

**SEFUROKSİM AKSETİL'İN
UV-SPEKTROFOTOMETRİ,
AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ VE
YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMLERİ İLE TABLETLERDEKİ
MİKTARININ TAYİNİ**

**Nafiz Öncü CAN
Yüksek Lisans Tezi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Eylül - 2002**

Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca Desteklenmiştir. Proje No: 010367

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nafiz Öncü CAN 'ın SEFUROKSİM AKSETİL'İN UV-SPEKTROFOTOMETRİ, AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ VE YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE TABLETLERDEKİ MİKTARININ TAYİNİ başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi ~~12.9.2002~~ tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç. Dr. Göksele ALTIÖKKA	
Üye	: Prof. Dr. Muzaffer TÜNGEL	
Üye	: Doç. Dr. Sibel A. ÖZKAN	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 05.09.2002 tarih ve17.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
* I. C. *
Prof. Dr. Yusuf ÖZBÜRK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**SEFUROKSİM AKSETİL'İN UV-SPEKTROFOTOMETRİ,
AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ VE YÜKSEK BASINÇLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE TABLETLERDEKİ
MİKTARININ TAYİNİ**

NAFİZ ÖNCÜ CAN

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA

2002

Bu çalışmada, Sefuroksim aksetil'in tablet formülasyonlarındaki miktarının tayini için UV-spektrofotometri, akış enjeksiyon (AE) ve fotodiyot dizisi dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) tekniklerinin kullanıldığı üç farklı yöntem tanıtılmaktadır. Farklı analitik koşullar kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda her üç yöntemin de güvenilir, doğruluğu ve tekraredilebilirliği yüksek, hızlı ve pratik yöntemler olduğu kanıtlanmıştır. YBSK analizinde maddeyi oluşturan iki diastereoizomerin ayırımı ve tayini başarıyla sağlanmış, iç standart (IS) kullanımı ile analizlerin geçerliliği kesinleştirilmiştir. Yöntemler sefuroksim aksetil içeren tabletlere uygulanmış ve sonuçların farmakopelere uygunluğu tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sefuroksim aksetil, miktar tayini, diastereoizomer, YBSK

ABSTRACT**Master of Science Thesis****DETERMINATION OF CEFUROXIME AXETIL BY UV-SPECTROPHOTOMETRY, FLOW INJECTION ANALYSIS (FIA) AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)****NAFIZ ÖNCÜ CAN****Anadolu University
Graduate School of Health Sciences
Department of Analytical Chemistry****Supervisor: Ass. Prof. Göksel ALTIOKKA****2002**

Three different techniques for the determination of cefuroxime axetil in tablet formulations using UV-spectrophotometry, flow injection analysis (FIA) and high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection are presented in this study. According to the results of the experiments performed under different analytical conditions it was proven that all of the procedures used in this study were reliable with high accuracy and repeatability, rapid and practical. The separation and the determination of two diastereoisomers of cefuroxime axetil were successfully performed and using an internal standard provided the validity of the method. The methods were applied to tablets containing cefuroxime axetil and the suitability of the results to the pharmacopoeia was evaluated.

Keywords: Cefuroxime axetil, determination, diastereoisomer, HPLC

TEŞEKKÜR

Bizlere bağımsız ve laik Türkiye Cumhuriyeti'ni hediye ederek, huzurlu ve gerçekçi bilimsel çalışma ortam ve imkanını kazandıran Büyük Önderimiz, Başöğretmen Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

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. Muzaffer TUNÇEL'e,

Bilgi, tecrübe ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgmeden beni destekleyen, çalışma yaşantımın her aşamasında yanımda olan ve beni yönlendiren değerli Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA'ya,

Bu çalışmanın hazırlanmasında ve düzenlenmesinde bilgisi, tecrübesi ve ince fikirleri ile önemli katkılar sağlayan değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Zeki ATKOŞAR'a,

Bugün, bu fakültede, rahat ve verimli bir ortamda çalışabilmemiz için ihtiyacımız olan tüm imkanları bizlere sunan, güler yüzünü ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen Eczacılık Fakültesi Dekanı değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Ümit UÇUCU'ya,

Akademik camianın bir üyesi olmamdaki katkılarını ve yardımlarını her zaman hissettiğim, başarılarını ve bilim adamlığını daima örnek aldığım Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Manevi desteğini ve çabasını, lisans dönemimden itibaren hiçbir zaman eksik etmeyen, değerli fikirleri ve tecrübesiyle bana daima yol gösteren Eczacılık Fakültesi Dekan Yardımcısı değerli Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ERGUN'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 çalışma arkadaşlarıma,

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,

Yaşantımın en önemli anlarında yanımda olan, sevgi dolu desteklerini daima yanımda hissettiğim sevgili TOPBAŞ Ailesi'ne,

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, sevgili eşim Araş. Gör. Özgür Devrim CAN'a

Teşekkürü bir borç bilir, en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Sefuroksim Aksetil'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	2
2.2. Sefuroksim Aksetil'in Farmakolojisi ve Etki Mekanizması	2
2.3. Sefuroksim Aksetil İle Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	11
3.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler.....	11
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	11
3.1.2. Kullanılan Aletler.....	11
3.2. Sefuroksim Aksetil Çözeltilerinin Stabilitesinin İncelenmesi.....	12
3.3. UV-Spektrofotometrik Çalışmalarda Yapılan İşlemler.....	12
3.3.1. Stok Çözelti.....	12
3.3.2. UV- Spektrofotometrik Koşullar.....	12
3.4. Akış Enjeksiyon Analizi İle Yapılan Çalışmalardaki İşlemler.....	13
3.4.1. Stok Çözelti.....	13
3.4.2. Hareketli Faz ve Tampon Sistemi.....	13
3.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi İle Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	14

3.5.1. Stok Çözelti.....	14
3.5.2. Hareketli Faz ve Tampon Sistemi.....	14
3.6. Tablet Örneklerinin Hazırlanışı.....	15
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	16
⇒ 4.1. UV-Spektrofotometrik Yöntem İle Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi	16
4.2. Akış Enjeksiyon Analizi İle Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi.....	17
4.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi İle Gerçekleştirilen Çalışmaların Değerlendirilmesi.....	20
4.4. Yöntemlerin Tabletlere Uygulanması.....	25
5. KAYNAKLAR.....	27

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1.	Sefuroksim aksetil'in kimyasal yapısı.....	2
4.1.	Sefuroksim aksetil'in UV-spektrofotometrik yöntem ile kaydedilmiş özgün spektrumu.....	16
4.2.	Akış enjeksiyon yönteminde pH-pik sinyalleri ilişkisi	18
4.3.	Sefuroksim aksetil'in 1.00×10^{-6} - 6.00×10^{-6} M derişimler arasındaki çözeltilerinin optimum koşullarda elde edilen sinyalleri.....	18
4.4.	Sefuroksim aksetil'in 3.0×10^{-6} M derişimdeki diastereoizomerlerine ilişkin kromatogram.....	21
4.5.	Sefuroksim aksetil (3.0×10^{-6} M) ve İndapamid'e (1.0×10^{-5} M) ait kromatogram.....	22
4.6.	Tablet içerisindeki SFA (SFA-A ve SFA-B)'ya ait kromatogram.....	23

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1.	UV-Spektrofotometrik yöntemle 1.0×10^{-5} – 4.0×10^{-5} M aralığında yapılan regresyon analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	17
4.2.	Sefüroksim aksetil'in 1.00×10^{-6} - 6.00×10^{-6} M derişimdeki çözeltilerinin optimum koşullarda elde edilen sinyallerinin doğruluk ve kesinlik incelemesi.....	19
4.3.	Akış enjeksiyon yönteminin gün içi ve günler arası tekraredilebilirlik sonuçları.....	19
4.4.	Sefüroksim aksetil diastereoizomer A ve B 'nin IS kullanılarak gerçekleştirilen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analizinden elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi.....	24
4.5.	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yönteminin doğruluğu ve kesinliği.....	25
4.6.	Sefüroksim aksetil içeren (Cefaks® 250 mg) tabletlerinin analiz sonuçları (n: 8)	26

KISALTMALAR DİZİNİ

- AE** : Akış enjeksiyon
AZ : Alıkonulma zamanı
ID : İç çap
IS : İç standart
LOD : Saptama sınırı derişimi
LOQ : Tayin sınırı derişimi
PN : Pik normalizasyonu
SFA : Sefuroksim aksetil
SFA-A: Sefuroksim aksetil diastereoizomer A
SFA-B: Sefuroksim aksetil diastereoizomer B
YBSK : Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sefuroksim aksetil (SFA) 2. kuşak sefalosporin grubuna ait ilaçlardan olup güçlü antibakteriyel etkisi nedeniyle geniş kullanım alanı bulmaktadır [1].

SFA ile ilgili doğrudan miktar tayinine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Çoğunlukla sefuroksim ve sefuroksim sodyum ile ilgili çalışmalara rastlanmaktadır.

Sefuroksim'in miktar tayinine yönelik yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) [2-9], UV-spektrofotometri ve YBSK'nın birlikte kullanıldığı [10], spektrofotometri ve atomik absorpsiyon spektrofotometrisinin birlikte kullanıldığı [11], spektroflorometri [12], miselsi elektrokinetik kapiler kromatografisi (MECC) [13], MECC ve kapiler elektroforezin birlikte kullanıldığı [14], kapiler elektroforez [15], polarografi [16] yöntemlerine rastlanmıştır.

Bu çalışmada, SFA'nın bazı yöntemleri kullanarak karşılaştırmalı incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, SFA'nın UV-spektrofotometri, akış enjeksiyon analizi (AEA) ve YBSK teknikleri ile farmasötik preparatlardaki miktarının tayini gerçekleştirilmiştir. YBSK deneylerinde tekraredilebilirliği ve duyarlılığı artırmak amacıyla iç standart (IS) tekniği kullanılmış, IS olarak da indapamid'in uygun olduğu bulunmuştur. Ayrıca SFA'nın UV-spektrofotometrik yöntemle spektral özellikleri de araştırılmıştır.

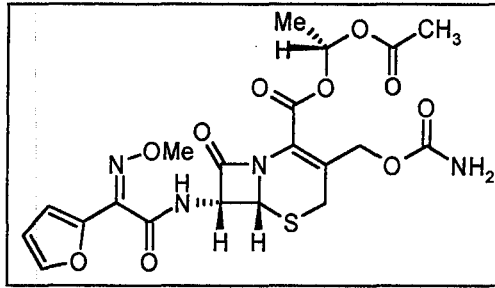
AEA sisteminde akış hızı, pH ve derişimin pik alanları ve pik yükseklikleri ile ilişkisi incelenmiştir. Ayrıca YBSK tekniği ile SFA'yı oluşturan iki diastereoizomerin de en iyi şekilde ayrılması için gereken hareketli faz, akış hızı, dalgaboyu gibi parametreler incelenerek optimum koşullar belirlenmiştir.

Her üç yöntem için uygulanan işlemlerin farmasötik preparatlardaki SFA miktarının tayini için uygulanabilirliği araştırılmış, elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirilerek yöntemin geçerliliği tartışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Sefuroksim Aksetil'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

SFA, iki diastereoizomerden oluşan ve kimyasal yapı formülü (1*RS*)-1-[(asetil) oksil] etil (6*R*,7*R*)-3-[(amino karbonil oksil) 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 2.1 de verilmektedir.



Şekil 2.1. Sefuroksim aksetil'in kimyasal yapısı

Kapalı formülü $C_{20}H_{22}N_4O_{10}S$ olup molekül ağırlığı 510.48 dir. 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 [17].

2.2. Sefuroksim Aksetil'in Farmakolojisi ve Etki Mekanizması

SFA, antibakteriyel etkiden sorumlu çekirdek kısmında beta-laktam halkası içeren sefalosporinlerden 2. kuşak bir antibiyotik olan sefuroksim'in oral olarak kullanılan ön-ilacıdır [18].

Barsak mukozasında ve portal dolaşım esnasında hidroliz olarak sefuroksim'e dönüşür [19].

Sefalosporinlerin gerek mide asidine dayanıksız olmaları gerekse emilimlerinin iyi olmaması nedeniyle parenteral kullanımlarının tercih edilmesine karşın SFA oral yolla kullanılabilir [18].

Sefuroksim, etkisini bakteri hücre duvarı sentezini engelleyerek ve otolitik enzimleri uyararak göstermektedir. Sefuroksim, diğer sefalosporinler gibi beta-laktamlara 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 [20].

Bunun yanında genel olarak ampisiline dirençli suşlar da dahil olmak üzere tüm suşlara karşı iyi etkinlik göstermektedir. Gram pozitif koklara 1. kuşak sefalosporinler kadar etki göstermekte ve bu nedenle özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarında tercih edilen sefalosporinler arasında yer almaktadır [21].

Sefuroksim plazma proteinlerine %50'ye varan oranlarda bağlanmaktadır ve böbrek yetmezliği halinde dozun ayarlanması gerekmektedir [22].

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 [23].

Başka bir çalışmada, dişi bireylerdeki biyoyararlanımın erkek bireylere oranla %3-4 oranında düşük olduğu bulunmuştur [24].

Yapılan başka bir çalışmada SFA'nın inflamasyon bölgesine geçişinin %92 ve serum yarılanma ömrünün 1.25 saat olduğu belirtilmiştir [25].

Bu özelliklerinin yanı sıra SFA'nın glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon yoluyla atıldığı ve bu yolun sefalosporinlerin genel atılım prensiplerine uyduğu da belirtilmektedir [26].

2.3. Sefuroksim Aksetil İle Gerçekleştirilen Çalışmalar

Piva ve arkadaşları [2], Sefuroksim'in plazmadaki miktarını YBSK kullanarak tayin etmişlerdir. Sefuroksim'in ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. IS olarak benzer yapıda bir molekül olan sefazolin

kullanılmıştır. Hareketli faz olarak (pH 2.7, 20 mM KH_2PO_4 : asetonitril) (80:20) seçilmiştir. Katı faz ekstraksiyonunda kartuşlar (C_{18} , 3 mL, 200 mg) 3 mL metanolü takiben 3 mL su geçirilerek aktive edilmiştir. 1 mL plazmaya 100 μL sefazolin (IS) (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H_2O) ve 100 μL %34 H_3PO_4 ilave edilmiş ve bu karışımın 600 μL 'si kartuşa gönderilmiştir. Kartuş, 3 mL su ile yıkandıktan sonra sefuroksim ve IS asetonitril:su (90:10) karışımın 800 μL 'si ile seyreltilmiştir. Elde edilen çözeltinin 35 °C'de azot gazı varlığında kurutulmasından sonra kalıntı tekrar pH 3'deki 200 μL H_3PO_4 'de çözülmüş ve 100 μL 'lik hacimler halinde YBSK sistemine enjekte edilmiştir. Dedeksiyon 274 nm'de UV dedektörle yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi için, 1 mg/mL'lik sefuroksim çözeltisi hazırlanmış ve su ile 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişime sahip olacak şekilde seyreltilmiştir. Kör plazma örnekleri ise 8 farklı kaynaktan alınmış ve çalışma çözeltisi ile 0.1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde seyreltilmiştir. Serumlar analiz zamanına kadar -36 °C'de saklanmıştır. Yöntem için LOQ 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LOD 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur.

Al-Said ve arkadaşları [3], sefuroksim'in iki ayrı farmasötik formu olan Zinnat® ve Cefuzime®'in miktar tayinini YBSK ile yapmışlar ve biyoeşdeğerlik çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Yapılan analizde örneklerin hazırlanması için 400 μL plazma 1.5 mL'lik mikro santrifüj tüpüne alınmış, 100 μL IS (sefaleksim 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve 100 μL %12.5 derişimdeki trikloroasetik asit ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Üstteki berrak kısım alınarak 50 μL 'si enjekte edilmiştir. Kromatografik ayırım Supelcosil LC-18DB (5 μm , 4.6x150 mm) kolon kullanılarak 2.0 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 0.05 M pH 3.0 KH_2PO_4 :asetonitril (90:10) kullanılmıştır. Dedeksiyonlar 280 nm'de UV-dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi ortalama 12 dakika sürmüştür ve LOQ değeri 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olarak bulunmuştur.

Tsai ve arkadaşları [4], mikrodializ ile rat beyindeki ve kanındaki sefuroksim miktarını YBSK kullanarak tayin etmişlerdir. Beyinden perfüzyon için 1 mL/dk 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 μL 'lik hacimlerde enjekte edilmiştir. Kromatografik yöntemde ise üzerinde 10 μL 'lik loop bulunan ters faz sıvı kromatografisi sistemi kullanılmıştır. Analizler için 280

nm'deki UV dedektör kullanılmıştır. Hareketli faz olarak pH 5'e ayarlanmış metanol:100 mM monosodyum fosforik asid (25:75) sistemi kullanılmış ve 0.05 mL/dk akış hızında kolona gönderilmiştir. Hareketli faz karışımı 0.22 µm çaplı milipor filtreden geçirilmiş ve içerisindeki oksijen uzaklaştırılmıştır. LOD değeri 5 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Rosseele ve arkadaşları [5], bronkoalveoler lavaj sıvısında YBSK yöntemiyle sefuroksim miktarını tayin etmişlerdir. Bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısı, günde 500 mg SFA kullanan hastalardan fiberbronskopi sonrasında alınmış, 10 dakika 1150 rpm'de (4 °C) santrifüj edildikten sonra üstteki berrak kısım -70 °C'de saklanmıştır. Ekstraksiyon yönteminde BAL sıvısı örnekleri (200-400 µL) pH 6'daki 1 mL 0.05 M sitrat tamponu ile seyreltilmiş ve 0.02 M pH:6 fosfat tamponundaki 30 µL (30 ng) sefaloridin IS olarak bu çözeltiliye ilave edilmiştir. C₁₈ kartuşlar, 2 mL asetonitril, 1 mL su ve 1 mL pH 6.0 0.05 M sitrat tamponu ile ıslatılmış ve BAL örnekleri vakumsuz olarak kartuşa yüklenmiş ve süzülmüştür. Kolonlar daha sonra 1 mL 0.05 M pH 6 sitrat tamponu, 0.5 mL su, iki defa metil tert-butil eter ve 3 defa da 1 mL asetonitril ile yıkanmıştır. Her bir yıkama arasında kolonlar vakum altında en az 1 dakika kurutulmuştur. Sefuroksim ve IS 1 mL metanol ile seyreltilmiş ve çözeltiler azot gazı varlığında 40 °C'de uçurulmuştur. Kalıntı 55 µL hareketli fazda çözülmüş ve 40 µL'si analitik kolona enjekte edilmiştir. Sefuroksim ve IS'nin stok çözeltileri (1 mg/mL) 0.02 M pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış ve -70 °C'de saklanmıştır. Çözeltilerin 1 hafta boyunca bozunmadığı gözlenmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril:0.05 M amonyum fosfat tamponu pH 3.2 (15:85) kullanılmıştır. UV dedektörün kullanıldığı yöntemde analizler 280 nm dalgaboyunda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak sefuroksim'in 9.17 dakikada, sefaloridin'in ise 6.25 dakikada pik verdiği gözlenmiştir. Yöntemin LOQ değeri 5 ng/mL, LOD değeri ise 1 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Garrafo ve arkadaşları [6], SFA'nın oral kullanımlı iki farklı dozaj formunun farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin karşılaştırdıkları çalışmada miktar tayinini YBSK kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada IS olarak bir başka sefalosporin grubu ilaç olan sefaloridin kullanılmıştır. Elde edilen serum örneklerinin trikloroasetikasit varlığında çöktürülmesinden sonra elde

edilen kısım 5 dk santrifüj edilmiş ve üst fazın 20 µL'si alınarak RP 18 Lichrospher 5 µm kolona enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak 0.05 M fosfat tamponu:asetonitril (85:15) sistemi kullanılmış ve pikler 273 nm'de UV detektörle bulunmuştur. LOD değeri 0.06 mg/L olarak saptanmıştır. Yöntemin 0.1-10 mg/L derişim aralığında doğrusallık gösterdiği belirtilmiştir (r:1.00). Güniçi ve günlerarası varyasyon katsayıları %5'in altında bulunmuştur.

Faouzi ve arkadaşları [7], sefaloridin, sefuroksim ve seftazidim'in %0.9 NaCl ve %5 glikoz çözeltilerine ilave edilerek hastalara verilmesi esnasındaki dayanıklılığını incelemişlerdir. Analiz için YBSK sisteminin kullanıldığı çalışmada sinyaller 254 nm dalga boyuna ayarlı diode-array dedektör kullanılmıştır. Analizler süresince asetonitril : %0.2 trietilamin (pH:2.5) bileşenlerinden, değişik oranlarda oluşturulmuş 3 farklı hareketli faz denenmiştir. Akış hızlarının da değişkenlik gösterdiği çalışmada sefaloridin, sefuroksim, seftazidim için sırasıyla (23:77), (24:76), (9:91) oranlarında hareketli faz sistemleri ve 1.0, 1.0, 1.5 mL/dk değerlerinde akış hızları kullanılmıştır. Alıkonma zamanlarının sefaloridin için 2.41 dk, sefuroksim için 3.38 dk, seftazidim için 1.93 dakika olduğu gözlenmiştir.

Lovdahl ve arkadaşları [8], sefpodoksım'in chinchilla türü hayvanların ortakulak sıvısındaki miktarını YBSK ile tayin ederken sefuroksimi IS olarak kullanmışlardır. Plazma ve diğer biyolojik sıvıların YBSK'ya enjekte edilebilir hale getirilmesi işlemlerinde 50 µL'lik örnek üzerine 50 µL IS (sefuroksim, 40 µg/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) kullanılmıştır. Akış hızı 0.35 mL/dk olarak belirlenmiş ve dedeksiyonlar 254 nm dalga boyundaki UV dedektör ile gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak Hypersil C₁₈ (250 x 2.1 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. LOQ değeri 0.05 µg/mL, LOD değeri ise 0.02 µg/mL bulunmuş ve tutunma zamanları sefpodoksım için 3.5 dk, sefuroksim için 5.9 dakika olarak belirlenmiştir.

Lee ve arkadaşları [9], sefuroksim, sefoksitin, sefaleksim ve sefaloridin'in plazmadaki miktarını YBSK kullanarak kolon değiştirme yöntemiyle tayin etmişlerdir. Bu amaçla 254 nm'de UV dedektör kullanılmıştır. Akış hızı olarak 1.0 mL/dk seçilmiştir. Standart sefalosporin çözeltileri suda hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler 0.01 M pH 3.5 asetat tamponu ile gerçekleştirilmiştir. IS olarak yine başka bir sefalosporin olan sefotaksim kullanılmıştır. Analitik işlemler 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada 100 µL plazma ve 300 µL IS hareketli faz olarak kullanılan 0.01 M pH 3.5 asetat tamponu ile seyreltilerek kolona enjekte edilmiştir. İkinci aşamada yıkama çözeltileri atılarak kolonda tutunmuş olan bileşenler hareketli faz aracılığıyla analitik kolona aktarılmıştır. Üçüncü aşamada ise hareketli faz olarak kullanılan (asetonitril : pH 4.3 asetat tamponu) (15:85) kullanılarak analizi yapılacak olan maddeler analitik kolonda ayrılmıştır. Bu çalışmada tutunma zamanlarının pH 'ın düşürülmesi ve hareketli fazın iyonik gücünün artmasıyla orantılı olduğu saptanmıştır. İlk aşamada birincil kolon olarak saflaştırma işlemleri için Corasil RPG 18 kolon kullanılmış, son aşamada miktar tayini için analitik kolon olarak Partisil ODS-3 kolon kullanılmıştır. 25 µL'lik plazma örnekleri kolona enjekte edilmiş, maddelerin geliş zamanları Sefaleksim 6.2 dk, Sefotaksim 8.7 dk, Sefuroksim 10.3 dk, Sefoksitin 12.2 dk, Sefaloridin 17.3 dk. olarak bulunmuştur. LOD değeri 0.5 µg/mL ve doğruluk aralığı 1 – 100 µg/mL olarak belirtilmiştir.

Eldingy ve arkadaşları [10], sefuroksim ve sefadroksil'in idrar içindeki miktarını 1. türev spektrofotometrisi ve YBSK kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada adı geçen iki maddenin 1. türev 0.1 N NaOH içerisinde 2-10 µg/ml derişim aralığında sırasıyla 292.5 ve 267.3 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. YBSK yöntemi ise sefuroksim için su:asetonitril:asetik asit (85:15:0.1) hareketli fazı ile 1.5 mL/dk akış hızı kullanılarak; sefadroksil için ise 0.02 M potasyum dihidrojenfosfat-asetonitril (95:5) ile 0.003% (w/v) heksansülfonik asit sodyum tuzundan oluşmuş ve fosforik asit ile pH 3'e hareketli faz sistemi kullanılarak 2 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Tayinler sefuroksim için 275 nm, sefadroksil için ise 260 nm dalgaboyunda UV detektör kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada sefuroksim'in 2-10 µg/mL, sefadroksilin ise 5-20 µg/mL aralığında doğruluk kalibrasyon eğrileri verdiği saptanmıştır.

Ayad ve arkadaşları [11], sefotaksim ve sefuroksim sodyumun spektrofotometri ve atomik absorpsiyon spektrofotometrisi yöntemleriyle miktar tayinini yapmışlardır. Spektrofotometrik metot, maddelerin pi-donörü gibi davranarak 7,7,8,8-tetrasiyanoindometan (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 ölçümü sırasıyla 838 ve 529 nm'de 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 ile tayin yöntemi ise adı geçen maddelerin alkali hidrolizinin ardından gümüş nitrat ya da kurşun asetat ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Elde edilen çökeleklerin içeriği, kurşun ve gümüş miktarı üzerinden doğrudan yada 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 arkadaşları [12], sefuroksim'in farmasötik dozaj formlarındaki miktarını spektrofotometrik yöntemle tayin etmişlerdir. Yöntem, sefuroksim'in 0.1 M NaOH varlığındaki hidrolizini takiben 100 °C'de 60 dakika ısıtılması sonucu meydana gelen floresan verici türevinin analizi üzerine kuruludur. Floresan verici ürünün 380 nm'de eksitasyon ve 436 nm'de emisyon verdiği gözlenmiştir. Yöntem, pH 10.5 olacak şekilde fosfat tamponu ile ayarlanmış sulu çözeltilere uygulanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 0.05 – 1.70 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermektedir. LOD, 1.0×10^{-2} µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yöntem SFA ve sefuroksim sodyum içeren farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

Sciacchitano ve arkadaşları [13], 5 farklı sefalosporinin (sefuroksim, sefaleksim, sefapirin, sefamandol napat ve sefalotin) MECC ile ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Analizler için 72 cm x 50 µm ID kapiler kullanılmıştır. Tüm analizler 30 °C'de hidrostatik enjeksiyonla gerçekleştirilmiştir. Uygulanan voltaj

306 V/cm ve enjeksiyon zamanı 5 saniye olarak belirlenmiştir. Analitler 210 nm dalga boyunda UV detektör ile dedekte edilmiştir. Sefalosporin çözeltisi, 10'ar mg'lık porsiyonlar halinde her bir sefalosporinin tartılarak 100 mL suda çözülmesiyle elde edilmiştir. Çalışma tamponu olarak 20 mM sodyum borat, 200 mM SDS, 100 mM pentansülfonik asit karışımı kullanılmıştır. Göç zamanları sefuroksim 13.5 dk, sefaleksim 18.5 dk, sefapirin 19.5 dk, sefamandol nafat 22 dk, sefalotin 26 dakika olarak bulunmuştur.

Pajchel ve arkadaşları [14], 5 ayrı sefalosporinin (sefuroksim sodyum, sefazolin, seftriakson sodyum, sefoperazon sodyum ve seftizidim) kapiler zon elektroforez (CZE) ve miselsi elektrokinetik kapiler kromatografisi (MECC) ile ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada her bir sefalosporinin suda 0.1-0.5 mg/mL derişimdeki çözeltileri hazırlanmıştır. CZE için elektrolit çözeltisi Na_2HPO_4 (3.12 g/L), sodyumtetraborat (7.63 g/L) ve MECC için sodyumdodesilsülfat'tan (SDS) (7, 10, 14 g/L) oluşturulmuştur ve pH 5-8'e ayarlanmıştır. pH taramasında, pH 6-7 aralığında hem CZE hem de MECC için doğrusal bir grafik elde edilmiş ve çalışma pH'ı 6.5 olarak belirlenmiştir. Aletsel parametreler olarak, dedeksiyon 214 nm'de UV dedektörle, ayırım da 60 cm x 75 µm ID kapilerde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan voltaj 18 kV olarak belirlenmiştir. Ayırımın daha iyi sağlanabilmesi için 3. çeşit elektrolit olarak sisteme ayrıca 17.4 g/L pentansülfonik asit eklenmiş ve ayırım bu sistemde gerçekleştirilmiştir. Bu ilave, özellikle sefuroksim ve sefazolinin ayrımını kolaylaştırmıştır. Ortama SDS ve pentansülfonik asit ilavesi ile MECC sisteminde ayrımın tam olarak sağlandığı görülmüştür. Göç zamanlarının ise seftazidim için 7.4, sefaperazon için 7.7, sefotaksim için 8.0, sefuroksim için 8.3, sefazolin için 8.4, seftriakson için 11.1 dakika olduğu gözlenmiştir.

Lin ve arkadaşları [15], tampon pH'sı, tampon derişimi ve tampon elektrolit miktarının göç davranışı üzerine etkisini kapiler elektroforez ile incelemişler ve 12 farklı sefalosporinin fosfat, sitrat, ve 2-(N-morfolino)etansulfonat (MES) tamponlarındaki ayrımını gerçekleştirmişlerdir. 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 300mM'a kadar çıkmaktadır. 12 sefalosporinin tamamının değişik tampon sistemleri kullanılarak ayırımı sağlanmıştır. Fakat 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 arkadaşları [16], sefuroksimin pH 1.0-10.0 aralığındaki polarografik davranışını ve asidik ortamdaki indirgenme mekanizmasını incelemiştir. 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.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Aletler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

SFA ($M_A=510.48$) Fako İlaç AŞ, IS olarak kullanılan İndapamid ($M_A=365.84$) ise Sanovel İlaç AŞ firmasından elde edilmiştir. Yöntemlerin, SFA'nın tablet formülasyonlarına uygulanması esnasında Deva İlaç AŞ firması tarafından üretilmiş olan Cefaks® (250 mg) Tablet kullanılmıştır.

Gradient grade metanol (CH_3OH), asetonitril (CH_3CN), potasyum dihidrojenfosfat (KH_2PO_4), potasyum hidroksit (KOH), o-fosforik asit (H_3PO_4) Merck Co. firmasının ürünüdür. Bidistile su tümüyle camdan oluşan sistem ile laboratuvarımızda hazırlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Aletler

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

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

Tablet analizleri esnasında çözeltilerin içerdiği çözünmemiş safsızlıkların çöktürülmesi amacıyla Sigma marka 1-6 model santrifüj aleti kullanılmıştır.

AEA analizi için Rheodyne (Cotati) enjeksiyon tablası üzerinde 20 μL 'lik loop taşıyan Shimadzu marka LC-6A model pompa kullanılmıştır. Maddeye ait sinyaller Shimadzu marka SPD-10A UV-VIS dedektör ile dedekte edilmiş ve sonuçlar yine Shimadzu C-R7A Chromatopac integratör ile hesaplanmıştır.

YBSK analizi için tümü Shimadzu firmasının ürünü olan LC-10A serisi sıvı kromatografisi sistemi kullanılmıştır. Sistem, LC-10AT gradient donanımlı pompa, SPD-M10A diode-array dedektör, CBM-10A iletişim sağlayıcı modülden

oluşmaktadır. Veriler LC10 (Version 1) programı ile işlenmiştir. Enjeksiyon tablası Rheodyne (Cotati) olup üzerinde 10 µL loop taşımaktadır. Enjeksiyonlar Hamilton 700 serisi 22 gauge uç kalınlığına sahip 25 µL'lik şırınga ile loop doldurarak yapılmıştır. Ayırma ve miktar tayini işlemlerinde Hypersil model 5 µm tanecik çapında ODS 150x4.6 mm ID Supelco marka C₁₈ kolon kullanılmıştır.

3.2. Sefuroksim Aksetil Çözeltilerinin Stabilitésinin İncelenmesi

2.50x10⁻⁵ M derişimde hazırlanan SFA çözeltileri +4 C'de buzdolabında saklanmış ve 1 hafta boyunca UV absorbansları ve AEA ile elde edilen pik alanlarına ait değerler kaydedilmiştir. İncelemeler sonucunda maddenin absorbans değerlerinde ve pik alanlarında herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Bu da, hazırlanan SFA çözeltileri ile en az 1 hafta süreyle çalışılabileceğini göstermektedir.

3.3. UV-Spektrofotometrik Çalışmalarda Yapılan İşlemler

3.3.1. Stok Çözelti

UV-spektrofotometrik çalışmalar için 51.0 mg dolayında standart SFA tartılmış ve 100 mL'lik balon jøjeye alınarak metanolde çözülmüştür. Böylece stok çözelti 1.00x10⁻³ M olarak hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiliden hareketle 3.00x10⁻⁶ – 1.00x10⁻⁴ M derişim aralığında bir seri çözelti hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler bidistile su ile yapılarak maddenin UV bölgedeki davranışı incelenmiş ve regresyon analizi yapılmıştır.

3.3.2. UV-Spektrofotometrik Koşullar

UV-Spektrofotometrik ölçümlerde maddenin maksimum absorbans verdiği dalgaboyunu belirleyebilmek amacıyla 200 – 400 nm dalgaboyu aralığında, 0.1 nm duyarlılıkta absorpsiyon taraması yapılmıştır. Tarama sonunda SFA'nın 281 nm dalgaboyunda maksimum absorbans verdiği saptanmış ve ölçümler bu dalga

boyunda gerçekleştirilmiştir. İncelemeler sonucunda SFA'nın 3.00×10^{-6} M – 1.00×10^{-4} M aralığındaki bölgede doğrusal sinyaller verdiği gözlenmiş ve bu bölgedeki molar absorptivite katsayısı 19241.9 olarak hesaplanmıştır. 1.50×10^{-5} M - 4.00×10^{-5} M konsantrasyon aralığında yapılan lineer regresyon analizinde kalibrasyon denklemi $A=18986.9C(M)+0.004$ olarak hesaplanmıştır. Regresyon katsayısı olarak $r=0.9999$ bulunmuştur.

3.4. Akış Enjeksiyon Analizi ile Yapılan Çalışmalardaki İşlemler

3.4.1. Stok Çözelti

51.0 mg SFA 100 mL'lik balon jofeye alınarak metanolde çözülmüştür. Gerekli seyreltmeler bu stoktan bidistile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

SFA'nın AEA ile yapılan çalışmalarında en uygun analiz koşullarının belirlenebilmesi için kullanılan SFA çözeltisi, başlangıçtaki stok çözeltinin seyreltilmesi ile elde edilen 3.00×10^{-6} M derişimdeki çözelti ile yapılmıştır.

3.4.2. Hareketli Faz ve Tampon Sistemi

SFA'nın AEA yöntemiyle analizi süresince kullanılacak analitik ve aletsel parametrelerin belirlenebilmesi amacıyla bir dizi inceleme yapılmıştır. Bu aşamada kullanılmak üzere 3.00×10^{-6} M derişime sahip SFA çözeltisi hazırlanmış ve deneyler bu çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

SFA'nın AEA yöntemiyle analizi sırasında kullanılacak hareketli fazın belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda %10 - %40 oranında metanol içeren metanol:su sistemleri denenmiş ve %10'luk metanol çözeltisinin en uygun taşıyıcı olduğuna karar verilmiştir.

AEA sistemindeki bir diğer parametre olan akış hızının belirlenebilmesi için 0.1-3.0 mL/dk aralığındaki akış hızlarında seri enjeksiyonlar yapılmış ve pik alanı-akış hızı, pik yüksekliği-akış hızı ilişkileri incelenmiştir. İncelemeler sonucunda 1.0-1.6 mL/dk bölgesinde akış hızına bağlı doğrusallık gözlenmiş ve

çalışmanın kalan kısmında 1.0 mL/dk akış hızının kullanılmasına karar verilmiştir.

SFA'nın en kararlı olduğu tampon sistemini ve pH bölgesini saptamak amacıyla pH 1.0-12.0 aralığında asetat ve fosfat tamponları hazırlanmış ve bu tamponlar enjeksiyon anında 0.1 M derişimde tamponlama sağlayacak şekilde analit çözeltilerine ayrı ayrı ilave edilmiştir. Enjeksiyonlar sonrası elde edilen verilerden SFA'ya ait pik alanı-pH, pik yüksekliği-pH grafikleri çizilmiş ve pik morfolojileri incelenmiştir. Değerlendirmeler neticesinde SFA'nın AEA ile analizi için en uygun tampon ve pH sisteminin 0.1 M pH 2.0 asetat tamponu olduğuna karar verilmiştir.

3.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi İle Gerçekleştirilen Çalışmalar

3.5.1. Stok Çözelti

51.0 mg SFA 100 mL'lik balon jøjeye alınarak metanolde çözülmüştür. Gerekli seyreltmeler belirtilen stoktan bidistile su kullanılarak yapılmıştır.

İndapamid (IS) ise 36.6 mg tartılarak 100 mL'lik balon jøjeye alınmış ve metanolde çözüldükten sonra gerekli seyreltmeler bidistile su ile yapılmıştır. IS tüm deneyler boyunca 1.00×10^{-5} M konsantrasyonda kullanılmıştır.

Standart stok çözeltilerin saklandığı kaplar alüminyum folyo ile kaplanarak +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.5.2. Hareketli Faz ve Tampon Sistemi

Deneyler süresince kullanılacak olan hareketli faz 0.1 M KH_2PO_4 pH 4.0 : asetonitril (70:30) 500 mL hazırlanmıştır. Hazırlanan hareketli faz içerisindeki çözülmüş gazların ve oksijenin uzaklaştırılması için çözeltinin içerisinde 30 dakika helyum gazı geçirilmiştir. Ayırma ve miktar tayini işlemleri bu çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

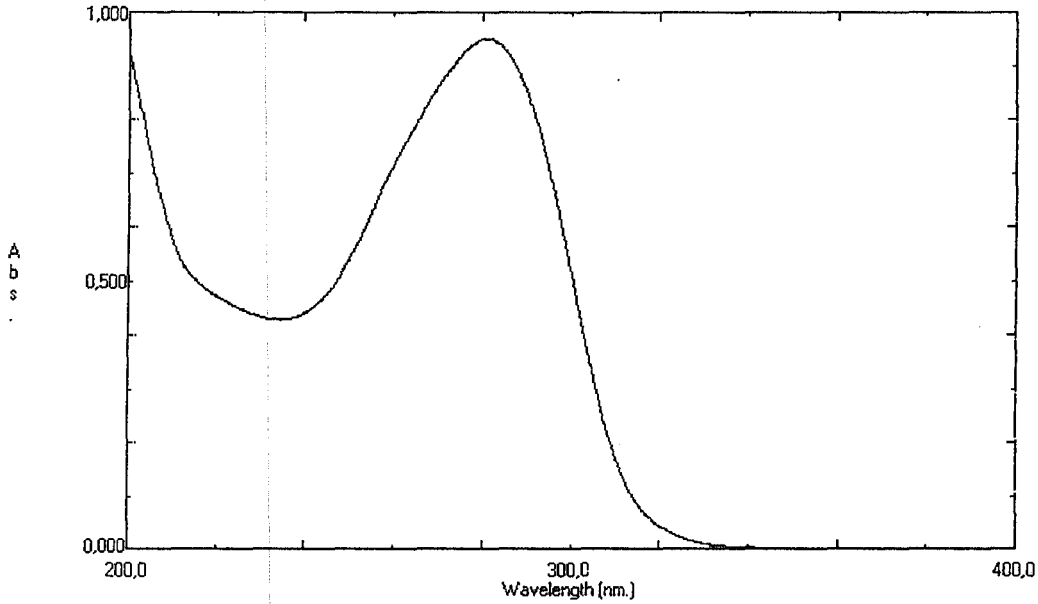
3.6. Tablet Örneklerinin Hazırlanışı

Her üç yöntem için kullanılmak üzere 30 adet tabletin tam tartımla ağırlığı bulunarak ortalama bir tablet ağırlığı hesaplanmıştır. 30 tabletin tümü bir havana alınmış ve ezilip karıştırılarak toz haline getirilmiştir. Deneyler arasındaki birlikteliği sağlamak ve tablet tartımlarından kaynaklanabilecek hataları en aza indirebilmek amacıyla tüm deneyler bu toz edilmiş tablet örnekleri ile yapılmıştır. Ortalama bir tablet ağırlığına eşdeğer miktarda madde tam olarak tartılmış ve 100 mL'lik balon jöjeye alınmıştır. Metanol ile 100 mL'ye tamamlandıktan sonra çözelti manyetik karıştırıcıyla 10 dakika karıştırılmıştır. Çözelti tüplere alınıp 6000 rpm hızda 30 dakika santrifüj edilmiştir. Her üç yöntemde üstteki berrak kısım alınmış, gerekli seyreltmeler yapılmış ve 281 nm dalga boyunda UV-spektrofotometrik yöntem için absorban değerleri, AEA ve YBSK için pik alanları ve yükseklikleri okunmuştur. Elde edilen veriler ilişkili kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak, tablet içerisindeki SFA miktarları hesaplanmıştır.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. UV-Spektrofotometrik Yöntem ile Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada UV-spektrofotometrik yöntem bir karşılaştırma yöntemi olarak seçilmiştir. SFA'nın 5.00×10^{-5} M derişimdeki bir spektrumu Şekil 4.1. de verilmektedir.



Şekil 4.1. 5.00×10^{-5} M derişimdeki sefüroksim aksetil'in UV-spektrofotometrik yöntemle kaydedilmiş özgün spektrumu

Spektrumdan da görüldüğü gibi SFA en yüksek absorbansı 281 nm'de vermektedir. 1.50×10^{-5} - 4.00×10^{-5} M derişim aralığındaki bir dizi çözeltinin 281 nm'deki absorbans-derişim ilişkisi incelenmiştir.

Bu derişim aralığında $A=18986.9C(M)+0.004$ ($r=0.9999$) denklemine uyan oldukça iyi bir doğrusallık bulunmuştur. SFA'nın UV-spektrofotometrik yöntemle yapılan regresyon analizinin istatistiksel değerlendirmesi Çizelge 4.1.'de verilmektedir.

LOD (S/N:3.3) ve LOQ (S/N:10) değerleri sırasıyla 1.91×10^{-6} M ve 5.79×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. UV-Spektrofotometrik yöntemle 1.0×10^{-5} – 4.0×10^{-5} M aralığında yapılan regresyon analizinin istatistiksel değerlendirmesi

Değer	UV-Spektrofotometri
A	18986,9
b	0,004
r	0,9999
Sr	0,0117
Se	100,1199
GA _{0,05}	45,4975

a: eğim b: kesim r: regresyon katsayısı Sr: regresyon doğrusunun standart sapması Se: eğimin standart sapması GA: güven aralığı (%95 olasılık düzeyinde)

4.2. Akış Enjeksiyon Analizi İle Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

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

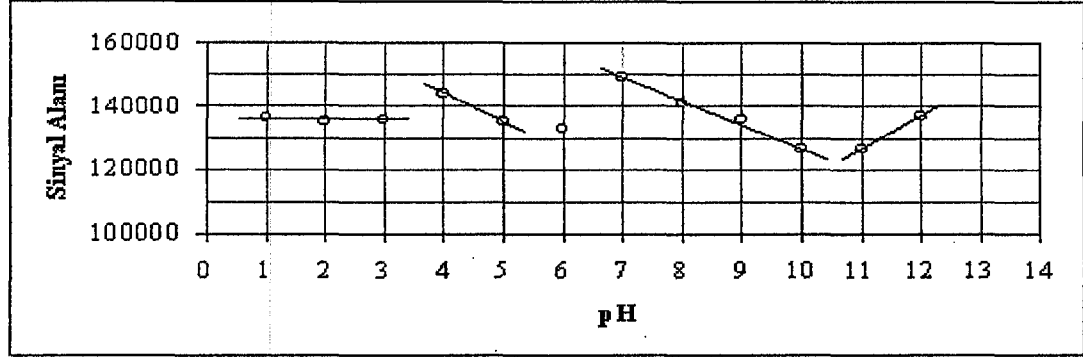
Çalışmanın bu bölümünde SFA'nın miktar tayini için AEA kullanılmıştır. Sinyaller UV dedektörde 281 nm'de kaydedilmiştir. Taşıyıcı fazın bileşimi, akış hızı ve pH değişimi gibi faktörlerin sinyal morfolojileri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Bölüm 3.4.2 de belirtilen koşullarda yapılan çalışmalarda %10-%40 metanol içeren sulu taşıyıcı fazın pik morfolojileri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Metanol yüzdesinin artmasının pik alanları ve pik yükseklikleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu durumda çözücü harcanmasının en azda tutulması amacıyla metanol:su (10:90) sistemi taşıyıcı faz olarak belirlenmiştir.

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

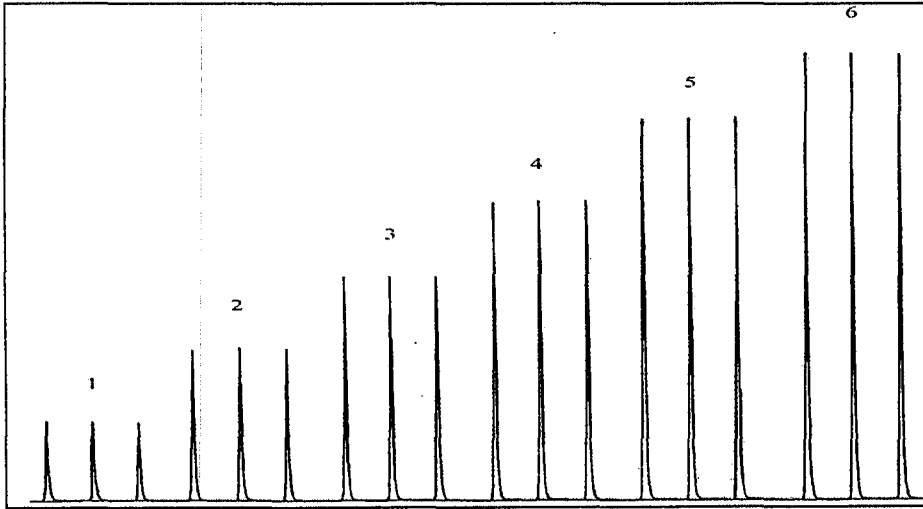
pH'nin sinyaller üzerine etkisini incelemek amacıyla, pH 1.0-12.0 aralığında hazırlanan 3.0×10^{-6} M derişimdeki SFA çözeltilerinin 6 kez enjeksiyonu yapılmış ve pH'a karşı pik alanları grafiğe geçirilmiştir. pH'a bağımlı olarak sinyal alanlarında önemli ölçüde değişimler gözlenmiştir.

Şekil 4.2. de de görüldüğü gibi bu değişimlerin en az olduğu bölge pH 1.0-3.0 aralığıdır. Bu nedenle pH 2.0'nin çalışma pH'ı olarak seçilmesi uygun görülmüştür. Seçilen bu pH değeri literatür verileriyle uyuşmaktadır [2, 3, 10, 16].



Şekil 4.2. Akış enjeksiyon yönteminde pH-pik sinyalleri ilişkisi (n: 6)

SFA derişiminin pik sinyalleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 1.0×10^{-6} - 6.0×10^{-6} M aralığında bir seri standart çözelti hazırlanmıştır. Derişim ile sinyal alanları arasındaki ilişki Şekil 4.3.'de verilmektedir.



Şekil 4.3. Sefuroksim aksetil'in 1.00×10^{-6} - 6.00×10^{-6} M derişimler arasındaki çözeltilerinin optimum koşullarda elde edilen sinyalleri

SFA ile sinyal alanları arasında $A = 1.29 \times 10^{10} C(M) + 4.23 \times 10^4$ $r = 0.9998$ denkleminin uyan çok iyi bir korelasyon olduğu bulunmuştur.

Ayrıca yöntemin validasyonu amacıyla 3 gün boyunca günü ve günlerarası doğrusallık ve kesinlik hesapları yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.2.'de toplanmıştır.

Çizelge 4.2. Sefuroksim aksetil'in 1.00×10^{-6} - 6.00×10^{-6} M derişimdeki çözellilerinin optimum koşullarda elde edilen sinyallerinin doğruluk ve kesinlik incelemesi

Değer	Güniçi			Günlerarası
	1. Gün (k=1; n=5)	2. Gün (k=1; n=5)	3. Gün (k=1; n=5)	Tüm Günler (k=3; n=15)
a	1.36×10^{10}	1.27×10^{10}	1.25×10^{10}	1.29×10^{10}
b	1.57×10^4	7.59×10^3	1.33×10^4	4.23×10^3
r	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998
Sr	4.03×10^3	2.60×10^3	4.36×10^3	2.82×10^3
Se	1.36×10^8	8.25×10^7	1.13×10^8	4.79×10^8
GA _{0.05}	$\pm 2.90 \times 10^8$	$\pm 3.70 \times 10^8$	$\pm 3.00 \times 10^8$	$\pm 1.65 \times 10^8$

a: eğim b: kesim r: regresyon katsayısı Sr: regresyon doğrusunun standart sapması Se: eğimin standart sapması GA: güven aralığı (%95 olasılıkdüzeyinde)

Yöntemin tekraredilebilirliğini ölçmek için 3 ayrı gün 3.00×10^{-6} M derişimdeki SFA çözellisi AEA sistemine enjekte edilmiş ve elde edilen sinyaller istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.3.'de verilmektedir.

Çizelge 4.3. Akış enjeksiyon yönteminin günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.

Değer	Güniçi			Günlerarası
	1. Gün (n=8)	2. Gün (n=8)	3. Gün (n=8)	Tüm Günler (k=3; n=24)
Xort	33375	32694	32143.6	32696.2
S	522.7	554.8	569.9	515.7
% BSS	1.6	1.7	1.8	1.9
GA _{0.05}	362.2	384.4	394.7	246.3

Xort: Değerler ortalaması s: standart sapma BSS: bağıl standart sapma GA: güven aralığı (%95 olasılık seviyesinde)

Yönteme ait LOD (S/N:3.3) ve LOQ (S/N:10) değerleri sırasıyla 1.31×10^{-7} M ve 4.00×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır.

4.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

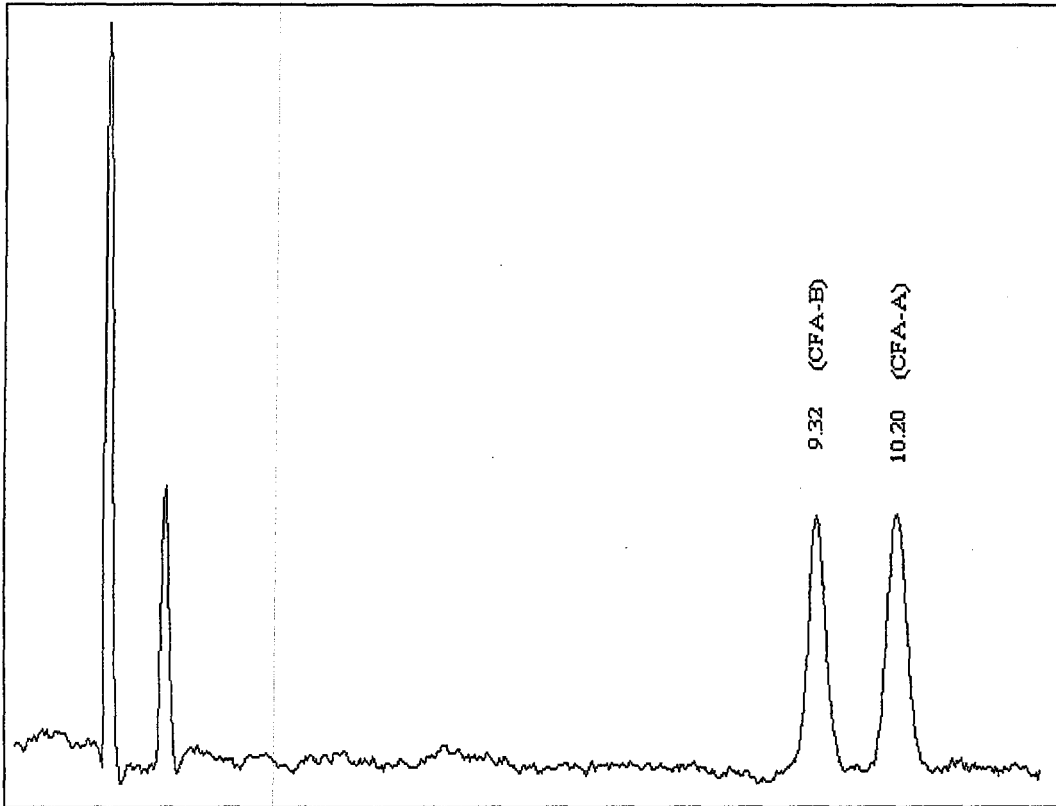
YBSK, yüksek ayırma gücünün yanı sıra seçicilik, doğruluk ve tekrar edilebilirlik gibi analitik analizler açısından öncelik oluşturan özelliklerinden dolayı hemen her çeşit analiz için yaygın olarak kullanılan etkin bir ayırma tekniğidir. Miktar tayininin söz konusu olduğu tüm laboratuvarlarda YBSK yöntemi vazgeçilemez bir yere ve üstünlüğe sahiptir. YBSK kullanımı sonucunda elde edilen sonuçlardaki istatistiksel uyum ve kesinlik, yöntemle ait dezavantajlar olarak bilinen çözücü maliyeti, yüksek saflıkta çözücü kullanımı ve uzun analiz süresi gibi parametreleri önemsiz kılmaktadır. Genel olarak çok düşük konsantrasyonlardaki tayinlere olanak sağlaması da YBSK için ayrıca önemli bir üstünlüktür.

Tümüyle yeni tasarlanmış olan bu çalışmada diode-array dedektörlü sistem kullanılmış, yöntemin optimizasyonuna dair gerekli çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sonuçlar değerlendirilerek yorumlanmıştır.

Sinyaller 281 nm dalgaboyunda kaydedilmiş ve genel istatistik değerlendirmelerin yanı sıra farmakopelerde belirtilen SFA'ya ait özel parametreler de değerlendirilmiştir. Hareketli faz sistemi olarak (0.1 M pH 4.0 KH_2PO_4 : asetonitril) (70:30) sistemi kullanılmış, en uygun akış hızının 1.0 mL/dk olduğu saptanmıştır. Bu koşullarda SFA'nın B ve A diastereoizomerlerine (SFA-B, SFA-A) spesifik olarak ortaya çıkan iki pikin sırasıyla 9.32 ve 10.20 dakikada geldiği bulunmuştur (Şekil 4.4.) Bu bağlamda toplam analiz süresinin rutin bir laboratuvar çalışması için oldukça uygun bir süre olduğu değerlendirilmesi yapılabilir.

YBSK analizleri için en uygun koşulların saptanabilmesi için yapılan çalışmalar sürecinde göze çarpan önemli bir nokta da tampon pH'sının düşmesine bağlı olarak SFA'ya ait piklerin geliş zamanlarının uzamasıdır. Bu durum genel hareketli faz bileşimi olan (0.1 M pH 4.0 KH_2PO_4 : asetonitril) (70:30) sistemindeki dengenin 0.1 M pH 4.0 KH_2PO_4 yönünde bozulması neticesinde de ortaya çıkmaktadır. Yani hareketli fazdaki 0.1 M pH 4.0 KH_2PO_4 hacmi asetonitril miktarı sabit kalmak koşuluyla artırıldığında piklerin geliş zamanlarının

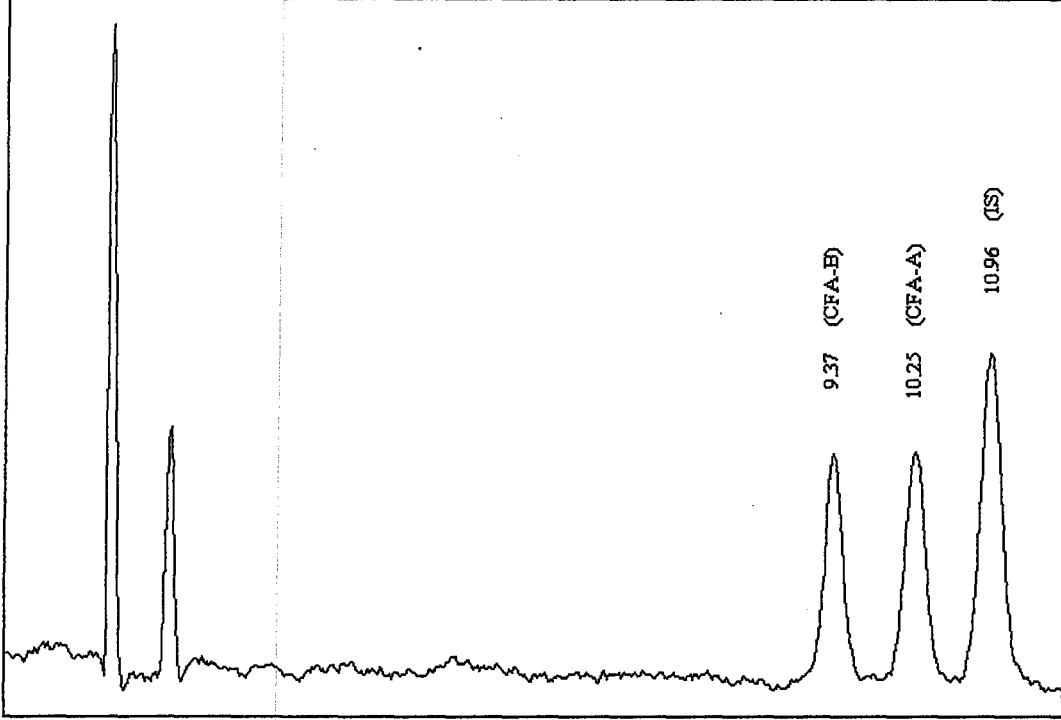
uzadığı görülmüştür. Bir başka deyişle hareketli faz bileşimindeki asetonitril oranı düşürüldüğünde piklerin geliş zamanları uzamaktadır. Bu durum, SFA'nın düşük polariteli yapısından yola çıkılarak açıklanabilir. 0.1 M pH 4.0 KH_2PO_4 oranı artırıldığında, yapısal olarak polar fazda çözünürlüğü düşük olan SFA polar olmayan asetonitril fazına itilmekte ve bu da ayırımında kullanılan ters faz kolonda tutunmayı artırarak geliş zamanlarının uzamasına yol açmaktadır.



Şekil 4.4. Sefuroksim aksetil'in 3.0×10^{-6} M derişimdeki diastereoizomerlerine ilişkin kromatogram (Hareketli faz, 0.1 M pH 4.0 KH_2PO_4 : asetonitril (70:30); akış hızı 1.0 mL/dk; dalgaboyu, 281 nm.)

Şekil 4.4. den görüldüğü gibi özel bir durum olarak ortaya çıkan diastereoizomer varlığının analitik açıdan değerlendirilmesinde, SFA diastereoizomer A ve SFA diastereoizomer B olarak adlandırılan iki diastereoizomerin bulunduğu, SFA'nın yapısal olarak bu iki diastereoizomerden meydana geldiği belirtilmiştir. Belirtilen bir kalite kontrol parametresi olarak SFA-A 'dan elde edilen sinyalin SFA-A ve SFA-B 'den elde edilen sinyallerin toplamına oranının 0.48-0.55 arasında olması gerekmektedir. Ayrıca SFA miktar tayininde, SFA miktarının SFA-A ve SFA-B 'nin toplam değerleri üzerinden

hesaplanarak bulunması gerektiği belirtilmiştir. Gerçekleştirilen YBSK çalışmalarında, hem pik alanları hem de pik normalizasyonu kullanılarak yapılan hesaplardan elde edilen veriler bu oranla uyşur niteliktedir. Sonuçlar bu yönde değerlendirilmiş ve farmakopelere uygun olduğu görülmüştür [17, 27, 28].



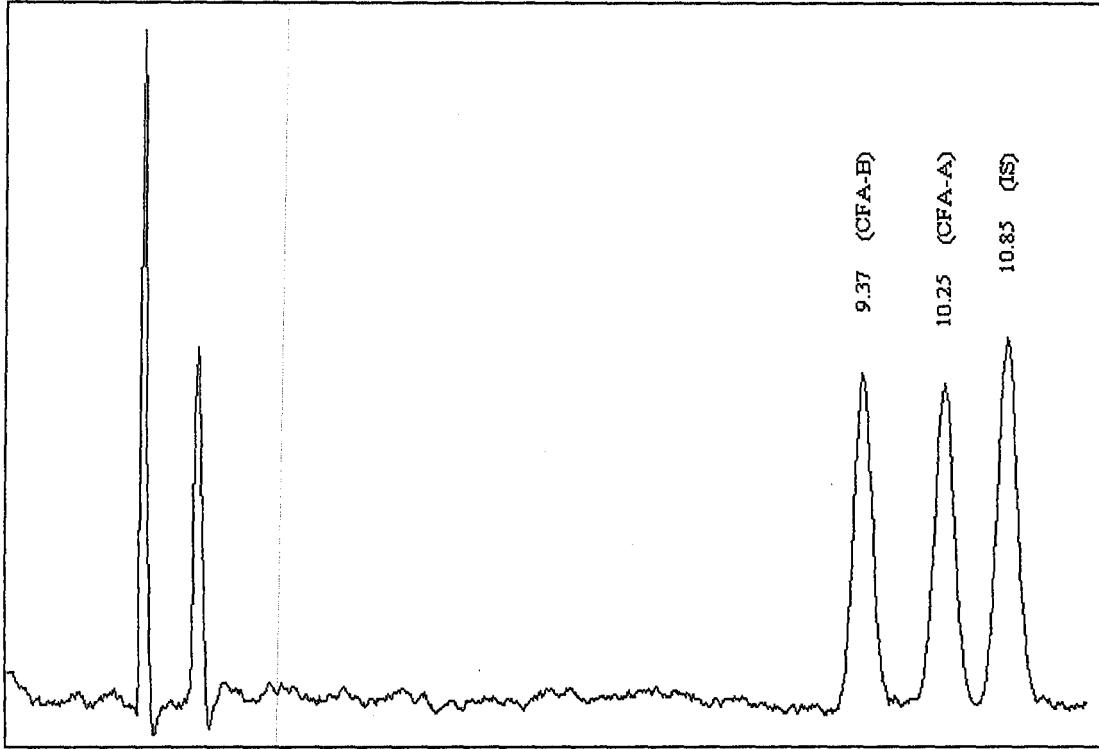
şekil 4.5. Sefuroksim aksetil (3.0×10^{-6} M) ve İndapamid'e (1.0×10^{-5} M) ait kromatogram (Hareketli faz 0.1 M pH 4.0 KH_2PO_4 : asetonitril (70:30); akış hızı 1.0 mL/dk; dalgaboyu 281 nm.)

şekil 4.5. de de görüldüğü gibi belirlenen koşullarda piklerin geliş zamanları ilk pik olan SFA-B için 9.37 dk, ikinci pik olan SFA-A için 10.25 dk ve IS için 10.96 dk olarak gözlenmiştir.

Kromatografik çalışmalarda, yöntemlerin standardizasyonu açısından önemli görevleri üzerine alan ve çalışmaların her koşulda tekraredilebilirliğine büyük katkı sağlayan IS uygulaması bu çalışmada da dış etkenlere bağımlı bir çok parametrenin ortadan kaldırılmasında etkin bir rol üstlenmiştir. Yöntemin genel çerçevesine uygun bir IS tespiti için IS olarak kullanılabilir maddeler araştırılmış ve denemeler sonucunda gerek analitik gerekse aletsel parametrelerle uyumlu İndapamid'in IS olarak kullanılmasına karar verilmiştir. İndapamid'in uygun derişimi belirlenerek, daha önceden saptanan analiz koşullarında YBSK sistemine enjeksiyonu gerçekleştirilmiş ve İndapamid'e ait pikin 10.96 dakikada

geldiği gözlenmiştir. Kaydedilen özgün bir kromatogram Şekil.4.5.'de verilmektedir.

Şekil 4.6. da ise tablet içerisindeki SFA (SFA-A ve SFA-B)'e ait kromatogramlar verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi standart SFA'ya ait piklerle tablet içerisindeki SFA e ait piklerin geliş sıralarının aynı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Tablet içerisindeki SFA (SFA-A ve SFA-B)'ya ait kromatogram (Hareketli faz, 0.1 M pH 4.0 KH₂PO₄ : asetonitril (70:30); akış hızı, 1.0 mL/dk; dalgaboyu, 281 nm.)

Karar verilen koşullarda değerlendirme için kabul edilebilir bir kromatogramın elde edilmesi sonucu yöntemin kesinliği ve doğruluğunu belirlemek amacıyla SFA ve IS'nin alıkonma zamanları, bunların alanlarının ve pik normalizasyon (PN-SFA / PN-IS) değerlerinin tekrarlanabilirlikleri incelenmiştir. SFA'nın toplam pik normalizasyonu için hesaplama, her iki pik alanının alıkonma zamanlarına bölünmesiyle elde edilen değerler toplanarak yapılmıştır. Değerlendirme sonuçları Çizelge 4.4'de verilmektedir.

Çizelge 4.4. SFA diastereoizomer A ve B 'nin IS kullanılarak gerçekleştirilen YBSK analizinden elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi (n=8).

	Tutunma Zamanı (SFA-B)	Alan (SFA-B)	Tutunma Zamanı (SFA-A)	Alan (SFA-A)	PN (SFA-B)	PN (SFA-A)	PN (SFA)	Tutunma Zamanı (IS)	Alan (IS)	PN (IS)	PN (SFA) / PN (IS)
	9.365	20074	10.248	20603	2143.5	2010.4	4154.0	10.968	24523	2235.9	1.8579
	9.358	20076	10.243	20386	2145.3	1990.2	4135.6	10.951	25373	2317.0	1.7849
	9.380	20315	10.264	21221	2165.8	2067.5	4233.3	10.976	25709	2342.3	1.8073
	9.332	20669	10.223	21392	2214.9	2092.5	4307.4	10.927	25468	2330.7	1.8481
	9.338	20478	10.220	20727	2193.0	2028.1	4221.1	10.930	25295	2314.3	1.8239
	9.375	20606	10.246	20853	2198.0	2035.2	4233.2	10.951	25297	2310.0	1.8325
	9.387	20885	10.265	21058	2224.9	2051.4	4276.3	10.965	25405	2316.9	1.8457
	9.473	20948	10.352	21017	2211.3	2030.2	4241.6	11.064	25680	2321.0	1.8274
% BSS	0.47	1.63	0.40	1.58	1.45	1.58	1.35	0.39	1.45	1.39	1.30
S	0.04	334.74	0.04	331.21	31.71	32.14	57.19	0.04	367.37	32.06	0.02
Xort	9.376	20506.4	10.258	20907.1	2187.1	2038.2	4225.3	10.967	25343.8	2311.0	1.828
GA _{0.05}	0.030	231.959	0.029	229.511	21.971	22.274	39.628	0.030	254.567	22.219	0.016

BSS: bağıl standart sapma s: standart sapma Xort: değer ortalaması GA: güven aralığı (%95 güven seviyesinde)

SFA için elde edilen piklerin alanları IS için elde edilen pik alanlarına oranlanarak değerlendirilmiş ve tekraredilebilirlik incelenmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre tekraredilebilirlik için %BSS değeri 1.4 bulunmuştur.

Çizelgeden görüldüğü gibi en iyi tekraredilebilirlik, SFA ve IS 'nin pik normalizasyon değerlerinin birbirine oranlanması ile sağlanabilmektedir. Bundan sonraki miktar tayini ile ilgili tüm çalışmalarda tümüyle pik normalizasyon oranları değerleri kullanılacaktır.

Ayrıca yöntemin validasyonu amacıyla 3 gün boyunca günüçi ve günlerarası doğruluk (accuracy) ve kesinlik (precision) hesapları yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.5.'de toplanmıştır.

Çizelge 4.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yönteminin doğruluğu ve kesinliği

Değer	Günüçi			Günlerarası
	1. Gün (k=1; n=6)	2. Gün (k=1; n=6)	3. Gün (k=1; n=6)	Tüm Günler (k=3; n=18)
a	446525.4	446729.8	446727.5	447263.1
b	0.007	0.008	0.009	0.003
r	0.9999	0.9999	0.9998	0.9998
Sr	0.02	0.03	0.04	0.04
Se	4379.17	6421.25	6892.05	4912.56
GA _{0,05}	3611.33	5061.713	5683.56	2003.17

a: eğim b: kesim r: regresyon katsayısı Sr: regresyon doğrusunun standart sapması
Se: eğimin standart sapması GA: güven aralığı (%95 olasılık seviyesinde)

Yönteme ait LOD (S/N:3.3) ve LOQ (S/N:10) değerleri sırasıyla 1.48×10^{-7} ve 4.47×10^{-7} M olarak bulunmuştur.

4.4. Yöntemlerin Tabletler Uygulanması

Bölüm 3.6. da anlatıldığı şekilde hazırlanan tablet örnekleri (Cefaks[®] 250 mg) her üç yöntemle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6.'da topluca verilmiştir.

Çizelge 4.6. incelendiğinde AEA ve YBSK yöntemleri ile elde edilen tüm sonuçların UV-spektrofotometrik yöntem sonuçları ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler de bunu kanıtlar niteliktedir.

İstatistiksel değerlendirmeler, α : 0.05 önem ve %95 olasılık düzeyinde yapılmıştır. $n-1=7$ serbestlik derecesine göre istatistiksel değerlendirmelerde F testi için 3.79, t testi için 2.36 kritik değerler verilmektedir. Her iki test için de hesaplanmış olan değerler bu kritik değerlerden düşük çıkmışlardır. Bu da AEA ile UV-spektrofotometrik ve YBSK ile UV-spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasındaki farkın anlamsız olduğunu açıklamaktadır. Sonuçlar uygulanan yöntemlerin BP [17] ve USP [28] tarafından kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğunu da belirtmektedir.

Çizelge 4.6. Sefuroksim aksetil içeren (Cefaks® 250 mg) tabletlerin analiz sonuçları (n: 8)

Deney No	YBSK (%)	AEA (%)	UV-Spektrofotometri (%)
1	101.90	102.70	99.80
2	100.70	101.30	99.90
3	102.30	103.30	102.70
4	103.80	103.80	102.10
5	102.40	102.40	100.60
6	100.60	101.30	99.10
7	97.60	98.90	98.80
8	102.90	103.20	101.80
Xort	101.53	102.11	100.60
s	1.91	1.58	1.45
s ²	3.63	2.50	2.10
% BSS	1.87	1.54	1.44
GA _{0.05}	1.60	1.31	1.20
F testi (p:0.05)	1.73	1.19	3.79
t testi (p:0.05)	0.29	0.07	2.36

Xort: değer ortalaması s: standart sapma s²: varyans BSS: bağıl standart sapma
GA: güven aralığı (%95 güven seviyesinde)

Sonuç olarak çalışmalarımızda geliştirilen ve uygulanan UV-spektrofotometrik, AEA ve YBSK yöntemlerinin SFA içeren tabletler için kullanışlı ve geçerli yöntemler olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Adams, D.H., Wood, M.J., Farrell, I.D., Fox, C., Ball, A.P., *J. Antimicrob. Chem.*, **16**, 359-366, 1985.
2. Piva, G., Farin, D., Gozlan, I., Kitzescohen, R., *Chromatographia*, **51**, 154-156, 2000.
3. Al-Said, M.S., Al-Khamis, K.I., Niazy, E.M., El-Sayed, Y.M., Al-Rashood, K.A., Al-Bella, S., Al-Yamani, M.A., Al-Najjar, T.A., Alam, S.M., Dham, R., Qumaruzaman, Q.Z., *Biopharm. Drug Dispos.*, **21**, 205-210, 2000.
4. Tsai, T.H., Cheng, F.C., Chen, K.C., Chen, Y.F., Chen, C.F., *J. Chromatogr. B*, **735**, 25-31, 1999.
5. Rosseel, M.T., Peleman, R., Vanhoorebeke, H., Pauwels, R.A., *J. Chromatogr. B*, **689**, 438-441, 1997.
6. Garrafo, R., Drugeon, H.B., Chiche, D., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **11**, 90-95, 1997.
7. Faouzi, M.A., Dine, T., Luyckx, M., Gressier, B., Brunet, C., Goudaliez, F., Mallevais, M.L., Cazin, M., Cazin, J.C., *Pharmazie*, **49**, 425-427, 1994.
8. Lovdahl, M.J., Reher, K.E., Russlie, H.Q., Canafax, D.M., *J. Chromatogr. B*, **653**, 227-232, 1994.
9. Lee, Y.J., Lee, H.S., *Chromatographia*, **30**, 80-84, 1990.
10. Elgindy, A., Elwalily, A.F.M., Bedair, M.F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23**, 341-352, 2000.
11. Ayad, M.M., Shalaby, A.A., Abdellatef, H.E., Elsaid, H.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18**, 975-983, 1999.
12. Murillo, J.A., Lemus, J.M., Garcia, L.F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 875-881, 1994.
13. Sciacchitano, C.J., Mopper, B., Specchio, J.J., *J. Chromatogr. B*, **657**, 395-399, 1994.
14. Pajchel, G., Tyski, S., *J. Chromatogr. A*, **895**, 27-31, 2000.
15. Lin, C.E., Chen, H.W., Lin, E.C., Lin, K.S., Huang, H.C., *J. Chromatogr. A*, **879**, 197-210, 2000.

16. Bernacca, G., Nucci, L., Pergola, F., *Electroanalysis*, **6**, 327-332, 1994.
17. British Pharmacopoeia, Vol.1-2, 283, 1550, Market Towers 1 Nine Elms Lane, London, SW8 SNQ, 1998.
18. Bökesoy, T.A., Çakıcı, İ., Melli, M., *Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Ders Kitabı*, 542-547, Gazi Kitabevi, Ankara, 2000.
19. Powell, D.A., James, N.C., Ossi, M.J., Nahata, M.C., Donn, K.H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 2042-2045, 1991.
20. Deguchi, K., Yokota, N., Koguchi, M., Suzuki, Y., Fukayama, S., Ishihara, R., Oda, S., Tanaka, S., Nakane, Y., Fukumoto, T., *Jap. J. Antibiotics*, **47**, 365-382, 1994.
21. Scott, L.J., Ormrod, D., Goa, K.L., *Drugs*, **61**, 1455-1500, 2001.
22. Martindale's Extra Pharmacopoeia, 177, Royal Pharmaceutical Society, Pharmaceutical Press, 1 Lambeth Street, London, SE1 7JN, UK, 1999.
23. Hardings, S.M., Williams, P.E., Ayrton, J., *Antimicrob. Agents Chem.*, **25**, 78-82, 1984.
24. Williams, P.E., Hardings, S.M., *J. Antimicrob. Chem.*, **13**, 191-196, 1984.
25. Wise, R., *J. Antimicrob. Chem.*, Supp E, **26**, 13-20, 1990.
26. Gentry, L.O., *Drugs*, Supp. 2, **34**, 154-163, 1987.
27. European Pharmacopoeia 1997 Third Edition, Supp. 1999, 357, European Pharmacopoeia Commission, B.P. 907, F-67029, Strasbourg, France 1999.
28. United States Pharmacopoeia XXIV, 356-357, Marck Printing Co., Easton, 2000.