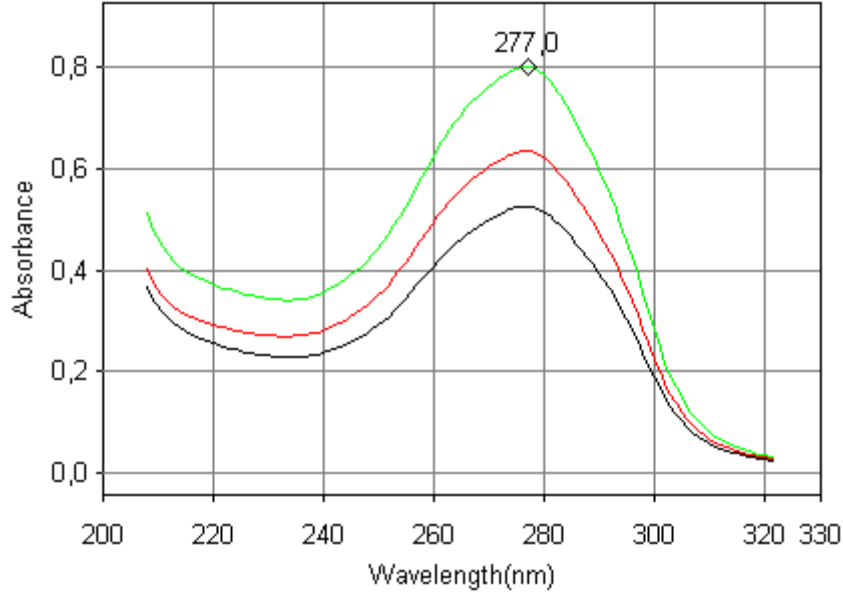
Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.77 ± 0.12	102.35	1.01
4.5		14.51 ± 0.03	100.01	0.21
9.5		19.69 ± 0.21	101.99	1.06
Günler Arası Geri Kazınım				
1.5	10	11.70 ± 0.02	102.01	0.17
4.5		14.43 ± 0.09	99.26	0.62
9.5		19.55 ± 0.03	100.54	0.15



Şekil 4.5. Cefurool tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometri absorpsiyon spektrumları.

Tablo 4.5. Farmasötik Preparat Cefurool tabletin analitik geri kazanım değerleri

Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.79 ± 0.22	102.52	1.86
4.5		14.68 ± 0.17	101.24	1.16
9.5		19.58 ± 0.07	100.41	0.36
Günler Arası Geri Kazınım				
1.5	10	11.65 ± 0.09	101.30	0.77
4.5		14.59 ± 0.13	100.62	0.89
9.5		19.61 ± 0.11	100.56	0.56



Şekil 4.6. Enfexia tabletinin 11.5 µg/mL, 14.5 µg/mL ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV- Görünür Bölge Spektrofotometri absorpsiyon spektrumları.

Tablo 4.6. Farmasötik preparat Enfexia tabletin analitik geri kazanım değerleri

Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.74 ± 0.04	102.09	0.34
4.5		14.62 ± 0.08	100.83	0.55
9.5		19.48 ± 0.11	99.89	0.56
Günler Arası Geri Kazınım				
1.5	10	11.42 ± 0.13	99.30	1.14
4.5		14.44 ± 0.17	99.59	1.18
9.5		19.62 ± 0.12	100.62	0.61

4.1.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemin uygulaması için 500 mg sefuroksim aksetil etkin maddesini içeren Cefaks, Aksef, Cefurol ve Enfexia tabletleri Eczanelerden temin edildi. Bu tabletlerin herbirinden Bölüm 3.4.'de anlatıldığı şekilde 10 µg/mL derişimde tablet çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin spektrumları alındı ve absorbansları altı kez okundu. Elde

edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması, yüzde geri kazanım ve güven aralıkları belirlendi (Tablo 4.7).

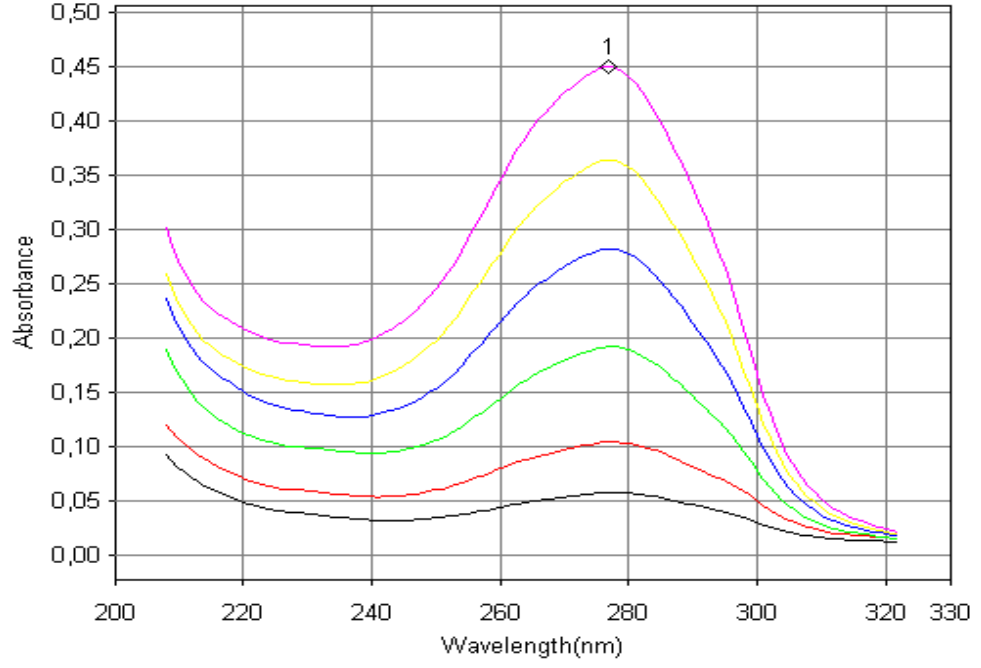
Tablo 4.7. Dört farklı ticari preparatta sefuroksim aksetil miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yönteminin uygulaması

İlaç	Bulunan $\pm$ SS (mg)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)	Güven Aralığı
Cefurol® Tablet	511.0 $\pm$ 0.6	102.2	0.12	101.9-102.5
Enfeksia® Tablet	514.0 $\pm$ 0.4	102.8	0.08	102.5-103.1
Cefaks® Tablet	492.6 $\pm$ 0.4	98.5	0.08	98.2-98.8
Aksef® Tablet	517.4 $\pm$ 0.5	103.5	0.10	103.2-103.8

4.1.2. UV- Görünür Bölge Spektrofotometri Yönteminin Plazma Çalışması

4.1.2.1. Plazma Standart Çalışma ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Erzurum Kızılay kan bankasından temin edilen boş insan plazmasının 0.5 mL sine kalibrasyon eğrisi değerlerini elde edebilecek miktarda önceden hazırlanmış olan sefuroksim aksetil standart stok çözeltisinden eklendi (spike edildi), karıştırıldı ve Bölüm 3.3.4.'de anlatıldığı şekilde ekstraksiyon edildi. Ayrıca boş plazmada aynı şekilde ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonrasında 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 30 μ g/mL derişimlerde plazma çalışma çözeltileri ve 1.5, 4.5 ve 9.5 μ g/mL derişimlerde plazma kalite kontrol çözeltileri elde edildi. Bu çözeltilerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemiyle spektrumları alındı ve absorbanları okundu (Şekil 4.7).

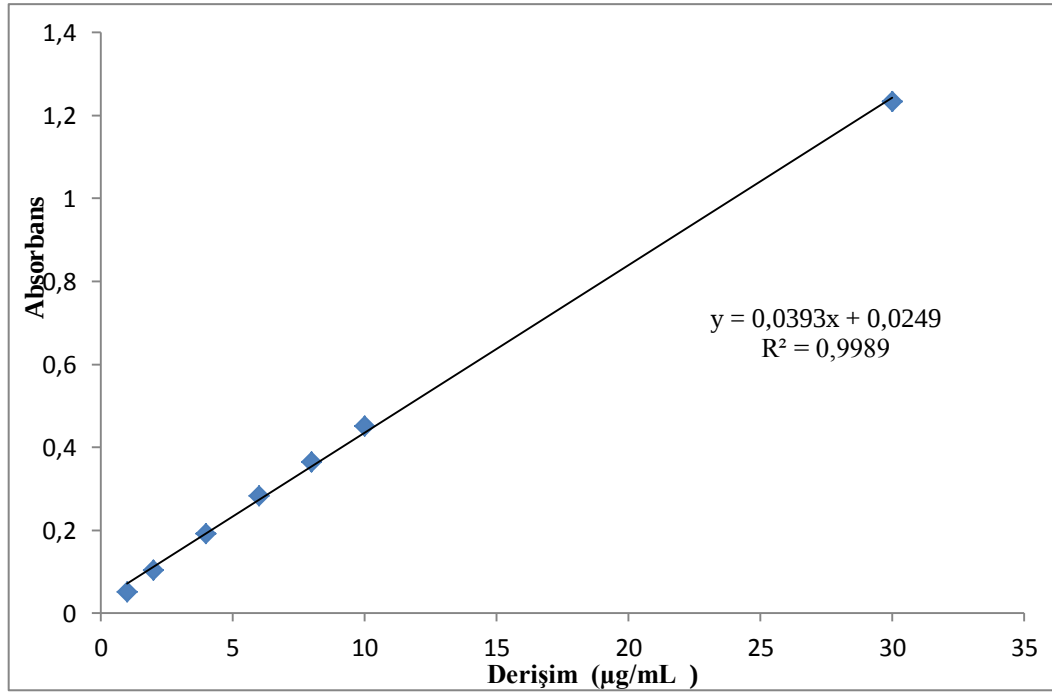


Şekil 4.7. 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 30 µg/mL derişimlerde sefuroksim aksetil plazma çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

4.1.2.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

a. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Plazmaya ekleme ve ekstraksiyon sonucunda 1-30 µg/mL derişim aralığında sefuroksim aksetil'in 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 30 µg/mL derişimlerdeki plazma çözeltileri elde edildi. Bu çözeltilerin derişimlerine karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. UV-Görünür Bölge spektrofotometri yöntemin plazmadan ekstrakte edilen sefuroksim aksetil kalibrasyon eğrisi

UV-Görünür Bölge spektrofotometri yönteminin, plazmadan ekstraksiyon sonrasında elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.8’ de verildi.

Tablo 4.8. Plazma çalışmasında Sefuroksim aksetil’ e ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler

Parametreler	UV-Görünür Bölge Spektrofotometri Yöntemi
Dalga Boyu (λ : nm)	277
Dğrusal Aralık ($\mu\text{g/mL}$)	1-30
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$A = 0.0393x + 0.0249$
S_a : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	8.3×10^{-4}
S_b : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması	7.3×10^{-3}
R: Korelasyon katsayısı	0.9994

b. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan 1 µg/mL'den daha küçük derişimlerde bir seri çözeltiler hazırlandı, boş plazmaya eklendi ekstraksiyon edildi. Ekstrakte edilen çözeltilerin absorbens değerleri altı kez okundu ve % Bağıl Standart Sapma (% BSS) değerleri belirlendi. % BSS değeri % 10'dan küçük olan değer miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20'den küçük olan değer ise gözlenebilme alt sınırı (LOD) değeri olarak kabul edildi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.45 µg/mL ve 1.0 µg/mL olarak belirlendi.

c. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Plazma çalışmasında, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içerisine düşen üç farklı derişimde standart çalışma çözeltileri plazmaya eklenip karıştırıldıktan sonra ekstrakte edilerek 1.5, 4.5 ve 9.5 µg/mL derişimde plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında bir günde altı kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı üç günde altı kez) analizleri yapıldı. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Kesinlik bağıl standart sapma (%BSS) ve doğruluk ta bağıl hatayla (% BH) ile verildi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Plazma çalışmasında yöntemin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (µg/mL)	Günüçi				Günler Arası			
	Bulunan Değer (µg/mL)	X± SS (µg/mL)	% BSS	% BH	Bulunan Değer (µg/mL)	X±SS (µg/mL)	% BSS	% BH
1.5	1.43				1.45			
	1.43				1.45			
	1.45	1.46±0.031	2.12	-2.67	1.53	1.51±0.052	3.31	0.67
	1.45				1.53			
	1.48				1.53			
	1.51				1.58			
4.5	4.20				4.33			
	4.23				4.33			
	4.25	4.25±0.031	0.73	-5.56	4.36	4.36±0.028	0.64	-3.11
	4.25				4.36			
	4.28				4.38			
	4.28				4.40			
9.5	9.47				9.54			
	9.49				9.56			
	9.44				9.62			
	9.52	9.48±0.033	0.35	-0.21	9.59	9.58±0.028	0.29	0.84
	9.46				9.59			
	9.52				9.59			

X: Ortalama Değer, SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

d. Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, üç farklı derişimde kalite kontrol çözeltileri plazmaya eklendi, karıştırıldı ve ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin absorbansları okundu. Aynı derişimdeki standart çözeltilerin absorbansları okundu. Belirlenen bu iki absorbans değerleri birbirine oranlanarak sefuroksim aksetilin plazmadan yüzde geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.10).

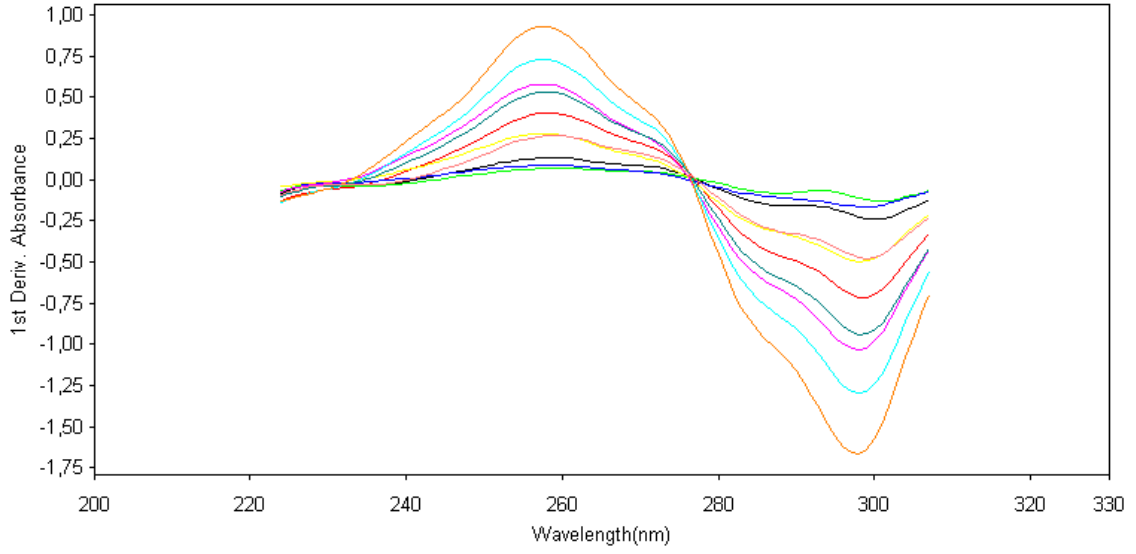
Tablo 4.10. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri

Güniçi Geri Kazanım			
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	1.46± 0.03	97.33	2.12
4.5	4.25± 0.03	94.44	0.73
9.5	9.48± 0.03	99.79	0.35
Günler Arası Geri Kazanım			
1.5	1.51± 0.05	100.66	3.31
4.5	4.36± 0.03	96.88	0.64
9.5	9.58± 0.03	100.84	0.29

4.2. Birinci Derece Türev Spektrofotometri Yöntemi

4.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Sefuroksim Aksetil’ in 100 µg/ mL derişimde stok çözeltisi analitik grade asetonitrille hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp analitik grade asetonitril ile seyreltilerek 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/ mL derişimlerde standart çalışma çözeltileri ve dört farklı derişimde (1.5, 4.5, 9.5 ve 30 µg/mL) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı ve birinci derece türev spektrumları alındı. Türev spektrumunda 258 nm dalga boyunda bir maksimum ve 298 nm dalga boyunda bir minimum olmak üzere iki pik gözlendi. Çalışmada ölçümler 298 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Elde edilen birinci derece türev spektrumları Şekil 4.9’ da verildi.

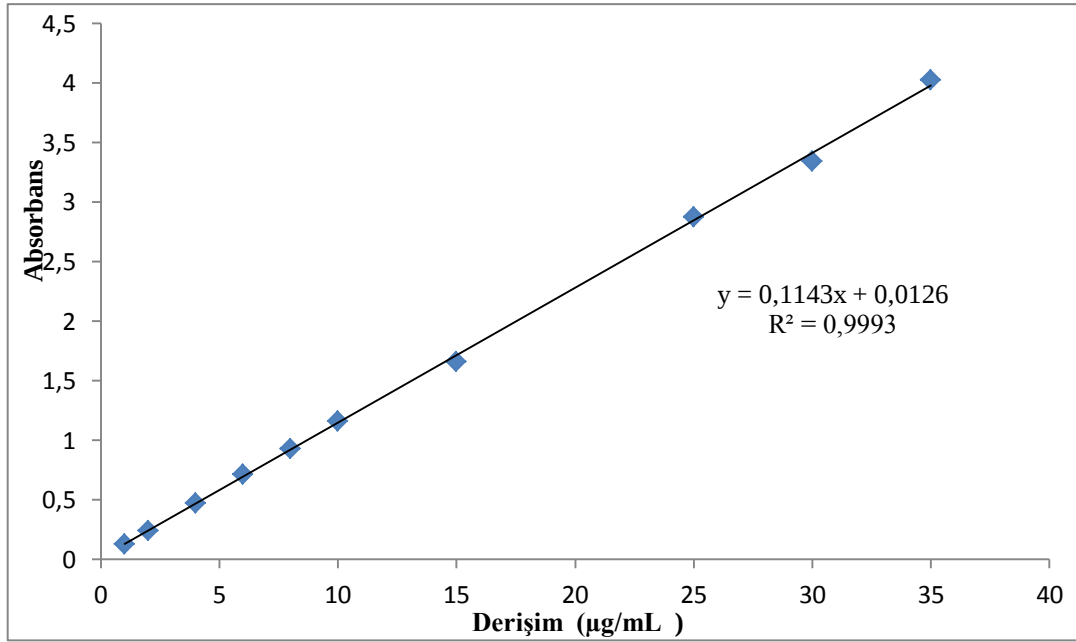


Şekil 4.9. 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerde sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin birinci derece türev spektrumları.

4.2.1.1.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

a. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrileri

1-35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişim aralığında hazırlanan sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin derişimlerine (1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) karşı 298 nm dalga boyunda okunan birinci derece türev absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde 298 nm dalga boyunda elde edilen kalibrasyon eğrisi

Birinci derece türev spektrofotometri yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.11’de verildi.

Tablo 4.11. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminin kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler

Parametreler	Birinci derece türev spektrofotometre yöntemi
Dalga Boyu (λ : nm)	298
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g/mL}$)	1-35
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$D_1 = 0,1143x + 0,0126$
S_a : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	$3,9 \times 10^{-4}$
S_b : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması	$3,42 \times 10^{-3}$
R: Korelasyon katsayısı	0,9996

b. Gözlenebilme Alt Sınırı (LOD) ve Miktar Tain Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan 1 µg/mL'den daha küçük derişimlerde bir seri çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin 298 nm dalga boyunda birinci derece türev absorbans değerleri altı kez okundu ve % Bağıl Standart Sapma (% BSS) değerleri belirlendi. % BSS değeri % 10'dan küçük olan değer miktar tayin alt sınırı (LOQ) ve % 20'den küçük olan değer ise gözlenebilme sınırı (LOD) değeri olarak kabul edildi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.4 µg/mL ve 1 µg/mL olarak belirlendi.

c. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği günüçi ve günler-arası değışkenlerle belirlendi. Günüçi ve günler-arası deney sonuçları, kalibrasyon eğrisi içine düşen dört farklı derişimde (1.5, 4.5, 9.5 ve 30 µg/mL) hazırlanan sefuroksim aksetil çözeltileri için elde edilen birinci derece türev değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapmaları belirlendi. Doğruluk % Bağıl Hata (% BH) kesinlik ise % Bağıl Standart Sapma (% BSS) ile verildi. Deney sonuçları Tablo 4.12'de verildi.

Tablo 4.12. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

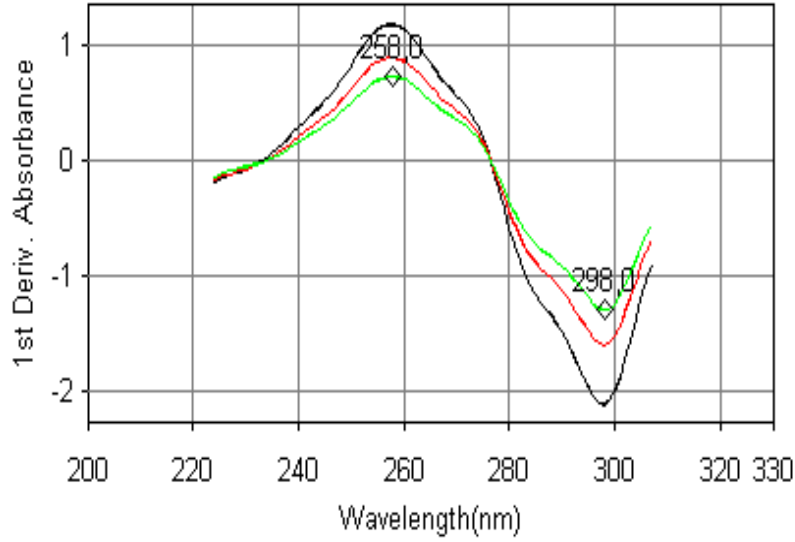
Eklenen (µg/mL)	Günüçi				Günler Arası			
	Bulunan Değer (µg/mL)	X± SS (µg/mL)	% BSS	% BH	Bulunan Değer (µg/mL)	X±SS (µg/mL)	% BSS	% BH
1.5	1.42	1.43±0.008	0.56	-4.67	1.44	1.45±0.006	0.41	-3.33
	1.44				1.44			
	1.43				1.44			
	1.43				1.45			
	1.44				1.45			
	1.44				1.45			
4.5	4.36	4.37±0.006	0.14	-2.89	4.40	4.40±0.005	0.11	-2.22
	4.36				4.40			
	4.36				4.40			
	4.37				4.41			
	4.37				4.41			
	4.47				4.40			
9.5	9.32	9.33±0.010	0.11	-1.79	9.41	9.43±0.014	0.15	-0.74
	9.34				9.41			
	9.33				9.43			
	9.35				9.43			
	9.33				9.44			
	9.33				9.44			
30	29.36	29.38±0.018	0.06	-2.07	29.29	29.31±0.019	0.06	-2.30
	29.37				29.29			
	29.38				29.32			
	29.39				29.32			
	29.41				29.32			
	29.39				29.34			

X: Ortalama Değer, SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

d. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım standart ekleme yöntemine göre yapıldı. 500 mg sefuroksim aksetil etkin maddesi içeren Cefaks, Aksef, Cefurol ve Enfexia tabletlerden Bölüm 3.4.'de anlatıldığı şekilde 10 µg/mL derişimde tablet çözeltisi hazırlandı. Birinci derece türev spektrumları alındı ve absorbansları belirlendi. Tablet çözeltisine 1.5, 4.5 ve 9.5 µg/mL derişimde sefuroksim aksetil standart çözeltileri eklendi, karıştırıldı ve son elde edilen çözeltilerin günüçi ve günler arası birinci derece türev spektrumları alındı (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14) ve absorbansları belirlendi. Yöntemin yüzde analitik geri kazanımı [% GK= (toplam değer-eklenen değer/tablet çözeltisi)x100]

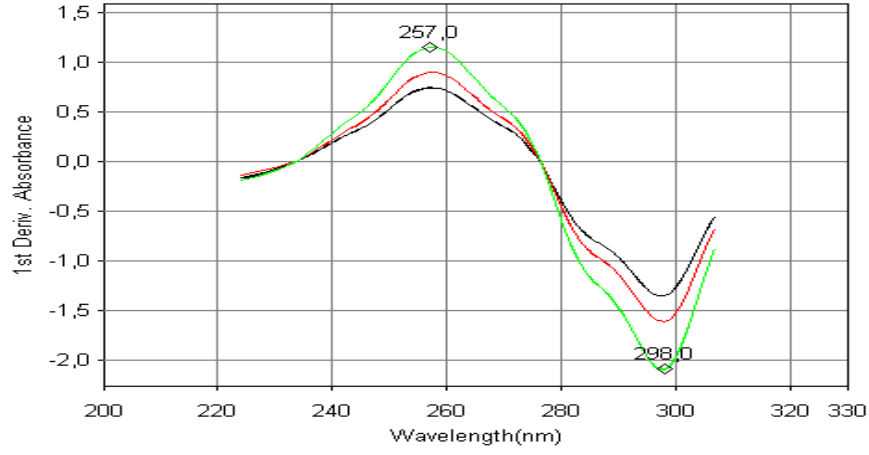
formülü kullanılarak tespit edildi. Herbir tablet için elde edilen sonuçlar Tablo 4.13, Tablo 4.14, Tablo 4.15 ve Tablo 4.16’da verildi.



Şekil 4.11. Cefaks tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev spektrumları

Tablo 4.13. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat Cefaks tabletin analitik geri kazanım değerleri

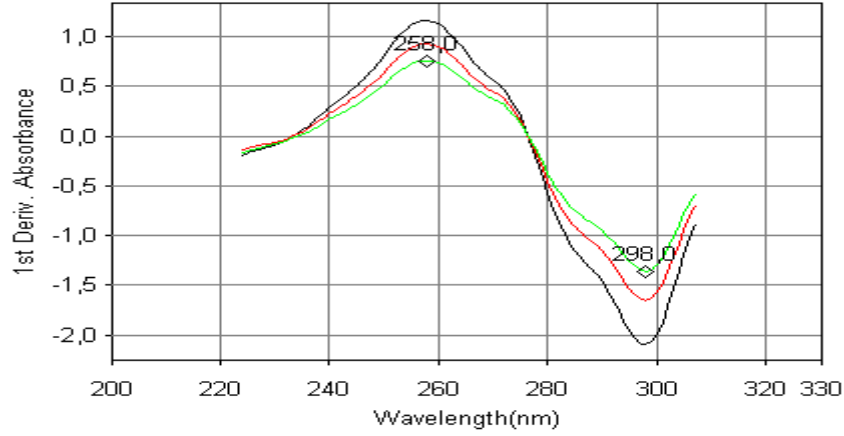
Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltilisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.65 ± 0.06	101.30	0.51
4.5		14.40 ± 0.16	99.31	1.11
9.5		19.52 ± 0.12	100.10	0.61
Günler Arası Geri Kazanım				
1.5	10	11,57 ± 0.08	100.61	0.69
4.5		14.59 ± 0.23	100.62	1.58
9.5		19.39 ± 0.19	99.44	0.98



Şekil 4.12. Aksef tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev absorbsiyon spektrumları

Tablo 4.14. Birinci türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat Aksef tabletin analitik geri kazanım değerleri

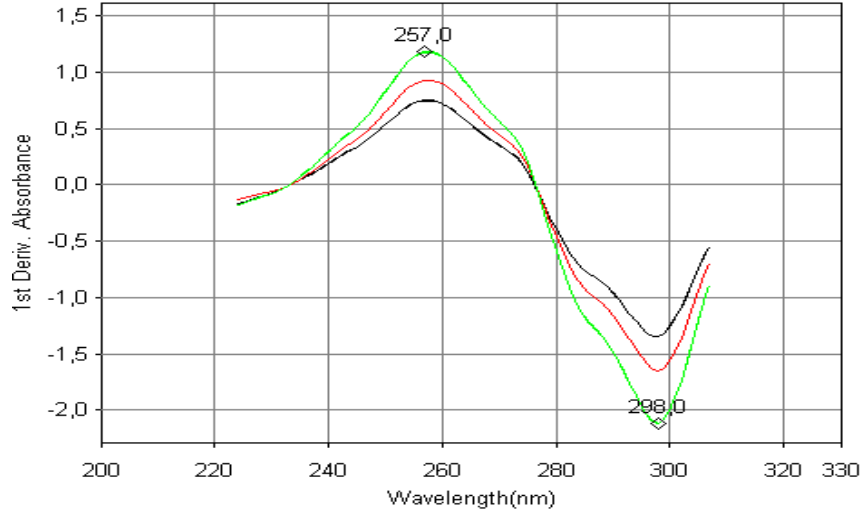
Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.82 ± 0.14	102.78	1.18
4.5		14.21 ± 0.22	98	1.55
9.5		19.37 ± 0.09	99.3	0.47
Günler arası Geri Kazınım				
1.5	10	11.66 ± 0.18	101.39	1.54
4.5		14.69 ± 0.27	101.31	1.84
9.5		19.43 ± 0.11	99.64	0.57



Şekil 4.13. Cefuroxime tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev absorpsiyon spektrumları

Tablo 4.15. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat Cefuroxime tabletin analitik geri kazanım değerleri

Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.79 ± 0.07	102.52	0.59
4.5		14.78 ± 0.14	101.93	0.95
9.5		19.78 ± 0.11	101.44	0.56
Günler Arası Geri Kazınım				
1.5	10	11.55 ± 0.08	100.43	0.69
4.5		14.39 ± 0.12	99.24	0.83
9.5		19.62 ± 0.09	100.62	0.46



Şekil 4.14. Eenfexia tabletinin 11.5, 14.5 ve 19.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin birinci derece türev absorbsiyon spektrumları

Tablo 4.16. Birinci derece türev spektrofotometri yönteminde farmasötik preparat Enfexia tabletin analitik geri kazanım değerleri

Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
1.5	10	11.73 ± 0.22	102.00	1.88
4.5		14.73 ± 0.17	101.59	1.15
9.5		19.62 ± 0.19	100.61	0.96
Günler Arası Geri Kazanım				
1.5	10	11.46 ± 0.21	99,65	1.83
4.5		14.74 ± 0.24	101.66	1.63
9.5		19.34 ± 0.12	99.18	0.62

4.2.2. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan Birinci Derece Türev Spektrofotometri yöntemin uygulaması için 500 mg sefuroksim aksetil etkin maddesini içeren Cefaks, Aksef, Cefurol ve Enfexia tabletleri Eczanelerden temin edildi. Bu tabletlerin herbirinden Bölüm 3.4.'de anlatıldığı şekilde 10 µg/mL derişimde tablet çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin birinci derece türev spektrumları alındı ve absorbansları altı

kez okundu. Elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması, yüzde geri kazanım ve güven aralıkları belirlendi (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Dört farklı ticari preparatta sefuroksim aksetil miktar tayini için Birinci Derece Türev Spektrofotometri yönteminin uygulaması

İlaç	Bulunan $\pm$ SS (mg)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)	Güven Aralığı
Cefurol® Tablet	488.0 $\pm$ 0.4	97.6	0.08	97.3-97.9
Enfeksia® Tablet	518.8 $\pm$ 0.6	103.8	0.12	103.5-104.1
Cefaks® Tablet	513.4 $\pm$ 0.3	102.7	0.06	102.4-103.0
Aksef® Tablet	508.0 $\pm$ 0.2	101.6	0.04	101.3-101.9

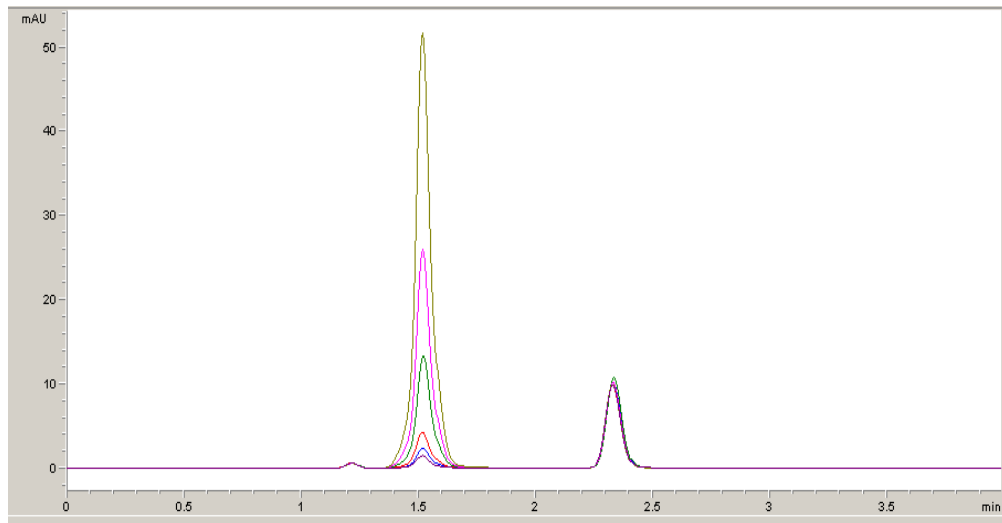
4.3. HPLC Yöntemi

4.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi Geliştirme

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir. Hareketli fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonmalarında önemli rol oynar. Mobil faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve ters faz HPLC’de çözünenin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. Bu çalışmada hareketli faz olarak, metanol, asetonyitril, metanol-asetonyitril, metanol-su, asetonyitril-su ve asetonyitril-% 0.1’lik asetik asitli su (asetonyitril- % 0.1’lik asetik asitli su: 50:50, 70:30, 80:20 ve 90:10 oranları, h/h) çözücü karışımları denendi. 70:30 (h/h) oranında asetonyitril-% 0.1’lik asetik asitli su çözücü karışımında diğer çözücü ve çözücü karışımlarına göre daha iyi ayırımın elde edildiği tespit edildi ve daha sonraki çalışmalarda bu çözelti karışımı kullanıldı. Ayrıca C₈ ve C₁₈ ters faz kolonlar denendi en iyi ayırım C₁₈ (250x4.6 mm,5 μ m) kolonda elde edildi.

4.3.2. Standart ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Sefuroksim Aksetil'in 100 µg/mL derişimde stok çözeltisi HPLC grade asetonitrilde hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp HPLC grade asetonitril ile seyreltilerek 2.5 µg/mL derişimde internal standart (etadolak) içeren 0.3, 0.5, 1, 3, 6 ve 12 µg/mL derişimler de standart çalışma çözeltileri ile 0.4, 4.0 ve 8.0 µg/mL derişimlerde kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. HPLC sistemine enjekte edilerek 280 nm dalga boyunda kromatogramları alındı (Şekil 4.15).

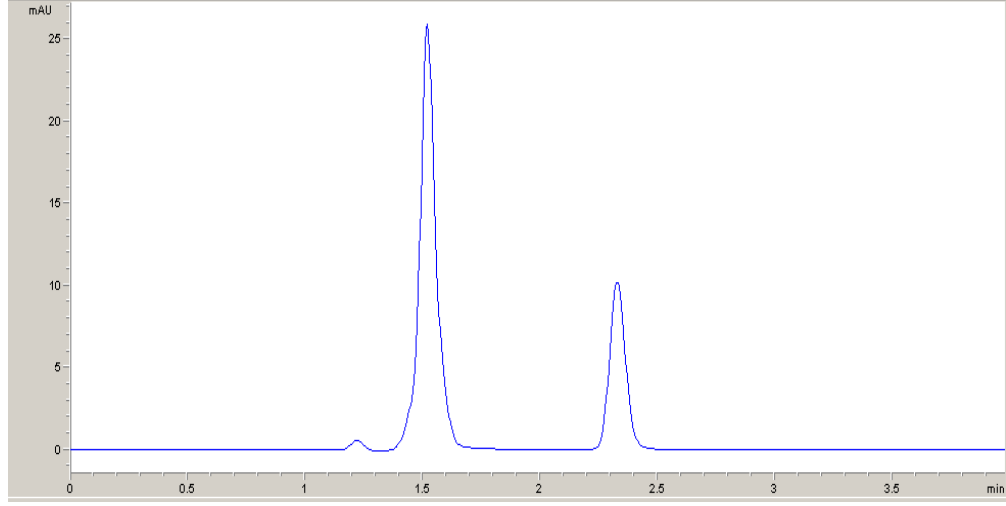


Şekil 4.15. HPLC yönteminde, 2.5 µg/mL derişimnde etodolak (IS) içeren 0.3, 0.5, 1, 3, 6 ve 12 µg/mL derişimlerde sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin kromatogramları.

4.3.3. HPLC Yönteminin Geçerlilik Testleri

4.3.3.1. Özgünlük (Belirleyicilik)

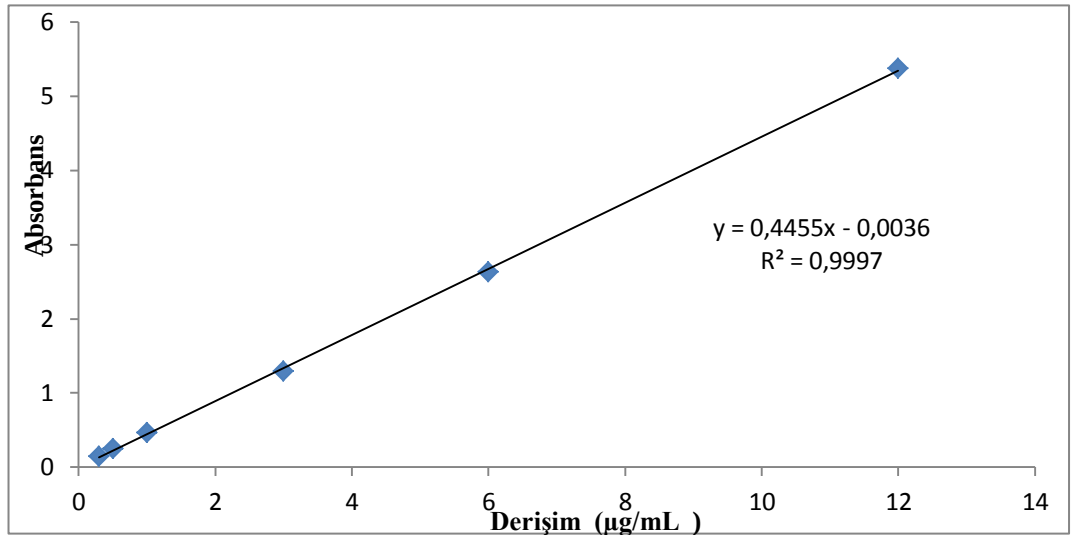
Önceden belirlenen kromatografik şartlar altında alınan kromatogramlarda herhangi bir interferense rastlanmadı. Sefuroksim aksetil ve etadolak (IS) alıkonma zamanları sırasıyla 1.5 dak ve 2.3 dak olarak belirlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 6 µg/mL derişimde standart sefuroksim aksetil çözeltilisinin HPLC kromatogramı

4.3.3.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

0.3, 0.5, 1, 3, 6 ve 12 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil çözeltileri ile etodolak çözeltilisinin kromatogramları alınarak pik alanları tespit edildi. Sefuroksim aksetil çözeltili derişimlerine karşı sefuroksim aksetil pik alanının etodolak pik alanına oranı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. HPLC yönteminin kalibrasyon eğrisi

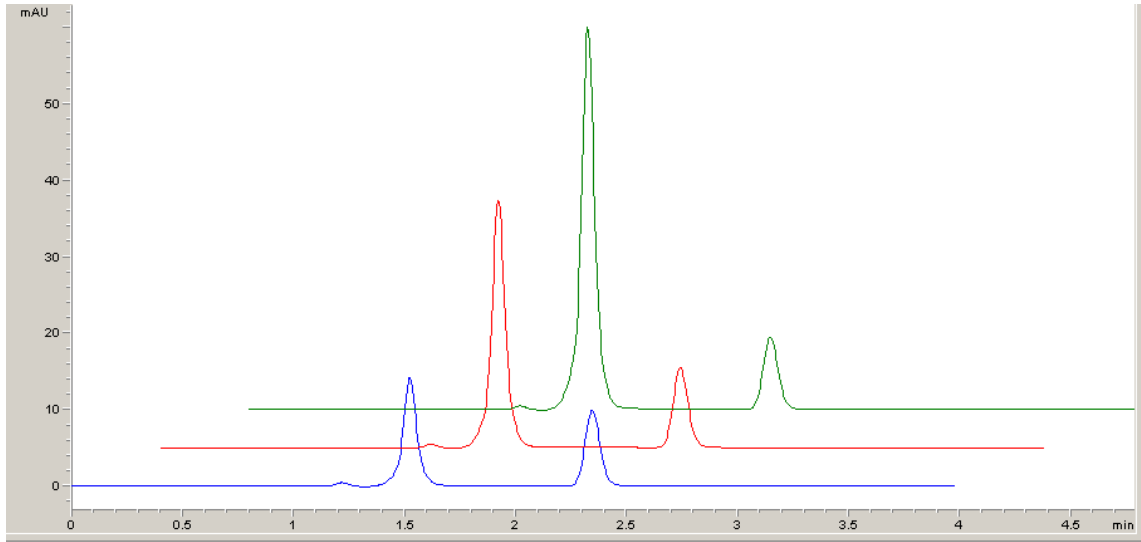
HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.18’ da verildi.

Tablo 4.18. Sefuroksim Aksetil kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	HPLC
Dalga Boyu (λ : nm)	280
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g /mL}$)	0.3-12
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$y= 0.4455x + 0.0036$
S_a : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	2.0×10^{-2}
S_b : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması	3.8×10^{-2}
R: Korelasyon katsayısı	0.9998

4.3.3.3. Doğruluk/Kesinlik

Sefuroksim Aksetil’ in kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde (0.4, 4 ve 8 $\mu\text{g/mL}$) kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 3 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 3 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Şekil.4.18’te kalite kontrol çözeltilerinin kromatogramları verilmiştir. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hataları belirlendi. Doğruluk bağıl hatayla (% BH) kesinlik ise bağıl standart sapma (% BSS) ile verildi (Tablo 4.19).



Şekil 4.18. Sefuroksim Aksetil’ in kalite kontrol çözeltilerine ait kromatogramlar

Tablo 4.19. HPLC yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Günüçi				Günler Arası			
	Bulunan Değer ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm SS$ ($\mu\text{g/mL}$)	% BSS	% BH	Bulunan Değer ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm SS$ ($\mu\text{g/mL}$)	% BSS	% BH
0.4	0.41	0.41 ± 0.006	1.46	2.50	0.41	0.42 ± 0.010	2.38	5.00
	0.42				0.42			
	0.41				0.43			
4.0	4.07	4.07 ± 0.035	0.86	1.75	4.03	4.05 ± 0.029	0.72	1.25
	4.10				4.08			
	4.03				4.03			
8.0	8.27	8.26 ± 0.010	0.12	3.25	8.33	8.28 ± 0.055	0.66	3.50
	8.25				8.28			
	8.26				8.22			

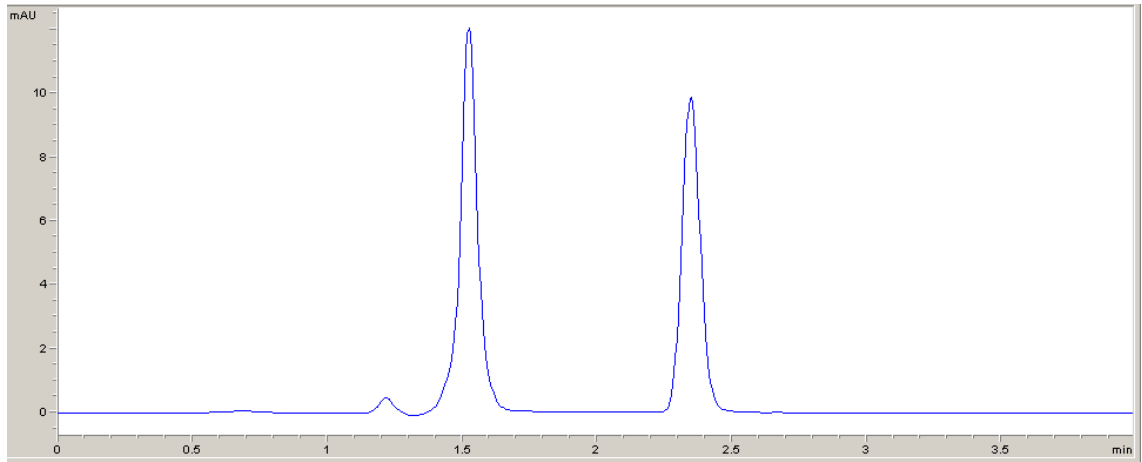
X: Ortalama Değer, SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

4.3.3.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt sınırı (LOQ)

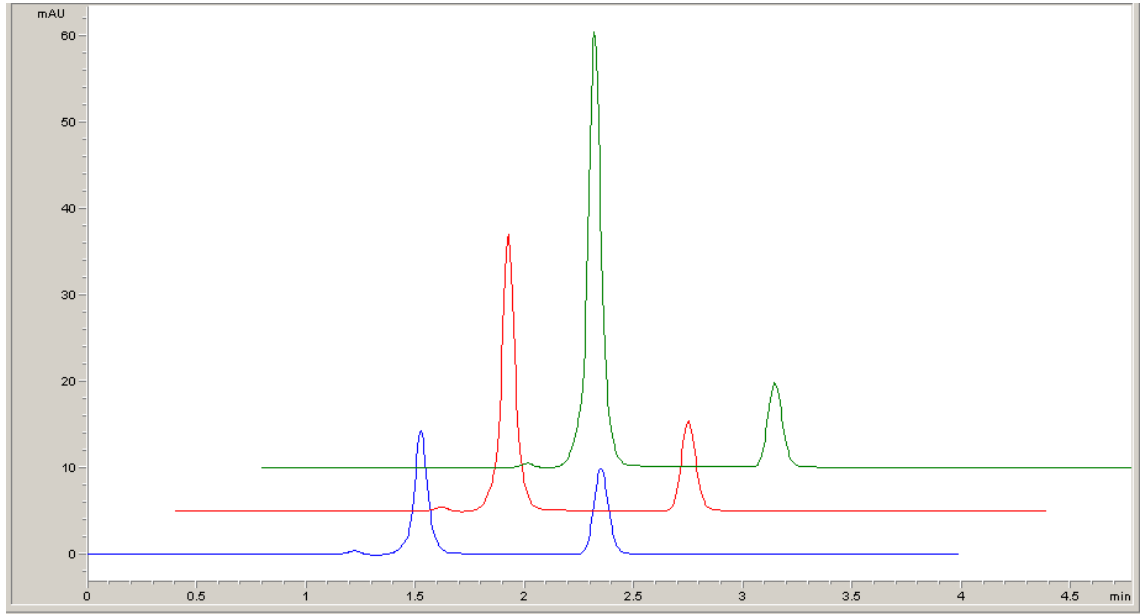
Kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimler de bir seri çözelti hazırlandı ve kromatogramları alındı. Kromatogramlar da sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD), 10 olduğu derişim ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $0.1 \mu\text{g/mL}$ ve $0.3 \mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi.

4.3.3.5. Geri Kazanım

Framasötik preparatlarda analitik geri kazanım standart ekleme yöntemine göre yapıldı. 500 mg sefuroksim aksetil etkin maddesi içeren Cefaks, Aksef, Cefurol ve Enfexia tabletlerden Bölüm 3.4.'de anlatıldığı şekilde 2.5 µg/mL derişimde tablet çözeltisi hazırlandı, kromatogramı alınarak pik alanı tespit edildi (Şekil 4.19). Bu çözelti üzerine 0.4, 4.0 ve 8.0 µg/mL derişimlerde sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltileri eklendi, kromatogramları alındı ve herbir çözeltinin pik alanları tespit edildi (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). Yöntemin yüzde analitik geri kazanımı [% GK= (toplam değer-eklenen değer/tablet çözeltisi) x100] formülü kullanılarak tespit edildi (Tablo 4.20, Tablo 4.21, Tablo 4.22 ve Tablo 4.23).



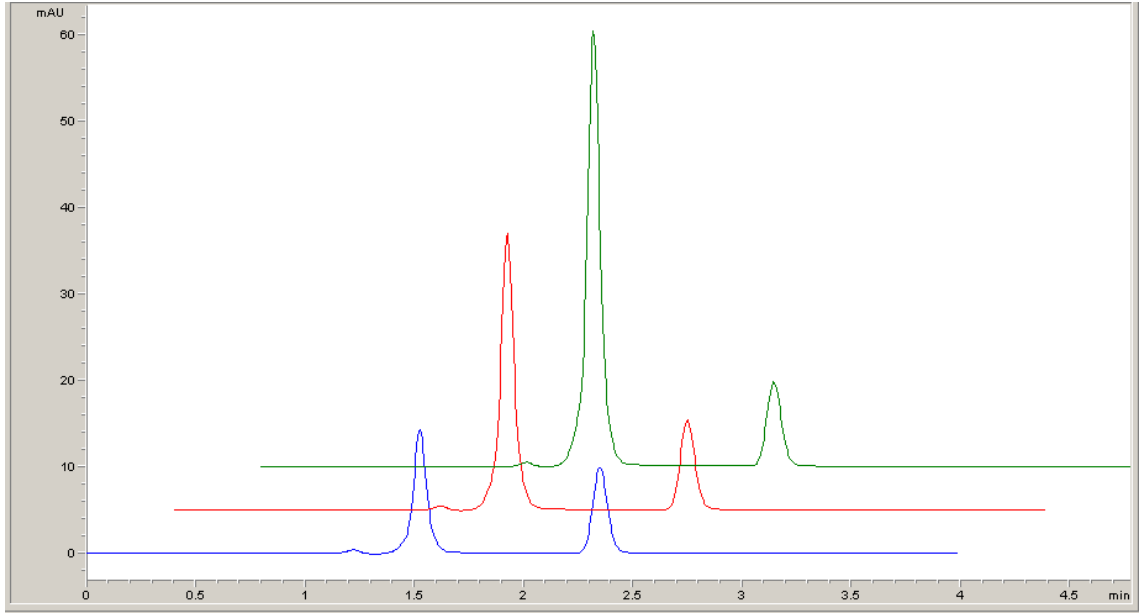
Şekil 4.19. 2.5 µg/mL derişimdeki sefuroksim aksetilin standart çalışma tablet çözeltilerinin kromatogramı



Şekil 4.20. 2.5 µg/mL derişimindeki Aksef tablet çözeltisine 0.4 µg/mL, 4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.

Tablo 4.20. HPLC yönteminde farmasötik preparat Aksef tabletin analitik geri kazanım değerleri

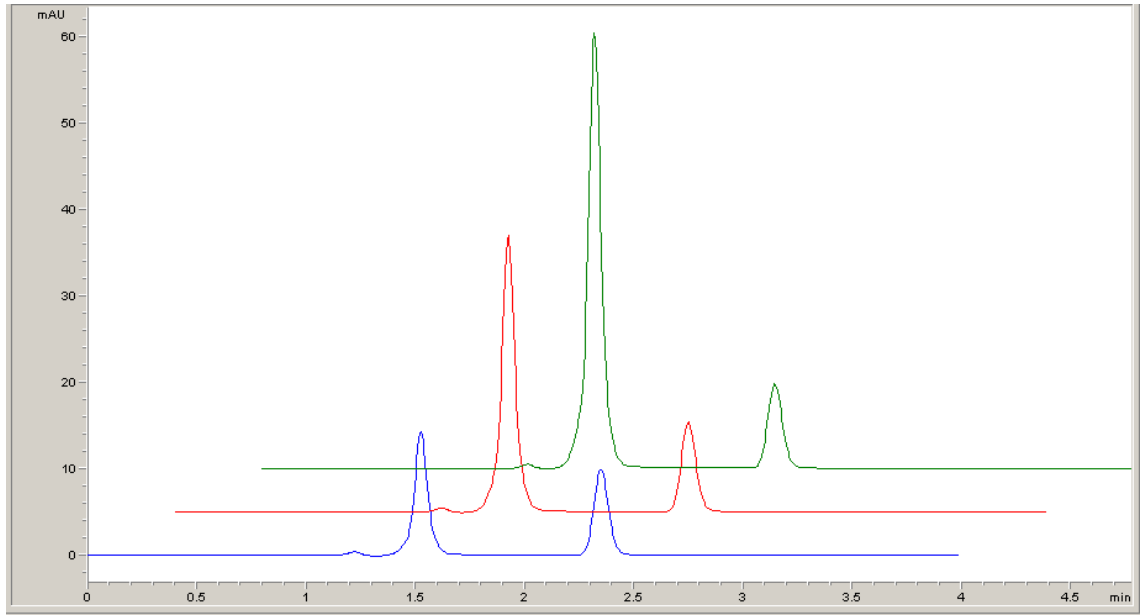
Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
0.4	2.5	0.41 ± 0.01	102.50	2.44
4.0		4.04 ± 0.02	101.17	0.51
8.0		8.29 ± 0.13	103.62	1.51
Günler Arası Geri Kazınım				
0.4	2.5	0.42 ± 0.02	104.33	4.12
4.0		4.15 ± 0.05	103.66	1.24
8.0		8.38 ± 0.12	104.75	1.45



Şekil 4.21. 2.5 µg/mL derişimindeki Enfexia tablet çözeltisine 0.4 µg/mL, 4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.

Tablo 4.21. HPLC yönteminde farmasötik preparat Enfexia tabletin analitik geri kazanım değerleri

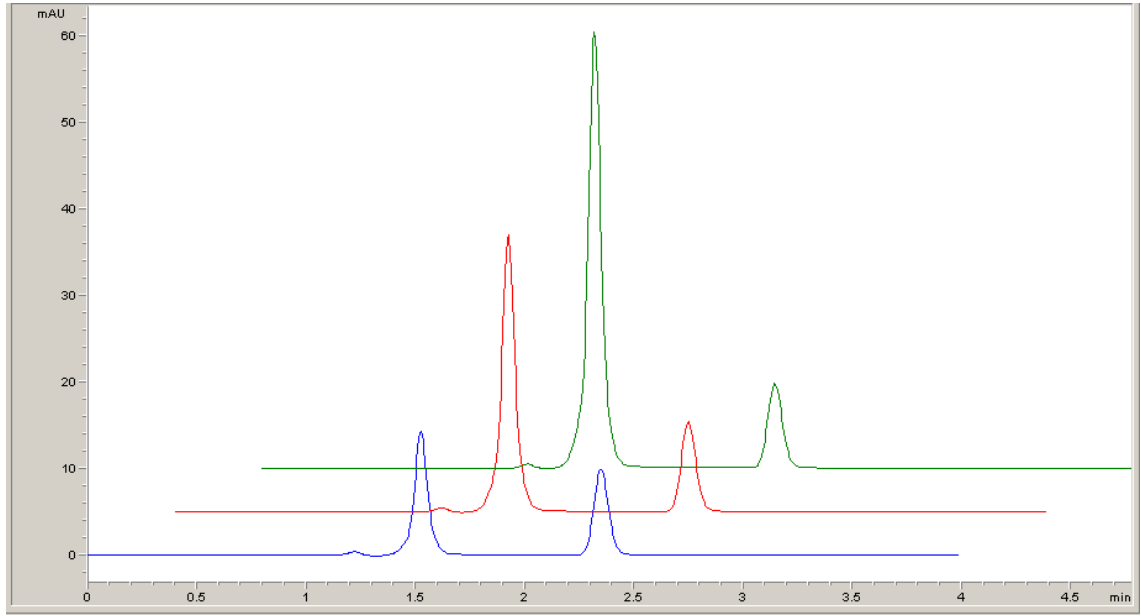
Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
0.4	2.5	0.42 ± 0.01	104.16	1.38
4.0		4.07 ± 0.02	101.64	0.42
8.0		8.22 ± 0.15	102.75	1.82
Günler Arası Geri Kazınım				
0.4	2.5	0.41 ± 0.01	102.5	2.43
4.0		4.14 ± 0.05	103.58	1.21
8.0		8.28 ± 0.16	103.5	1.90



Şekil 4.22. 2.5 µg/mL derişimindeki Cefurola tablet çözeltilerine 0.4 µg/mL, 4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuoksım aksetil standart çalışma çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.

Tablo 4.22. HPLC yönteminde farmasötik preparat Cefurol tabletin analitik geri kazanım değerleri

Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltilisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
0.4	2.5	0.42 ± 0.02	105.00	3.61
4.0		4.05 ± 0.04	101.25	0.89
8.0		8.26 ± 0.11	103.25	1.35
Günler Arası Geri Kazınım				
0.4	2.5	0.42 ± 0.02	105.00	4.12
4.0		4.07 ± 0.04	101.83	0.93
8.0		8.24 ± 0.07	103.00	0.85



Şekil 4.23. 2.5 µg/mL derişimindeki Cefaks tablet çözeltilerine 0.4 µg/mL, 4.0 µg/mL ve 8.0 µg/mL derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen HPLC kromatogramları.

Tablo 4.23. HPLC yönteminde farmasötik preparat Cefaks tabletin analitik geri kazanım değerleri

Güniçi Geri Kazanım				
Eklenen Standart Çözelti (µg/ mL)	Tablet Çözeltisi (µg/ mL)	Bulunan±SS (µg/ mL)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
0.4	2.5	0.41 ± 0.02	102.50	5.58
4.0		4.12 ± 0.10	103.00	2.32
8.0		8.25 ± 0.09	103.13	1.17
Günler Arası Geri Kazınım				
0.4	2.5	0.41 ± 0.02	102.50	3.76
4.0		4.19 ± 0.04	104.66	0.97
8.0		8.32 ± 0.09	104.00	1.05

4.3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan HPLC yöntemin uygulaması için 500 mg sefuroksim aksetil etkin maddesini içeren Cefaks, Aksef, Cefurol ve Enfexia tabletleri

Eczanelerden temin edildi. Bu tabletlerin herbirinden Bölüm 3.4.'de anlatıldığı şekilde 2.5 µg/mL derişimde tablet çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin kromatogramları alındı ve pik alanları altı kez okundu. Elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması, yüzde geri kazanım ve güven aralıkları belirlendi (Tablo 4.24).

Tablo 4.24. Dört farklı ticari preparatta sefuroksim aksetil miktar tayini için HPLC yönteminin uygulaması

İlaç	Bulunan±SS (mg)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)	Güven Aralığı
Cefurool® Tablet	486.0±0.2	97.2	0.04	96.9-97.5
Enfeksia® Tablet	508.1±0.1	101.6	0.02	101.3-101.9
Cefaks® Tablet	509.6±0.2	101.9	0.04	509.3-509.9
Aksef® Tablet	512.0±0.3	102.4	0.06	102.1-102.7

5. TARTIŞMA

Analitik kimya, bir maddenin bileşenlerinin ayrılması, tanınması ve miktarlarının bulunması işlemlerini nitel analiz ve nicel analiz olarak inceleyen bilim dalıdır. Herhangi bir maddenin analizi için kullanılacak analitik tekniklerin üstünlükleri ve sınırlamaları hakkında yeteri kadar bilgi donanımına ve iyi bir karar verme yetisine sahip olmak gerekir. Bunların yanında, çalışılacak konu ile ilgili iyi bir literatür taramasının yapılmış olması gerekmektedir. Aslında analitik bir tekniğin nasıl belirleneceği konusunda belli bir şey söylemek mümkün değildir. Çünkü şartlara bağlı olarak kullanılacak teknikler değişebildiğinden her zaman, sadece bir tane en iyi yol olmayabilir. Analitik bir yöntemin bir değer ifade edebilmesi için, yöntemin doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi geçerlilik test parametrelerinin incelenmesi gerekmektedir. Yöntem geliştirme ve geçerlilik testlerinin belirlenmesinde bileşimi analitik bir çalışma için belirlenmiş kurallar çerçevesinde üretilmiş standart numunelerin kullanılması gereklidir.

Analitik bir çalışmada çalışmaya başlamadan önce çalışmayla ilgili iyi bir literatür taramasının yapılması gereklidir. Literatür çalışması sonrasında elde edilen bilgiler doğrultusunda bir çalışma programı oluşturup bu program çerçevesinde çalışmayı gerçekleştirmek gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmaya başlamadan önce iyi bir literatür taraması gerçekleştirildi. Literatür taramasında sefuroksim aksetil etkin maddesi ile ilgili birçok çalışmaya ulaşıldı. Literatür çalışması ışığı altında antibiyotik olarak kullanılan sfuroksim aksetil etkin maddesinin hem farmasötik preparatlarda hem de plazmada miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometrisi, Birinci Derece Türev Spektroforometrisi ve HPLC yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı.

Çalışmada kullanılan sefuroksim aksetil standart etken maddesi ve internal standart olarak kullanılan etodolak Novagenixden temin edildi. Sefuroksim aksetil etkin maddesini içeren Aksef, Cefaks, Cefurol ve Enfeksia tabletleri Eczanelerden temin edildi.

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemi diğer yöntemlere göre daha kolay olması bakımından ilaç endüstrisinde farmasötik preparatlarda ilaç etken maddelerinin miktar tayininde tercih edilen yöntemlerden biri olduğu söylenebilir. Bu teknikte, UV-Görünür Bölge spektrumu, madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir. Yani $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri çalışmasında, sefuroksim aksetil' in 277 nm dalga boyunda maksimum absorbans verdiği tespit edildi. Yöntemin doğrusal olduğu 1-35 µg/mL derişim aralığında, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL derişimlerde sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin derişimine karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $A = 0,0401x + 0,0327$ (A: Absorbans, x: sefuroksim aksetil derişimi) ve korelasyon katsayısı (R) 0.9997, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0.4 µg/mL ve miktar tayin alt sınırı (LOQ) değeri 1.0 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günle arası bağıl standart sapma (% BSS) değerinin % 1.50'den bağıl hatanın (% BH) ise % 7.0'den küçük olduğu tespit edildi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntem sefuroksim aksetil etkin maddesi içeren dört farklı tabletlerde etkin madde miktar tayininde başarıyla uygulandı ve dört tablet için yöntemin ortalama geri kazanım değeri % 100.74 olarak belirlendi.

UV-Görünür Bölge Spektrofotometri yöntemiyle plazmada sefuroksim aksetil miktar tayini yapılmaya çalışıldı. Bu çalışmada 1-30 µg/mL derişim aralığında hazırlanan bir seri sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinden uygun miktarlarda 0.5 ml plazma üzerine eklenip (spike edilip) karıştırıldı ve bölüm 3.3.4.de belirtildiği şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ekstraksiyon işlemi sonucunda 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µg/mL derişimlerde plazma çalışma çözeltileri elde edildi. Bu çözeltilerin spektrumları alındı ve absorbansları tespit edildi. Her bir çözeltinin derişimine karşı absorbans değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $A=0.0393x + 0.0249$ (A: Absorbans, x: sefuroksim aksetil derişimi) ve korelasyon katsayısı (R) 0.9994, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0.45 µg/mL ve miktar tayin alt sınırı (LOQ) değeri 1.0 µg/mL olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası bağıl standart sapmasının (% BSS), % 3.5'den ve bağıl hatanın ise (% BH) % 6.0'dan küçük olduğu ve plazmadan sefuroksim aksetil'in ortalama geri kazanımı değerininin % 98.03 olduğu tespit edildi.

Türev spektrofotometresi, türev spektrumlarının kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir ve UV-Görünür Bölge çalışmalarından çok daha geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni UV-Görünür Bölge spektrumlarında üst üste binen, çakışan bantların daha çok görülmesi ve ayırım gücünün zayıf olmasıdır. Türev uygulamaları bu sorunlara belli oranlarda çözüm getirmiş ve karakteristik pikleri az olan ve çözülmemiş bantları içeren spektrumların ayırım gücünü artırmıştır.

Birinci Derece Türev Spektrofotometresi çalışmasında alınan spektrumda 258 nm dalga boyunda bir maksimum ve 298 nm dalga boyunda bir minimum olmak üzere iki pik gözlemlendi. 298 nm dalga boyunda çalışma gerçekleştirildi. Yöntemin doğrusal olduğu 1-35µg/ mL derişim aralığında hazırlanan 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 25 ve 35 µg/mL

derişimlerdeki sefuroksim aksetil standart çalışma çözeltilerinin derişimine karşı birinci derece türev absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon eğrilerinin yapılan regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $D_1 = 0,1143x + 0,0126$ (D_1 : Birinci derece türev absobansı, x: sefuroksim aksetil derişimi) ve korelasyon katsayısı (R) 0.9996 olarak belirlendi. Birinci derece türev spektrofotometresi yöntemi için gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0.4 µg/mL ve miktar tayin alt sınırı (LOQ) değeri 1.0 µg/mL olarak tespit edildi. Güniçi ve günler arası bağıl standart sapması (% BSS) % 0.6'dan ve bağıl hata ise (% BH) % 5.0'den küçük olduğu belirlendi. Yöntemin farmasötik preparatlardaki geri kazanımı % 100.62 olarak tespit edildi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntem sefuroksim aksetil etkin maddesi içeren dört farklı tabletlerde etkin madde miktar tayininde başarıyla uygulandı.

Kromatografi, miktarı bilinmeyen ve içinde başka maddelerinde olduğu karışımlardaki kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan yöntemler bütünüdür. Bu yöntemler topluluğundan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık, geri kazanım, düşük hacimde numune ile analiz yapılmasına imkan tanınması ve sonuçların hızlı tayin edilebilmesi özellikleri sayesinde diğer yöntemlere kıyasla daha avantajlı bir yöntem olarak göze çarpar. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi bu üstünlükler hasebiyle ilaç endüstrisinde gerek farmasötik preparatlardan miktar tayininde gerekse de biyolojik sıvılardan ilaç etkin maddelerinin analizlerinde sıkça başvuru olan bir yöntemdir.

HPLC çalışmalarında sıcaklık, kolon, sabit faz, hareketli fazın bileşenleri ve mobil faz içerisindeki bulunma yüzdeleri gibi parametreler analizi yapılacak maddenin absorbans değerlerine ve analiz süresine etki etmektedir. Bundan dolayı ayırımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların

optimizasyonuna gerek duyulmaktadır. Çalışma parametreleri belirlenirken öncelikle literatürdeki veriler incelendi ve bu verilere göre bazı testler yapılarak en uygun aralıklar ve ayırımın en iyi olduğu şartlar belirlendi. Ters faz C₁₈ kolonu (5 µm, 250 x 4.6 mm), % 0.1'lik asetik asitli su: asetonitril (30:70, h/h) den oluşan hareketli faz, kolon sıcaklığı değişken, 1.0 mL/dak hareketli faz akış hızı, 280 nm dalga boyu ve 10 µL enjeksiyon hacminden oluşan çalışma parametreleri kullanıldı. Ayrıca literatürdeki var olan yöntemlere de alternatif olabilecek yeni bir yöntemin ortaya konması amaçlandı.

Çalışmamızda diğer bazı yöntemlerde kullanılan türevlendirme ajanlarına ihtiyaç duyulmadı. Herhangi bir türevlendirme girişimine ihtiyaç duyulmadan doğrusallığı oldukça iyi bir kalibrasyon eğrisi elde edildi ve geri kazanım değerleri de baz alındığında tatmin edici bir çalışma olduğu gözlemlendi.

Standart çözeltilerin 0.3-12 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendi. Stok çözeltiden 0.3, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0 ve 12.0 µg/mL derişimlerinde bir sefuroksim aksetil standart çözeltili hazırlandı ve karışıma internal standart olarak 2.5 µg/mL derişiminde etodolak eklenerek HPLC'de kromatogramları alındı. Her bir çözeltilinin derişimine karşı sefuroksim aksetil pik alanının etadolak pik alanına oranı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $y = 0,4455x - 0,0036$ (y: sefuroksim aksetil pik alanının etodolak (IS) pik alan oranı, x: sefuroksim aksetil derişimi); korelasyon katsayısı (R) 0.9998 olarak, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD), 0.1 µg/mL, miktar tayin alt sınırı (LOQ 0.3 µg/mL olarak belirlendi. Yöntemin günüçi ve günler arası bağıl standart sapması (% BSS) değeri % 2.5'den, bağıl hatası (% BH) ise % 5.0'den küçük, tabletten analitik geri kazanım değerinin ortalama olarak % 103.22 olduğu tespit edildi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntem sefuroksim aksetil

etkin maddesi içeren dört farklı tabletlerde (Cefaks, Cefurol, Aksef ve Enfexia tabletler)
etkin madde miktar tayininde başarıyla uygulandı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; sefuroksim aksetil etkin maddesinin standart çalışma çözeltilerinde ve tabletlerde miktar tayini için UV- Görünür Bölge Spektrofotometri, Birinci Derece Türev Spektrofotometri ve HPLC yöntemleri ile plazmada sefuroksim aksetil miktar tayini için UV-Görünür Bölge Spektrofotometri ve Birinci Derece Türev Spektrofotometri yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Bu yöntemlerin sefuroksim aksetil miktar tayini için hassas, duyarlı, seçici, doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğu geçerlilik testleri ile gösterildiğinden geliştirilen yöntemlerin kalite kontrol çalışmalarında sefuroksim aksetil miktar tayini için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ileriki sefuroksim aksetil ile ilgili çalışmalara da yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Öner M. Genel Mikrobiyoloji. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*,1992: 231-245.
2. Salyers AA, Whitt DD. *A Molecular Approach*. Baskı. Bacterial pathogenesis, 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2002.
3. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of clinical microbiology. *American Society for Microbiology, Washington, DC Storage and Shelf Life Store below*,2003, 30: 2-8.
4. Mandell GL, Douglas Jr RG, Bennett JE. *Principles and practice of infectious diseases. Volumes 1 and 2*. Baskı. John Wiley & Sons., 1979.
5. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,1995, 39: 1211.
6. Öncül O. Antibiyotikler 1. *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyumu*,2002, 31: 23-28.
7. Montesissa C, Villa R, Anfossi P, Zanoni R, Carli S. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of cefoperazone and cefamandole in dogs following single dose intravenous and intramuscular administration. *The Veterinary Journal*,2003, 166: 170-176.
8. Öztürk R. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişmesi ve Günümüzde Direnç Durumu. *İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*,1997: 27-51.
9. Can NÖ. SefuroksimAksetil'in UV-Spektrofotometri, akış enjeksiyon analizi ve HPLC yöntemi ile tabletlerdeki miktarının tayini üzerine bir çalışma. Analitik

- Kimya Anabilim Dalı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans tezi, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, 2002.
10. Akalın HE. *Antibiyotiklere Direnç Gelişmesi ve Antibiyotik Kullanımı. Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar*. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 1994: 38–39.
 11. Viljanen P, Boratynski J. The susceptibility of conjugative resistance transfer in gram-negative bacteria to physicochemical and biochemical agents. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 88: 43-54.
 12. Gür D. *Antibiyotiklere Direnç Gelişmesi. Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. Güneş Kitabevi Limitet Şirketi. Ankara, 1994: 19-37.*
 13. S. Ü. *Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar*. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi Limitet Şirketi, 1994: 132-143.
 14. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1987, 20: 323-334.
 15. Georgopapadakou NH, Liu FY. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1980, 18: 834-836.
 16. Balcı RS. Seyhan baraj gölünün bakteriyolojik kirlilik düzeyinin belirlenmesi ve üyelerinde antibiyotik dirençliliği üzerine bir çalışma. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.
 17. Akman Y., Ketenoğlu O., Evren H., Kurt L., S. D. *Çevre Kirliliği, Çevre Biyolojisi*. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2000: 268.

18. Arda M. Biyoteknoloji. İçinde: *Kökem Derneği Bilimsel Yayınlar*, Ankara, 1995: 432.
19. Dinçer S. Hastane Laboratuvarı ve Kanalizasyondan İzole Edilen Enterobacteriaceae Cinslerinde Plasmid-Kodlu III. Kuşak Cephalosporin Dirençliliğinin Dağılımı, R-Plazmidlerinin Konjugasyon ve Transformasyon ile Aktarabilirliğinin Saptanması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Adana: Çukurova Üniversitesi, 1994.
20. Ippen-Ihler K, Minkley Jr E. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*, 1986, 20: 593-624.
21. Mercenier A, Chassy BM. Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie*, 1988, 70: 503-517.
22. Coral G. Bazı Gram(+) ve Gram(-) Bakteri Grupları Arasında Elektrotransformasyon Yöntemi ile Rekombinant Bakteri Üretimi Olasılığının Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Adana: Çukurova Üniversitesi, 1996.
23. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. *İnsan biyokimyası*. Baskı. Palme Yayıncılık, 2006.
24. White E, Humphrey JT. *British Pharmacopoeia 1998 ; Volume 1(1)*. Baskı. Stationery Office, 1998.
25. Bökesoy T.A., Çakıcı İ., M. M. *Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı*. Baskı. Ankara, Gazi Kitabevi, 2000: 542-547.
26. Powell DA, James NC, Ossi MJ, Nahata MC, Donn KH. Pharmacokinetics of cefuroxime axetil suspension in infants and children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1991, 35: 2042-2045.

27. Deguchi K, Yokota N, Koguchi M, Suzuki Y, Fukayama S, Ishihara R, Oda S, Tanaka S, Nakane Y, Fukumoto T. Antimicrobial activities of cefuroxime against recent clinical isolates. *The Japanese journal of antibiotics*,1994, 47: 365-382.
28. Scott LJ, Ormrod D, Goa KL. Cefuroxime axetil: an updated review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs*,2001, 61: 1455-1500.
29. Martindale W, Reynolds JEF. *The Extra Pharmacopoeia*. Pharmaceutical Press, 1 Lambeth Street, London, SE1 7JN, UK, 1999, 177.
30. Harding S, Williams P, Ayrton J. Pharmacology of Cefuroxime as the 1-acetoxyethyl ester in volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,1984, 25: 78-82.
31. Williams PEO, Harding SM. The absolute bioavailability of oral cefuroxime axetil in male and female volunteers after fasting and after food. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,1984, 13: 191-196.
32. Wise R. The pharmacokinetics of the oral cephalosporins—a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,1990, 26: 13.
33. Gentry LO. Cephalosporins in urinary tract infection. *Drugs*,1987, 34: 154-163.
34. Piva G, Farin D, Gozlan I, Kitzes-Cohen R. HPLC method for determination of cefuroxime in plasma. *Chromatographia*,2000, 51: 154-156.
35. Al-Said MS, Al-Khamis KI, Niazy EM, El-Sayed YM, Al-Rashood KA, Al-Bella S, Al-Yamani MA, Al-Najjar TA, Alam SM, Dham R. Bioequivalence evaluation of two brands of cefuroxime 500 mg tablets (Cefuzime® and Zinnat®) in healthy human volunteers. *Biopharmaceutics & drug disposition*,2000, 21: 205-210.
36. Tsai T, Cheng F, Chen K, Chen Y, Chen C. Simultaneous measurement of cefuroxime in rat blood and brain by microdialysis and microbore liquid

- chromatography: Application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*,1999, 735: 25-31.
37. Rosseel M, Peleman R, Van Hoorebeke H, Pauwels R. Measurement of cefuroxime in human bronchoalveolar lavage fluid by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*,1997, 689: 438-441.
 38. Garraffo R, Drugeon H, Chiche D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of two oral forms of cefuroxime axetil. *Fundamental & clinical pharmacology*,1997, 11: 90-95.
 39. Faouzi M, Khalfi F, Dine T, Luyckx M, Brunet C, Gressier B, Goudaliez F, Cazin M, Kablan J, Belabed A. Stability, compatibility and plasticizer extraction of quinine injection added to infusion solutions and stored in polyvinyl chloride (PVC) containers. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,1999, 21: 923-930.
 40. Lovdahl MJ, Reher KE, Russlie HQ, Canafax DM. Determination of cefpodoxime levels in chinchilla middle ear fluid and plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*,1994, 653: 227-232.
 41. Lee Y, Lee H. Simultaneous determination of cefoxitin, cefuroxime, cephalixin and cephaloridine in plasma using HPLC and a column-switching technique. *Chromatographia*,1990, 30: 80-84.
 42. El-Gindy A, El Walily AFM, Bedair MF. First-derivative spectrophotometric and LC determination of cefuroxime and cefadroxil in urine. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,2000, 23: 341-352.

43. Ayad MM, Shalaby AA, Abdellatef HE, Elsaid HM. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins through oxidation with cerium (IV) and 1-chlorobenzotriazole. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,1999, 20: 557.
44. Murillo J, Lemus J, Garcia L. Spectrofluorimetric analysis of cefuroxime in pharmaceutical dosage forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*,1994, 12: 875-881.
45. Sciacchitano CJ, Mopper B, Specchio JJ. Identification and separation of five cephalosporins by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*,1994, 657: 395-399.
46. Pajchel G, Tyski S. Adaptation of capillary electrophoresis to the determination of selected cephalosporins for injection. *Journal of Chromatography A*,2000, 895: 27-31.
47. Lin CE, Chen HW, Lin EC, Lin KS, Huang HC. Optimization of separation and migration behavior of cephalosporins in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*,2000, 879: 197-210.
48. Bernacca G, Nucci L, Pergola F. Polarographic behavior of the β -lactam antibiotic Cefuroxime and study of the reduction mechanism in acidic media. *Electroanalysis*,1994, 6: 327-332.
49. Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Fundamentals of analytical chemistry*. Bask1. Saunders College Pub., 1988.
50. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of instrumental analysis*. Bask1. Saunders College Pub., 1998.
51. Gündüz T. *İnstrumental analiz*. Bask1. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, 1988.

52. Wiberg K, kemi Suİfa. *Multivariate Spectroscopic Methods for the Analysis of Solutions*. Baskı. Institutionen för analytisk kemi, Univ., 2004.
53. Perkampus HH, Grinter HC, Threlfall T. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Baskı. Springer-Verlag Berlin, 1992.
54. Moyer JD, Smith PA, Levy EJ, Handschumacher RE. Kinetics of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate and pyrazofurin depletion of pyrimidine ribonucleotide and deoxyribonucleotide pools and their relationship to nucleic acid synthesis in intact and permeabilized cells. *Cancer research*, 1982, 42: 4525-4531.
55. Sharma S, Sharma MC. Simultaneous spectrophotometric estimation of etoposide tablet formulations using hydrotropsolubilization agents, *Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials*, 2010, 2:227-229.
56. Yenilmez L. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve ilaç analizindeki uygulamaları. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2006.
57. Hamilton RJ, Sewell PA. *Introduction to high performance liquid chromatography*. Baskı. Chapman and Hall New York, 1982.
58. Krstulović AM, Brown PR. *Reversed-phase high-performance liquid chromatography: theory, practice, and biomedical applications*. Baskı. Wiley, 1982.
59. Ludwig Huber PH, George SA. *Diode Array: Detection in HPLC*. Baskı. Dekker, 1993.
60. Guideline ICHHT. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). *IFPMA: Geneva*, 2005.
61. Burchfield HP, Storrs EE. *Biochemical applications of gas chromatography*. Baskı. Academic Press, 1962.

62. Tunçbilek İ. Gaz kromatografisi–kütle spektrometresi tekniği kullanılarak doping amacıyla kullanılan hidroksietil nişastanın (hes) idrardan analizi üzerine bir çalışma. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2005.
63. Smith RM. *Gas and liquid chromatography in analytical chemistry*. Wiley, 1988.
64. Hübschmann HJ. *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2008.
65. Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*,2006, 1: 387-396.
66. Smith H, Sacks R. Pressure-tunable GC columns with electronic pressure control. *Analytical Chemistry*,1997, 69: 5159-5164.
67. Fowles IA. *Gas Chromatography, 2nd Ed (set Price of 34 Books)*. Baskı. Wiley India Pvt. Limited, 2008.
68. Sevcik J. *Detectors in Gas Chromatography*. Elsevier Science, 2011.
69. Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML. Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical research*,2000, 17: 1551-1557.
70. Rosés M, Canals I, Allemann H, Siigur K, Bosch E. Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength, and mobile phase composition on the retention of weak acids. *Analytical Chemistry*,1996, 68: 4094-4100.
71. Rondinini S, Mussini P R, Mussini T. Reference value standards and primary standards for pH measurements in organic solvents and water+ organic solvent

- mixtures of moderate to high permittivities. *Pure and applied chemistry*, 1987, 59: 1549-1560.
72. Rondinini S, Nese A. Standard pH values for potassium hydrogenphthalate reference buffer solutions in acetonitrile—water mixtures up to 70 wt% at various temperatures. *Electrochimica acta*, 1987, 32: 1499-1505.
73. De Aguiar P, Bourguignon B, Massart D. Comparison of models and designs for optimisation of the pH and solvent strength in HPLC. *Analytica chimica acta*, 1997, 356: 7-17.
74. Barbosa J, Bergés R, Sanz-Nebot V. Retention behaviour of quinolone derivatives in high-performance liquid chromatography: Effect of pH and evaluation of ionization constants. *Journal of Chromatography A*, 1998, 823: 411-422.
75. Barbosa J, Bergés R, Sanz-Nebot V, Toro I. Chromatographic behavior of ionizable compounds in liquid chromatography. Part 2. Standardization of potentiometric sensors and effect of pH and ionic strength on the retention of analytes using acetonitrile—water mobile phases. *Analytica chimica acta*, 1999, 389: 43-52.
76. Covington AK, Bates R, Durst R. *Definition of pH scales, standard reference values, measurement of pH and related terminology*. Baski. Blackwell, 1985.
77. Bosch E, Espinosa S, Rosés M. Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography: III. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile—water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 1998, 824: 137-146.
78. Hartmann CH. Gas chromatography detectors. *Analytical Chemistry*, 1971, 43: 113-125.

EKLER

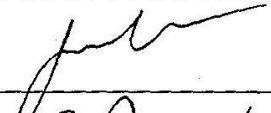
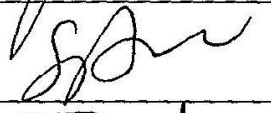
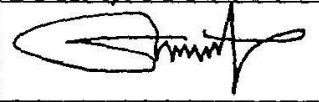
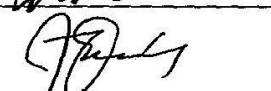
EK 1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Atakan TURAN
Doğum tarihi	05.10.1987
Doğum yeri	Ağrı
Medeni hali	Bekâr
Uyruğu	T.C.
Adres	Kırk Özer Sitesi C Blok Kat:1 No:2 Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Karşısı Palandöken / ERZURUM
Tel	0530 886 68 60
Faks	0442 232 61 75
E-mail	ecz.atakanturan@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	İ.M.K.B. Nevzat Ayaz Fen Lisesi2001–2005
Lisans	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2005–2010
Yüksek lisans	Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı 2010–2013
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	Orta derecede
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Erzurum Eczacı Odası	(2010-)

EK 2. ETİK KURUL ONAYI

“2012. 3.1/ 16 “SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 24.07.2012

3/1.16- Enstitümüz Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Atakan TURAN' ın “Sefuroksim Aksetil’ in Biyoanalitik Yöntem Validasyonu” tez konusu görüşüldü; İlginin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Doç. Dr. Ayşe OKANLI	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. Samih DİYARBAKIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof.Dr.Yavuz Selim SAĞLAM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Ahmet YILDIZ	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr.Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd.Doç.Dr.Engin SAYGIN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi ve Raportör	