

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SEFDİNİR VE KLAVULANİK ASİDİN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
İLE TABLETlerde YAN YANA ANALİZİ**

ALİ RAHMİ ALP

**DANIŞMAN
PROF. DR. SIDIKA ERTÜRK TOKER**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Öğrencisi Ali Rahmi ALP tarafından Sıdıka TOKER'in danışmanlığında hazırlanan '**Sefdinir ve Klavulanik Asidin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Tabletlerde Yanyana Analizi**' başlıklı tez aşağıdaki jüri tarafından. 22/02/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı-Danışman
Prof.Dr.Sıdıka TOKER
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr. Armağan ONAL
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri
Yard.Doç.Dr.Dilek BİLGİÇ ALKAYA
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ALİ RAHMİ ALP

(İmza)



İTHAF

Anneme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN'a;

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, desteğini esirgemeyen, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sıdıka ERTÜRK TOKER'e;

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili aileme, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39309

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sefdinir.....	2
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	2
2.1.2. Farmakolojisi	3
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	4
2.1.3.1. HPLC ile analizleri.....	4
2.1.3.2. Spektrofotometrik ve Spektrofluorimetrik Yöntemler ile Analizleri.....	8
2.2. Klavulanik Asit	10
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	10
2.2.2. Farmakolojisi	11
2.2.3. Analiz Yöntemleri.....	11
2.2.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri.....	11
2.2.3.2. Spektrofotometrik Yöntemler ile Analizleri	15
2.2.3.3. Diğer Yöntemler ile Analizleri.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	17
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	17
3.1.2. Çözeltiler.....	17
3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi	17

3.1.2.2. Sefdinir Stok Çözeltisi	18
3.1.2.3. Klavulanik Asit Stok Çözeltisi.....	18
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	19
3.3. Sefdinir ve Klavulanik Asidin Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi	20
3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	20
3.4. HPLC Yönteminin Validasyonu	20
3.4.1. Seçicilik.....	20
3.4.2. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD).....	20
3.4.3. Doğrusallık.....	21
3.4.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik	21
3.4.5. Doğruluk	21
3.5. Tabletlerde Sefdinir ve Klavulanik Asidin Analizi	21
3.5.1. Tablet Stok Çözeltisinin Hazırlanması	21
3.5.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Analiz.....	22
3.5.3. Sefdinirin Kıyas Yöntemi ile Miktar Tayini	22
3.5.4. Klavulanik Asidin Kıyas Yöntemi ile Miktar Tayini.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Sefdinir ve Klavulanik Asidin Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analiz Sonuçları	24
4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	24
4.2. Yöntem Validasyonu	24
4.2.1. Seçicilik.....	24
4.2.2. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)	25
4.2.3. Doğrusallık.....	26
4.2.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik	30
4.2.5. Doğruluk	31
4.3. Tabletlerde Sefdinir ve Klavulanik Asidin Analizi	32
4.3.1. Geliştirilen HPLC ve Kıyas Yöntemlerinin Tablet Analizlerine Uygulanması ve Sonuçların Birbiri ile Karşılaştırılması	32
5. TARTIŞMA	35
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	42

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Sefdinirin 18,0–84,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri	28
Tablo 4-2: Tablo 4-1' deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler.....	28
Tablo 4-3: Klavulanik asidin 7,5–35,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri	29
Tablo 4-4: Tablo 4-3' teki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler.....	29
Tablo 4-5: Aynı gün ve farklı gün içinde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	31
Tablo 4-6: Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi	32
Tablo 4-7: 300 mg cefdinir ve 125 mg klavulanik asit içeren tabletlerin geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları ve bu sonuçların kıyas yöntemleri ile istatistiki olarak karşılaştırılması.....	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Sefdinirin açık kimyasal formülü.....	2
Şekil 2-2: Sefdinirin 20,0 µg/mL konsantrasyonda fosfat tamponunda (pH:3) 200-350 nm aralığında alınmış UV spektrumu.....	2
Şekil 2-3: Klavulanik asidin açık kimyasal formülü	10
Şekil 2-4: Klavulanik asidin 33,3 µg/mL konsantrasyonda metanolde 200-350 nm aralığında alınmış UV spektrumu.....	10
Şekil 4-1: 84 µg/mL sefdinir (2) ve 35 µg/mL klavulanik asite (1) ait örnek kromatogram.....	24
Şekil 4-2: Mobil faz enjeksiyonuna ait kromatogram	25
Şekil 4-3: Tablet yardımcı maddeleri karışımının enjeksiyonuna ait kromatogram	25
Şekil 4-4: Sefdinirin 18,0–84,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	26
Şekil 4-5: Klavulanik asidin 7,5–35,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	27
Şekil 4-6: Doğrusallık konsantrasyonlarından 18 µg/mL sefdinir (2) ve 7,5 µg/mL klavulanik asite (1) ait kromatogram	30
Şekil 4-7: Doğrusallık konsantrasyonlarından 48 µg/mL sefdinir (2) ve 20 µg/mL klavulanik asite (1) ait kromatogram	30
Şekil 4-8: 30 mg sefdinir ve 12,5 mg klavulanik asit içeren tablet analizinden elde edilen kromatogram	33

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPTLC: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi

LC-MS/MS: Sıralı Kütle spektrumlu Sıvı Kromatografisi

LC-ESI-MS/MS: Elektrosprey İyonizasyon Sıralı Kütle Spektrumlu Sıvı Kromatografisi

HPLC-ESI

UV: Ultraviyole

LOQ: Tayin sınırı

LOD: Gözlenebilme Sınırı

NSAİ: Non Steroidal Anti Enflamatuvar

CZE: Kapiler Zon Elektroforez

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

DAD: Diyod Sıralı Dedektör

I.D.: İç yarıçap

GC-MS: Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometrisi

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

ÖZET

Alp, A. R. (2015). Sefdinir ve Klavulanik Asidin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Tabletlerde Yanyana Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışmasında, sefdinir ve klavulanik asidin tabletlerde yan yana tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisine dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde C18 kolonda; 20 mM fosfat tamponu (pH: 3) - metanol (65:35, h/h) hareketli fazı ile 1,0 mL/dk akış hızında maddelerin ayrılması gerçekleştirilmiş ve dedeksiyon dalga boyu 210 nm'ye ayarlanmıştır. Maddelerin doğrusallık aralıkları sefdinir için 18.0-84.0 µg/mL ve klavulanik asit için 7.5-35.0 µg/mL, gözlenebilme sınırları sefdinir için 0.63 µg/mL, klavulanik asit için 0,44 µg/mL ve tayin sınırları ise sefdinir için 1.91 µg/mL ve klavulanik asit için 1.33 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem ilaç maddesinin tabletlerdeki analizine başarıyla uygulanmış ve sonuçlar Student-t ve Fisher-F testleri uygulanarak istatistiksel olarak farmakope yöntemleri ile elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak iki yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar yönünden %95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Geliştirilen bu yöntem kolay, seçici ve tekrarlanabilir olup sefdinir ve klavulanik asidin yan yana tablet analizlerinde güvenle kullanılabilir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Sefdinir, Klavulanik Asit, HPLC, Yanyana Tayin, İlaç Analizi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39309

ABSTRACT

Alp, A. R. (2015). Simultaneous Determination of Cefdinir and Clavulanic Acid in Tablets by using High-Performance Liquid Chromatographic Methods, Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

In this study, a new simple and selective assay methods have been presented for the simultaneous analysis of cefdinir and clavulanic acid in tablets. The method was based on high performance liquid chromatography by using a mobile phase methanol-10,0 mM phosphate buffer solution, pH 3 (65:35, v/v) and C18 column. The mobile phase flow rate was 1,0 mL/min and the substances were detected at 210 nm. The linearity ranges were found as 18,0-84,0 µg/mL and 7,5-35,0 µg/mL for cefdinir and clavulanic acid, respectively. The limits of detection and quantification were found to be 0,63 and 1,91 µg/mL for cefdinir and 0,44 and 1,33 µg/mL for clavulanic acid, respectively. The proposed methods were successfully applied to the determination of commercially available tablets and the obtained results were compared statistically with pharmacope methods of Student-t and Fischer-F tests. It was found that there is no significant difference between two methods in terms of the mean values and standart deviations at %95 confidence levels. The developed methods are simple, selective and reproducible and can be used safely routine simultaneous analysis of cefdinir and clavulanic acid in tablets.

Key Words: Cefdinir, Clavulanic Acid, HPLC, Simultaneous Determination, Drug Analysis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 39309

1. GİRİŞ VE AMAÇ

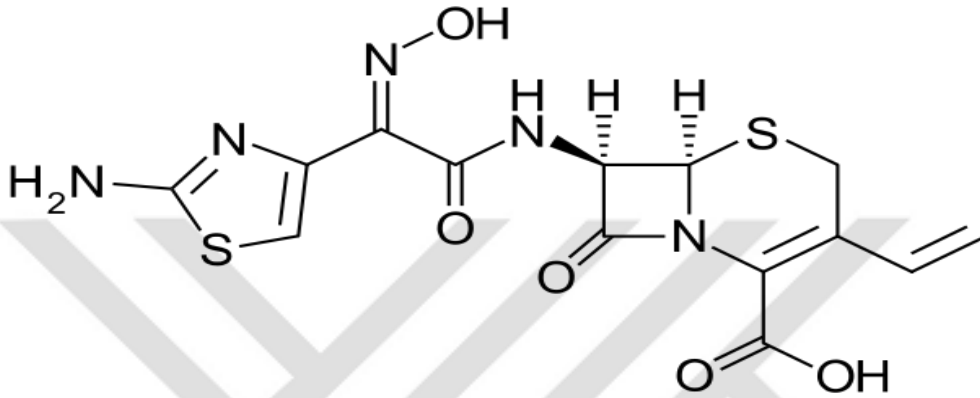
Sefdinir oral yoldan kullanılan geniş spektrumlu, yarı sentetik, bir üçüncü kuşak sefalosporindir. Oksasiline duyarlı *Staphylococcus aureus* ve koagülaz-negatif stafilokoklar, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Escherichia coli* ve *Moraxella catarrhalis*'e karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Sefdinir, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis* ve *P. Vulgaris*'e karşı da oldukça etkilidir. Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile erişkin ve çocuklarda kronik bronşit, otitis media, farenjit, pnömoni, sinüzit ve tonsillit dahil çeşitli üst solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılmaktadır. Klavulanik asit ise *Streptomyces clavuligeris*'ten elde edilen klavam türevi beta-laktamaz inhibitörü bir antibiyotiktir. Klavulanik asit, genellikle tek başına belirgin bir antibakteriyel etki göstermez. Bakterilerde beta-laktamaz enzimlerinin yapımı penisilinlere karşı rezistans kazanılmasında en önemli ve genel faktörü oluşturduğu için, klavulanik asit bugüne kadar penisilinlerin etki güçlerinin artırılması ve etki spektrumlarının genişletilmesi amacıyla kullanılmıştır. Ancak yeni bir kombinasyon ile benzer etki için sefdinir ile birlikte kullanımına başlanmıştır. Sefdinir - klavulanik asit kombinasyonunda klavulanik asidin varlığı sefdiniri beta - laktamaz enzimlerince parçalanmaktan korur ve sefdinirin etki spektrumunu normalde dirençli pek çok bakteriyi de içine alacak şekilde genişletir (Kayaalp 2000, Mine ve arkadaşları 1988, Sultan 1994)

Sefdinir ve klavulanik asidin farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde bu iki ilaç maddesinin yan yana analizi için yapılmış çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında sefdinir ve klavulanik asit birlikte yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak tabletlerde analizi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılmış ve ilaç maddelerinin tabletlerdeki analizlerine uygulanabilirliği test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

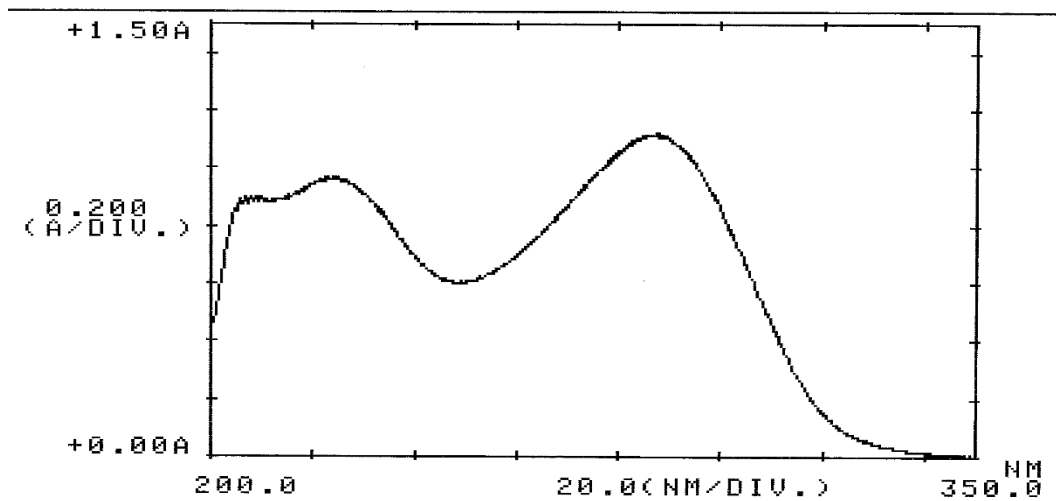
2.1. Sefdinir

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1: Sefdinirin açık kimyasal formülü

Sefdinirin kimyasal formülü, [6R-[6 α ,7 β (Z)]]-7-[[2-amino-4-tiazolil] (hidroksimino)asetil]amino]-3-etenil-8-okso-5-tiya-1-azabisiklo[4.2.0]okt-2-en-2-karboksilik asit, kapalı formülü ise C₁₄H₁₃N₅O₅S₂' dir. Beyaz kahverengimsi sarı bir katı olan sefdinirin molekül ağırlığı, 395.42 g/mol'dür. Seyreltik hidroklorik asit içinde az, 0.1 M pH: 7.0 fosfat tamponu içinde ise yavaş yavaş çözülür (Dailymed).



Şekil 2-2: Sefdinirin 20,0 µg/mL konsantrasyonda fosfat tamponunda (pH:3) 200-350 nm aralığında alınmış UV spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

Sefdinir oral geniş spektrumlu, yarı sentetik, üçüncü kuşak bir sefalosporindir. Penisilinler gibi bir beta-laktam antibiyotiktir ve asıl etkinliği bakterisit etki göstermesidir. Penisilinler ve bazı sefalosporinlere dirençli mikroorganizmalar sefdinire duyarlıdır. Sefdinir'in *S. aureus*'a ait penisilin bağlayan protein (PBP) 3, 2, 1 ve *E. Faecalis*'a ait penisilin bağlayan protein (PBP) 2 ve 3 üzerine diğer sefalosporinlerden daha fazla etkinliği bulunmaktadır. Sefdinir çözünülebilir mediyatörlerle nötrofil stimülasyonu sırasında, nötrofillerden ekstrasellüler ortama miyeloperoksidaz salınımını inhibe etmektedir. Sefdinir aerobik gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara etkindir.

Maksimum plazma sefdinir konsantrasyonları, ilacın alınmasını takiben 2 ila 4 saatte meydana gelmektedir. Plazma sefdinir konsantrasyonları dozla beraber artar. Sefdinirin tahmini biyoyararlanımı, 300 mg alımından sonra %21, 600 mg alımından sonra %16'dır. Sefdinir'in farmakokinetikleri, insanlarda 200-400 mg arası oral dozlarda lineer ve dozdan bağımsız olarak karakterizedir. Normal erişkinlerde günde bir ya da iki kere verilmesiyle ilaç birikimi meydana gelmemektedir. Çoklu doz verilmesinin ardından farmakokinetik parametreler tekli doz verilmesinden sonraki şekline benzemektedir.

Erişkinlerde yapılan çalışmalara göre, $<30\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar kreatinin klerensi olan kişilerde doz değişimi gerekmemektedir. Sefdinir, çocuklarda oral yolla alımı takiben yaklaşık 2 saat gibi hızlı bir şekilde pik plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Hafif yağlı yemeklerle birlikte alındığında sefdinirin C_{maks} 'ı ve AUC'si sırasıyla %16 ve %10 oranında azalmaktadır. Bu düşüşler, klinik olarak anlamlı değildir; dolayısıyla sefdinir yemeklerle birlikte alınabilir.

Sefdinir'in erişkinlerdeki ortalama dağılım hacmi (V_d) 0.35L/kg (± 0.29)'dır. Pediatrik popülasyonda (6 ay-12 yaş) sefdinir'in dağılım hacmi 0.67L/kg (± 0.38)'dir. Sefdinir, erişkinlerde ve çocuklarda %60 ila %70 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Bağlanma, konsantrasyondan bağımsız olarak gerçekleşmektedir.

Sefdinir, etkin bir şekilde metabolize edilmez. Aktivite primer olarak ana ilaçtan kaynaklanır. Sefdinir, ortalama 1.7 (± 0.6 sa)'lik $t_{1/2}$ ile primer olarak renal yolla değişmeden atılır. Normal renal fonksiyonlu sağlıklı kişilerde, renal klerens 2.0 (± 1.0) mL/dk/kg 'dır. 300 ve 600 mg'lık doz alımını takiben idrar ile değişmeden atılan miktar sırasıyla %18,4 ($\pm 6,4$) ve 11.6 ($\pm 4,6$)'dır.

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. HPLC ile analizleri

Sefdinirin saf ve farmasötik formlarını için basit, hızlı ve doğru bir rutin HPLC yöntemiyle kantitasyonu yapılmıştır. Ters faz C18 kolonda 40 °C' de MeOH ve 25 mM KH₂PO₄ pH: 3.0 (10:90, h/h) mobil fazı 5 mL/dk akış hızıyla DAD (Diyod Sıralı Dedektör)ünde 214 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Yöntem sistem uygunluğu, doğrusallık, kesinlik, gözlenebilme ve kantitsyon sınırları, özgüllük, istikrar ve dayanıklılık için valide edilmiştir (Hashem ve arkadaşları 2012).

Sefdinirin kantitatif tayini için kararlılık gösteren bu HPLC yönteminde, C18 kolonu ile mobil faz olarak 0.02 M amonyum format tamponu pH:4.5 ve metanol karışımı kullanılmıştır. Geliştirilen bu yöntem LCMS uyumlu olup bozunma ürünlerini tespit etmek için kullanılabilir. Yöntem ayrıca doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık açısından doğrulanmıştır (Mashelkar ve Renapurkar 2010).

Sefdinirin insan idrarı ve farmasötik örneklerinde basit ve güvenilir bir sıvı kromatografik yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik ayırım C18 kolonu ile 10 mM potasyum dihidrojen fosfat pH: 4.5 – asetonytril (90:10, h/h) mobil fazıyla; kantitasyon ise 285 nm UV dedeksiyonda, 0.7–39 µg/mL konsantrasyon aralığında pik alanına bağlı lineer kalibrasyon eğrisiyle yapılmıştır (Hadad ve arkadaşları 2009).

İnsan plazmasında sefdinirin tayini için hassas ve seçici LC–MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. RP18 Waters Symmetry Shield kolonu ile methanol – su – formik asit (25:75:0.075, h/h/h) mobil fazı kullanılan bu yöntemde, 5–2000 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu ve LOQ değerinin 5 ng/ml olduğu belirlenmiştir. 36, 360 ve 1800 ng/mL konsantrasyonlarında geri kazanım % 99.6 - % 106.7 aralığında saptanmıştır. (Chen ve arkadaşları 2006).

Çeşitli kromatografi koşulları ve diğer deney parametrelerinin optimizasyonu sonrası sefdinir ve sefiksimin insan plazmasında tayini için izokritik ters faz HPLC-UV yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Perkin Elmer C18 (30 mm×4.6 mm, 10 µm) kolonu tarafından korunan Supelco Discovery HS C18 (150 mm×4.6 mm, 5 µm) analitik kolonu ile numunelerin ayırımı yapılmıştır. Metanol/asetonytril (50:50, h/h)- % 0.05 trifloroasetik asit (19:81, h/h) mobil fazı ve 2.0 mL/dk akış hızı ile yapılan deneyde

fırın sıcaklığı 50 °C, dalga boyu ise 285 nm'ye ayarlanmıştır. Her iki madde için LOQ 4 ng/mL, LOD ise 1 ng/mL olarak bulunmuştur (Khan ve arkadaşları 2011).

Sefdinirin sıçan plazması ve üresinde tayini için seçici ve hassas LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Kromatografik ayırım Synergi 4m polar-RP 80A kolonu (150 × 2.0 mm, 4 mm), %0.1'lik formik asit – metanol (65:35, h/h) mobil fazı ve 0.2 mL/dk akış hızı ile yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi plazma ve üre için 10–10,000 ng/mL konsantrasyon aralığı üzerinde doğrusaldır ve LOQ 10 ng/mL olarak bulunmuştur (Jin ve arkadaşları 2013).

Sefdinirin Waters RP Spherisorb C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) üzerinde tayini için (RP-HPLC) metodu geliştirilerek metodun kararlılık validasyonu yapıldı. Mobil faz olarak su içeren (pH 3'e ayarlanmış ortofosforik asit): aseonitril: metanol 13:5:2 (h/h/h) kullanıldı. Akış hızı 1 mL/dk. Ayırma oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Dedeksiyon PDA detektörüyle 296nm de gerçekleştirildi. Geliştirilen metot istatistiksel olarak doğrusallık, kesinlik, sipesifiklik, LOD, LOQ için valide edildi. Metodun özgülüğü asit ve alkali degradasyon, oksidasyon, fotoliz ve ısı degradasyonu gibi zorlama degradasyon çalışmalarıyla belirlendi. Bozunma ürünleri analitten, anlamlı bir şekilde farklı tutunma zamanlarıyla iyi bir şekilde ayrıldı. Beer yasasına 0.05-15.00 µg/mL konsantrasyon aralığı üzerinde uyuldu ve korrealasyon katsayısı 0.999 olarak bulundu (Hamrapurkar ve arkadaşları 2011).

Sefdirin kapsül ve süspansiyon gibi farklı dozaj formlarında tayini için basit, hızlı, spesifik, kararlılık gösteren keskin ters faz HPLC metodu geliştirildi. Metot geliştirildi ve plesabo preparatları, formulasyonlar ve ilaç maddesi numunelerinin bozunma ürünleri analizlenerek ICH (International Conference on Harmonization) a göre optimize edildi. Önerilen metot, koruyucular gibi farmasötik içeriklerle birlikte stres koşulları altında oluşan bozunma ürünlerinden ilaç başarılı bir şekilde ayrılabilir. Geliştirilen metot sefdinirin kapsüller ve insta-süspansiyonlarda tayininde başarılı şekilde kullanıldı. Metot 6-14 µg/mL aralığında doğrusaldır. Ortalama geri kazanımlar insta süspansiyonlar ve kapsüller için sırasıyla %99.3 ve %99.6 olarak hesaplandı. Metot özgüllük, keskinlik ve dayanıklılık gösterdi (Mehta ve arkadaşları 2005).

Sefdinirin farmasötik dozaj formlarında miktar tayini için basit, spesifik, doğru, hızlı, pahalı olmayan izokratik RP-HPLC metodu geliştirildi ve valide edildi. RP-HPLC metod Welchrom C18 kolonuyla (4.6 × 250 mm, 5µm), Shimadzu LC20AT Prominence Liq. Chromatograph ile geliştirildi. Mobil faz 10 mM fosfat tamponu (trietilaminle pH

3 e ayarlı) : acetonitrile (50:50 h/h) karışımından oluştu. Akış hızı 1.0 mL/dk dedeksiyon dalga boyu 235 nm. Sefdinirin alıkonma zamanı 2.523 dk olarak bulundu. Sefdinir için doğrusallık 0.999 korrealasyon katsayısıyla 2-10 µg/mL aralığında bulundu. Geliştirilen metodun validasyonu özgüllük, doğrusallık, keskinlik, dayanıklılık, LOD, LOQ için gerçekleştirildi. Geliştirilen metod sefdinirin farmasötik kapsül dozaj formlarında rutin kalite kontrol analizleri için kullanılabilir (Ravisankar ve arkadaşları 2013).

Sefdinirin kapsüllerdeki tayini için RP-HPLC kullanarak basit, etkili ve tekrarlanabilir metod geliştirildi. Elüsyon 0.01 N KH₂PO₄ (pH: 6.9) ve MeOH (80:20 % h/h) içeren mobil faz kullanarak Water's Spherisorb ODS 4.6×150 mm analitik kolonuyla 285 nm'de 1.0 mL/dk akış hızıyla yapıldı. Miktar tayini için dış standart kalibrasyon metodu kullanıldı. Elüsyon zamanı 2 dakika, doğrusallık 5-10 µg/mL aralığındadır (Gandhimathi ve arkadaşları 2004).

Sefdirin farmasötik dozaj formlarına ilaveten toz ilaçta da sefdinir analizi için basit, keskin, hızlı, RP-HPLC metodu geliştirildi. Miktar tayini 5 µm parçacık çaplı Partisil C18 oktadesil silan kolonuyla 150 × 4.6 mm, i.d. izokratik modda 60:40 (h/h) oranında asetonyril-su içeren mobil faz ile gerçekleştirildi. Akış hızı 1.0 mL/dk dedeksiyon dalga boyu 240 nm. Sefdinirin alıkonma zamanı 1,9 dk. Metod 0.5-50 µg/mL aralığında doğrusal cevap verdi ve geri kazanım yüzdesi 98.6-100.15 aralığındadır. Önerilen metotun sefdinirin farmasötik dozaj formlarında analizi için tekrarlanabilir ve uygun olduğu bulundu (Sankar ve arkadaşları 2004).

Sefdinir ve bozunma ürünlerinin tayini için HPLC metodu önerildi. Metot oda sıcaklığında YMC-Pack ODS-A kolonu kullanarak 10mM sodyum dihidrofen fosfat: asetonyril: metanol (80:10:10, 0.5 % trietilamin ile, O-fosforik asit kullanarak pH 4,5 ayarlı) mobil fazıyla sefdinirin asidik bozunma ürünlerinden HPLC ile ayrılmasına dayandırıldı. Miktar tayini pik alanlarına bağlı olarak 285 nm UV dedeksiyonuyla gerçekleştirildi. İlaç asit hidrolizine maruz bırakıldı. Ana bileşik ve bozunma ürünlerinin tamamen ayrılması yaklaşık 10 dk da gerçekleşti. Sefdinir elüsyonu 6.5 dk da gerçekleşti. Metot 2-25 µg /mL (r = 0.9998) konsantrasyon aralığında doğrusaldır ve sırasıyla LOD ve LOQ 0.0598 ve 0.1813 µg /mL (Kessiba ve arkadaşları 2012).

Farmasötik dozaj formlarda sefditoren pivoksil ve sefdinir tayini için iki tane basit ve keskin RP-HPLC metodu geliştirildi. Bu metotlar izokratik modda sefditoren pivoksil için Kromosil C18 (250 x 4.6 mm, 5µm) kolonu kullanılarak metanol ve 0.025

M potasyum dihidrojen fosfat tamponundan oluşan (75:25 h/h) mobil faz ile 1.0 mL/dk akış hızında dedeksiyon 231 nm 'de ve sefdinir için asetonyitril ve 0.01 M potasyum dihidrojen fosfat tamponundan oluşan (70:30 h/h) mobil faz ile 1.0 mL/dk akış hızında dedeksiyon 285 nm 'de gerçekleştirildi. Alıkonma zamanı sefditoren pivoksil için 2.75 dk sefdinir için 2.97 dk olarak bulundu. Doğrusallık sefditoren pivoksil için 40-120 µg/ml sefdinir için 20-100 µg/ml konsantrasyon aralığında bulundu. Metotlar doğru ve keskindir, Metotların bu ilaçların farmasötik dozaj formlarında kantitatif analizi için uygun olduğu bulunmuştur (Narala ve Saraswathi 2011).

Formulasyonlarındaki analizinin yanı sıra anti diabetik ilaç olan sefdirin tabletteki kantitatif tayini için kesin ve hızlı RP-HPLC metodu geliştirildi. Bu metotta C15, 25 cm, 5 cm 4.6 mm ID kolonuyla izokratik modda 55:45 oranında 0.01N fosfat tamponu (pH: 7.2) ve metanol içeren mobil faz kullanıldı. Dedeksiyon dalga boyu 285 nm akış hızı 1.0 mL/dk. Doğrusallığı 100-500 mg/mL aralığında olan sefdinir regresyon katsayısını 1 olarak göstermiştir. Geliştirilen metot hassaslık, doğruluk ve kesinlik belirlenerek valide edildi. Metodun özgüllüğünü belirlemek için sefdinir çeşitli stres koşullarına maruz bırakıldı. Seçilen mobil fazın kullanıldığı metot basit, hızlı, doğru, kesindir ve bunun sonucu olarak Pioglitazonun rutin kalite kontrol analizlerine ve doz ilaç ve formulasyonlarının bilinen safsızlıklarının ayrılması için uygulanabilir (Kumudhavalli ve arkadaşları 2011).

Av köpeği plazmasındaki sefdinirin tayini için SPE ile eşleşmiş UV dedeksiyonlu HPLC metodu geliştirildi. Analitler Lichrospher C18, 4.6 mm×37 mm, 25 µm olan kolona tutunduruldu ve biyolojik matriks 2.0 mL/dk akış hızında pH 3'e ayarlanmış 20 mM KH₂PO₄ çözeltisi ile yıkandı. Değişirme valfinin döndürülmesiyle hedef analitler guard kolondan analitik kolona geri yıkama modunda 1.5 mL/dk akış hızında metanol-asetonyitril- KH₂PO₄ (pH 3 e ayarlı) 11.25:6.75:82, h/h/h) mobil faz ile elüe edildi ve sonra (Ultimate™ XB-C18, 4.6 mm×50 mm, 5 µm) analitik kolonunda ayrıldı. Analitin SPE ve HPLC ile ayrılması 4 dakikada tamamlandı. UV dedeksiyonu 286 nm' de gerçekleşti. Kalibrasyon eğrisi 0.05–50 µg/mL konsantrasyon aralığı üzerinde kusursuz doğrusallık ($R^2 = 0.9995$) gösterdi. Optimize edilen metot özgüllük, doğrusallık, LOD, LOQ, kesinlik ve doğruluk bakımından iyi performans sergiledi. Bu metot klinik öncesi farmakokinetik çalışmaları desteklemek için av köpeği plazmasındaki sefdinir analizine başarılı bir şekilde uygulanabilir (Ji ve arkadaşları 2012).

2.1.3.2. Spektrofotometrik ve Spektrofluorimetrik Yöntemler ile Analizleri

Tionin ile Cefdinir tayini için basit bir spektrofotometrik yöntem sunulmuştur. Yöntem asidik ortamda akabinde salınan iyot için iyodat ile reaksiyona giren sodyum hidroksit ile azitromisinin β lactam halkasının hidrolizi tayinine dayanır. Serbest iyot mor renkli tionin türlerini 610 nm' de maksimum absorpsiyonunda ağartır. Absorpsiyon 4 - 4.3 pH aralığı içinde ölçülmüştür. Azitromisin için 0.6 - 6.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralığında Beer yasasına uymaktadır. Sefdinirin tayinininde analiz parametreleri optimize edilmiş ve yöntem başarıyla uygulanmıştır (Virupaxappa ve arkadaşları 2010).

Sefdinirin Farmasötik formülasyonları ve dökme ilaç hallerinde tayini için İki yeni, basit, duyarlı, hassas ve hassas spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir ve valide edilmiştir. İlk yöntem, 490 nm' de ölçülen sefdinirin 1, 2 Naftakinon 4 sülfonik asit sodium (NQS) ile bir alkali ortam içinde (pH: 11) turuncu renkli bir ürünün oluşturmasına dayanır. İkinci yöntem, 100 °C 'de 0.5 M NaOH ve ardı sıra 390 nm' de ölçülen bir sarı renkli kromojen oluşturulması için 4kloro7nitrobenzo2oksa1,3diazol (NBD-Cl) ile sülfid iyonları oluşturulan reaksiyon kullanılarak sefdinirin hidrolizine bağlıdır. Optimum koşullar altında, iyi lineer ilişkiler doğrultusunda iyi korelasyon katsayıları (0.9990-0.9999) NQS ve NBD-Cl için sırasıyla 10-80 ve 5,030 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralığında bulundu. LOD ve LOQ değerleri NQS ve NBD-Cl için sırasıyla 1.097 - 0.280 ve 3.656 - 0.934 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralıklarındadır. Önerilen yöntem, basit, hızlı, hassas ve uygun olup başarılı bir şekilde sefdinirin farmasötik formülasyonlardaki analizine uygulanmıştır ve geri kazanım yüzdeleri %99.25' den 100.20 arasında değişmektedir. (Gouda ve arkadaşları 2012).

Sefdinir için formülasyonlarda basit, hızlı, seçici ve ekstraktif olmayan spektrofotometrik yöntem önerilmiştir. Bu yöntem sefdinirin komplek oluşturma ve Fe indirgeyici koşullar altında tamponlanmış bir ortam içinde (pH: 11) magenta renkli verici alıcı kompleksi ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$; görünür molar absorbtivite = $3720 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oluşturmasına dayanmaktadır. Beer yasası 8-160 mg/mL konsantrasyon aralığında takip edilmektedir (Singh ve arkadaşları 2010).

Bu çalışmada, farmasötik preparatlarda sefdinir ve sefiksimin birinci türev spektrofotometrik yöntemi ile tayini geliştirilmiştir. Sefdinir ve sefiksim 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0) içinde çözüldü ve $dA / d\lambda$ değerleri ilk türev spektrumlarında sefdinir için 306.8 nm' de ve sefiksim için 307,0 nm' de ölçüldü. Sefdinir ve sefiksim sırasıyla 2-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9993$) ve 2.5-35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9997$) aralığı içerisinde Beer

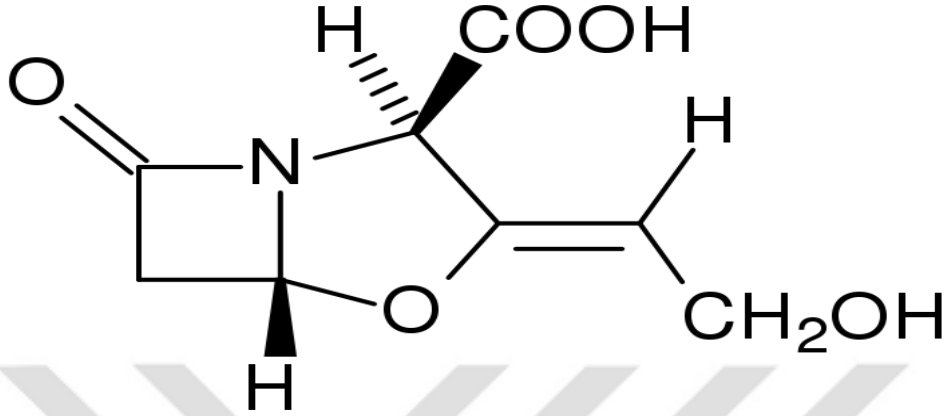
Kanununa uymaktadır. Sefdinir ve sefiksim için sırasıyla LOD değerleri 0.28 µg/mL and 0.45 µg/mL, LOQ değerleri ise 0.98 µg/mL and 1.50 µg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlar önceden geliştirilmiş HPLC metodu ile karşılaştırılmıştır (Baş ve arkadaşları 2013).

Bu çalışmanın hedefi sefdinir tayininde spektrofotometrik yöntem geliştirmek için deneysel değişkenlerin optimizasyonu ve taramasında deneysel tasarım kullanmaktır. Önerilen yöntem sefdinir ile 3-metilbenzotiyozolinon-2-hidrazonun (MBTH) 660 nm λ max'ta ölçülen yeşil renkli kromojen oluşturan asidik ortamda FeCl₃ mevcudiyetinde oksidatif birleştirme reaksiyonu dayanmaktadır. Optimum değerler 5 mg/ml FeCl₃, %0.06 HCl, 4 mg/ml MBTH, 10 dakika reaksiyon süresi ve çözücü seyreltici olarak metanoldur. Beer yasasına 0.5-6.0 µg/ml aralığında uyulmuştur. Önerilen yöntem, yaygın olarak karşılaşılan katkı maddeleri, ticari dozaj formlarında sefdinirin tayini için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Taleb ve arkadaşları 2014).

Mevcut çalışma sefdinirin toz ve farmasötik maddeler içinde, hidrolitik bozunma ürünleri etkisindeki alkali ve asit varlığında kantitatif analizi için dört farklı stabilite gösteren yöntemlerin geliştirilmesini ve validasyonunu açıklar. İlk yöntem, türev spektrofotometresi dayanmaktadır. İlk türev spektrofotometrisi uygulaması sefdinirin alkali degradasyon ürününün varlığında 313,4 nm' de ve aynı zamanda ikinci türev spektrofotometrisi ise asit degradasyon ürününün varlığında 298,2 nm' de yapılmıştır. İkinci yöntem sefdinirin ilk türev oran spektrofotometresinin asit degradasyon ürününün mevcudiyetinde 312 nm' de ve alkali degradasyon ürününün mevcudiyetinde 310.2 nm' de belirlenmesine dayanmaktadır. Üçüncü yöntem ilacın laboratuarda hazırlanan asit ve alkali bozunma ürünleri karışımlarının ortalama merkezleme oran spektrofotometresi ile sırasıyla 288,4 ve 284,8 nm' de belirlenmesine dayanmaktadır. Dördüncü yöntem ise HPTLC-dansitometri ile dietiler-metanol-su-buzlu asetik asit (6: 3: 1: 0.05, h/h) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önerilen, kararlılık gösteren bu metodlar basitlik, hız ve doğruluğu nedeniyle kalite kontrol analizi için etkili yöntemlerdir (Omar ve arkadaşları 2014).

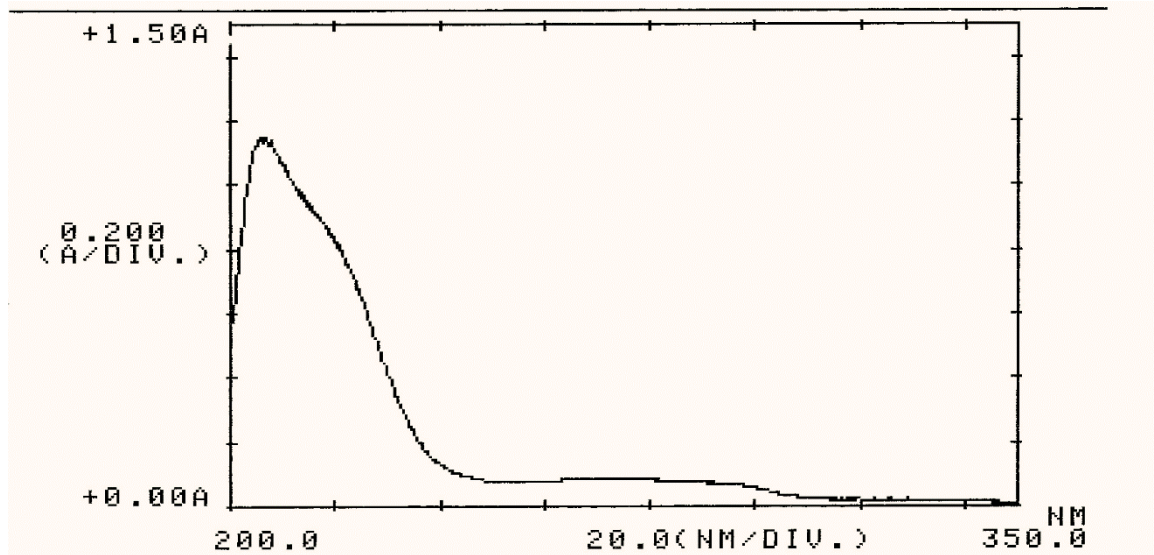
2.2. Klavulanik Asit

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-3: Klavulanik asidin açık kimyasal formülü

Klavulanik asidin kimyasal adı (2R,3Z,5R)-3-(2-hidroksietilendien)-7-okso-4-oksa-1-azabisiklo[3.2.0]heptan-2-karboksilik asit olup kapalı formülü $C_8H_9NO_5$ 'dir. Molekül ağırlığı, 199.1608 g/mol'dür (Drugbank).



Şekil 2-4: Klavulanik asidin 33,3 µg/mL konsantrasyonda metanolde 200-350 nm aralığında alınmış UV spektrumu

2.2.2. Farmakolojisi

Klavulanik asit, sefolosporin ve penisilinlere dirençli mikroorganizmalarda sıklıkla karşılaşılan geniş spektrumdaki beta-laktamaz enzimlerini inaktive etmektedir. Klavulanik asit özellikle direnç gelişiminde etkili olan plazmid aracılı beta-laktamazlara karşı iyi bir aktiviteye sahiptir. Genel olarak kromozomal aracılı tip 1 beta-laktamazlara karşı etkinliği ise daha düşüktür. Klavulanik asidin formülasyonundaki varlığı, sefdiniri beta-laktamaz enzimlerince parçalanmaktan korur ve sefdinirin etki spektrumunu normalde dirençli olan çok sayıda bakteriyide içine alacak şekilde genişletir.

Klavulanik asit oral uygulama sonrasında hızla ve iyi absorbe olur. Proteinlere bağlanma oranı ise %22-30' dur. Klavulanik asit akciğerler, idrar, plöral ve peritoniyal sıvılar içinde dağılırlar.

Klavulanik asit kapsamlı bir şekilde metabolize edilir, ancak mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Klavulanik asit insanda 2,5-dihidro-4-(2-hidroksietil)-5-okso-1H-pirol-3-karboksilik asit ve 1-amino-4-hidroksi-bütan-2-on'a metabolize olur. Ardından glomerular filtrasyona uğrayarak idrarla atılır. Renal fonksiyonu bozuk olan hastalarda ilacın plazma yarı ömrüde o düzeyde uzar. Bu gibi hastalarda dozun hastanın durumuna göre ayarlanması gerekir.

2.2.3. Analiz Yöntemleri

2.2.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

İnsan plazmasında amoksisilin ve klavulanik asidin yan yana tayini için 220nm UV dedeksiyonunda sade ve hassas bir HPLC metodu geliştirilmiştir. İyi kromatografik ayırım asetonitril-fosfat çözeltisi-tetrametil amonyum klorür mobil fazı ve ters faz C8 kolonu ile yapılmıştır. Tayin katsayıları >0.998 olarak amoksisilin için kalibrasyon eğrileri 0.625-20 mg/L, klavulanik asit için 0.3125-10 mg/L konsantrasyon aralığı üzerinde lineer olduğu bulunmuştur. Amoksisilin ve klavulanik asit için sırasıyla 0.625 ve 0.3125 mg/L miktar tayini olan Bu metod tekrarlanabilir ve kesinliği yüksektir. İnsan plazmasından analitik geri kazanım iki madde için % 91 – 102 aralığındadır (Hoizey ve arkadaşları 2002).

İnsan plazmasında amoksisilin ve klavulanik asidin yan yana tayini için geliştirilen hızlı, sade ve hassas bir HPLC yönteminde en düşük tayin sınırı sırasıyla 15 ve 30 ng/mL olarak elde edilmiştir. Kromatografik ayırım Chromolith Performance (RP-18e, 100 mm×4.6 mm) kolonda 0.02 M disodyum hidrojen fosfat tamponu pH: 3.0 -

metanol (96: 4, h/h) izokritik mobil fazı ile 228 nm dalga boyunda yapılmıştır. Gün içi ve günler arası değişkenlik katsayısı ise %9' dan az olarak bulunmuştur (Foroutan ve arkadaşları 2007).

Terbütalinin iç standart olarak kullanıldığı insan plazmasında amoksisilin ve klavulanik asidin yan yana tayini için hızlı, sade ve hassas bir HPLC – MS yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik ayırım C8 ters faz kolunuda formik asit – su – asetonitril (2:1000:100) mobil fazı ile negatif seçilmiş iyon izleme (SIM) modundaki elektrosprey iyonizasyon (ESI) kütle spektrometresi dedeksiyonu ile yapılmıştır. Valide edilmiş ve başarıyla uygulanmış bu yöntemde kantitasyon sınırı, amoksisilin için 0.12 µg/mL ve klavulanik asit için de 0.062 µg/mL olarak bulunmuştur ve bu veriler HPLC–UV metodundan 5 kat daha azdır (Yoon ve arkadaşları 2004).

Amoksisilin ve klavulanik asidin yan yana tayini için β – siklodekstrin durgun fazı ile hızlı, sade ve doğru bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Çalışma metanol – tampon çözeltisi pH: 4.5 (35:65, h/h) mobil fazı ile 225 nm dalga boyunda yapılmıştır. Geri kazanımlar, amoksisilin için % 99.25 - 105.63, klavulanik asit için ise % 99.50 - 101.64 aralığındadır (Tsou ve arkadaşları 1997).

Av köpeği plazmasında sefatrizin ve klavulanik asidin yan yana tayini için hızlı ve özgün bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Ters faz C18 kolonu ile yapılan bu çalışmada doğruluk, sefatrizin için 2- 100 µg/ml ve klavulanik asit için 1- 50 µg/ml aralığındadır. Kesinlik (RSD cinsinden ifadeyle) sefatrizin için % 4.2- 18.2 ve klavulanik asit için % 5.5 - 15.8, doğruluk ise sefatrizin için % 97.9 - 120 ve klavulanik asit için % 97.7 - 119.2 aralıklarında bulunmuştur (Choi ve arkadaşları 2004).

Metronidazolun iç standart olarak kullanıldığı insan plazmasında klavulanik asidin kantitasyonu için hızlı, sade, doğru, hassas ve tekrarlanabilir bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. İlaç ve iç standartın kromatografik ayrımı oda sıcaklığında, 1.8mL/dk akış hızıyla, 4-µm paslanmaz çelik Novapak ® C18 (150 x 3.9mm² I.D.) kolonu ve %4 metanol içeren 0.01 M potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH: 3.2' ye ayarlanmış) mobil fazıyla yapılmıştır. UV dedeksiyonun 311 nm' ye ayarlandığı bu çalışmada kantitasyon limiti 100 ng/mL, üç değişik konsantrasyonlardaki değişkenlik katsayısı (% C.V.) gün içi % 3.30- 3.93, günler arası ise % 1.74 - 2.74 aralıklarında bulunmuştur (Matar ve arkadaşları 2005).

Tikarsilin ve klavulanik asidin farmasötik formlarında yan yana tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Kromatografik ayırım beta-

siklodekstrin kolon (Cyclobond I, 250 x 4.6 mm, 5 µm), 0.8 mL/dk akış hızı, metanol – 16 mM amonyum asetat tamponu pH: 6.0 (50:50, h/h) mobil fazı ve 220 nm dalga boyundaki dedeksiyonu ile yapılmıştır. Kalibrasyon eğrileri klavulanik asit için 1-100 µg/mL, tikarsilin için ise 2-200 µg/mL aralıklarında doğrusaldır. Klavulanik asit ve tikarsilin için sırasıyla LOQ değerleri 0.42 ve 1.42 µg/mL, LOD değerleri ise 0.14 ve 0.47 µg/mL olarak bulunmuştur (Tsou ve arkadaşları 2009).

Amoksisilin ve klavulanik asidin enjekte edilebilir dozaj formlarından yan yana tayini için basit, hızlı, hassas, doğru ve sağlam stabilite gösteren bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Kromatografik ayırım Inertsil C18 kolonu (250 × 4.0 mm, 4 µm), pH:5.0 tampon – metanol (95:5, h/h) mobil fazı, 1ml/dk akış hızı ve 220 nm UV dedeksiyonunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusal kalibrasyon aralığı amoksisilin için 79.51- 315.32 µg/ml ve klavulanik asit için ise 17.82 - 67.90 µg/ml aralıklarında bulunmuştur (Tippa ve Singh 2010).

Dana plazmasında klavulanik asidin kantitasyonu için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik ayırım su ve asetonitril içerisinde % 0.05' lik formik asit ve ters faz PLRP-S polimerik kolonuyla gerçekleştirilmiştir. LOQ 25 ng/ml, LOQ ise 3.5 ng/ml olarak bulunmuştur ve bu değerler yayınlanmış UV yada kütle spektrometresi kullanılmış yöntemlerden daha azdır (Reyns ve arkadaşları 2006).

Yenilebilir domuz dokusunda klavulanik asidin tayini için LC-ESI-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Tazobaktamın iç standart olarak kullanıldığı kromatografik ayırım ters faz PLRP-S polimerik kolon (150mm×2.1mm i.d., 100Å) su ve asetonitril içinde % 0.05' lik (h/h) formik asit karışımı ile yapılmıştır. LOQ 50 ng/g olarak, LOD ise 8.0 - 15.14 ng/g aralığında bulunmuştur (Reyns ve arkadaşları 2007).

Klavulanik asidin tayini için iyon çifti ters fazlı HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışma 10 mM tetrabütülamonyum bromür, 0.6 mM sodyum dihidrojen fosfat, 0.4 mM disodyum hidrojen fosfat (suda) - metanol (10:1, h/h) (pH: 7.02) mobil fazı, 1.5 ml/dk akış hızı, LiChrosorb RP-18 (25 cm x 4.6 mm i.d.) durağan fazı ve 220 nm dedeksiyonda yapılmıştır (Haginaka ve arkadaşları 1981).

Tavşan serumu ve doku kafes sıvısında β-laktam tikarsilin ve β-laktamaz inhibitor klavulanatın yan yana analiz için dalga boyu değiştirilebilir teknikli bir gradiyent elüsyon HPLC tekniği geliştirildi. Kromatografik ayırma 9 dakikada dalga boyu 218 nm'den 258 nm 'ye programlanabilen UV dedektör ile ters faz C18 kolonu kullanılarak gerçekleştirildi. Akış hızı 1.0 mL/dk, mobil faz ise gradiyent elüsyon

programlamayı takip eden asetonitril, fosfat tamponu ve tetrabütül amonyum hidroksit içeriyordu. Numune süreci sıvı-sıvı ekstraksiyon ile gerçekleştirildi. İyi doğruluk, geri kazanım, kesinlik ve doğruluk elde edildi. Standart eğri aralıkları tikarsilin için 1–100 mg/mL klavulanat için 0.2–20 mg/mL. Bu metot farmakokinetik bir çalışmadan tavşan serumu ve doku kafes sıvısı numunelerinde tikarsilin ve klavulanatın analizine başarılı bir şekilde uygulanabilir (Chonghua ve arkadaşları 2003).

Farmasötik dozaj formunda klavulanik asit ve sefadroksilin yan yana analizi için basit ve keskin iki UV-spektrofotometrik ve RP-HPLC metodu geliştirildi. İlk UV spektrofotometrik metotta yan yana eşitlik metodu kullanılarak sefradoksil ve klavulanik asit için sırasıyla 8-40 µg/mL ve 2-10 µg/mL konsantrasyon aralığı üzerinde 231 ve 281 nm’ de gerçekleştirildi. Sefradoksil ve klavulanik asit için ortalama geri kazanımlar % 99.43-100.7 ve % 98.5-100 aralığındaydı. İkinci UV metot sefradoksil ve klavulanik asit için sırasıyla 8-40 µg/mL ve 2-10 µg/mL konsantrasyon aralığı üzerinde birinci derece türev spektroskopisi kullanılarak 258 ve 264 nm’de gerçekleştirildi. Sefradoksil ve klavulanik asit için ortalama geri kazanımlar % 98.40 - 100.7 ve % 99.4-100.6 aralığındaydı. RP-HPLC analizi 1% H₃PO₄ ile pH 5.5 e ayarlanmış su-metanol-trietilamin (85: 15: 0.1), mobil fazıyla, akış hızı 1.0 mL/dk, sabit faz olarak Purospher® RP-C18 (4.6 mm i.d×250 mm) kolonuyla 285nm dedeksiyon dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık sefradoksil ve klavulanik asit için sırasıyla 8-40 µg/ml ve 2-10 µg/ml konsantrasyon aralığında elde edildi. Sefradoksil ve klavulanik asit için alıkonma zamanlarının 3.840 ve 5.580 dk olduğu bulundu. Sefradoksil ve klavulanik asit için elde edilen ortalama geri kazanımlar % 99.58 - 100.10 ve % 99.45-100.01. aralığındaydı. Geliştirilen metot istatistiksel olarak ICH a göre valide edildi ve belirlenen değerler ile metodun kesin, doğru ve basit olduğu bulundu. Önerilen metot sefradoksil ve klavulanik asit için toz formu ve formülasyonlarında rutin kalite kontrol analizlerine başarılı bir şekilde uygulanabilir (Patel ve Joshi 2014).

Sefadroksil ve klavulanik asidin potasyum klavulanat olarak kombine dozaj formlarının yan yana analizi için RP-HPLC metodu geliştirildi. Ayırma Phenomenex C18 (150 x 3mm, 5µm) kolonu kullanılarak Fosfat tamponu (pH 5.5): Asetonitril (95:05 v/v) mobil fazıyla, 10 µl enjeksiyon hacimli 1.0 ml/dk akış hızında gerçekleştirildi. Dedeksiyon 230 nm de yapıldı. Sefadroksil ve potasyum klavulanat için alıkonma zamanlarının sırasıyla 5.236 ve 7.561 dk olduğu bulundu. Metot doğruluk, doğruluk ve kesinlik için valide edildi. Sefadroksil ve potasyum klavulanat için doğruluk

sırasıyla 40-200 µg/ml ve 10-50 µg/ml olarak bulundu. Sefadroksil ve potasyum klavulanat için yüzde geri kazanımlar sırasıyla % 98-99.53 ve % 99-100.53 aralığında olduğu bulundu. RP-HPLC metodu doğru, kesin, basit ve spesifiktir (Patel ve arkadaşları 2014).

Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamın insan serumunda tayini ve ayrılması için HPLC metodu geliştirildi. Kromatografik ayırma için metanol- 5mM tetraetilamonyum asetat (TEAA) (35:65, v/v, pH:4.5) içeren optimum mobil fazı 1.0mL/dk akış hızında β-cyclodextrin (β-CyD) kolonu ile birlikte kullanıldı. Ortalama geri kazanımlar klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam için sırasıyla % 84.4-87.8, % 88.4-90.6, ve % 89.0-90.8 inhibitörlerle katılmış insan serum numunelerinden rutin olarak elde edildi. LOQ (<0.156 mg/mL) ve varyasyon katsayısı (< %3.92)'dir, bunlar da bu metodun hassas ve tekrarlanabilir olduğunu kanıtlar (Tsou ve arkadaşları 2002).

2.2.3.2. Spektrofotometrik Yöntemler ile Analizleri

Klavulanik asit (CA) ve amoksisilinin (AMO) kombinasyonunu tabletlerde eş zamanlı tayini için difüze reflektans IR forier dönüşüm spektroskopisi (DRIFTS) ve çok değişkenli kalibrasyon kullanılarak bir metod geliştirilmiştir. Ca için, bu model tahmini hata karelerinin ortalamalarının kökünün (RMSEP) 5.1 mg/g olduğunu göstermiştir. Amo için, bu model 22.3 mg/g RMSEP göstermiştir (Mueller ve arkadaşları 2012).

Klavulanik asit ve amoksisilinin yan yana tespiti için zayıflatılmış toplam yansıtma eklentisi ile birleştirilmiş Fourier dönüşümlü orta kızılötesi tekniği (ATR / FTIR) kullanılarak bir yöntem geliştirilmiştir. 27 numune kalibrasyon seti ve 8 numune ise tahmin seti olarak kullanılmıştır. ATR / FTIR verileriyle geriye dönük en küçük kareler algoritması kullanılarak tahmini bağıl standart hata (RSEP) klavulanik asit için % 3.8 ve amoksisilin için % 5.1 elde edilmiştir. Önerilen metodoloji ile elde edilen sonuçlar HPLC kullanılarak karşılaştırıldı ve önemli bir fark elde edilmedi. ATR / FTIR ile çok değişkenli analiz yöntemleri kullanılarak önerilen yöntem klavulanik asit ve amoksisilinin ticari eczacılık ürünlerinin eşzamanlı tayini için uygundur (Müller ve arkadaşları 2011).

2.2.3.3. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Klavulanik asit farklı akım/sinyal polorografisiyle tayin edilir. Elektroaktif ürün yarı sülfirik ortamda hidrolizle elde edilmiştir. -0.75 V da analitik olarak kullanılabilen azalma pikleri verir. Polografi sinyalleri için optimum koşullar belirlenmiştir ve çalışma elektrokimyasal prosesi etkileyen farklı parametrelerde yapılmıştır. klavulanik asidin tayini için 8.0×10^{-6} - 1.4×10^{-4} M konsanrasyonları aralığında bir polografik yöntem önerilmiştir. Dedeksiyon limiti 2×10^{-6} ve relatif standard sapma %1' dir. Metod amoksisilin varlığında klavulanik asidin tayinine uygulanmıştır (Gonzalez ve arkadaşları 1991).

Tikarsilin ve klavulanik asidin ikili karışımında ve enjekte edilebilir formulasyonlarında aynı anda tayini için bir direkt potansiyometrik yöntem geliştirilmiştir. Susuz potansiyometriye uyarlanması 0.1 mol/L asetik HClO kullanılarak iki isimli ilacı tek analizde aynı anda tayin etmemizi sağlar. Her bir ilacın geri kazanımı (Tikarsilin için % 100.86 ve klavulanik asit için ise % 101.47) klavulanat - potansiye tikarsilin uygulamasında oldukça tatminkardır (Abdel ve Khattab 1991).

Durdurmalı akış karıştırma tekniği klavulanik asidin tayininde imidazol ile reaksiyonuyla basit, hızlı kinetik bir metod geliştirilmiştir. Geleneksel metod dengeye gelmek için 12-15 dakikaya ihtiyaç duyarken, kinetik ölçüm birkaç saniye içinde yapılabilir. Klavulanik asidin kalibrasyon grafiği 1-40 $\mu\text{g/mL}$ aralığında lineer ve dedeksiyon limiti 0,3 $\mu\text{g/mL}$ bulundu. Metodun kesinliği ve seçiciliği raporlandı. Analitik metodun farmasötik ve serum örneklerine uygulanarak elde edilen sonuçlar rutin analize ne kadar kolay adapte edilebileceğini gösterir (Izauierdo ve arkadaşları 1993).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda 2013-2014 yılında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışma süresince kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler:

Sefdinir (Deva İlaç, İstanbul, Türkiye)

Klavulanik asit (Deva İlaç, İstanbul, Türkiye)

Elucef Plus® (300 mg Sefdinir ve 125 mg Klavulanik Asit)

Metanol (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ortofosforik asit (%85 ağı/ağı) (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Potasyum dihidrojen fosfat (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum hidroksit (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ultra saf su (HPLC saflığında)

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi

Mobil faz çözeltisi olarak 20 mM fosfat tamponu (pH: 3) – metanol (65:35, h/h) karışımı kullanıldı. Mobil faz süzülerek analize hazır hale getirildi.

0,2 M fosfat tamponunun hazırlanması

2,722 g potasyum dihidrojen fosfat tam olarak tartıldı, 100 mL' lik balon jodede su ile çözündürüldü ve hacmine tamamlandı.

20 mM fosfat tamponunun hazırlanması

50 mL 0,2 M KH_2PO_4 çözeltisi alınıp ortofosforik asit çözeltisi ile ayarlanarak pH değeri 3' e ayarlandı. Bu ayarlı çözülden 25 mL alınarak 250 mL' ye bir balon jodede saf su ile hacmine tamamlanarak 20 mM çözelti hazırlandı. Vakum altında süzülerek hazır hale getirildi.

3.1.2.2. Sefdinir Stok Çözeltisi

5 mg Sefdinir tam olarak tartıldı, 5 mL' lik balon jodede fosfat tamponu (pH: 7) ile çözüldürüldü ve hacmine tamamlandı.

3.1.2.3. Klavulanik Asit Stok Çözeltisi

5 mg Klavulanik asit tam olarak tartıldı, 5 mL'lik balon jodede metanol ile çözüldürüldü ve hacmine tamamlandı. Ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. HPLC cihazı (Shimadzu Corporations- Japan)

- Shimadzu LC-20A pompa sistemi (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- SPD-M20A Diyod Sıralı Dedektör (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- DGU-20A5 Gaz giderme ünitesi (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- SIL-20AC Otomatik numune örnekleycisi (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- CTO-10AS VP Kolon fırını (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- Shimadzu LC-solution yazılımı (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- Analitik kolon Teknokroma Nucleosil 100 C18 (4.6 mm I.D. 250mm, 5µm; Barcelona, Spain).

2. Yazılımlar

- MS Office Word Programı
- MS Office Excel Programı

3. Mobil Faz Süzme Ünitesi (Millipor, 0,5 µ)

4. pH metre (WTW pH 3210 Set 2)

5. Teraziler (Denver Instrument TB 2150D)

6. Vorteks Mikser (Elektro-mag)

7. Ultrasonik banyo (Elma Ultrasonic LC 30 H)

8. Ultra saf su cihazı (Purelab Option-Q)

9. Otomatik pipetler (Eppendorf 100 µL ve 1000 µL lik)

10. Reaksiyon tüpleri (Vidalı, kapaklı 12mL lik)

11. Balonjojeler (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mL lik)

12. Dereceli ve transfer pipetler

13. Süzgeç kağıtları (mavi bantlı)

14. Hesap makinesi (Casio Scientific Calculator fx-82 MS)

3.3. Sefdinir ve Klavulanik Asidin Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi

Sefdinir ve Klavulanik asidin yan yana HPLC ile analizinin yapılabilmesi için dedektör dalga boyları, kolon, mobil faz sistemi, mobil faz akış hızı, kolon sıcaklığı gibi kromatografik koşullar belirlendi. Belirlenen şartlar altında geliştirilen yöntem ilaç maddelerinin tabletlerdeki analizine uygulandı.

3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Literatür çalışmaları göz önüne alınarak HPLC çalışmaları, C₁₈, CN, 5 µm partikül çaplı kolonlarda, çeşitli oranlarda asetonytril ve metanol-su ve 10 mM orto fosforik asit (pH: 3), mobil faz sistemleri uygulanarak denendi. Analiz edilen türevin alıkonma zamanı ve çalışılacak dalga boyları belirlendi. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.1.'de yer almaktadır.

3.4. HPLC Yönteminin Validasyonu

3.4.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, mobil fazdan ve tablet yardımcı maddelerinden gelebilecek bir girişim olup olmadığı incelendi. Bunlara ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1.'de gösterilmiştir.

3.4.2. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD)

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.2' de verildi.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.4.3. Doğrusallık

Doğrusal aralık, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık ve tekrarlanabilirlikte sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır.

Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için Sefdinir ve Klavulanik asidin 7 farklı konsantrasyonda içeren karışımlar hazırlandı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanları ve konsantrasyona karşılık grafikler çizildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.3.'de bildirildi.

3.4.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda sefdinir için (18, 48, 84 µg/mL) klavulanik asit için (7,5, 20, 35 µg/mL) ve içeren çözeltilerle Bölüm 4.2.4' de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 6 farklı günde (günler arası) yapılmıştır. Her konsantrasyon için analizler en az 6 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.4' de bildirildi.

3.4.5. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için 5 mL' lik balonjojede 18,0 µg/mL sefdinir ve 7,5 µg/mL klavulanik asit konsantrasyonlardaki tablet çözeltisi üzerine 4 farklı konsantrasyonda sefdinir ve klavulanik asit standart çözeltilerinden ilave edildi ve 5 mL'ye 20 mM fosfat tamponu (pH: 3) – metanol (65:35, h/h) çözücü karışımı ile tamamlandı. Elde edilen alan oranı değerleri daha önce hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar bulundu. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5' de verilmiştir.

3.5. Tabletlerde Sefdinir ve Klavulanik Asidin Analizi

3.5.1. Tablet Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

Bunun için, 300 mg sefdinir ve 125 mg klavulanik asit içeren efervasan tablet (Elucef Plus®) 100 mL' lik balon jodede saf su ile çözüldürülerek hacmine tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Bu süre sonunda mavi bantlı süzgeç kağıtlarından süzüldü. Böylece 3000 µg/mL sefdinir ve 1250 µg/mL klavulanik asit içeren tablet stok çözeltisi hazırlandı (Stok Çözelti 1).

3.5.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Analiz

Tablet stok çözeltisinden seyreltme işlemleri HPLC yönteminde 20 mM fosfat tamponu (pH: 3) – metanol (65:35, h/h) ile yapıldı. Bu çözeltiden alınan 50 µL'lik kısımlar 5 mL lik balonjölere aktarılarak hacmine tamamlandı (30 µg/mL sefdinir ve 12,5 µg/mL klavulanik asit) ve çözeltiler HPLC sistemine enjekte edildi. İşlem 6 kez tekrarlandı. Tabletlerdeki sefdinir ve klavulanik asit miktarları daha önce hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi yardımıyla hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1' de belirtildi.

Sefdinir ve klavulanik asit tabletlerde çok farklı miktarlarda bulunduğu ve bu konsantrasyonlarda yan yana analizi mümkün olabilmesi için sefdinir daha az klavulanik asit ise nispeten iyi görebileceğimiz hassasiyetteki dalga boyu seçilerek maddeler analiz edildi.

3.5.3. Sefdinirin Kıyas Yöntemi ile Miktar Tayini

Kıyas yöntemi olarak USP farmakopedeki HPLC-UV yöntemi kullanıldı (USP32 2009).

Standart Çözelti: 0,2 mg/mL konsantrasyondaki sefdinir çözeltisi, fosfat tamponu (pH: 7) ile seyreltilerek hazırlandı.

Örnek Çözeltisi: 300 mg sefdinir içeren efervasan tablet 100 mL' lik balon jödede saf su ile çözündürülerek hacmine tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Bu süre sonunda mavi bantlı süzgeç kağıtlarından süzüldü. Uygun miktarda alınıp 30 µg/mL konsantrasyonu verecek şekilde seyreltilti.

Kromatografik Sistem:

Kolon: C₁₈, 200 x 4,6 mm, 5 µm iç çap

Mobil Faz: tetrametilamonyum hidroksit-asetonitril-metanol-etilendiamintetraasetik asit (80:12:8:0,04)

Dedektör dalgaboyu: 254 nm

Akış Hızı: 1,0 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi: 50 µl

Yöntem: Örnek ve standart çözeltiler HPLC cihazında (n=6) olacak şekilde analiz edildi ve alıkonma zamanı 5,5 dakika olan piklerin alanlarından örnekteki sefdinir miktarı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1 de bildirilmiştir.

3.5.4. Klavulanik Asidin Kıyas Yöntemi ile Miktar Tayini

Kıyas yöntemi olarak USP farmakopedeki HPLC-UV yöntemi kullanıldı (USP30 2009).

Standart Çözelti: 0,25 mg/mL konsantrasyondaki klavulanik asit çözeltisi, metanol ile seyreltilerek hazırlandı.

Örnek Çözeltisi: 125 mg klavulanik asit içeren efervesan tablet 100 mL' lik balon jofede saf su ile çözündürülerek hacmine tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Bu süre sonunda mavi bantlı süzgeç kağıtlarından süzüldü. Uygun miktarda alınıp 25 µg/mL konsantrasyonu verecek şekilde seyreltildi.

Kromatografik Sistem:

Kolon: C₁₈, 250 x 4,6 mm, 4 µm iç çap

Mobil Faz: KH₂PO₄ tampon çözeltisi (0,2 M, pH: 4,4)-metanol (95:5)

Dedektör dalgaboyu: 220 nm

Akış Hızı: 1,5 mL/dk

Enjeksiyon Hacmi: 20 µl

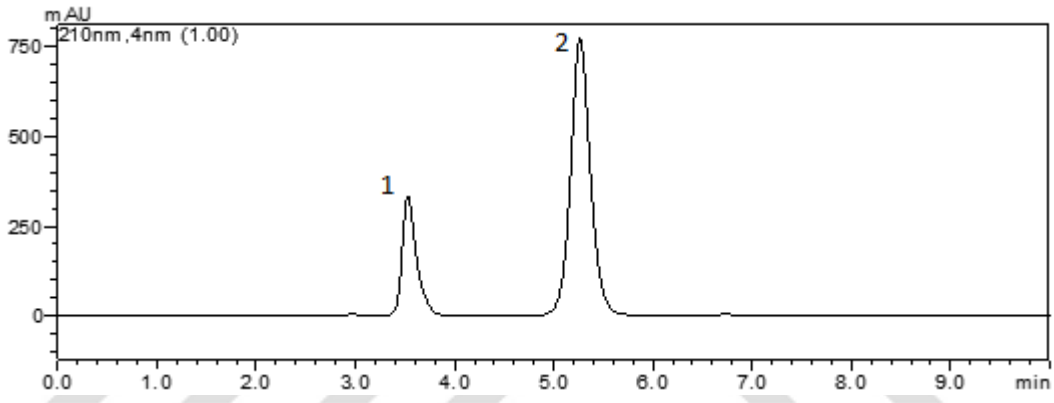
Yöntem: Örnek ve standart çözeltiler HPLC cihazında (n=6) olacak şekilde analiz edildi ve alıkonma zamanı 6,5 dakika olan piklerin alanlarından örnekteki klavulanik asit miktarı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1 de bildirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sefdinir ve Klavulanik Asidin Yan Yana Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analiz Sonuçları

4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Yapılan denemeler sonucunda en iyi sonuçlar 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında, 5 µm partikül çaplı C18 kolonda, 20 mM fosfat tamponu (pH:3) – metanol dedeksiyonla, 210 nm dalga boyu kullanılarak yapılmıştır. Bu kromatografik sistemde alıkonma zamanları sefdinir için 3,6; klavulanik asit için 5,3 dakikadır (Şekil 4-1).

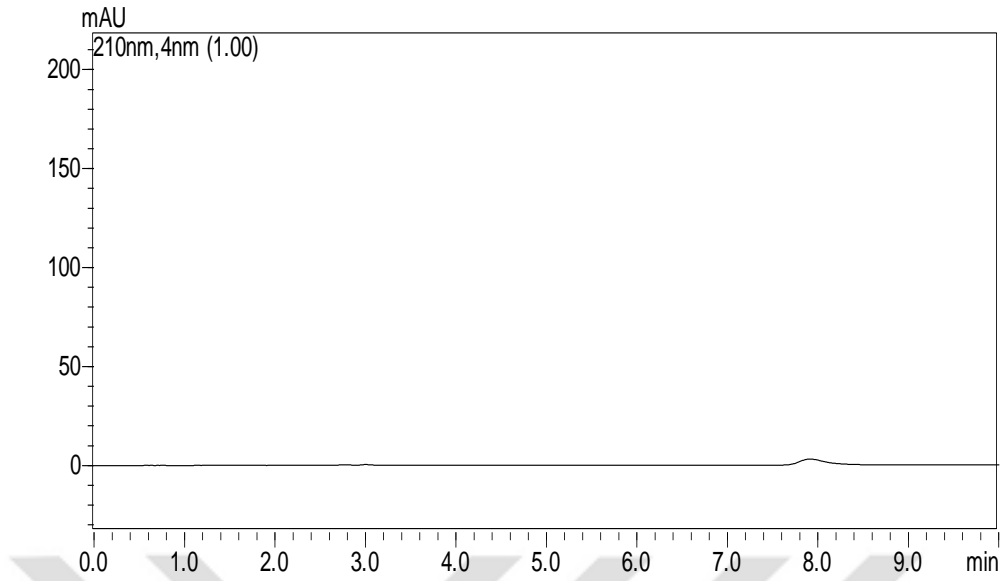


Şekil 4-1: 84 µg/mL sefdinir (2) ve 35 µg/mL klavulanik asite (1) ait örnek kromatogram

4.2. Yöntem Validasyonu

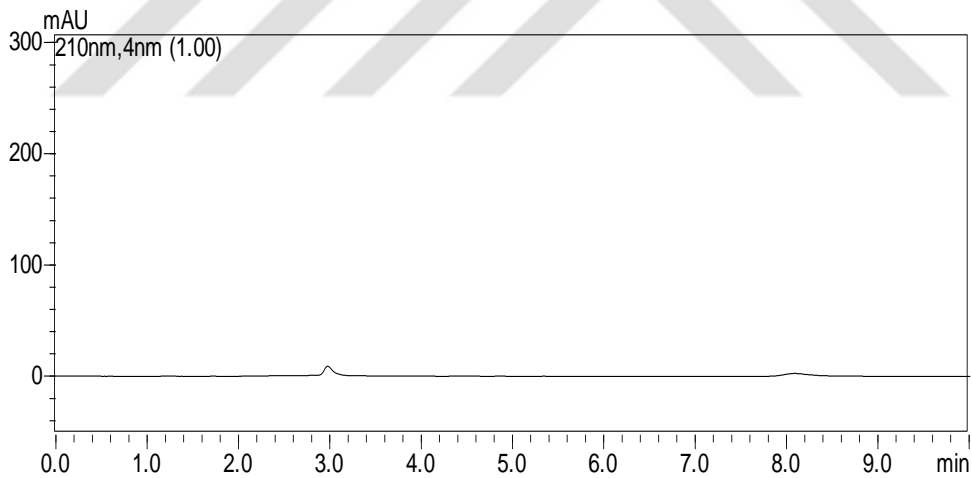
4.2.1. Seçicilik

a) Mobil faz enjekte edildi, sefdinir ve klavulanik asit piklerinin çıktığı dakikalarda herhangi bir pik olmadığı belirlendi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Mobil faz enjeksiyonuna ait kromatogram

b) Tablet yardımcı maddeleri karışımı enjekte edildi. Bunların analize girişim yapmadığı görüldü (Şekil 4-3).



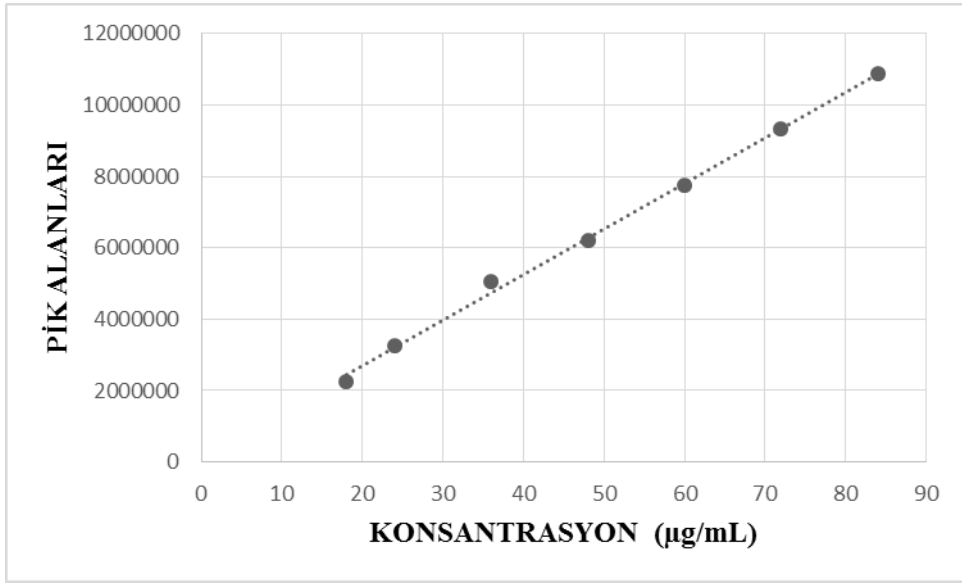
Şekil 4-3: Tablet yardımcı maddeleri karışımının enjeksiyonuna ait kromatogram

4.2.2. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

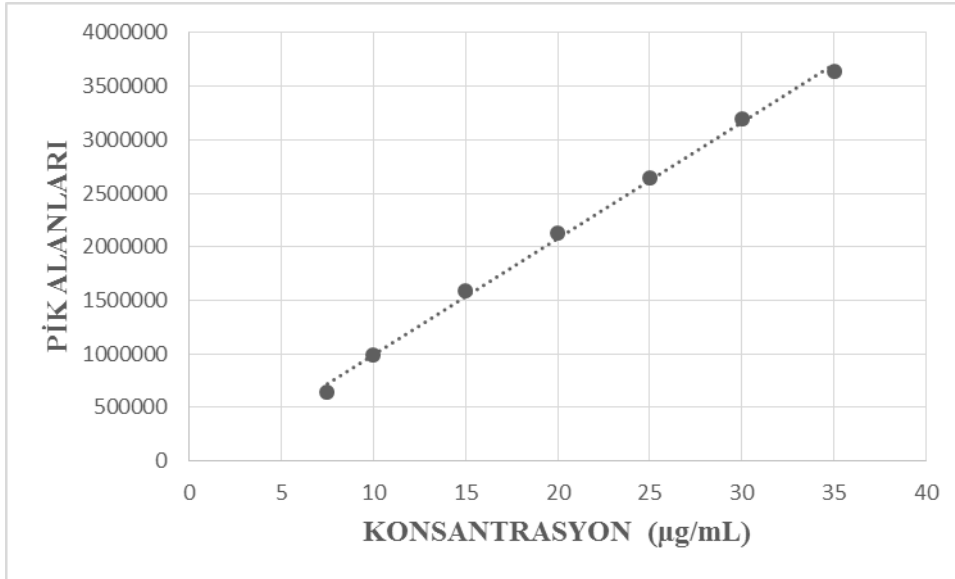
Bölüm 3.4.2’de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD değerleri sefdinir için 0.63 $\mu\text{g/mL}$ ve klavulanik asit için 0,44 $\mu\text{g/mL}$, LOQ değerleri sefdinir için 1.91 $\mu\text{g/mL}$ ve klavulanik asit için 1.33 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

4.2.3. Doğrusallık

Sefdinir için 18,0–84,0 $\mu\text{g/mL}$, klavulanik asit için 7,5–35,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler ile Bölüm 3.4.3.’ de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alanı değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi sefdinir için Şekil 4-4’ de ve klavulanik asit için Şekil 4-5’ de verilmiştir.



Şekil 4-4: Sefdinirin 18,0–84,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 4-5: Klavulanik asidin 7,5–35,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 4-1 ve 4-3’de pik alanları ve ortalamaları (A), SD ve RSD değerleri, Tablo 4-2 ve 4-4’de ise en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denkleminde ($A = mC + b$ [$m =$ eğim, $b =$ kesim noktası, $C =$ konsantrasyon]) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r) verilmiştir. Doğrusallık çalışmalarından HPLC yöntemi ile elde edilmiş 18 µg/mL sefdinir ile 7,5 µg/mL klavulanik asit ve 48 µg/mL sefdinir ile 20 µg/mL klavulanik asit standartlarına ait kromatogram örnekleri Şekil 4-6 ve 4-7’de verilmiştir.

Tablo 4-1: Sefdinirin 18,0–84,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri

C (µg/mL)	18	24	36	48	60	72	84
A							
1	2221340	3234106	5012426	6030905	7746724	9265823	10836810
2	2224516	3239164	5025432	6197612	7749082	9303949	10842998
3	2225317	3244222	5038437	6204002	7757849	9305552	10852300
4	2258509	3290457	5067508	6215704	7758192	9311643	10886259
5	2262904	3295203	5077599	6250093	7765814	9372884	10887127
6	2262934	3299948	5087690	6250780	7810608	9429965	10935599
Ortalama	2242587	3267183	5051515	6191516	7764712	9331636	10873516
SD¹	20767,96	31005,5	30410,82	81874,91	23516,52	59241,89	37231,01
RSD² (%)	0,926071	0,948998	0,602014	1,322373	0,302864	0,63485	0,342401

Ortalama alan oran (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 127777x + 146127,2 \quad (r = 0,9987)$$

Tablo 4-2: Tablo 4-1' deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama±SD¹
m	127531	127694	127732	127396	127704	128606	127777±425
b	104671	130219	134773	174119	176671	156310	146127,2±28002
r	0,9984	0,9988	0,9987	0,9986	0,9987	0,9987	0,9987±0,0001

¹SD: Standart sapma

Tablo 4-3: Klavulanik asidin 7,5–35,0 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri

A \ C (µg/mL)	7,5	10	15	20	25	30	35
1	641018	982233	1573934	2119730	2580377	3182580	3542596
2	642220	982319	1579969	2120242	2651778	3183721	3655918
3	643422	984021	1582250	2120809	2654322	3186723	3656012
4	646232	991778	1584937	2122455	2654730	3187589	3657976
5	648371	994549	1597749	2123675	2658358	3189078	3663964
6	650511	997320	1602050	2139388	2662087	3212038	3665521
Ortalama	645295,7	988703,3	1586815	2124383	2643609	3190288	3640331
SD¹	3709,525	6669,655	10851,83	7495,869	31184,72	10927,57	48052,84
RSD² (%)	0,574857	0,674586	0,683875	0,352849	1,179627	0,342526	1,320013

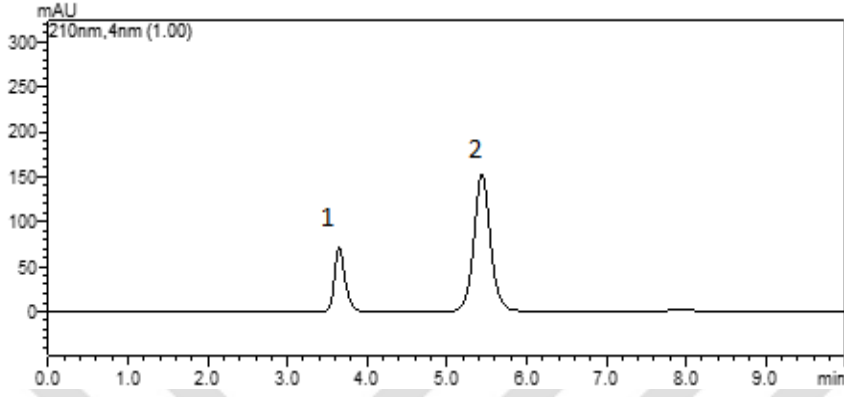
Ortalama alan oran (A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:

$$A = 108741x - 96604,2 \quad (r = 0,9988)$$

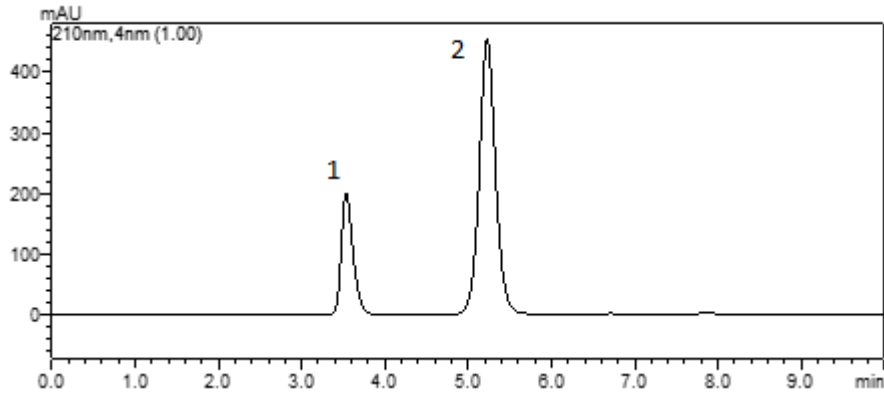
Tablo 4-4: Tablo 4-3' teki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama±SD¹
m	106193	109291	109286	109139	109129	109409	108741±1252
b	72864	108265	106529	100952	96453	94562	96604±12815
r	0,9979	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9988	0,9988±0,0004

¹SD: Standart sapma



Şekil 4-6: Doğrusallık konsantrasyonlarından 18 µg/mL sefdinir (2) ve 7,5 µg/mL klavulanik asite (1) ait kromatogram



Şekil 4-7: Doğrusallık konsantrasyonlarından 48 µg/mL sefdinir (2) ve 20 µg/mL klavulanik asite (1) ait kromatogram

4.2.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda sefdinir için (18, 48, 84 µg/mL) klavulanik asit için (7,5, 20, 35 µg/mL) içeren çözeltilerle Bölüm 3.4.4.'de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri %0,1-0,72 arasında hesaplandı (Tablo 4-5).

Farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise %0,23-1,95 arasında bulundu (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Aynı gün ve farklı gün içinde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği

Gün içi (n=6)				Gün arası* (n=6)		
	Alınan Konsantrasyon (µg / mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg / mL) Ortalama±SD ¹	RSD ² (%)	Alınan Konsantrasyon (µg / mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg / mL) Ortalama±SD ¹	RSD ² (%)
Sefdinir	18,0	17,96±0,004	0,42	18,0	17,97±0,015	1,55
	48,0	48,4±0,01	0,10	48,0	48,5±0,10	0,95
	84,0	84,7±0,03	0,10	84,0	84,6±0,12	0,41
Klavulanik Asit	7,5	7,7±0,07	0,72	7,5	7,6±0,19	1,98
	20,0	20,2±0,12	0,06	20,0	20,3±0,45	0,23
	35,0	34,8±0,57	0,10	35,0	35,6±2,87	0,51

*Altı farklı günde elde edilen sonuçlar

¹SD: Standart sapma

²RSD: Relatif standart sapma

4.2.5. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için bölüm 3.4.5' de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Daha sonra geri kazanım yüzdeleri $(C_t - C_u) \times 100 / C_a$ formülünden hesaplandı.

Burada;

C_t : Bulunan toplam (Sefdinir veya Klavulanik asit) konsantrasyonu,

C_u : Farmasötik preparatdan alınan analit konsantrasyonu,

C_a : İlave edilen standart çözeltinin konsantrasyonu dur.

Geri kazanım değerleri %96,60-104,2 aralığında bulundu (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi

	Alınan Konsantrasyon ($\mu\text{g} / \text{mL}$) ¹	İlave edilen Konsantrasyon ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g} / \text{mL}$) (Ortalama \pm SD ²)	RSD ³ (%)	Geri Kazanım (%)
Sefdinir	18,0	6,0	6,10 \pm 0,030	0,129	96,60
		18,0	18,04 \pm 0,014	0,039	96,64
		30,0	30,56 \pm 0,004	0,007	98,52
		54,0	54,89 \pm 0,006	0,009	97,94
Klavulanik Asit	7,5	2,5	2,48 \pm 0,013	0,128	104,26
		7,5	7,45 \pm 0,027	0,172	103,94
		12,5	12,47 \pm 0,007	0,035	106,17
		22,5	22,11 \pm 0,011	0,040	96,045

¹ Elucef Plus® tablet, her tablette 300 mg sefdinir ve 125 mg klavulanik asit içerir.

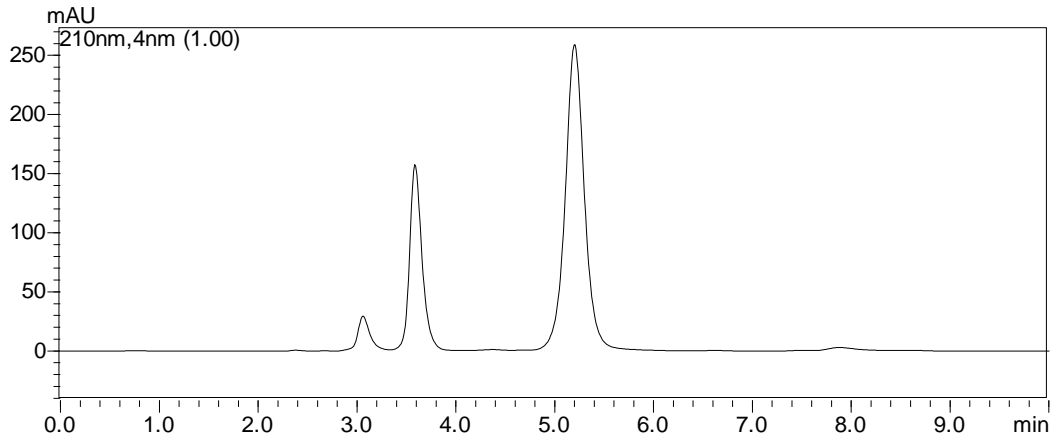
²SD: Standart sapma

³RSD: Relatif standart sapma

4.3. Tabletlerde Sefdinir ve Klavulanik Asidin Analizi

4.3.1. Geliştirilen HPLC ve Kıyas Yöntemlerinin Tablet Analizlerine Uygulanması ve Sonuçların Birbiri ile Karşılaştırılması

Geliştirilen yöntem ile elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması t-testi (Student t-test), standart sapmalar yönünden karşılaştırılması F testi (Fisher test) uygulanarak yapıldı. Tablo 4-7' de de görüldüğü gibi hesaplanan t- ve F- değerleri %95 olasılık düzeyi ve 5 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen HPLC yöntemi ile kıyas yöntemleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.



Şekil 4-8: 30 mg sefdinir ve 12,5 mg klavulanik asit içeren tablet analizinden elde edilen kromatogram

Tablo 4-7: 300 mg sefdinir ve 125 mg klavulanik asit içeren tabletlerin geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları ve bu sonuçların kıyas yöntemleri ile istatistikî olarak karşılaştırılması

	Sefdinir		Klavulanik Asit	
	Geliştirilen HPLC yöntemi	Kıyas yöntemi	Geliştirilen HPLC yöntemi	Kıyas yöntemi
n ₁	300,40	300,80	125,08	125,04
n ₂	300,60	300,20	125,09	125,01
n ₃	300,40	300,20	125,03	125,08
n ₄	300,40	301,60	125,07	125,16
n ₅	300,60	299,60	125,16	125,08
X _{ort} ¹	300,08	299,28	125,086	125,074
Geri Kazanım (%)	100,02	99,81	100,43	100,37
SD ²	0,438	2,49	0,047	0,056
RSD ³ (%)	0,12	0,67	0,23	0,28
t.s/ \sqrt{n}	0,437	2,48	0,047	0,056
Güven sınırları	300,64-375,52	300,80-376,76	125,04-20,13	125,02-20,01
t-test of significance ⁴	0,334		0,087	
F-test of significance ⁴	0,031		0,06	

¹n₁=n₂=5 ²SD: Standart sapma ³RSD: Relatif standart sapma ⁴p = 0,05, t (tablo) = 2,23, F (tablo) = 5,05

5. TARTIŞMA

Sefdinir oral yoldan kullanılan geniş spektrumlu, yarı sentetik, bir üçüncü kuşak sefalosporin ve klavulanik asit ise *Streptomyces clavuligaris*'ten elde edilen klavam türevi beta-laktamaz inhibitörü bir antibiyotiktir. Klavulanik asit, genellikle tek başına belirgin bir antibakteriyel etki göstermez. Bakterilerde beta-laktamaz enzimlerinin yapımı penisilinlere karşı rezistans kazanılmasında en önemli ve genel faktörü oluşturduğu için, klavulanik asit bugüne kadar penisilinlerin etki güçlerinin artırılması ve etki spektrumlarının genişletilmesi amacıyla kullanılmıştır. Ancak yeni bir kombinasyon ile benzer etki için sefdinir ile birlikte kullanımına başlanmıştır. Sefdinir - klavulanik asit kombinasyonunda klavulanik asidin varlığı sefdiniri beta-laktamaz enzimlerince parçalanmaktan korur ve sefdinirin etki spektrumunu normalde dirençli pek çok bakteriyi de içine alacak şekilde genişletir (Kayaalp 2000, Mine ve arkadaşları 1988, Sultan 1994). Bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında sefdinir ve klavulanik asit birlikte yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak tabletlerde analizi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılmış ve ilaç maddelerinin tabletlerdeki analizlerine uygulanmıştır.

Bu HPLC yönteminin ön çalışmalarında öncelikle optimum kromatografik koşullar belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda ayırmalarda en iyi sonuçlar 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında, 5 µm partikül çaplı C18 kolon ile mobil faz olarak 20 mM fosfat tamponu (pH: 3) metanol- (65:35, h/h) çözücü sisteminde, 30 °C de, 1 mL/dak akış hızı kullanılarak elde edilmiştir. Çalışma UV dedeksiyonla, 210 nm dalgaboyu kullanılarak yapılmıştır. Alıkonma zamanları ise sefdinir için 3,6, klavulanik asit için 5,3 dakika olarak bulunmuştur.

HPLC yöntemine göre belirlenen çalışma koşullarında doğrusal aralık, sefdinir için 18,0-48,0 µg/mL ve klavulanik asit için 7,5-35,0 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde üç farklı konsantrasyonda analizler yapılmış ve aynı gün içinde yapılan analizlere ait RSD değeri sefdinir için % 0,06-0,72 ve klavulanik asit için % 0,10-0,42 farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen RSD değerleri ise sefdinir için % 0,23-1,98, klavulanik asit için % 0,41-1,55 olarak saptanmıştır. Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla standart katma metodu uygulanmış ve geri kazanım değerleri sefdinir için %

99,82-100,53 ve klavulanik asit için % 100,44-104,67 aralığında bulunmuştur. Ayrıca ölçü eğrilerinin eğimi ve y eksenini kestiği nokta kullanılarak hesaplanan LOD değerleri sefdinir için 0,63 klavulanik asit için 0,44 µg/mL ve LOQ değerleri sefdinir için 1,91 ve klavulanik asit için 1,33 µg/mL olarak bulunmuştur. Çözelti stabilitesinin saptanması için de standart çözeltiler, buzdolabında ve otomatik numune örnekleyici koşullarında 24 ve 72 saat bekletilmiş ve yapılan değerlendirmeler sonucunda çözeltilerin stabil kalmadığı belirlenmiştir.

Geliştirilen bu yöntem bu iki ilaç maddesinin birlikte bulunduğu bir efervesan tablet analizine uygulanmıştır. Aynı ilaç bu iki maddenin farmakopeye verilen analiz yöntemleri ile de ayrı ayrı analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Student-t testi ve Fischer-F testi kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılmış ve Student-t testinin değerleri sefdinir için 0,334 ve klavulanik asit için 0,087 ve Fischer-F testinin değerleri de sefdinir için 0,031 ve klavulanik asit için 0,06 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak geliştirilen yöntem ve farmakope yöntemleri ile bulunan sonuçlar kıyaslanmış ve sonuçlar %95 olasılık düzeyinde beş deneme için verilen teorik değerlerden ($t= 2,23$; $F=5,05$) küçük olduğundan ortalamalar (t-testi) ve standart sapmalar (F-testi) yönünden anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Özet olarak bu çalışmada tabletlerde sefdinir ve klavulanik asidin yan yana analizi için kullanımı kolay, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntem rutin farmasötik analizlerde, bu iki ilaç maddesinin yan yana miktar tayininde güvenilir, hızlı, pratik olarak rahatlıkla kullanılabilir niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Abdel M. E. M., Khattab N. A. (1991). Potentiometric titrimetry for the simultaneous quantification of ticarcillin and clavulanic acid in bulk and injectable dosage forms. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **340**, 770-780.
- Baş E., Özdemir S., Çağlayan M. G., Palabiyik İ. M., Onur F. (2013). First derivative spectrophotometric determination of cefixime and cefdinir in pharmaceutical preparations. *Turk J Pharm Sci*, **10**, 321-328.
- Chen Z. J., Zhang J., Yu J. C., Cao G. Y., Wu X. J., Shi Y.G. (2006). Selective method for the determination of cefdinir in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **834**, 163–169.
- Choi H. G., Jun H. W., Kim D. D., Sah H., Yoo B. K., Yong C. S. (2004). Simultaneous determination of cefatrizine and clavulanic acid in dog plasma by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**, 221–231.
- Chonghua L., Qiuming G., David P. N., Charles H. N. (2003). Simultaneous determination of ticarcillin and clavulanate in rabbit serum and tissue cage fluid by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, **794**, 227–236.
- Foroutan S. M., Zarghi A., Shafaati A., Khoddam A., Movahed H. (2007). Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **45**, 531–534.
- Gandhimathi M., Suganthi A., Ravi T. K., Pattasseril M. B. (2004). RP-HPLC estimation of cefdinir in capsules. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**, 248-249.
- Gonzalez P. C., Gonzalez M. I., Rodriguez V. A. B. (1991). Polarographic determination of clavulanic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **9**, 383-386.
- Gouda A. A., Hashem H., Hassan W. (2012). Spectrophotometric methods for determination of cefdinir in pharmaceutical formulations via derivatization with 1, 2naphthoquinone4sulfonate and 4chloro7nitrobenzo2oxa1,3diazole. *Drug testing and analysis*, **4**, 991-1000.

- Hadad G. M., Emara S., Mahmoud W. M. M. (2009). Optimization and validation of an HPLC method for the determination of cefdinir in dosage form and human urine. *Chromatographia*, **70**, 1593–1598.
- Haginaka J., Nakagawa T., Nishino Y., Uno T. (1981). High performance liquid chromatographic determination of clavulanic acid in human urine. *The Journal of Antibiotics*, **34**, 1189-1194.
- Hamrapurkar P., Patil P., Phale M., Gandhi M., Pawar S. (2011). A developed and validated stability-indicating reverse-phase high performance liquid chromatographic method for determination of cefdinir in the presence of its degradation products as per International Conference on Harmonization guidelines. *Pharmaceutical methods*, **2**, 15-20.
- Hashem H., Gouda A. A., Hassan W. (2012). Development and validation of a rapid stability indicating chromatographic determination of cefdinir in bulk powder and dosage form using monolithic stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **35**, 1638-1648.
- Hoizey G., Lamiable D., Frances C., Trenque T., Kaltenbach M., Denis J., Millart H. (2002). Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30**, 661–666.
- Izquierdo P., Gomez H. A., Perez B. D. (1993). Stoppedflow photometric determination of clavulanic acid in pharmaceutical and serum samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **11**, 9274-931.
- Ji L., Li W., Zhao C., Rui X., You L., Taijun H., Guorong F. (2012). Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of cefdinir in beagle dog plasma integrated with an automatic on-line solid-phase extraction following protein precipitation in the 96-well plate format. *Journal of Chromatography B*, **895 – 896**, 83-88.
- Jin H. E., Kim I. B., Kim C. K., Maeng H. J. (2013). Determination of cefdinir levels in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics after oral and intravenous administration of cefdinir. *Biomedical Chromatography*, **27**, 1423–1430.

- Kayaalp, O. (2000). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. *Ankara Hacettepe-Taş Yayınları*.
- Kessiba A. M., Abd E. K. M., Hegazy M. A., El G. A. E. (2012). Stability indicating HPLC method for the determination of Cefdinir in presence of its acid induced degradation products. *Analytical Chemistry: An Indian Journal*, **11**, 61-65.
- Khan A., Iqbal Z., Khan M. I., Javed K., Khan A., Ahmad L., Shah Y., Nasir F. (2011). Simultaneous determination of cefdinir and cefixime in human plasma by RP-HPLC/UV detection method: Method development, optimization, validation, and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, **879**, 2423–2429.
- Klavulanik Asit, *Drugbank*, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00766>.
- Kumudhavalli M. V., Chandira R. M., Jayakar B., Goswami S., Abhiteja K. (2009). RP – HPLC determination of Cefdinir in bulk drug and solid dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, **2**, 1141-1143.
- Mashelkar U. C., Renapurkar S. D. (2010). A LC-MS compatible stability-indicating HPLC assay method for cefdinir. *International Journal of ChemTech Research*, **2**, 114-121.
- Matar K. M., Nazi E. M., Sayed Y. M. E., Yamani M. J. A., Suwayeh S. A. A., Khamis K. I. A. (2005). Quantitative determination of clavulanic acid in plasma by HPLC: application to a pharmacokinetic study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **28**, 97–107.
- Mehta T. N., Subbaiah G., Pundarikakshudu K. (2005). Determination of cefdinir by a stability indicating liquid chromatographic method. *Journal of AOAC International*, **88**, 1661-1665.
- Mine Y., Kamimura T., Watanabe Y., Tawara S., Matsumoto Y., Shibayama F., Kikuchi H., Takaya T., Kuwahara S. (1988). In vitro antibacterial activity of FK482, a new orally active cephalosporin. *J Antibiot (Tokyo)*, **41**, 1873-1887.
- Mueller A. L. H., Picoloto R. S., Ferrao M. F., Silva F. E. B., Mueller E. I., Moraes F. E. M. (2012). Simultaneous diffuse reflectance infrared determination of clavulanic acid and amoxicillin using multivariate calibration techniques. *Drug Testing and Analysis*, **4**, 500-506.
- Müller A. L. H., Flores E. M. M., Müller E. I., Silvab F. E. B., Ferrao M. F. (2011). Attenuated total reflectance with fourier transform infrared spectroscopy

- (ATR/FTIR) and different PLS algorithms for simultaneous determination of clavulanic acid and amoxicillin in powder pharmaceutical formulation. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, **22**, 1903-1912.
- Narala S. R., Saraswathi K. (2011). RP- HPLC Methods for the determination of cephalosporins (cefditoren pivoxil and cefdinir) in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**, 1002-1004.
- Omar A. A., Maha F., Reham N., Laila A. F. (2014). Simple spectrophotometric and HPTLC-densitometric methods for determination of cefdinir in bulk powder and pharmaceuticals, and in presence of its hydrolytic degradation products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **4**, 129-136.
- Patel D. R., Prajapati L. M., Joshi A. K., Kharodiya M. L., Rajpurohit p. t. (2014). RP-HPLC Method for simultaneous estimation of cefadroxil and clavulanic acid in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, **3**, 381-390.
- Patel N. J., Joshi S. H. (2014). Analytical method development and validation for simultaneous estimation of cefadroxil and clavulanic acid in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, **3**, 264-278.
- Ravisankar P., Rao G. D., Chaitanya, M. K. (2013). Development and validation of RP-HPLC method for the determination of cefdinir in bulk and capsule dosage form. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, **1**, 255-263.
- Reyns T., Baere S. D., Croubels S., Backer P. D. (2006). Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal Of Mass Spectrometry*, **41**, 1414–1420.
- Reyns T., Boever S. D., Baere S. D., Backer P. D., Croubels S. (2007). Quantitative analysis of clavulanic acid in porcine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **597**, 282–289.
- Sankar D. G., Priya K. D., Krishna M. V., Latha P. V. M. (2004). RP-HPLC method for the estimation of Cefdinir in bulk drugs and in dosage forms. *Acta Ciencia Indica, Chemistry*, **30**, 273-276.

Sefdinir, *Dilymed*, <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=7490df67-56c0-4a1c-8533-2107f3e8aea5>

Sefdinir, *Wikipedia*, <http://en.wikipedia.org/wiki/Cefdinir>

- Singh B. K., Parwate D. V., Srivastava S., Shukla S. K. (2010). Selective and non-extractive spectrophotometric determination of cefdinir in formulations based on donor-acceptor complex formation. *Quim. Nova*, **33**, 1471-1475.
- Sultan T., Baltch A.L., Smith R.P., Ritz W.(1994). In vitro activity of cefdinir (FK482) and ten other antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from adult and pediatric patients. *Chemotherapy*, **40**, 80-91.
- Taleb N. H. A., Wasseef D. R. E., Sherbiny D. T. E., Ashry S. M. E. (2014). Application of factorial design for optimization of spectrophotometric determination of cefdinir using MBTH. *American Journal of Pharmtech Research*, **4**, 238-258.
- Tippa D. M. R., Singh N. (2010). Development and validation of stability indicating HPLC method for simultaneous estimation of amoxicillin and clavulanic acid in injection. *American Journal of Analytical Chemistry*, **1**, 95-101.
- Tsou T.L., Lee C.W., Wang H.J., Cheng Y.C., Liu Y.T., Chen S.H. (2009). Development of a new HPLC method for the simultaneous determination of ticarcillin and clavulanic acid in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, **92**, 1089-1094.
- Tsou T. L., Wu J. R., Tang S. T., Liu H. W. (2002). Separation and determination of β -lactamase inhibitors in human serum by hplc with a β -cyclodextrin stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **25**, 3117–3130.
- Tsou T. L., Wu J. R., Young C. D., Wang T. M. (1997). Simultaneous determination of amoxycillin and clavulanic acid in pharmaceutical products by HPLC with β -cyclodextrin stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **15**, 1197 – 1205.
- USP30-NF25, *USP Pharma pharmacopoeia*, **29**, 617.
- USP32-NF27, *USP Pharma pharmacopoeia*, **33**, 1162.
- Virupaxappa B. S., Shivaprasad K. H., Latha M. S. (2010). A simple spectrophotometric method for the determination of cefdinir in pharmaceuticals. *Analytical Chemistry: An Indian Journal*, **9**, 408-412.
- Yoon K. H., Lee S. Y., Kima W., Park J. S., Kimb H. J. (2004). Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC–ESI mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **813**, 121–127.