

Atf İçin: Ergin M, 2022. Yıkama Metodu Kullanılarak Saflaştırılan Amoksisilin Trihidratın Taguchi Yöntemi ile Optimizasyonu. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(2): 933-945.

To Cite: Ergin M, 2022. Optimization of Amoxicillin Trihydrate Purified Using Washing Method by Taguchi Method. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(2): 933-945.

Yıkama Metodu Kullanılarak Saflaştırılan Amoksisilin Trihidratın Taguchi Yöntemi ile Optimizasyonu

Mustafa ERGİN^{1*}

ÖZET: Saf bir kristal ürün elde etmek için tekrar tekrar uygulanan kristalizasyon basamakları veya farklı kimyasallara başvurulması, bitmiş ürünün veriminde farklı sorunlara neden olabilir. Bundan dolayı, kristal ağıın içerisindeki safsızlıklar, ana ürünü etkilemeden uzaklaştırılmalıdır. Bu çalışmada, Amoksisilin trihidrat (Amct) ve safsızlık olarak 4-hidroksifenilglisin (4-HPG) kullanılmıştır. Amct kristal kafesinden, safsızlık olarak 4-HPG'nin yıkama yöntemleri kullanılarak uzaklaştırılması gösterilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada ilk kez, yıkama verimi ile yıkama yöntemleri, çözeltiler ve sıcaklıklar arasındaki ilişkiyi incelemek için Taguchi metodu kullanılmıştır. Denemelerde bir Büchner cam hunisi istenilen sıcaklıkta ve ürün kaybı olmadan çalışılacak şekilde yeniden tasarlanmıştır ve denemeler burada yapılmıştır. Bu çalışma, farklı yıkama yöntemleri, kullanılan Taguchi metot ve yeniden tasarlanan Büchner cam hunisi ile literatüre farklılık katmaktadır. Etki grafiklerinden yıkama verim değerlerini etkileyen faktörler sırasıyla yıkama yöntemi, sıcaklık ve çözelti olarak belirlenmiştir. En yüksek verim, tek aşamalı yıkama yöntemi ile Etilalkol kullanılarak 15°C'de elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amoksisilin trihidrat, 4-hidroksifenilglisin, kristalizasyon, saflandırma, Taguchi metot

Optimization of Amoxicillin Trihydrate Purified Using Washing Method by Taguchi Method

ABSTRACT: Repeated crystallization operations or the employment of several chemicals to achieve a pure crystalline product might result in a variety of issues with the completed product's yield. As a result, the impurities in the crystal mesh must be eliminated while the core product remains unaffected. Amoxicillin trihydrate (Amct) and 4-hydroxyphenylglycine (4-HPG) were employed as impurities in this investigation. Washing methods were proven to be effective in removing 4-HPG contaminants from the Amct crystal lattice. In addition, for the first time in this study, the Taguchi technique was employed to investigate the link between yield and washing procedures, solutions, and temperatures. A Büchner glass funnel was developed in the experiments to work at the required temperature with no product loss, and testing were undertaken here. This study makes a difference to the literature with different washing methods, the Taguchi method used and the redesigned Büchner glass funnel. From the effect graphs, it was determined that the factors affecting the yield values were washing method, temperature and solution, respectively. The highest washing yield was obtained at 15°C by using ethanol with the one-stage washing method.

Keywords: Amoxicillin trihydrate, 4-hydroxyphenylglycine, crystallization, purification, Taguchi method

¹Mustafa ERGİN ([Orcid ID: 0000-0003-4158-368X](https://orcid.org/0000-0003-4158-368X)), İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

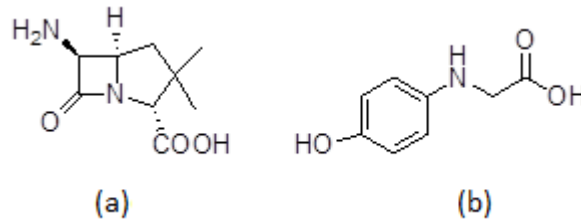
*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mustafa ERGİN, e-mail: mfergin@iuc.edu.tr

GİRİŞ

Amoksisilin trihidrat (Amct), birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu β -laktam antibiyotiklerin en çok tercih edilenlerinden biridir. Dünya'da Amct tek başına 4.4 milyar USD'lik bir pazar payına sahip olarak son Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 65 ülkenin 60'ında en çok reçete edilen antimikrobiyal ilaçtır (WHO, 2018). β -laktam ilaçlara olan talebin, 2000'li yıllardan itibaren özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde iki katından daha fazla arttığı belirlenmiştir (Klein ve ark., 2018). Dolayısıyla, bu ilaçların arz-talep ilişkisinin, coğrafi olarak değişim gösterdiği söylenebilir. Bununla beraber, Kasım 2019'de COVID-19 pandemisinin başlaması ile Çin'in üretimini durdurduğu Amct hammadesine erişimde dünya çapında bir problem yaşanmıştır (FDA, 2021). Dolayısıyla, bu antibiyotik ve safsızlık ürünlerinin belirlenmesi için maliyeti, çevresel etkiyi (Yasa ve ark., 2016), kontaminasyonu (Ergin ve Ergin, 2021), atığı ve daha fazlasını en aza indirmek için gerekli teknolojilerden ve tasarım (Onar ve Vardar, 2018; Yasa, 2020) ilkelerinden yararlanmak oldukça önemli hale gelmiştir.

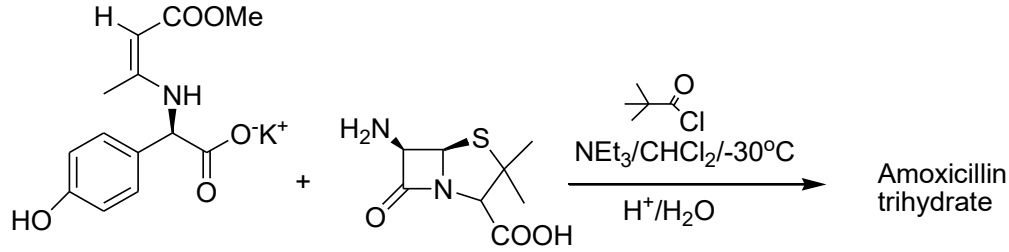
Ayırma işlemi, kimya ve ilaç endüstrilerinde, işletme maliyetinin yaklaşık %40-70'ini oluşturur. İlaç ve gıda gibi insan sağlığını doğrudan etkileyen ve ikinci kalite ürünlerin asla kabul edilemeyeceği birçok endüstride, bitmiş veya ara ürünlerin geri kazanılması ve saflaştırılması için ayırma işlemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, işletmecilerin bu sektörlerde ticari hayatlarını devam ettirebilmeleri için kaliteli ürünlerin yanı sıra verimli ürünler üretebilecek ekonomik süreçleri araştırmaları ve kullanmaları gerekmektedir. Bunu başarmak için kullanılan işlemde yüksek saflıkta ve verimli bir ürün elde edilmelidir. Bu nedenle, işlemde kaynaklanan safsızlıkları gidermek için pahalı farklı kimyasallar veya maliyetli üretim teknikleri yerine yıkama işleminin kolay ve basit modifikasyonları tercih edilebilir.

Bu çalışmada kullanılan yıkama metodunun pratik olarak endüstri kullanımı ile karşılaştırmak ve mekanizmasını ortaya çıkarmak için gerçek ilaç/safsızlık sistemi Amct/4HPG (bkz. Şekil 1) kullanılmıştır.



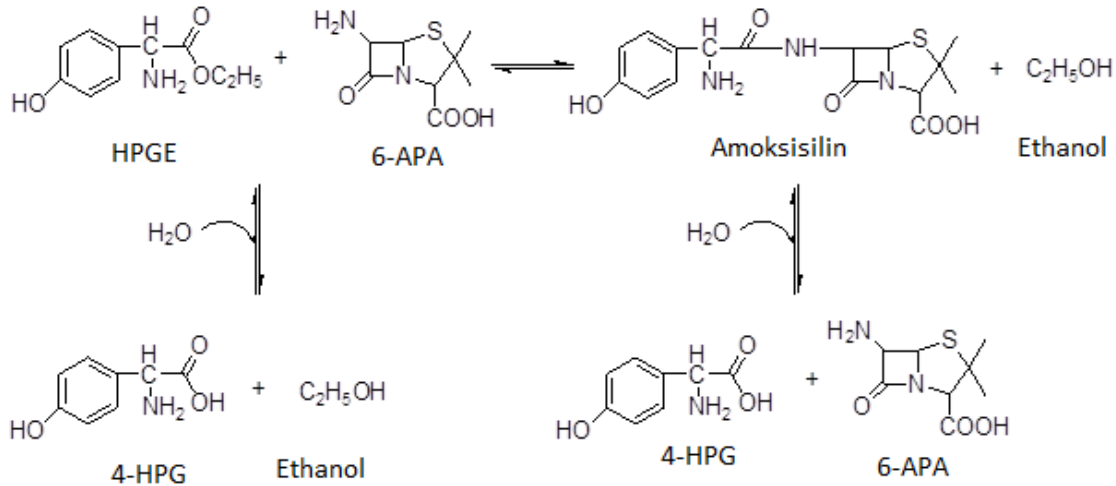
Şekil 1. a) Amoksisilin trihidrat ve b) 4-hidroksifenilglisin'in moleküler yapısı

Amct, kimyasal ve enzimatik olmak üzere iki farklı üretim metodu ile yarı sentetik olarak üretilmektedir (Giron ve ark., 2002; Youshko ve ark., 2004). Kullanılan her iki yöntem için de başlangıç materyali, amid bağının [-CONH-] kırılmasının ardından meydana gelen 6-APA'dır (Bruggink ve ark., 1998; Engel ve Kleemann, 2003; Elander, 2003; Alemzadeh ve ark., 2010). Amoksisilin üretimi için kullanılan ilk metot "Dane tuzu" adı verilen kimyasal yöntemdir (bkz. Şekil 2). Bu yöntemde, reaksiyonun gerçekleşmesi için oldukça düşük sıcaklıklar (-30°C) gerekmektedir. Ayrıca, insan sağlığı ve çevre koşullarına zararlı olduğu düşünülen bazı reaktif ve solventler de bu proseste kullanılmaktadır. Prosesin sonucunda ortaya çıkan atık türü/miktarı ve bunların uzaklaştırılması günümüzde ayrıca önemli bir sorundur (Bruggink ve ark., 1998).



Şekil 2. Amoksisilin üretimi için kimyasal yöntem

İkinci yöntem ise enzimatik yöntemdir (bkz. Şekil 3). Bu yöntem; ılıman reaksiyon koşulları ve daha az işlem adımı nedeniyle kimyasal yöntemle göre günümüzde üretim için daha çok tercih edilen üretim metodudur. Bu yöntemde, 4-hidroksifenilglisin etil ester (HPGE) ve 6-Aminopenisilanik asit (6-APA), amoksisilin oluşturmak üzere reaksiyona girer. İki hidroliz reaksiyonu aynı anda meydana gelir. İlk aşamada, reaktif HPGE; 4- hidroksifenilglisin (4-HPG) ve etilalkol oluşturmak üzere su varlığında penisilin G asilaz (PGA) tarafından hidrolize edilir. İkinci aşamada, Amct (Amoksisilin trihidrat) ürünü, 4-HPG ve 6-APA'yı oluşturmak için su varlığında PGA tarafından hidrolize edilir (Hsi ve ark., 2013). Prosesin sonunda amoksisilin yanında safsızlık olarak 6-APA ve 4-HPG'nin bulunması kaçınılmazdır.



Şekil 3. Amct üretimi için enzimatik sentez

Amct üretmek için tercih edilen her iki prosesin sonucunda da şartlar farklı olsa da kullanılan hammaddeler nedeniyle benzer safsızlıklar meydana gelmektedir. Oluşan safsızlık ürünleri, ham madde verimini düşürerek bir sonraki saflaştırma ve ayırma işlemlerini etkilemekte ve ayrıca bitmiş ürünün üretiminde sorunlara neden olmaktadır. Dolayısıyla bu safsızlıkların kolay, ucuz şekilde belirlenebilmesi ve uzaklaştırılabilmesi oldukça önemlidir. Bunun için yıkama prosesi kullanılması (Ergin, 2021) veya farklı kimyasal maddeler (Alvarez ve Myerson, 2010; Vartak ve Myerson, 2017) ile safsızlıklar uzaklaştırılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışma, literatürdeki yıkama prosesi ile ilgili bazı boşlukları doldurmayı amaçlamıştır. İlk olarak, farklı kimyasallar veya tekrarlanan kristalizasyon aşamaları kullanılmadan, sadece farklı yıkama yöntemlerinden faydalanılarak Amct'nin kristal kafesi içindeki proses kaynaklı bozunma ürününün uzaklaştırılmasını içermektedir. Böylece, çalışma yıkama işleminin zaman-maliyet etkisi açısından önemini ortaya koymayı amaçlamıştır. Yine bu doğrultuda ilk kez yıkama verimi ile üç farklı yıkama yöntemi, üç farklı solvent ve iki farklı sıcaklık arasındaki ilişki "Taguchi Metodu" kullanılarak araştırılması hedeflenmiştir. Son olarak, çalışma Büchner cam hunisini ürün verimini

istenilen sıcaklıkta çalışacak şekilde yeniden tasarlayarak literatüre yenilik getirmeyi amaçlanmıştır. Çalışma, maliyet-verimlilik-saflık-zaman çerçevesi dikkate alınarak pandemilerle başa çıkma gerçeğiyle karşı karşıya kalan dünyada önemli olan tüm β -laktam antibiyotiklere Amct yıkama işlemlerinin verimli bir şekilde uygulanabilirliğini teşvik etmek için önemli bir yol olacaktır. Ayrıca çalışmada, yıkama yöntemleri, sıcaklık ve araştırılan çözeltiler arasındaki farklılıklar ve benzerlikler çerçevesinde Amct/4-HPG'nin yıkama verim değerleri incelenmiştir. Elde edilen veriler, sadece Amct değil, tüm β -laktam antibiyotiklerin üretiminde yıkama işlemi için etkili stratejiler geliştirmeye yardımcı olabilir.

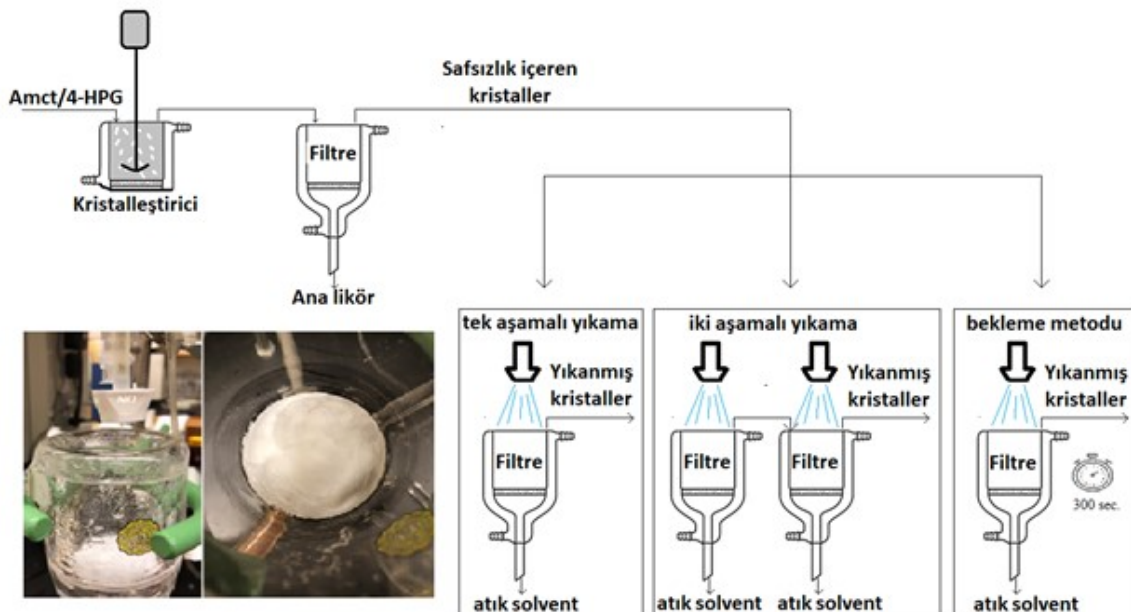
MATERYAL ve METOT

Kimyasallar

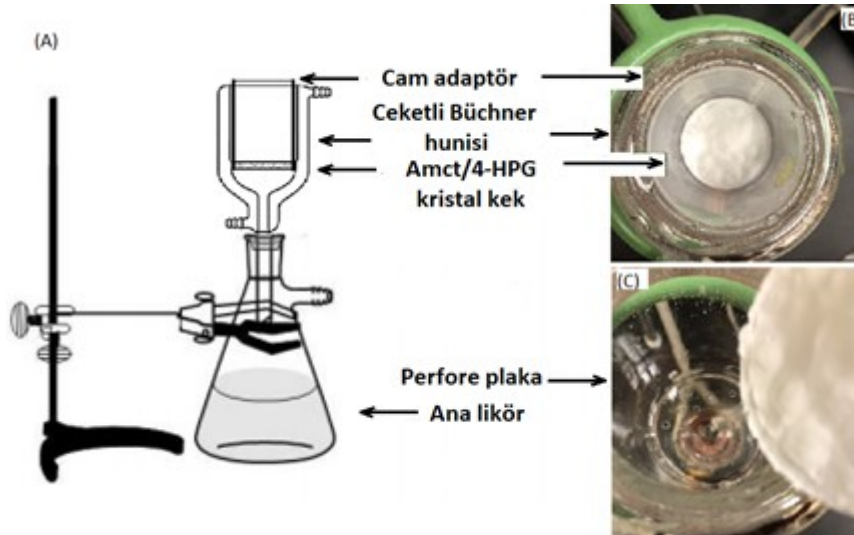
Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal bileşikler, ilave bir saflaştırma olmadan kullanılmıştır. Amct, North China Pharmaceutical Inc., Hebei, Çin'den temin edilmiştir. 4-HPG, isopropilalkol, Etilalkol, mono-potasyum fosfat (KH_2PO_4) ve dibazik potasyum fosfat (K_2HPO_4), Sigma Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır. Çalışma boyunca kullanılan distile su Milli-Q sistemi (Millipore, ABD) ile hazırlanmıştır. Hidroklorik asit, Sigma-Aldrich'ten satın alınmış ve 1.0 L'lik bir ölçülü balonda 1.0 M HCl hazırlanmıştır. Sodyum hidroksit, Sigma-Aldrich'ten temin edilmiş ve 5.0 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Metot

Amct/4-HPG kristalleştirme ve yıkama işlemi için kullanılan proses Şekil 4'de gösterilmiştir. 100 mL'lik özel olarak tasarlanmış bir Büchner cam hunisi (bkz. Şekil 5) ve iki adet 150 mL'lik ceketli reaktör, kararlı durum koşullarını sağlamak için tüm kristalizasyon deneylerinde kullanılmıştır. Bu çalışmada, yapılan tüm denemelerde ürün kaybı olmadan ürünün kolayca alınabilmesi ve istenilen sıcaklıkta çalışabilmesi için Büchner cam hunisi yeniden tasarlanmıştır. Proses sıcaklığı, sirkülasyonlu bir su banyosu (VWR Science 1150) ile istenilen çalışma sıcaklığına ayarlanmıştır ve sistemin 30 dakika boyunca stabilize olmasına izin verilmiştir. Tüm solventler, çalışma ortamıyla aynı sıcaklıkta olmaları amacıyla her denemeden bir saat önce, su banyosunda tutulmuştur. Her deneme ilk olarak belirtilen koşullarda kristalize edilmiş, ardından aynı koşullarda yıkama işlemine tabii olmuştur.



Şekil 4. Amoksisilin kristalizasyon prosesinin şematik gösterimi (Fatih, 2021)



Şekil 5. Amct/4-HPG'nin yıkama işlemi için kullanılan aparat. (A) Yıkama işlemi için filtrasyon aparatının bileşenleri. (B) Amct/4-HPG'nin hazırlanması için kullanılan filtrasyon kurulumu. Not: Kristallerin filtreden daha kolay çıkarılmasını ve filtre duvarlarına yapışmamasını sağlamak için bir cam adaptör kullanılmıştır. (C) Yıkanmış Amct/4-HPG kristallerinin filtreden çıkarılması (Fatih, 2021)

Kristalizasyon ve yıkama işlemleri sırasıyla 15°C ve 25°C olmak üzere iki farklı sıcaklık için ve pH 6 koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu işlem her şarj için ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Reaktör 2'deki safsızlık süspansiyonu, maksimum pompa akış hızı (120 rpm) ile reaktör 1'deki ana malzeme süspansiyonuna taşınmıştır. 300 rpm'de 5 dakika karıştırıldıktan sonra, aynı sıcaklıkta 1 M HCl, tüm süspansiyon çözünene kadar (pH 1.8, yaklaşık 50 ml HCl) 20 rpm akış hızında ceketli reaktör 1'e beslenmiştir. Çözünmemiş parçacıkları uzaklaştırmak için 0.45 µm Whatman naylon filtre kağıdı kullanılmıştır. Çözelti, sistemle aynı sıcaklıkta 5 M NaOH çözeltisi ile beslenmiştir ve istenen pH'a ayarlandıktan sonra 30 dakika boyunca kristalleşmesine izin verilmiştir. HCl ve NaOH adımlarının pH'ı, bir pH metre (Fischer Scientific AE 150, ABD) ile sürekli olarak kontrol edilmiştir.

Daha sonra elde edilen kristaller bir pompa ile yavaşça Büchner cam hunisine aktarılmıştır. Safsızlıklar içeren kristaller, 0.2 µm Whatman naylon filtre kağıdından süzülmüştür. Ana likörün kristallerden tamamen uzaklaştığından emin olmak için vakum bir süre daha uygulanmıştır. Filtrasyon sonunda ana likör ve yıkanmamış kristal numuneler birbirinden dikkatlice ayrılmıştır.

Yıkama denemesi

Tüm yıkama deneyleri, 100 ml özel olarak tasarlanmış Büchner cam huni kullanılarak 10 ml yıkama solventi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan yıkama solventinin hacmi kristal keki tamamen kaplayacak şekilde 10 ml olarak belirlenmiştir. Yıkama deneylerinde USP Farmakopesi'nde belirtilen düşük toksisite değerleri nedeniyle yıkama solventi olarak Etilalkol, isopropilalkol ve distile su tercih edilmiştir. Çözücü, ıslak keke etkili bir şekilde uygulamak için belli bir mesafeden püskürtülmüştür. Böylece solvent hem miktarı hem de uygulama yöntemi ile yaş kek üzerine homojen olarak dağılmış ve safsızlıkların giderilmesinde etkin rol oynamıştır. Yıkanan kristaller, bir vakum pompası kullanılarak 0.2 µm Whatman naylon filtre kağıdından süzülmüştür. Filtrasyon sonunda çözücü ve yıkanan kristal numuneler birbirinden dikkatlice ayrılmış ve hassas kristal numuneler kurutulmuştur.

Kristal kafes yapısındaki safsızlıkları gidermek için elde edilen kristallere üç farklı yıkama yöntemi uygulanmıştır. Tek aşamalı yıkama yönteminde, kristaller taze çözücü kullanılarak bir kez yıkanmış ve çözücü tamamen filtrelene kadar vakum uygulanmıştır. Çift aşamalı yıkama yöntemi olarak adlandırılan ikili yıkama sisteminde, tek aşamalı sistemle yıkanan kristaller aynı miktarda taze

çözücü kullanılarak ikinci kez yıkanmış ve çözücü tamamen süzülene kadar vakum uygulanmıştır. Bekletme yöntemi olarak adlandırılan son yöntemde, kristallere diğer yöntemlerde olduğu gibi aynı miktarda taze çözücü uygulanmış ve çözücü kristal üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra çözücü tamamen uzaklaşana kadar vakum yapılmıştır. Ayrıca, yıkama solventinin filtrelenmesi için uygulanan vakum süresi, yaklaşık 30 s olarak tüm denemelere eşit olarak gerçekleştirilmiştir.

Taguchi metot

Bir çalışmada istemeden yapılan küçük hatalar zaman kaybına, önemli ekonomik kayıplara ve hatta ampirik geçerliliğin geçersiz olmasına neden olabilir, çünkü iyi bir deneysel plan dahilinde çalışmak başarı için kilit faktörlerden biridir. Yıkama aşaması, kristalizasyon sisteminin vazgeçilmez bir aşaması olmasına rağmen, yıkama işleminin işlevi daha önce literatürde detaylı olarak çalışılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada yıkama sisteminin başarılı bir şekilde değerlendirilmesi için iyi bir deney planı çerçevesinde denemeler yapılmıştır. Bu çalışmada, kullanılacak malzemeler (Amct ve 4-HPG) ile proses koşulları arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için farklı yıkama yöntemleri, farklı çözeltiler ve sıcaklıklar kullanılarak birkaç pilot deneme yapılmıştır. Bu pilot denemeler ile "malzeme kullanılan sistem-süreç koşulları" arasındaki ilişki gözden geçirilerek olası hatalar, zaman ve ekonomik kayıplar ortadan kaldırılmıştır. Yıkama işleminde kullanılan parametrelerin sistem üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak için "Taguchi Method" tasarımı kullanılmıştır. Bu deney tasarımı yönteminde kontrol edilemeyen ve açıklanamayan değişkenlerin kontrolünü sağlar (Lin, 2004). Bu faktörlere karşı performans karakteristik kontrol faktörü seviyesinin belirlenmesinde Taguchi yönteminde amaç fonksiyon değerleri bir sinyal/gürültü (S/N) oranına dönüştürülür, yani deneysel veri kalitesi özelliklerini gösteren istenmeyen rastgele gürültü değeri için istenen sinyal oranı olarak ortaya konur.

Bu yöntemi kullanmanın temel amacı, daha az deneme ile çok daha anlaşılır sonuçlara ulaşmaktır. Deney tasarımındaki diğer bir adım, süreç parametrelerinin seviyelerini ayarlamaktır. Bu çalışma, önceki pilot deneylerin sonuçları ile literatür taramasından elde edilen bilgiler dikkate alınarak ve uzmanlarla istişare edilerek gerçekleştirilmiştir. Çizelge 1, deneysel çalışmada kullanılan parametreleri ve bunların seviyelerini, üç seviye yıkama metodu, üç seviye solüsyon ve iki seviye sıcaklık ile sunulmuştur. Taguchi L18 ($2^1 \times 3^2$) ortogonal dizi, optimum yıkama metotlarının belirlenmesi, solüsyon ve sıcaklık etkilerinin analizi için en uygun olarak seçilmiş ve Minitab 19 yazılımı kullanılmıştır.

Çizelge 1. Taguchi deney tasarımı için kullanılan proses parametreleri ve seviyeleri

No.	Proses Parametresi	Seviye 1	Seviye 2	Seviye 3
1	Yıkama metodu	Tek aşamalı	İki aşamalı	Bekleme
2	Çözeltiler	Etilalkol	İsopropilalkol	Distile Su
3	Sıcaklık	15°C	25°C	-

Yıkama verim değeri kalite karakteristik faktörü olduğundan, bu çalışma için "daha büyük-daha iyi" özelliği seçilmiştir. Eşitlik (1), "daha büyük-daha iyi" özelliğinin S/N oranını ifade eder.

$$\text{Daha büyük-daha iyi: } \frac{S}{N} = -10 \log n \sum_{i=1}^n y_i^2 \quad (1)$$

Burada, n , tekrarlanan deneylerin sayısını, y_i , deneysel veriyi, i , ortalama ölçülen değeri temsil etmektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kristalizasyon sonrası elde edilen Amct kristallerinin belirlenen solüsyon ile yıkanması sonrası elde edilen kristal miktarının, yıkama öncesi kristal miktarına bölünmesi sonucunda yıkama verimi elde edilmiştir.

Gürültü-sinyal (S/N) oranının analizi

Amct kristallerinin yıkanmasının ardından Taguchi L18 deneysel tasarımı ile elde edilen S/N oranları ve deneysel yıkama verim değerleri Çizelge 2’de gösterilmektedir. Taguchi tabanlı yanıt tablosu kullanılarak deneysel yıkama verim özelliklerinin optimal seviyeleri için yıkama prosesi, solüsyon ve sıcaklık kontrol faktörleri arasında en etkili olanı belirlenmiştir.

Çizelge 2. Deneysel sonuçlar ve S/N oranları

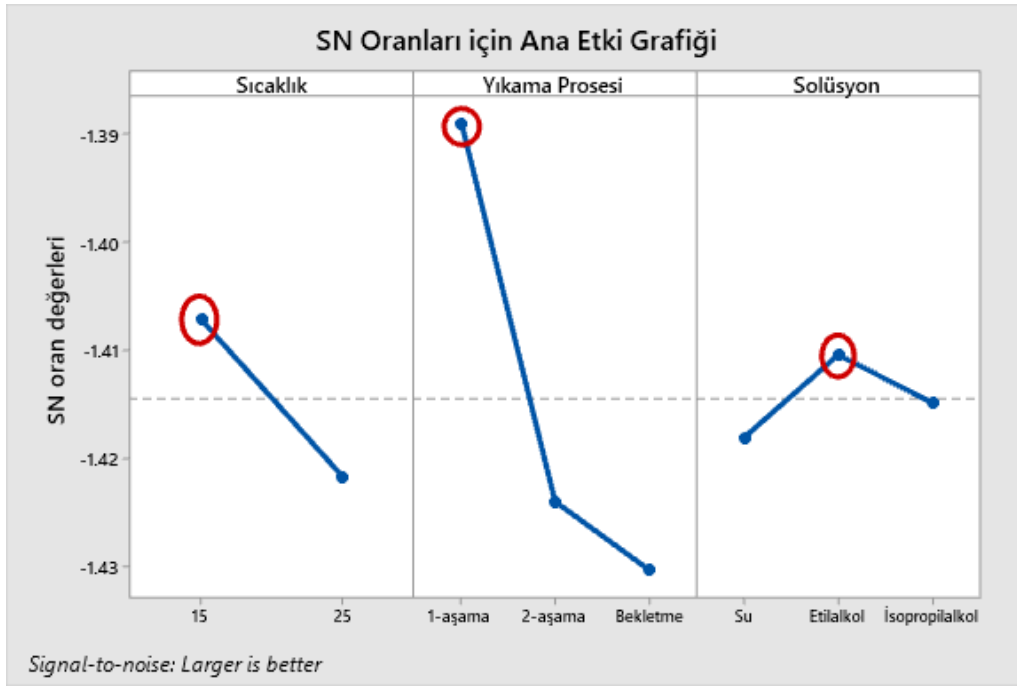
No.	Sıcaklık (°C)	Yıkama Prosesi	Solüsyon	Yıkama Verimi (%)	Verim için S/N Oranı
1	15	1-aşama	Distile Su	85.28	-1.38306
2	15	1-aşama	Etilalkol	85.34	-1.37695
3	15	1-aşama	İsopropilalkol	85.31	-1.38
4	15	2-aşama	Distile Su	84.89	-1.42287
5	15	2-aşama	Etilalkol	84.98	-1.41367
6	15	2-aşama	İsopropilalkol	84.94	-1.41775
7	15	Bekletme	Distile Su	84.85	-1.42696
8	15	Bekletme	Etilalkol	84.92	-1.4198
9	15	Bekletme	İsopropilalkol	84.88	-1.42389
10	25	1-aşama	Distile Su	85.11	-1.40039
11	25	1-aşama	Etilalkol	85.16	-1.39529
12	25	1-aşama	İsopropilalkol	85.13	-1.39835
13	25	2-aşama	Distile Su	84.76	-1.43618
14	25	2-aşama	Etilalkol	84.90	-1.42185
15	25	2-aşama	İsopropilalkol	84.80	-1.43208
16	25	Bekletme	Distile Su	84.73	-1.43926
17	25	Bekletme	Etilalkol	84.77	-1.43516
18	25	Bekletme	İsopropilalkol	84.75	-1.43721

Çizelge 3, S/N response tablosunu sunar ve yıkama verimi üzerindeki en etkili parametre olarak yıkama prosesini en az etkili parametre olarak ise sıcaklığı gösterir.

Çizelge 3. Sinyal gürültü oranları için response tablosu

Seviye	Sıcaklık	Yıkama Prosesi	Solüsyon
1	-1.407	-1.389	-1.418
2	-1.422	-1.424	-1.410
3	-	-1.430	-1.415
Delta	0.015	0.041	0.008
Rank	2	1	3

Amct’ın kristalizasyonunda yıkama verimi için S/N değerleri üzerindeki kontrol faktörünün etkileri Şekil 6’da ortaya koymuştur. Yıkama verimi (bkz. Şekil 6) için optimal yıkama prosesi parametreleri (en yüksek değerler) 1 aşamalı yıkama prosesi, solüsyonun 2. seviyesi olan etilen ve sıcaklık için 15°C bulunmuştur.



Şekil 5. Yıkama verimi için ortalama S/N oranı üzerindeki proses parametresi etkileri

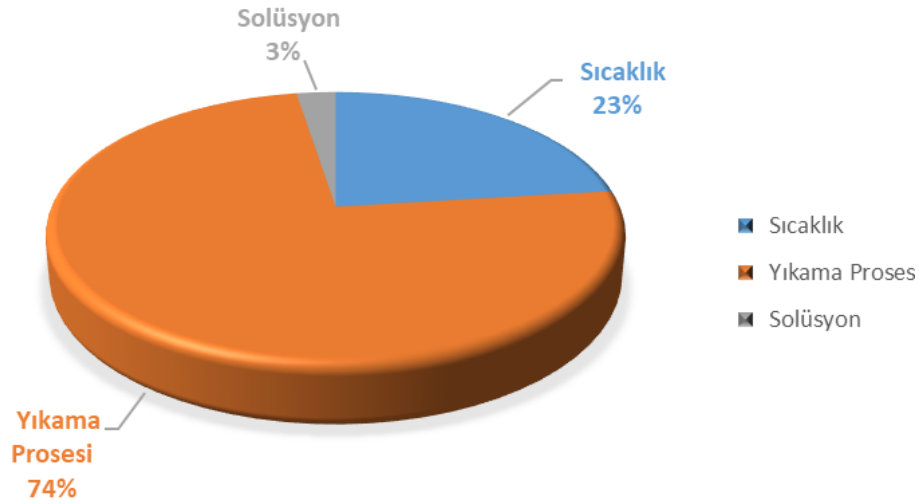
Varyans analizi

Bir deney tasarımında tüm kontrol faktörlerinin birbirleri ile olan etkileşimlerini belirlemek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Çizelge 4, %95 güven düzeyinde ve %5 anlamlılık düzeyinde yıkama prosesi, solüsyon ve sıcaklık kontrol faktörlerinin yıkama verimi üzerindeki etkilerini ortaya koyan ANOVA sonuçlarını göstermektedir. Kontrol faktörlerinin önemini belirlemek için her bir kontrol faktörünün F değeri karşılaştırılmıştır (Kumar ve Choudhury, 2008). Yıkama verimliliğinde hangi faktörün daha etkili olduğu Şekil 7'de çizilen pasta grafiğinde gösterilmektedir. Toplam değişkenlik üzerindeki etkilerin %74'ünü yıkama yöntemi, %23'ünü sıcaklık ve %3'ünü çözelti oluşturdu. Elde edilen bu değerler çerçevesinde en etkili değer "yıkama yöntemi" olduğu açıkça görülmektedir.

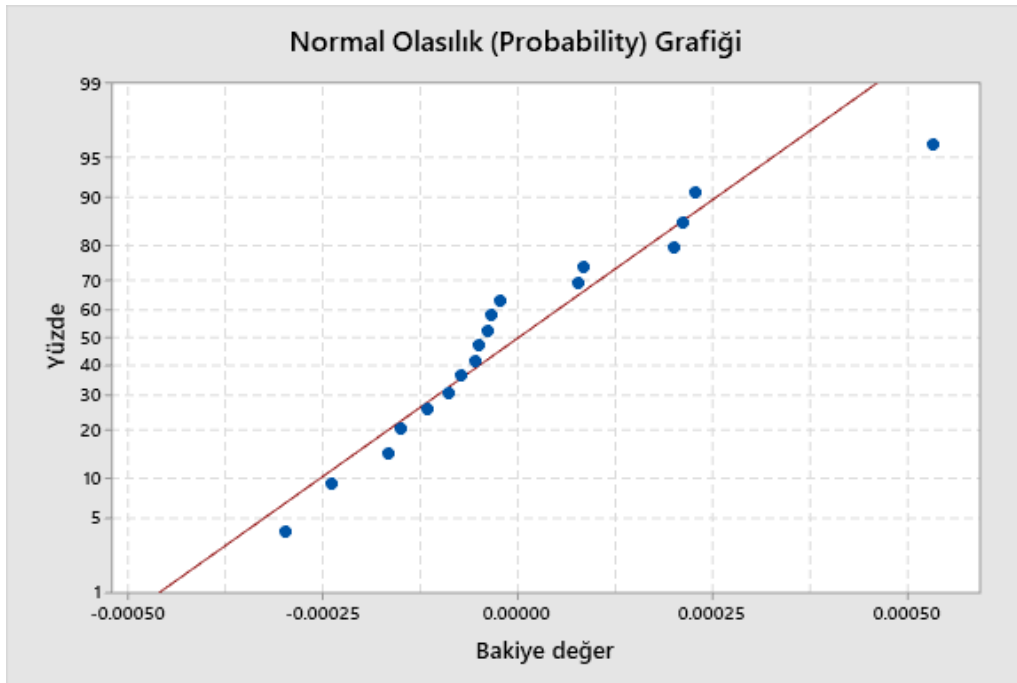
Çizelge 4. Sinyal gürültü oranları için response tablosu

Kaynak	DF	Seq SS	Katkı	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Sıcaklık	1	0.000009	%13.27	0.000009	0.000009	163.84	0.00000
Yıkama Prosesi	2	0.000057	%83.28	0.000057	0.000029	514.27	0.00000
Solüsyon	2	0.000002	%2.48	0.000002	0.000001	15.31	0.00050
Error	12	0.000001	%0.97	0.000001	0.000000		
Total	17	0.000069	%100.00				

Normal olasılık grafiği (Normal probability plot), regresyon modeli denkleminde bireysel değerlerin sapmasını gösterir. Çizginin etrafındaki kümelenmiş noktalar düşük sapma gösterir. Yıkama verimi için artık (residual) grafik Şekil 8'de gösterilmektedir. Normal olasılık grafiğinin, hataların normal dağıldığını gösteren neredeyse doğrusal bir yanıt gösterdiği açıktır.



Şekil 6. Yıkama verimindeki faktörlerin etki dağılımını gösteren pasta grafiği



Şekil 7. Yıkama veriminin S/N oranları için artık grafik

Regresyon analizi

Regresyon analizi, bir bağımlı değişken ile bir veya daha fazla bağımsız değişken arasındaki ilişkinin modellenmesi ve analizi için uygulanır (Kıvak, 2014). Bu çalışmada, yıkama verimini denklemler yoluyla hesaplamak için regresyon analizi kullanılmıştır. Denklem tahminleri, lineer ve kuadratik modeller olarak formüle edilmiştir. Çizelge 5, çıktı parametreleri için tahmin edilen ikinci dereceden ve doğrusal denklemleri göstermektedir. Lineer regresyon modeli denklemleri aracılığıyla bulunan R^2 değeri yıkama verimi için %99.03 olarak bulunmuştur. Tahmin edilen değerler ile deneysel sonuçlar arasında çok iyi bir korelasyon ortaya konmuştur.

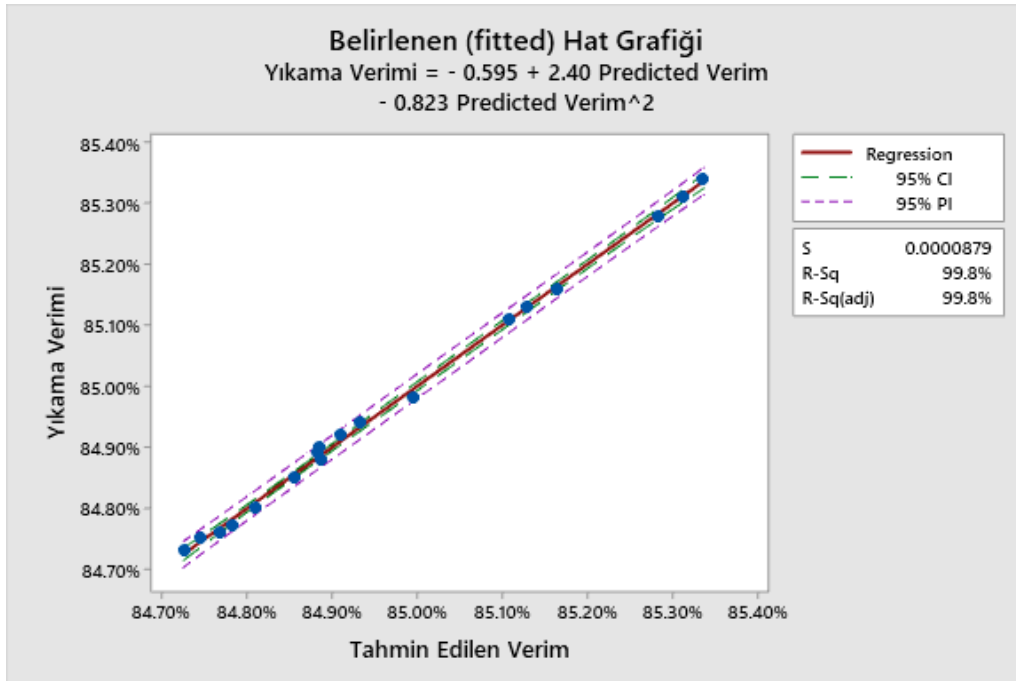
Çizelge 5. Yıkama veriminin tahmini için denklemler**R-sq %99.03**

$$\begin{aligned} \text{Yıkama Verimi} = & 0.852572 + 0.0 \text{ Sıcaklık}_{15} - \\ & 0.001422 \text{ Sıcaklık}_{25} + 0.0 \text{ Yıkama Prosesi}_{1\text{-aşama}} - \\ & 0.003433 \text{ Yıkama Prosesi}_{2\text{-aşama}} \\ & - 0.004050 \text{ Yıkama Prosesi}_{\text{Bekletme}} + 0.0 \text{ Solüsyon}_{\text{Su}} \\ & + 0.000750 \text{ Solüsyon}_{\text{Etil}} \\ & + 0.000317 \text{ Solüsyon}_{\text{İzopropil}} \end{aligned}$$

R-sq %99.83

$$\text{Yıkama Verimi} = - 0.595 + 2.40 \text{ Predicted Verim} - 0.823 \text{ Predicted Verim}^2$$

İkinci dereceden regresyon modelinde deneysel sonuçlarla karşılaştırıldığında tahmin edilen değerler Şekil 9'da görülebilir. İkinci dereceden regresyon modeli ile gerçekleştirilen denklemlerde R^2 değeri yıkama verimi için %99.83 olarak belirlenmiştir. İkinci dereceden regresyon modeli ile elde edilen tahmin değerleri, doğrusal regresyon modeli ile elde edilenlerden daha yoğundur, bu da ikinci dereceden regresyon modelinin yıkama verimi tahmininde başarılı olduğunu gösterir.



Şekil 8. Yıkama verimi için deneysel sonuçlarla karşılaştırıldığında ikinci dereceden regresyon modeli

Amct üretimi sırasında ortaya çıkan safsızlıkların uzaklaştırılması konusunda farklı çalışmalar yapılmıştır. Alvarez ve Myerson (2010) ve Vartak ve Myerson (2017), Amct/4-HPG kristal örgüsüne, safsızlık 4-HPG ile kompleks yapmak üzere 47 adet bileşik kullanmıştır. Çalışma sonucunda 11 bileşen ile 4-HPG'nin kompleks oluşturduğu ve süzme metodu ile kolayca uzaklaştırıldığından bahsetmiş ve yüksek verim elde edildiğini ortaya koymuştur (Alvarez ve Myerson, 2010; Vartak ve Myerson, 2017). Ancak, Amct gibi oldukça hassas bir ilaca yeni bir kimyasalın eklenmesi ürünün raf ömrünü negatif olarak etkileyecektir. Shaohua Feng, (2006) ise yapmış olduğu çalışmada Amct'nin, 4°C'de pH 4.7'de kristalleştirildiğini belirtmiştir. Türbidimetrimin endüstriyel kristalizasyonda çekirdeklenmeyi tespit etmek için etkili bir teknik olduğu göstermiştir. İndüksiyon periyodu aşırı doygunluğun artmasıyla azalır ve bozunma ürünleri çekirdeklenme sürecini engellediğini ifade etmiştir (Shaohua Feng, 2006). Bunların dışında, Ergin (2021) ise farklı kompleks oluşturmak için kimyasal kullanmak yerine sadece proses koşullarını iyileştirerek daha saf ve verimli bir ürün elde etmeyi

amaçlamıştır. Bunun için yıkama metodunu, yıkama için farklı solüsyonları ve farklı sıcaklıkları kullanmıştır. Ayrıca, çalışmayı genel faktöriyel tasarım kullanarak optimize etmiştir. Çalışma sonucunda, oldukça yüksek ürün saflığı ve ürün verimi elde edildiği belirtilmiştir (Ergin, 2021).

Amct üretim prosesinin son aşaması olan yıkama prosesi, farklı yıkama metotları, farklı yıkama solüsyonları ve farklı sıcaklıklar kullanılarak Taguchi metodu ile gürültü-sinyal (S/N) oranının analizine başvurulmuş ilk defa bu çalışmada incelenmiştir. Çalışma sonucunda prosesin optimizasyonu noktasında bu güne kadar ihmal edilen yıkama prosesinin oldukça önemli olduğu görülmüştür. Sıcaklığın pH 6'da 15°C'den 25°C'ye yükseltilmesi, Amct'nin çözünürlüğü üzerinde önemli bir etkiye sahip değildir.

Rudolf ve ark., (2001) ve Diender ve ark., (2002) çalışmalarında, aynı pH aralığında 268 K'dan 298 K'ya 5 K'lık bir artışın Amct'nin çözünürlüğünde yaklaşık 0.44 mM'lik bir ortalama artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, sıcaklığın Amct'nin çözünürlüğü üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını gösterdiler. Literatürde, safsızlık olarak kullanılan 4-HPG için aynı pH aralığında 268 K'dan 298 K'ya her 5 K sıcaklık artışında 6 mM'lik bir azalma olduğu belirtilmektedir (Rudolph ve ark., 2001; Diender ve ark., 2002). Böylece sunulan veriler ışığında, sıcaklığın safsızlık olan 4-HPG'nin çözünürlüğünde daha etkili olduğu söylenebilir. Sıcaklığın bileşiklerin çözünürlüğü üzerindeki etkisi, kristal yapının entalpisinin sıfıra doğru eğilim gösterdiğini göstermiştir. Ayrıca kristal yapının entropisinin sıcaklığa duyarlı olmadığını da ortaya çıkarmıştır.

Rudolph ve ark., (2001), Amct/4-HPG kristal kafesinin yukarıda bahsedilen sıcaklığa karşı davranışına ilave olarak, bu iki maddenin farklı koşullar altında çözünürlüğünü etkileyen en önemli faktörlerden biri de hidrofobik özellikleridir. Rudolph ve ark. yaptıkları çalışmada Amct'nin 4-HPG'den neredeyse iki kat daha fazla hidrofobik özelliğe sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (Rudolph ve ark., 2001).

Douhéret ve ark., (2001), Franks, (2013), Bezerra ve ark., (2013) ise Amct ve 4-HPG'nin moleküler yapılarının birbirine benzer olmasına rağmen, 4-HPG'nin moleküler ağırlığının Amct'den daha küçük olduğunu, bunun da birçok çözücüde çözünmesini kolaylaştırdığını ifade etmişlerdir. Su ve Etilalkol dielektrik sabitleri sırasıyla 78.35 ve 24.60'dır. Dolayısıyla, Etilalkolün, polar çözünenleri çözme yeteneği suyunkinden daha düşüktür (Douhéret ve ark., 2001; Franks, 2013; Bezerra ve ark., 2013). Dolayısıyla, Etilalkol ve isopropilalkol kullanımı, çözünmüş moleküller arasındaki elektrostatik etkileşim yoluyla kümelenmeye izin verir. Çalışmada Etilalkol ve isopropilalkol kullanımı ortamın dielektrik sabitinde ve su aktivitesinde azalmaya neden olacağından çözünürlükte azalmaya neden olmuştur.

Bu çalışmada, bekletme süresinin etkisini göstermek amacıyla Amct/4-HPG kristal kafes üzerine tek aşamalı yıkama yöntemi, iki aşamalı yıkama yöntemi ve bekletme yöntemi, farklı yıkama solventleri uygulanmıştır. Bekleme süresinin artması ile kristalin ve kullanılan solventlerin temas süresi uzamıştır. Bu nedenle, kullanılan çözücüye bağlı olarak, Amct nispeten daha az çözülmüş ve kristal kafes içinde kalmış, 4-HPG ise çözelti fazına geçmiştir. Amct'nin yıkama verimi kalış süresinin 10 s'den 300 s'ye çıkarılmasıyla önemli ölçüde azalmıştır.

SONUÇ

Amoksisilin'in kristal yapısına moleküler yapı bakımından benzer olan 4-HPG'nin bir safsızlık olarak eklendiğinde kristal kafesten farklı kimyasallar kullanılmadan, sadece farklı yıkama yöntemleri kullanılarak uzaklaştırılmasının araştırılması literatür için oldukça önemli bir çalışmadır. Bu detaylı çalışma hem kesikli hem de sürekli proseslerin önemli bir parçası olan yıkama prosesine ışık tutmakta ve yıkamanın kristalizasyondaki önemini geniş bir perspektiften incelemektedir. Bu çalışma, üç

seviyeli yıkama yöntemi, üç seviyeli solvent ve iki seviye sıcaklık kullanılarak tasarlanmış ve deneyler Taguchi metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Özellikle sanayide kullanılan tek aşamalı yıkama yöntemi, maliyet-etkinlik-saflık-zaman dörtlü dengesi dikkate alınarak iki aşamalı yıkama ve bekleme yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Ana etki grafiğinden yıkama verim değerini etkileyen kritik faktörlerin sırasıyla yıkama yöntemi, sıcaklık ve çözelti olduğu görülmüştür. Tek aşamalı yıkama yöntemi, yıkama yöntemleri arasında en yüksek verim değerlerini ortaya koymuştur. Islatma yönteminde solüsyonun kalış süresinin etkisinden dolayı daha düşük yıkama verimi elde edilmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Alemzadeh I, Borghei G, Vafi L, Roostaazad R, 2010. Enzymatic synthesis of amoxicillin with immobilized penicillin g acylase. *Scientia Iranica. (Transaction C, Chemistry, Chemical Engineering)*, 17: 106-113.
- Alvarez AJ, Myerson AS, 2010. Continuous plug flow crystallization of pharmaceutical compounds. *Crystal Growth*, 10: 2219-2228.
- Bezerra I, Chiavone-Filho O, Mattedi S, 2013. Solid-liquid equilibrium data of amoxicillin and hydroxyphenylglycine in aqueous media. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30: 45-54.
- Bruggink A, Roos EC, de Vroom E, 1998. Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. *Organic Process Research & Development*, 2(2): 128-133.
- Diender MB, Straathof AJJ, Van Der Does T, Ras C, Heijnen JJ, 2002. Equilibrium modeling of extractive enzymatic hydrolysis of penicillin g with concomitant 6-aminopenicillanic acid crystallization. *Biotechnology and bioengineering*, 78(4): 395-402.
- Douhéret G, Davis MI, Reis JCR, Blandamer MJ, 2001. Isentropic compressibilities—experimental origin and the quest for their rigorous estimation in thermodynamically ideal liquid mixtures. *ChemPhysChem*, 2: 148-161.
- Elander RP, 2003. Industrial production of β -lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 385-392.
- Engel J, Kleemann A, Kutscher B, Reichert D, 2014. *Pharmaceutical Substances, 2009: Syntheses, Patents and Applications of the Most Relevant APIs*. Georg Thieme Verlag.
- Ergin A, Ergin MF, 2021. The role of antifouling coating in the marine industry. *Research & Reviews in Engineering*, 53.
- Ergin MF, 2021. Purification of amoxicillin trihydrate in the presence of degradation products by different washing methods. *CrystEngComm*, 23(46), 8121-8130.
- FDA, 2021. Drug Shortages [Online]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/drug-shortages>. [Accessed].
- Franks F, 2013. *Water in crystalline hydrates aqueous solutions of simple nonelectrolytes (Vol. 2)*, Springer Science & Business Media.
- Giron D, Goldbronn C, Mutz M, Pfeffer S, Piechon P, Schwab P, 2002. Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 68: 453-465.
- Hsi KHY, Concepcion AJ, Kenny M, Magzoub AA, Myerson ASJC, 2013. Purification of amoxicillin trihydrate by impurity-coformer complexation in solution. *CrystEngComm*, 15: 6776-6781.
- Kıvık T, 2014. Optimization of surface roughness and flank wear using the Taguchi method in milling of Hadfield steel with PVD and CVD coated inserts. *Measurement*, 50: 19-28.
- Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, Goossens H, Laxminarayan R, 2018. Global Increase and Geographic Convergence in Antibiotic Consumption Between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115: E3463-E3470.
- Kumar KK, Choudhury S, 2008. Investigation of tool wear and cutting force in cryogenic machining using design of experiments. *Journal of Materials Processing Technology*, 203: 95-101.
- Lin C, 2004. Use of the Taguchi method and grey relational analysis to optimize turning operations with multiple performance characteristics. *Materials And Manufacturing Processes*, 19: 209-220.

- Onar HÇ, Vardar BA, 2018. Synthesis and antioxidant activity of novel 8-formyl-4-substitued coumarins. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 32: 175-178.
- World Health Organization (WHO), 2018. *Who Report On Surveillance Of Antibiotic Consumption: 2016-2018 Early Implementation*.
- Rudolph ESJ, Zomerdijk M, Ottens M, Van Der Wielen LAM, 2001. Solubilities and partition coefficients of semi-synthetic antibiotics in water+ 1-butanol systems. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40: 398-406.
- Vartak S, Myerson AS, 2017. Continuous crystallization with impurity complexation and nanofiltration recycle. *Organic Process Research & Development*, 21: 253-261.
- Yaşa H, 2020. A Study On Catalyst Used In Mannich Reaction To Obtain B-Amino Carbonyl Compounds In Recent Years. *Theory Research In Science Mathematics II*, 73.
- Yaşa H, Ergin MF, Ergin A, Alkan G, 2016. Importance of inert gases for chemical transportation. *Proceedings Book*, 825.
- Youshko MI, Moody HM, Bukhanov AL, Boosten WH, Švedas VK, 2004. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of β -lactam antibiotics in highly condensed aqueous systems: Beneficial impact of kinetic substrate supersaturation: Beneficial impact of kinetic substrate supersaturation. *Biotechnology and Bioengineering*, 85: 323-329.