ÖHÜ Müh. Bilim. Derg. / OHU J. Eng. Sci.

ISSN: 2564-6605

Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt 6, Sayı 2, (2017), 394-405
Omer Halisdemir University Journal of Engineering Sciences, Volume 6, Issue 2, (2017), 394-405

Araştırma / Research

DENEYSEL TASARIM METODU KULLANILARAK YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ İLE AMOKSİSİLİN TAYİNİ

Seyfullah KEYF (ORCID: 0000-0001-8846-0674)*

Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimya-Metalürji Fakültesi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Geliş / Received: *22.12.2016*
Düzeltmelerin gelişi / Received in revised form: *30.01.2017*
Kabul / Accepted: *31.01.2017*

ÖZET

Yaygın bir antibiyotik olan amoksisilinin analizinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde gerçekleştirilen analizlerde zaman ve maliyet önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada HPLC ile amoksisilin analizinde optimizasyon için kemometrik yöntemler kullanılmıştır. Mobil fazın metanol oranı, pH'sı ve akış hızı faktör olarak, alıkonma zamanı, pik alanı ve pik yüksekliği cevap yüzeyi olarak belirlenmiştir. Faktörler ve cevap yüzeyleri arasındaki bağıntı Design Expert 7.0.0. programı kullanılarak elde edilmiştir. Optimizasyon, alıkonma zamanı 5-6 dakika tutularak gerçekleştirilmiştir. Deneysel optimizasyon değerleri Merkezi Bileşik Tasarım Yöntemiyle hesaplanan değerlerle karşılaştırıldığında, pH için %99,6, akış hızı için %95, metanol yüzdesi için %98 doğruluk tespit edilmiştir. Phenomenex C18 100A (250×4,00 mm, 5 µm) kolonunun kullanıldığı yöntemde optimum koşullar %15 metanol, pH 8,5 ve akış hızı 0,8 mL/dk şeklinde belirlenmiş, yöntemin belirleme sınırı (LOD, alan için) 0,0134 mg/L ve tayin sınırı (LOQ, alan için) 0,0452 mg/L olarak saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, amoksisilin, HPLC, kemometri

DETERMINATION OF AMOXYSILINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING EXPERIMENTAL DESIGN METHOD

ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is used for analysis of amoxicillin which is an antibiotic widely used. Time and cost of analysis performed in the pharmaceutical industry are important. Therefore, in this study, chemometric methods were used to optimize amoxysiline analysis by HPLC. The percentage of methanol in the mobile phase, pH and flow rate were used as a factor, the retention time, peak area and peak height were defined as the response surface. Correlation between these factors and the response surface was obtained using Design Expert 7.0.0. program. Optimization was performed by keeping retention time around 5-6 min. The experimental optimization variables values and calculated optimization variables values by using Central Composite Design Method were compared, and the accuracy of 99.6% for pH, 95% for flow rate and 98% for methanol percentage was determined. Optimum conditions for HPLC method with Phenomenex C18 100A (250 x 4.00 mm, 5 µm) column were 15% methanol, 8.5 pH and 0.8 mL/min flow rate, and the analytical performance of the method was as follows: limit of detection (LOD, for area) 0.0134 mg/L and limit of quantification (LOQ, for area) 0.0452 mg/L.

Keywords: Antibiotic, amoxicillin, HPLC, chemometry

*Corresponding author / Sorumlu yazar. Tel.: +90 212 383 4777; e-mail / e-posta: seyfkeyf@yahoo.com

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve insan sağlığı açısından çok büyük öneme sahip ilaçlardır. Kelime anlamı ile "antibiyotik" terimi, "hayata karşı" demektir. Bu kimyasal maddeler, bakterilerin çoğalmasını önlemekte ve bazen de bakterileri öldürmektedir. 1935 yılında Domagh sülfonamitler ile enfeksiyon hastalıklarında kemoterapi kavramını ortaya çıkarmış ve prontosil üzerinde yapılan çalışmalarla 1938'de Nobel Ödülü'nü almıştır. On yıl içinde, 5.400 değişik sülfonamit türevinin sentezi yapılarak ve klinik testlerden geçirilerek antibiyotik tarihinde büyük gelişmeler kaydedilmiştir. 1942'de penisilinin klinik olarak ilk kez denenmesiyle sülfonamitlerin antibakteriyel kemoterapinin ilacı olarak kullanılmasına yeni bir yöntem getirilmiştir. Alexander Fleming bir rastlantı sonucu kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarının çevresinde staflokokların (her insanda bulunabilen mikroorganizma çeşidi) üreyemedikleri, tersine öldüklerini görmüştür. 1939-1943 yılları arasında, Actinomycetes türleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda streptomisin adı verilen bir madde elde edilmiştir. 1944 yılında bu madde tedavi amaçlı kullanıldı, İlerleyen yıllarda mikroorganizmalar tarafından direnç artımından dolayı etkinliğini yitirmiş ve daha dar alanlarda bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kloramfenikol ve klortetrasiklin gibi yüzlerce antimikrobiyal ajan keşfedilerek literatüre kazandırılmıştır [1].

Charles ve Chulavatnatol [2] tarafından yapılan çalışmada, amoksisilin plazmada HPLC yöntemi ile UV dedektör kullanılarak miktar tayininin yapılması amaçlanmıştır. 229 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril ve pH'sı 7,4 olan tampon çözelti (1:25, h:h) kullanılmıştır. Toplam analiz süresi 24 dakikadır. Kalibrasyon aralığı, 0,25-16 mg/L'dır. Sonuç olarak, analizde gözlenen interferansların amoksisilinin bilinen iki metabolitine ait olduğu belirtilmiştir.

Yuan ve ark. [3] tarafından yapılan çalışmada, amoksisilin insan plazmasında ve orta kulak sıvısında katı faz ekstraksiyon ile miktar tayini yöntemini kullanmışlardır. Çalışma HPLC sisteminde UV dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kantitatif alt limit değeri (LOQ) 0,125 µg/mL'dır. Çalışılan konsantrasyon aralığı, 0,125-35 µg/mL'dir.

Yuan ve ark. [4] tarafından yapılan çalışmada, amoksisilinin insan ve çinçilla (sincaba benzer güney Amerika hayvanı) plazması, orta kulak sıvısı ve tam kanda HPLC ile analizinin yapılması amaçlanmıştır. Üç büyük matriksin karşılaştırılmasını, insan ve çinçilla farkını belirlemişlerdir. Katı faz yöntemi ile ekstraksiyon yapılmış olup UV dedektörde 210 nm'de çalışılmıştır. Hypersil C8 kolon ile hareketli faz olarak da pH'sı 6,5 olan fosfat tamponu ve tetrabutilamonyumklorür içeren %6'lık asetonitril kullanılmıştır. 0,25-20 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışmışlardır.

Fontana ve ark. [5] tarafından yapılan çalışmada, polietilenglikol (PEG) ile kaplı polietilsiyanoakrilat (PECA) nanopartikülleri içine amoksisilin salınım profili, bazı bedensel sıvıların benzer çeşitli koşulları altında çalışılmıştır. Tüm bu deneyler içinde, serbest formda amoksisilin salınımı HPLC ile incelenmiştir. Araştırma sonucunda, pH 7,4'de PEG molekülü ilave edildiğinde ilaç salınımının yükseliş gösterdiği belirlenmiştir. İnsan plazmasında ise, bu durumun aksi gözlenmiştir.

Holstege ve ark. [6] tarafından yapılan çalışmada, süt içindeki beta-laktam antibiyotikleri için daha duyarlı ve kantitatif bir metot geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışılan antibiyotikler ampisilin, amoksisilin, penisilin G, penisilin V, kloksasilin, sefapirin ve seftiofurdir. Antibiyotikler ters-faz kolon ayırma yöntemi ve asetonitril ile sütten uzaklaştırılmıştır.

Dousa ve Hosmanova [7] tarafından yapılan çalışmada, HPLC kullanılarak karışımdaki amoksisilinin rutin olarak tanımlanması ve ölçümü için hızlı bir analitik yöntem geliştirilmiş ve test edilmiştir. Ön karışım örnekler 10 dakika 100 mL ekstraksiyon karışımı, su-metanol (800:200, h:h) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Yöntemin seçici olduğu ve rutin analizler için kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

Kerc ve Opara [8] tarafından yapılan çalışmada, ağız yolu ile alınan amoksisilin/klavulanat içerikli ani salınımlı tablet ve kontrollü salınım yapan kapsül şeklinde tedavi sistemlerinin biyolojik çalışma ile geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, yapılan çalışmada 1.500 mg amoksisilin, 125 mg klavulanik asit içeren yeni bir tedavi sisteminin geliştirilmesindeki parametreler onaylanmıştır.

Ashnagar ve Naseri [9] tarafından yapılan çalışmada, İran'da birkaç ilaç firmasından alınan çeşitli dozaj formalarda 3 çeşit penisilinin (amoksisilin, kloksasilin ve ampisilin) standart aktivite saflıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak, standart toz ve değişik dozaj formlarda saflık oranı %100 olarak belirlenmiştir

Tavakoli ve ark. [10] tarafından yapılan çalışmada, yeni sürekli salınım yapan tablet formasyonu ilaç salım profilleri ve yardımcı maddelerin uyumluluk çalışmalarını değerlendirmek amacıyla eş zamanlı olarak tek bir dalga boyunda (254 nm), amoksisilin ve metronidazol miktarını ölçmek için basit, hızlı, duyarlı ters fazlı HPLC metodu geliştirmek amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda tek dalga boyunda iki maddenin belirlenmesi için sunulan yöntem standartlarında doğruluk, kesinlik ve istikrar için yeterince basit, hızlı, kesin ve doğru olduğu kanıtlanmıştır. Yeni sürekli salım formülasyonlarının ve ilaç katkı maddesi uyumluluk çalışmalarının değerlendirilmesi için metot geliştirilmiştir.

Ay [11] tarafından yapılan çalışmada, ileri oksidasyon metodları kullanılarak, Fenton ve foto-Fenton işlemleri ile sulu çözeltilerde amoksisilinin bozunma ve mineralizasyonunu incelemek amaçlanmıştır. Çeşitli konsantrasyonlarda amoksisilin içeren sentetik atık sular hazırlanarak deneylerde kullanılmıştır. Amoksisilin ve toplam organik karbon ölçümleri, ileri oksidasyon yöntemleri için en etkili katalizör, oksidant ve antibiyotik konsantrasyon kombinasyonlarının ve reaksiyon süresinin belirlenmesi, test edilen metotların koşullarının karşılaştırılması ve en etkili yöntemin seçilmesi için yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, amoksisilin içeren sentetik atık suların ileri oksidasyonunda Fenton reaktifi kullanılarak %100 antibiyotik ve %37,08 toplam organik karbon giderimi sağlanmıştır. Foto-Fenton yöntemi kullanıldığında %100 antibiyotik ve %50,25 TOK giderimi sağlanmıştır.

Beg ve ark. [12] tarafından yapılan çalışmada, ilaç ve farmasötik formülasyonlarda amoksisilin trihidrat analizleri için hızlı ve hassas 229 nm'de UV algılaması olan ters faz HPLC yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, amoksisilin trihidrat analizleri geliştiren yöntemle elde edilen sonuçlar deneysel tasarımı, ANOVA kullanılarak istatistiksel analiz ile doğrulanmıştır.

İlaç endüstrisinde; kullanılan kimyasalların, sarfların, analiz cihazlarının ve etkin analiz için harcanan zaman ve maliyetin yüksek olması nedeniyle gerekli deney sayısının azaltılması oldukça önemlidir. Amoksisilinin gibi ilaç etken maddelerinin doğru, güvenilir analizi için HPLC'de kullanılan kolon özelliklerine göre metot geliştirilmesi, sağlık çalışmaları içinde önemli yer bulmaktadır. Bu nedenler göz önünde bulundurularak cihaz optimizasyonu için kemometrik yöntemler kullanılması önem arz etmektedir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

2.1.1. HPLC Donanımı

Vakum: Spectra System SCM1000 (Thermo Scientific, Boston, Amerika)
Pompa: Spectra System P1500
Kontrol elemanı: Spectra System SN4000
Otomatik örnekleyici: Spectra System AS3000
Dedektör: Spectra System UV2000
ChromQuest programı

2.1.2. Diğer Ekipmanlar

Mikro pipet: PhysioCare Concept-Eppendorf Research Plus (100-1000 µL; 0,5-5 mL) (Eppendof, Newyork, Amerika)
Hassas terazi: AND GR-200
pH metre: Hanna HI 2211
Manyetik karıştırıcı: MTOPS MS300HS
Derin dondurucu: Uğur Derin Dondurucu UCF 1600 L
Mikrovialler: Agilent

2.2 Kullanılan Kimyasallar

Referans standart: Sanovel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Tekirdağ, Türkiye)
Metanol: (Sigma- Aldrich) Lot# SZBD030SV
Potasyum dihidrojen fosfat: (Merck) Lot# AMO453073 332
Sodyum hidroksit: (Sigma- Aldrich) Lot# SZBD3170V
Nitrik asit: (Düzey Lab) Saflık: % 60-65
Hidroklorik asit (%37): (Emparta) Lot# K45763634 428

2.3 Yöntemin Kromatografik Şartları

Kolon: Phenomenex C18 100A 250×4,00 mm, 5 µm (Phenomenex, Los Angeles, Amerika)
Hareketli faz: Metanol: Su: Tampon çözelti (15: 46: 39, h:h:h)
Akış hızı: 0,8 mL/dk

Analiz süresi: 10 dakika
Dedektör: Spectra System UV2000, 230 nm
Enjeksiyon hacmi: 20 µL

2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1. Optimizasyon için Çözelti Hazırlanması

2.4.1.1. Standart Çözeltisi

Standart referans içinde trihidrat yapısının bulunması, standart çözelti hazırlama hesaplamalarına dâhil edilerek gerekli miktarlar hesaplandı. Standart çözeltiyi hazırlamak için 0,1 g amoksisilin trihidrat (419,45 g/mol) 100 mL deiyonize su ile çözülerek 870 ppm amokisisilin (365,4 g/mol) içeren standart çözelti hazırlandı. Elde edilen çözeltiden 5 mL alınıp 50 mL'ye tamamlanarak 87 ppm derişimde amokisisilin çözeltisi hazırlandı.

2.4.1.2. Hidroklorik Asit Çözeltisi

% 37'lik Hidroklorik asit çözeltisinden 1,24 mL çözelti alınarak içinde bir miktar deiyonize su bulunan 150 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Uygun hacme deiyonize su ile tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda 15 dakika karıştırıldı. Hazırlanan çözeltiye tarih eklenerek "0,1 M HCI çözeltisi" ismiyle etiketlendi.

2.4.1.3 Tampon Çözelti

Bu çalışmada, literatür araştırması sonucunda pH 8,0 için kullanılan tampon çözeltisi bilgileri kullanılarak işlemler yapılmıştır.

a) pH 8,0 için 0,2 M Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi

2,72 g potasyum dihidrojen fosfat tartıldı ve 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Bir miktar deiyonize su ile çözülmesi sağlanarak uygun hacme tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda 20 dakika karıştırıldı. Her analiz için bu işlem tekrarlanarak taze çözelti kullanıldı. Hazırlanan çözeltilere tarih eklenerek, "0,2 M KH_2PO_4 Tamponu" ismiyle etiketlendi.

b) 0,2 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi

0,7488 g sodyum hidroksit tartıldı ve 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Bir miktar deiyonize su ile çözülmesi sağlanarak uygun hacme tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda 20 dakika karıştırıldı. Hazırlanan çözeltinin 93,6 mL'si alındı ve tarih eklenerek, "0,2 M NaOH çözeltisi" ismiyle etiketlendi. Geriye kalan çözelti gerektiğinde pH ayarlamasında kullanılmak üzere ayrı bir behere konuldu. Üzerine tarih eklenerek, "0,2 NaOH Çözeltisi" ismiyle etiketlendi. Her analiz için bu işlem tekrarlanarak taze çözelti kullanıldı.

2.4.1.4. Mobil Faz

Optimizasyon işlemleri için kemometrik merkezi bileşik tasarım yöntemine göre belirlenen 9 tane mobil faz hazırlandı. Bu mobil fazlar için pH 8 tamponundan gerekli pH değerlerine geçiş yapıldı ve bu mobil fazlar günlük olarak hazırlandı. Analizler için 500 mL balon joje kullanıldı.

1) Mobil faz A (pH 8,0; %10 Metanol)
2) Mobil faz B (pH 8,0; %20 Metanol)
3) Mobil faz C (pH 9,0; %10 Metanol)
4) Mobil faz D (pH 9,0; %20 Metanol)
5) Mobil faz E (pH 7,5; %15 Metanol)
6) Mobil faz F (pH 9,5; %15 Metanol)
7) Mobil faz G (pH 8,5; %15 Metanol)
8) Mobil faz H (pH 8,5; %5 Metanol)
9) Mobil faz I (pH 8,5; %25 Metanol)

2.4.2. Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması

Kalibrasyon işlemleri için temel olarak 870 ppm amoksisilin standart çözeltisi hazırlandı ve düşük ppm'li çözeltilere geçiş yapmak için 870 ppm, 435 ppm, 43,5 ppm'lik standart çözeltiler kullanıldı. Standart referans içinde trihidrat yapısının bulunması, standart çözelti hazırlama hesaplamalarına dahil edilerek gerekli miktarlar hesaplandı. 870 ppm amoksisilin standart çözeltisi için 0,1 g amoksisilin 100 mL deiyonize su ile çözüldü ve manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırıldı. Konsanstrasyon geçişleri için hesaplanan miktarda çözelti alınarak gerekli hacme tamamlandı. Hazırlanan her kalibrasyon standart çözeltisi, manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırıldı. Hazırlanan çözeltiler tarih ve konsantrasyon miktarı yazılarak etiketlendi. Tablo 1'de kalibrasyon için hazırlanan standart çözeltilerin değeri gösterilmektedir.

Tablo 1. Kalibrasyon standartlarının hazırlanması

50 mL'lik Balon Jojeye Aktarılan Çözelti Miktarı	Kalibrasyon Standartlarının Konsantrasyonları (mg/L)
-	870
870 mg/L çözeltisinden 25 mL	435
870 mg/L çözeltisinden 12,5 mL	217,5
870 mg/L çözeltisinden 5 mL	87
870 mg/L çözeltisinden 2,5 mL	43,5
435 mg/L çözeltisinden 1 mL	8,7
435 mg/L çözeltisinden 0,5 mL	4,35
43,5 mg/L çözeltisinden 1 mL	0,87
43,5 mg/L çözeltisinden 0,2 mL	0,174
43,5 mg/L çözeltisinden 0,05 mL	0,0435

2.5. Optimizasyon

Optimizasyon işlemleri için kemometrik yöntemler kullanılarak deney sayısı azaltılmıştır. Bu sayede hem zamandan hem de malzemeden tasarruf edilmiştir. Kemometrik yöntemler içerisinden 'Merkezi Bileşik Tasarım Yöntemi' seçilmiştir ve Design Expert 7.0.0. programı kullanılmıştır.

Optimizasyon için üç faktör (bağımsız değişkenler) seçilmiştir. Bunlar;

- pH (x_1)
- Akış hızı (x_2)
- Mobil fazdaki metanol yüzdesi (x_3)'dir.

Optimizasyon fonksiyonun sonucu, konsantrasyon ölçümü karşılık gelen alan değerini içeren cevap yüzeyi (bağımlı değişken) seçilmiştir.

- Alan (Y_1)

2.5.1. Deney Verilerinin Belirlenmesi

Yapılan literatür araştırması sonucunda pH aralığı 7,5- 9,5 olarak baz alınmıştır. Metanol yüzdesinin 10-20 aralığında kullanıldığı literatür çalışmalarında gözlenmekle beraber, çalışmanın daha geniş aralıklı tutulması amaçlanarak metanol yüzdesi 5-25 olarak belirlenmiştir. Akış hızı da aynı şekilde düşünülerek 0,4-1,2 mL/dk olarak belirlenmiştir. Tablo 2'de faktörlerin seviye değerleri gösterilmektedir. Bu değerlere bağlı olan deneylerin verileri de, Tablo 3'te gösterilmektedir.

Tablo 2. Merkezi bileşik tasarım yöntemi için incelenen faktörlerin seviye değerleri

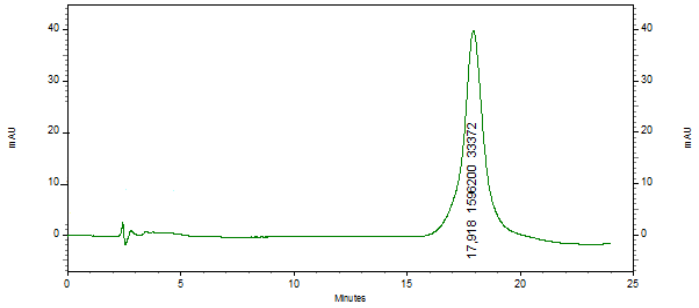
Seviye	pH	Akış Hızı (mL/dk)	Metanol (%)
-1	7,5	0,4	5
-0,5	8,0	0,6	10
0	8,5	0,8	15
0,5	9,0	1,0	20
1	9,5	1,2	25

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Deneylerin HPLC Uygulamaları

Yapılacak deneylere göre, mobil faz ile sistem kurulumu yapılıp mobil fazın cihaza tanıtılması ve cihazın temizlenmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda işlemler aşağıdaki sırayla en düşük alan, en yüksek alan ve orta nokta alan için deney kromatogramları örnek olarak verilmiştir.

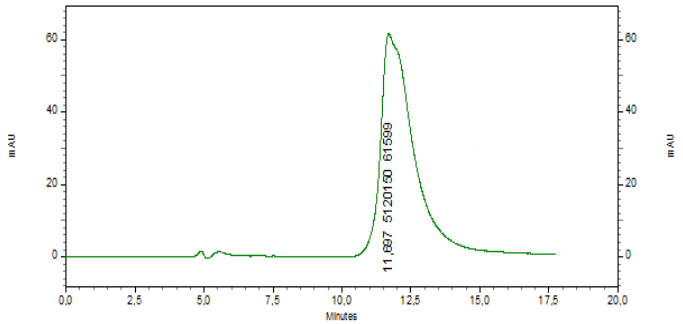
Deney 13 için, Mobil Faz H cihaza tanıtıldıktan sonra programdan oluşturulan metot çağırıldı. AMOK-ST standart çözeltisi mikroviale aktarılarak cihaza konuldu. Akış hızı Deney 13 için 0,8 mL/dk olarak ayarlanıp analiz başlatıldı. Deney 13 için yapılan analizin tekrarlarından deneme 1, sonuç olarak kabul edildi. Şekil 1'de bu deneyin kromatogramı gösterilmektedir.



Şekil 1. Deney 13 kromatogramı

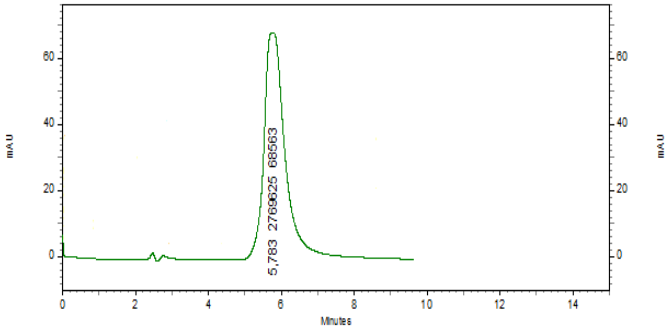
Deney 11, 12, 15, 16, 17, 18 ve 19 için, Mobil Faz G cihaza tanıtıldıktan sonra programdan oluşturulan metot çağırıldı. AMOK-ST standart çözeltisi mikroviale aktarılarak cihaza konuldu.

Akış hızı Deney 11 için 0,4 mL/dk olarak ayarlanıp analiz başlatıldı. Deney 11 için yapılan analizin tekrarlarından deneme 1, sonuç olarak kabul edildi. Şekil 2'de bu deneyin kromatogramı gösterilmektedir.



Şekil 2. Deney 11 kromatogramı

Deney 19 için yapılan analizin tekrarlarından deneme 1, sonuç olarak kabul edildi. Şekil 3'te bu deneyin kromatogramı gösterilmektedir.



Şekil 3. Deney 19 kromatogramı

3.2. Deney Sonuçları ve Yorumlanması

Tablo 3'te analizler sonucunda elde edilen piklerin alanları gösterilmektedir. Bu değerler Design Expert 7.0.0. programına girilerek cevapların faktörlere göre denklemleri ve grafikleri elde edilmiştir.

Tablo 3. Elde edilen piklerin alıkonma zamanı, alanı ve yükseklik değerleri

Deney	pH	Akış Hızı (mL/dk)	Metanol (%)	Alan
1	8,0	0,6	10	3879102
2	9,0	0,6	10	3629564
3	8,0	1,0	10	2311112
4	9,0	1,0	10	2167239
5	8,0	0,6	20	3986114
6	9,0	0,6	20	3567371
7	8,0	1,0	20	2292871
8	9,0	1,0	20	2287637
9	7,5	0,8	15	4544852
10	9,5	0,8	15	2651222
11	8,5	0,4	15	5120150
12	8,5	1,2	15	1715401
13	8,5	0,8	5	1596200
14	8,5	0,8	25	2915962
15	8,5	0,8	15	2859250
16	8,5	0,8	15	2794654
17	8,5	0,8	15	2807656
18	8,5	0,8	15	2798235
19	8,5	0,8	15	2769625

3.2.1. Alan Model Denklemleri

Merkezi Bileşik Tasarım Yöntemi'ne göre Tablo 3'te temsili olarak gösterilen noktaların deneysel verileri kullanılarak cevap fonksiyonları bulunmuştur.

Regresyon analizi yapıldıktan ve F-anlamlılık testine uymayan terimler elendikten sonra model denklemleri oluşturulmuştur. Modelin önemi ve yeterliliğini anlamak için F-değerine (Fisher variation ratio) ve olasılık değerine (Prob> F) bakılır. F-değeri, model ortalamalarının karelerinin, farkların karelerine oranlanması ile bulunur. Prob> F değerinin <0,0500 olması o modelin önemli ve anlamlı olduğunu göstermektedir [13].

Alan için model denklemi (1) eşitliğinde verilmektedir.

$$Y_1 = 2795000 - 287800x_1 - 800800x_2 + 174200x_3 + 64894{,}25x_1\,x_2 - 3820{,}25x_1\,x_3 + 7164{,}75x_2\,x_3 + 200400x_1^2 + 155300x_2^2 - 135100x_3^2 \quad (1)$$

(1) Eşitliği için korelasyon sayısı 0,9354 olarak bulunmuştur. Varyans analizi sonuçları Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. Alan için varyans analiz sonuçları

	Kaynak	Serbestlik Derecesi	Karelerin Toplamı	Ortalama Kare	F Değeri
Alan (Y_1)	MODEL	9	1,448 E^{13}	1,6091 E^{12}	14,49
	KALAN	9	9,995 E^{11}	1,1110 E^{11}	
	TOPLAM	18	1,548 E^{11}		

Varyans analizi sonucunda Design Expert yazılımıyla alan için hesaplanan Prob> F değeri (P value) 0,0001'dir. Prob> F değeri 0,0500'ten küçük olduğu için denklem geçerli ve önemlidir. Bunun yanında, P değerleri 0,01'den küçük olduğundan elde edilen model denklemi %99 önem seviyesi şartını sağlamaktadır. Sağlanması planlanan önem seviyesi %95 olduğundan model denklemlerinde herhangi bir değişikliğe gidilmesine gerek olmadığına karar verilmiştir.

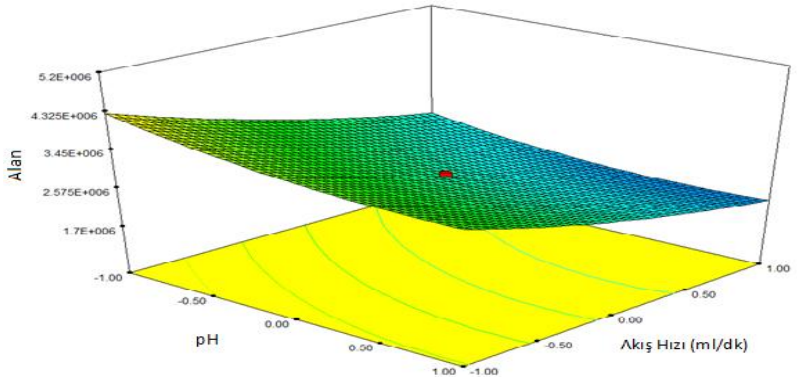
3.2.2. Model Denklemlerinin Yorumlanması

3.2.2.1. Alan Model Denklem Yorumu

Alan model denklemi için $x_1$ve x_2 terimlerinin katsayılarının negatif olması, pH ve akış hızının arttırılmasının alan değerinin azalmasına neden olacağını göstermektedir. Denklemdeki x_3 terimi katsayısının pozitif olması ise, metanol yüzdesinin arttırılmasının alan değerinde artışa neden olacağını göstermektedir.

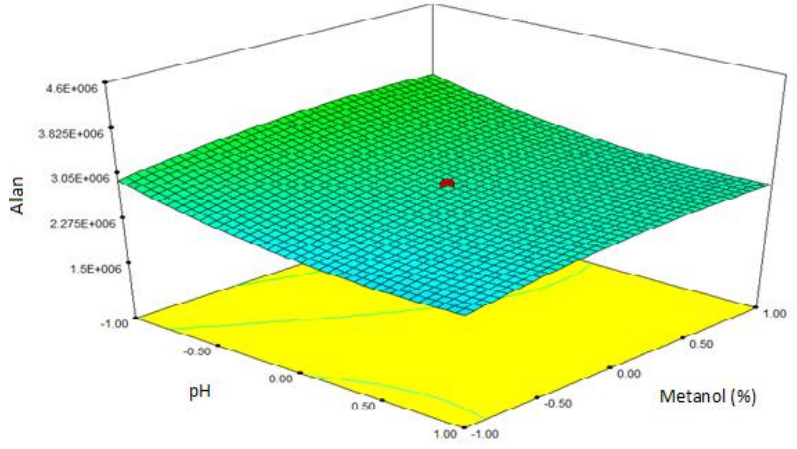
Alan modeli için en yüksek katsayıya sahip x_2 terimidir. Buda akış hızının alan için en etkili faktör olduğunu göstermektedir. Yani pH ve metanol yüzdesi değerlerinin değiştirilmesi ile alan değerindeki değişim, akış hızının değiştirilmesi ile kıyaslandığında, pH ve metanol yüzdesi değişimi etkisi akış hızına göre daha düşüktür.

Alanın, pH (x_1) ve akış hızı (x_2) faktörlerine göre Design Expert 7.0.0. yazılımı kullanılarak elde edilen grafiği Şekil 4'te gösterilmektedir. Bu grafiğe göre alanın, akış hızı değişimden pH değişimine göre daha fazla etkilendiğini ve maksimum alan değerine, akış hızı seviye değeri -1 (0,4 mL/dk) ve pH değeri -1 (7,5) olduğunda ulaşıldığı görülmektedir.



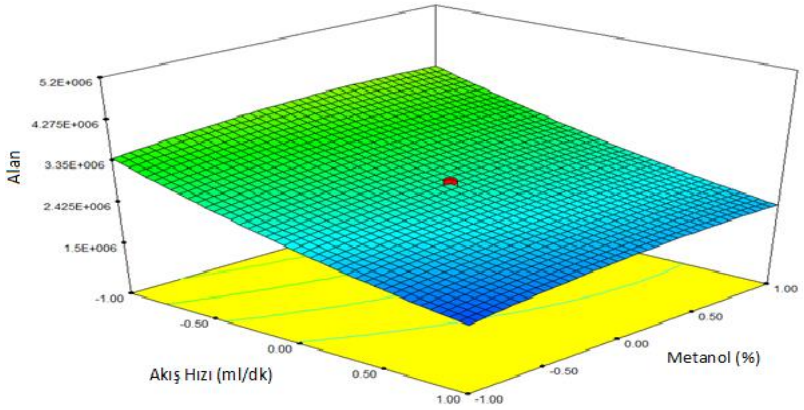
Şekil 4. Alan için pH - akış hızı grafiği

Alanın, pH (x_1) ve metanol oranı (x_3) faktörlerine göre Design Expert 7.0.0. yazılımı kullanılarak elde edilen grafiği Şekil 5'te gösterilmektedir. Bu grafiğe göre alanın, pH değişimden metanol (%) değişimine göre daha fazla etkilendiği ve maksimum alan değerine, pH değeri -1 (0,4 mL/dak) ve metanol (%) değeri 1 (%25) olduğunda ulaşıldığı görülmektedir.



Şekil 5. Alan için pH - metanol (%) grafiği

Alanın, akış hızı (x_2) ve metanol yüzdesi (x_3) faktörlerine göre Design Expert 7.0.0. yazılımı kullanılarak elde edilen grafiği Şekil 6'da gösterilmektedir. Bu grafiğe göre alanın, akış hızı değişimden metanol yüzdesi değişimine göre daha fazla etkilendiği ve maksimum alan değerine, akış hızı değeri -1 (0,4 mL/dk) ve metanol (%) değeri 1 (25) olduğunda ulaşıldığı görülmektedir.



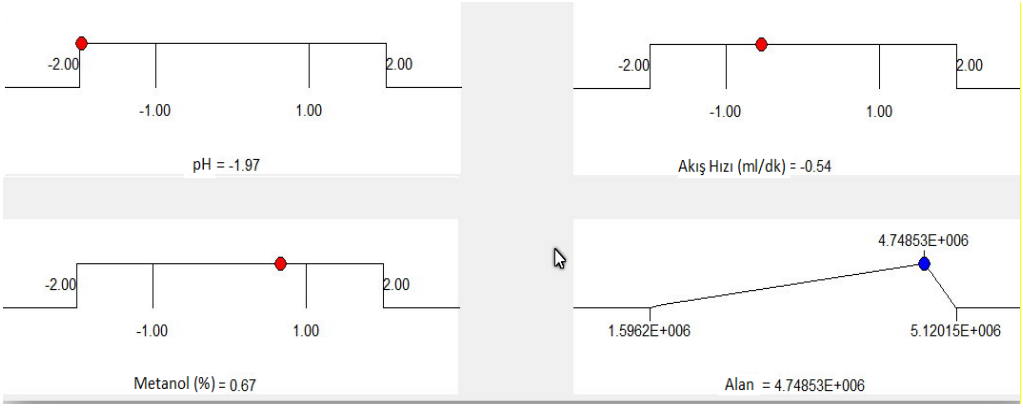
Şekil 6. Alan için akış hızı - metanol (%) grafiği

Akış hızı en önemli 1., pH 2. ve metanol (%) 3. parametre olarak tespit edilmiştir.

3.2.2.2. Optimizasyon Değerlerinin Belirlenmesi

Optimizasyon değerleri Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak belirlenmiştir. HPLC cihazında amoksisilin analizi optimizasyonu; pH, akış hızı ve metanol (%) şeklinde üç faktör, alan cevap yüzeyi içermesinden dolayı, 'Çekicilik Fonksiyonları Yaklaşımı' kullanılmıştır. Çekicilik Fonksiyonları Yaklaşımı uygulanmasında kullanılan kriterler; Design Expert tarafından önerilen çözümler arasında ilgili parametre değerlerinin çalışma aralığı içinde olması, en yüksek global çekicilik fonksiyonu değeri (D) : 1,000, akış hızının yüksek, pH değeri 7,00 değerine yakın, metanol yüzdesi en düşük olan tampon çözeltisi değerlerine göre cevap yüzeyi (amoksisilin konsantrasyonu) en yüksek olduğu optimum çözüm seçilmiştir.

Alan için elde edilen optimum çözüm Şekil 7'de verilmiştir. Bu çözüm D=1,000 değerine sahiptir ve 7,95 pH değerini (x_1^i= -1,97), 0,584 mL/dk akış hızı değerini (x_2^i=-0,54), %21,7 metanol değerini (x_3^i= -0,67) göstermektedir.



Şekil 7. Amoksisilin analizi için elde edilen optimum çözüm

3.3. Kalibrasyon

Optimizasyon kısmındaki elde ettiğimiz deneysel çalışmaların sonucunda geçerliliğinin kanıtlaması ile optimum nokta verileri pH 7,95, akış hızı 0,58 mL/dk, metanol yüzdesi ise %21,7 olarak kesinleştirildi. Buna bağlı olarak kalibrasyon işlemleri yapıldı.

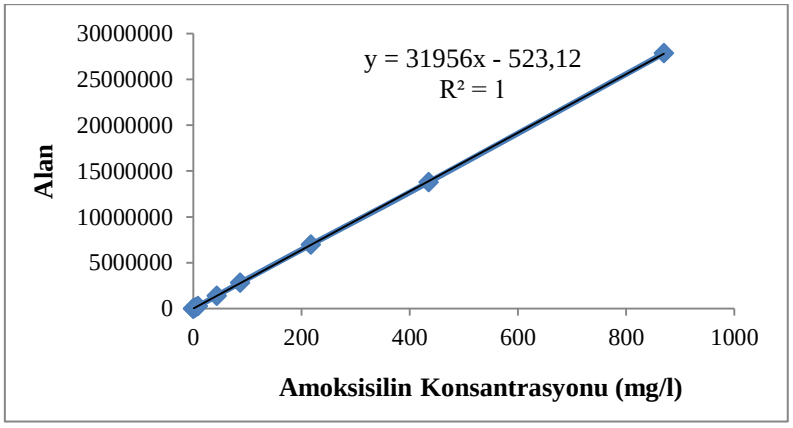
3.3.1. Sistemin Analitik Performansının Tespiti

Sistemin performans gösterebileceği değerlerin tespit edilebilmesi için belirlenen optimum nokta koşullarına göre hazırlanan 0,0435-870 mg/L konsantrasyon aralığındaki çözeltilerin HPLC sisteminde analizi ile sağlanan değerler doğrultusunda kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlardan elde edilen değerler Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Kalibrasyon eğrileri değerleri

Amoksisilin Konsantrasyonları (mg/L)	Pik Alanları	Pik Yükseklikleri
0,0435	675	57
0,1740	4224	239
0,8700	26510	1293
4,3500	134422	6120
8,7000	265961	12183
43,5000	1397932	60917
87,0000	2830533	122203
217,5000	6976962	297186
435,0000	13787024	566553
870,0000	27846050	1049690

Analizler sonucu elde edilen piklerin alanları (Amoksisilin konsantrasyonu) yardımıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Amoksisilin konsantrasyonu-pik alanı kalibrasyon eğrisi

Belirleme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerlerini belirlemek için kalibrasyon eğrisinde kullanılan minimum konsantrasyon değerine sahip 0,0435 ppm'lik standart çözelti 5 defa analiz edilmiştir. Bu analizlerden elde edilen veriler Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Standart çözelti (0,0435 ppm) kromatogram verileri

Analiz Sayısı	Pik Alanı
1	675
2	633
3	980
4	814
5	886

Bu piklerin alan ve yükseklik değerlerinin standart sapması bulunarak, alan için Şekil 8'deki doğrunun eğimi bulunmuştur. Bu değerler LOD değerinin hesaplanması için (2) eşitliğinde verilen denklemde yerine, LOQ değerlerinin hesaplanması için ise (3) eşitliğinde verilen denklemde yerine koyularak hesaplama yapılmış ve sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir.

$$LOD = \frac{3 \times Standart\ Sapma}{Eğim} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 \times Standart\ Sapma}{Eğim} \quad (3)$$

Tablo 7. Kalibrasyon verileri

Veri	Alan
Doğru Denklemi	y = 31956x - 523,12
Korelasyon Katsayısı	$R^2 = 1$
Standart Sapma	144,4621
LOD	0,0134
LOQ	0,0452

Çalışma aralığının doğrusallığı korelasyon katsayısı ile belirlenir ve 0,99'dan büyük olması istenir. Elde edilen iki eğride bu şartı sağlamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda 0,0435-870 mg/L olarak belirlenen kalibrasyon aralığı doğrusallığı sağlamaktadır.

4. SONUÇLAR

Amoksisilinin Phenomenex C18 100A 250×4,00 mm, 5µm kolonu kullanılan HPLC ile miktar tayini yöntemi en uygun şartlar aranılarak geliştirilmiştir. UV dedektör kullanılmış olup, en uygun dalga boyunun 230 nm olduğu belirlenmiştir. Analiz 10 dakikadan daha az bir sürede tamamlanabilecek şekilde yöntem geliştirilmiştir.
İlaç endüstrisinde maliyetin yüksek olması nedeniyle gerekli deney sayısını azaltılması oldukça önemlidir. Deney sayısını azaltmak için kemometrik yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerden Merkezi Bileşik Tasarım Yöntemi ile faktör olarak; mobil fazdaki metanol yüzdesi, pH ve akış hızı, cevap yüzeyi olarak da; pik alanı kabul edilmiştir. Cevap yüzeyleri ile faktörler arasındaki bağıntılar Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak elde edilmiştir. Bulunan model denklemlerinin uygunluğu kanıtlanmıştır. Yapılan işlemler sonucu optimizasyon çözümleri pH 8,47, akış hızı 0,84 mL/dk, metanol %14,7 olarak belirlenmiştir ve bu değerler Merkezi Bileşik Tasarım Yöntemi verilerinde belirlenen merkezi nokta değerleri ile yaklaşık olarak aynı bulunmuştur. Deneysel optimizasyon değişken değerleri elde edilen sonuçlarla Merkezi Bileşik Tasarım Yöntemi ile hesaplanan optimizasyon değerleri %99 doğruluk aralığında olduğu tespit edilmiştir.
Kalibrasyon işlemlerinde standart amoksisilin konsantrasyonu-alan korelasyon katsayısı değeri (R^2) 1,0000'dir. Geliştirilen analitik yöntemin 0,0435-871 mg/L konsantrasyonu aralığında doğrusal olduğu kanıtlanmıştır.
Ayrıca amoksisilinin insan vücudunda çeşitli parametrelere göre etkisi de incelebilir. Bu sayede tıbbi bakımdan ilacın insana etkisi kesin olarak ölçülebilir. İnsan vücudun da absorbe edilme oranlarına bağlı olarak vücuttan çıkan amoksisilinin çevre şartlarına geçmesi ile çevredeki canlılara ve mikroorganizmalara kimyasal etkileri önemli bir araştırma konusu olarak incelenebilir.

KAYNAKLAR

[1] KOÇ TÜRKOĞLU, F., Pediatri Kliniğine Başvuran Annelerin Çocuklarda Antibiyotik Kullanımı Konusundaki Bilgi ve Tutumlarının araştırılması, T.C. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Aile Hekimliği ,Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.

[2] CHARLES, B., CHULAVATNATOL, S., "Simple Analysis of Amoxicillin in Plasma by High Perfomance Liquid Chromatography with Internal Standardization and Ultraviolet Detection", Biomedical Chromatography, 7(4), 204-207, 1993.

[3] YUAN, Z., RUSSLIE, H.Q., CANAFAX, D.M., "Sensitive Assay for Measuring Amoxicillin in Human Plasma

and Middle Ear Fluid Using Solid–Phase Extraction and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", Journal of Chromatographt B, 674, 93-99, 1995.

[4] YUAN, Z., RUSSLIE, H.Q. CANAFAX, D.M., "High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amoxicillin in Human and Chinchilla Plasma, Middle Ear Fluid and Whole Blood", Journal of Chromatography B, 692, 361-366, 1997.

[5] FONTANA, G., LICCIARDI, M., MANSUETO, S., SCHILLACI, D., GIAMMONA, G., "Amoxicillin- loaded Polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake", Biomaterials, 22, 2857-2865, 2001.

[6] HOLSTEGE, D.M., PUSCHNER, B., WHITEHEAD, G., GALEY, F.D., "Screening and Mass Spectral Confirmation of β-Lactam Antibiotic Residues in Milk Using LC-MS/MS", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 406-411, 2002.

[7] DOUSA, M., HOSMANOVA, R., "Rapid determination of amoxicillin in premixes by HPLC", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 37, 373–377, 2005.

[8] KERC, J., OPARA, J., "A New Amoxicillin/Clavulanate Therapeutic System: Preparation, in vitro and Pharmacokinetic Evaluation", International Journal of Pharmaceutics, 335, 106–113, 2007.

[9] ASHNAGAR, A., NASERI, N.G., "Analysis of Three Penicillin Antibiotics (Ampicillin, Amoxicillin and Cloxacillin) of Several Iranian Pharmaceutical Companies by HPLC", E-Journal of Chemistry, 4, 536-545, 2007.

[10] TAVAKOLI, N., VARSHOSAZ, J., DORKOOSH, F., ZARGARZADEH, M.R., "Development and Validation of a Simple HPLC Method for Simultaneous in Vitro Determination of Amoxicillin and Metronidazole at Single Wavelength", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 325-329, 2007.

[11] AY, F., Advanced Oxidation Treatment of Antibiotic Containing Water, Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Enstitüsü Bilimleri, İzmir, 2009.

[12] BEG, S., KOHLI, K., SWAIN, S., HASNAIN, M.S., " Development and Validation of RP-HPLC Method for Quantitation of Amoxicillin Trihtdrate in Bulk and Pharmaceutical Formulations Using Box-Benhnken Experimental Design", Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 35, 393-406, 2012.

[13] AÇIKALIN, K., Çeşitli Biyokütle Atık Maddelerin Pirolizi ve Elde Edilen Ürünlerin Analizi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2010.