
Bazı Sefalosporinlerin Gama Radyasyonuyla Sterilizasyonunun Mikrobiyolojik Açıdan Değerlendirilmesi

Uzm. Ecz. Vahide LİMAN

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Radyofarmasi Anabilim Dalı, ANKARA

Birinci kuşak sefalosporin olan sefazolin sodyum (CFZ-Na) beta-laktam grubu antibiyotikler arasında yer almaktadır. Bakterisidal etkili geniş spektrumlu semi-sentetik bir sefalosporindir. 1948 yılında *Cephalosporium acremonium* adlı fungusdan sefalosporin C elde edilmiştir. Kimyasal modifikasyonlarla sefalosporin C'den şu anda yaygın olarak kullanılan yarı-sentetik sefalosporinler elde edilmektedir. Söz konusu ilaçlar, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin hücre duvarı sentezini inhibe ederek etki gösterirler (1). Çeşitli enfeksiyonlar ve cerrahi işlem sonrası profilaktik amaçla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Sefalosporinlerden değişik şekillerde veterinerlik alanında da yararlanılmaktadır (2).

CFZ-Na'un seruma bağlanma oranı %74 civarlarında, vücutta parçalanmaya karşı dirençli bir antibiyotiktir. Karaciğerde hemen hemen hiç inaktive edilmez. Değişmeksizin idrarla atılır. Gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalara karşı geniş bir aralıkta etkilidir. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, A grubu beta-hemolitik streptokoklar, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* türleri, *Enterobacter aerogenes*, *Haemophilus influenzae* etkili olduğu bakteri türleri arasında sayılabilir. CFZ-Na'un kullanıldığı başlıca endikasyonlar idrar yolu, deri ve yumuşak doku, safra yolu, kemik enfeksiyonları ve genital enfeksiyonlar, septisemi, endokardit, preoperatif profilaksi olarak sıralanabilir (3).

CFZ-Na, klinikte parenteral kullanımı olan bir antibiyotiktir. Monografında da belirtildiği gibi ürünlerin apirojen ve steril olması gerekmektedir (4). Stabili-

tesisi sıcaklık ve gün ışığından oldukça etkilenen ve buna bağlı olarak farmakolojik aktivitesini yitiren CFZ-Na'un sterilizasyonu oldukça hassas bir konudur. İlaç endüstrisinde uygulanan sterilizasyon işlemleri, uygulama şekillerine göre farklılık göstermektedir. Buna göre uygulanmakta olan sterilizasyon teknikleri şöyle sıralanmaktadır (5):

- Buhar sterilizasyonu veya otoklav sterilizasyonu,
- Kuru ısı sterilizasyonu,
- Etilen oksit (EO) sterilizasyonu,
- Aseptik filtrasyon,
- Radyasyonla sterilizasyon.

Sefalosporin grubu gibi bazı antibiyotikler için özellikle yüksek sıcaklıklarda hidrolize olmaları nedeniyle kullanılacak sterilizasyon yöntemleri oldukça kısıtlıdır. Otoklavla sterilizasyon gibi yüksek sıcaklık gerektiren teknikler de bu nedenle elimine olmaktadır. Parenteral preparatların sterilizasyonunda kullanılan aseptik tekniğin maliyeti oldukça yüksektir. EO ile sterilizasyon ise kalıntı bırakmakta ve kalıntının uzaklaştırılması için gerekli bekleme süresinin uzun olması da zaman kaybına neden olmaktadır (5).

Radyosterilizasyonda noniyonize ve iyonize radyasyon kullanılmıştır. Noniyonize radyasyonun IR ve UV olarak iki önemli formu vardır. İkisi de farklı mekanizmalarla etkilidirler. Şöyle ki: IR oluşturduğu ısı ile tahribat gücüne sahiptir. UV ise hücre bileşenlerinde çeşitli kimyasal reaksiyonlara neden olarak ölüme sebep olur. Fakat iki süreç de farmasötiklerde ve cerrahi malzemelerin sterilizasyonunda istenmeyen kimyasal reaksiyonlara sebep olurlar. Bu nedenle tercih edilmezler (6).

İyonize radyasyon özelliği taşıyan yüksek enerjili elektron ve gama radyasyonunun mikroorganizmaları öldürücü etkileri vardır. Bununla ilgili iki teori öne sürülmüştür: Birincisi direkt olarak DNA hasarı, diğeri de DNA'da meydana gelen ikincil reaksiyonlarla serbest radikal oluşumu ve radikallerin inaktivasyona neden olmasıdır (6).

Endotoksin düzeyinin azaltılması, sterilizasyon yöntemleri arasında sadece gama radyasyonu ile sterilizasyon ile başarılmıştır. Bu da radyasyonla sterilizasyonun en önemli avantajlarından biridir (7).

Radyosterilizasyonun uygulanmasında iki önemli problem vardır. Birincisi: Gama radyasyonu ile sterilizasyonun yönteminin düşük konsantrasyonlarda da olsa radyolitik ürün vermesidir. Sterilizasyonun güvenliğini sağlamak için radyolitik ürünlerin oluşma mekanizmalarının aydınlanması gerekmektedir. İkinci olarak da: Radyosterilizasyon düzenlemesinin farklı ülkelerde farklı yorumlanması olarak belirtilmektedir (8).

Farmasötiklerin sterilizasyonunda iyonize radyasyonun kullanımının artması, sefalosporin grubu antibiyotikler üzerinde gama radyasyonun etkilerini inceleyen

çalışmaların da hızlanmasına neden olmuştur. Günümüzde endüstriyel alanda radyasyonun kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Bu, nükleer reaktörlerle enerji elde edilmesinden, gama radyasyonunun çeşitli ürünlerin sterilizasyonunda kullanılmasına kadar geniş bir yelpazede örneklenabilir. Özellikle steril ürünün söz konusu olduğu ilaç endüstrisi açısından bu yöntem oldukça önemlidir. Gama radyasyonu ile sterilizasyon, işlem esnasında sıcaklık artışı gerektirmemekle beraber ürün üzerinde çok düşük sıcaklık artışlarına neden olması, toz ve likit ürünlere uygulanabilirliği, validasyonun kolay olması gibi özellikleriyle klasik sterilizasyon yöntemlerine üstünlük göstermektedir. Ayrıca gama ışınlarının penetrasyonu yüksektir ve paketlenmiş ürünlerin ışınlanmasına izin vermektedir. Bu da zaman ve maliyet bakımından oldukça avantaj sağlamaktadır. Radyasyonla sterilizasyonda kısıtlayıcı tek parametre, ürün üzerine uygulanacak radyasyon dozunun seçimidir. Gama radyasyonu ile sterilizasyon yöntemi ilk olarak BP 1993 ve USP XVII'de endüstriyel sterilizasyon yöntemleri arasında yer almıştır. Farmakopelerce kabul edilen sterilizasyon dozu ise ürünün mikrobiyal yüküne bağlı olarak değişmekle beraber 25 kGy olarak belirtilmektedir (9,10).

Bazı Sefalosporin Grubu Antibiyotiklerin Gama Radyasyonu ile Sterilizasyonunun Mikrobiyolojik Yönünden Değerlendirilmesi

Gama radyasyonunun söz konusu antibiyotikler için oldukça avantajlı olması nedeniyle günümüze kadar birçok sefalosporin üzerinde gama radyasyonu ile ışınlanmaları araştırılmış ve sterilizasyonlarının fizibilitesi yapılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla etkin maddelerin ve ticari preparatlarının çeşitli dozlarla ışınlandıktan sonra radyasyon stabilitelelerinin değerlendirilmesi için fizikokimyasal ve mikrobiyolojik testler yapılmıştır. Yapılan bazı mikrobiyolojik çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Toz haldeki **sefaloridin**, 10, 25 ve 50 kGy'lerde ışınlanmış ve antimikrobiyal aktivitesinin etkilenmediği gözlenmiştir. Sefaloridin örneklerine 10^6 *B. pumilus* spuru eklenerek yapılan sterilite testi sonuçlarında en düşük radyasyon dozuna tabi tutulan örnekte dahi üreme görülmemiştir (11-13). Yapılan diğer bir çalışmada, katı haldeki sefaloridin 100 kGy'ye kadar ışınlanmış ve antibiyotik aktivitesi değişmemiştir. Konsantrasyonu bilinmeyen sefaloridin sulu çözeltisi 25 kGy'lik radyasyon dozu ile ışınlandığında antibiyotik aktivitesini kaybetmiştir (14).

Katı haldeki **sefalotin sodyumun** ışınlandığı bir başka çalışmada, gama radyasyonunun maddenin potensini azalttığı saptanmıştır. Fleuretti, katı haldeki sefalotin sodyumu 100 kGy'ye kadar ışınlanmış ve bileşiğin antibiyotik aktivitesinin 25 kGy'de %2 ve 100 kGy'de %13 kadar azaldığını bildirmiştir. Konsantrasyonu bilinmeyen sulu çözeltilerinin antibiyotik aktivitesi 25 kGy'de tamamen kaybolmuştur (14). Bu madde ile yapılan diğer bir çalışmada ise sefalotin sodyumun aktivitesi 25 kGy'de %2.3, 50 kGy'de %5.7 oranında azalmıştır (15).

Yapılan başka bir çalışmada katı haldeki **sefradin** 5-25 kGy doz aralığında ışınlanmıştır. Sonuçta sefradinin bakterisidal aktivitesinin doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (16). Sefradin ile yapılan diğer bir çalışmada da 25 ve 50

kGy'lik radyasyon dozları kullanılmıştır. *S. aureus* (Teva 29) kullanılarak mikrobiyolojik ölçümler yapılmıştır. Bakterinin inhibisyon çapı ve antibiyotik konsantrasyonu arasındaki ilişkiden yararlanılarak elde edilen mikrobiyolojik analiz sonuçlarına göre sefradinin mikrobiyolojik potensi, 25 kGy'de %89 ve 50 kGy'de %67 olarak tespit edilmiştir (26).

Sefaleksim kuru halde ışınlanmıştır. Mikrobiyal ölçümler göstermiştir ki; sefaleksinin potensi 10 kGy'de %0.1, 25 kGy'de %3 ve 50 kGy'de %7'ye kadar azalmaktadır (11-13).

B. subtilis'e karşı yapılan mikrobiyal aktivite testinde 85 kGy uygulamadan sonra dahi herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bulunan sonuçlara göre sefuroksimin gama radyasyonu sterilizasyona uygun olduğu düşünülmüştür (17).

Sefotaksim ile yapılan bir çalışmada, söz konusu antibiyotik 5-46 kGy doz aralığında ışınlanmıştır. *E. coli* (ATCC 12305) kullanılarak yapılan mikrobiyolojik aktivite çalışmaları sonucunda 46 kGy'de ışınlanan sefotaksim aktivitesinin değişmediği gözlenmiştir (17). Sefotaksim ile yapılan diğer bir çalışmada da 25 ve 50 kGy'lik radyasyon dozları kullanılmıştır. 10^6 *B. pumilus* sporu eklenerek yapılan sterilite güvence düzeyi (SAL) dozu tayini çalışmalarında 25 kGy radyasyon dozunda üreme olmadığı tespit edilmiştir (26).

Sefoksitin sodyum üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, madde ^{137}Cs gama radyasyonu kaynağı ile 25 ve 50 kGy'lerde ışınlanmıştır. Işınlanmış ve ışınlanmamış örneklerin kimyasal analizleri, mikrobiyolojik ölçümleri ve sterilite testleri yapılmış; erime noktası, TLC ve UV absorban sonuçları verilmiştir. Bunlara göre 50 kGy'ye kadar ışınlanan sefoksitin sodyumun bozunmadığı tespit edilmiştir. Sefoksitin sodyum örneklerine 10^6 *B. pumilus* sporu eklenerek yapılan sterilite testinin sonucunda yaygın olarak kullanılan 25 kGy'lik radyasyon dozu uygulanan örneklerde bakteriyel üreme olmamıştır. Sefoksitin sodyum, kimyasal yapısı itibarıyla radyasyona oldukça dayanıklıdır ve bu özelliği radyasyonla sterilizasyonuna izin vermektedir (18).

Gama radyasyonu sterilizasyonda en önemli kritik nokta ışınlama dozudur. Çünkü yaygın olarak kullanılan 25 kGy'lik dozun, ışınlanan maddenin cinsine göre istenmeyen kimyasal ve fiziksel değişikliklere neden olabileceği bildirilmiştir (19). Bir maddenin, radyasyonla sterilizasyon işlemine tabi tutulmadan önce, bu işleme uygunluğu araştırılmalıdır. Özellikle komplike bileşiklerde, radyolitik bozunma ürünleri incelenerek, ürün stabilitesinin korunma derecesi ve sterilizasyonun kalitesi tayin edilebilir. Radyasyonla sterilizasyonla, farmasötik ürünün yapısında ve aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin tespiti, onun bu işleme uygunluğu hakkında bilgi verecektir. Bu amaçla preparatın ışınlama öncesi ve sonrası fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmelidir.

Bu amaçla çalışmamız kapsamında ışınlanmayan örneklerin kontrol grubu olarak kullanıldığı ve 5, 10, 25 ve 40 kGy'lik radyasyon dozlarında ışınlanan CFZ-Na toz örnekler ve CFZ-Na içeren ticari liyofilize parenteral preparatlar

üzerinde fizikokimyasal ve mikrobiyolojik incelemeler yapılmıştır (20). Bu çalışma ile sahip olduğu avantajlarla konvansiyonel sterilizasyon yöntemlerine oldukça önemli bir alternatif olan gama radyasyonu sterilizasyon tekniği CFZ-Na açısından irdelenmiş ve elde edilen sonuçların Türk ilaç endüstrisine ışık tutacağı düşünülmüştür.

DENEYLER ve BULGULAR

5, 10, 25 ve 40 kGy'lik radyasyon dozlarında ışınlanan CFZ-Na toz örneği ve ticari ürünleri üzerinde yapılan mikrobiyolojik incelemeler Tablo 1'de gösterilmiştir.

A. TOZ CFZ-Na

Uygulanan dört farklı radyasyon dozunun toz maddenin antimikrobiyal aktivite düzeyinde oluşturabileceği değişimler incelenmiştir. Bu amaçla yapılan mikrobiyal aktivite testi aşağıda açıklanmıştır.

Mikrobiyal Aktivite Testi

Test edilecek bileşiğin antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesinde "National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS)"ın önerdiği mikrodilüsyon yönteminden yararlanılmıştır (21). Buna göre mikroorganizma inokulumu hazırlanarak mikrodilüsyon yöntemiyle antibakteriyel aktivite saptanmıştır.

Mikroorganizma inokulumu hazırlanması: Bakteriler için Muller-Hinton agar (MHA) 18-24 saat 37°C'de üretilmiş mikroorganizma referans suşlarının kültürlerinden Muller-Hinton broth (MHB) içeren tüplere ekim yapılmış ve 37°C'de 2-6 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tüplerdeki bulanıklık, 0.5 McFarland süspansiyonuna ($1-2 \times 10^8$ cfu/mL⁻¹) eşdeğer bulanıklığa getirilmiştir. Distile su veya serum fizyolojik kullanılarak son inokulum 5×10^5 cfu/mL⁻¹ olacak şekilde sulandırılmıştır.

Kullanılan Standart Bakteri Suşları:

<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
<i>E. coli</i>	ATCC 25922

Tablo 1. Toz CFZ-Na ve ticari liyofilize parenteral preparatları üzerinde yapılan mikrobiyolojik çalışmalar.

a. Toz CFZ-Na	b. Ticari liyofilize parenteral preparatları (T1 ve T2)
<ul style="list-style-type: none">• Mikrobiyal aktivite	<ul style="list-style-type: none">• Mikrobiyal aktivite• Sterilite• Pirojenite• SAL dozunun tespiti

Mikrodilüsyon işlemi: Antibakteriyel aktivite çalışmasında damlatıcı ile mikrotitrasyon yolaklarının her bir çukuruna 50'şer μL MHB besiyeri konmuştur. Daha sonra her sıranın ilk çukuruna daha önce stok çözeltileri ile hazırlanmış olan antibakteriyel aktiviteleri araştırılan bileşikler ve standart antibiyotiklerin çözeltilerinden 50'şer μL eklenmiştir. Çok kanallı pipet yardımı ile bütün maddelerin iki kat artan dilüsyonları yapılmıştır. Böylece karşılaştırılacak bileşikler için $512-0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$, standart antibiyotikler için ise $64-0.625 \mu\text{g/mL}^{-1}$ olacak şekilde dilüsyonlar elde edilmiştir. Mikrotitrasyon plaklarının son sırasındaki çukurlarının biri üreme kontrolü (besiyeri + mikroorganizma) diğeri ise besiyeri (sadece besiyeri) kontrolü olarak kullanılmıştır. Plaklar hafifçe çalkalanarak bakteriler için 35°C 'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda bakteriler için gözle görülür bulanıklığın olmadığı son çukur, çalışılan bileşik ve standart için (tobramisin) minimum inhibitör konsantrasyon [Minimum Inhibitor Concentration (MİK)] değeri olarak belirlenmiştir.

Toz CFZ-Na'un ışınlama önce ve sonrası elde edilen MİK değerleri Tablo 2'de belirtilmiştir. *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı yapılan antimikrobiyal aktivite testine göre toz maddenin antimikrobiyal aktivitesinde artan radyasyon dozu ile değişme gözlenmemiştir.

B. TİCARİ LİYOFİLİZE PARENTERAL CFZ-Na PREPARATLARI

Maddenin monografında steril ve apirojen olması gerektiği belirtilen parenteral dozaj formlarının gama radyasyonu ile sterilizasyonu sonucunda bu özellikleri taşıyıp taşımadığı pirojenite ve sterilit testleri ile irdelenmiştir. Ticari ürünlerin, toz maddede olduğu gibi antimikrobiyal aktivitelerinde ışınlamayla herhangi bir değişim olup olmadığı mikrobiyal aktivite testi ile incelenmiştir. Ayrıca gama radyasyonu ile sterilizasyon işleminde sterilizasyonun hangi dozlarda sağlandığını belirten SAL dozu tespiti ile sterilit ve pirojenite testleri de yapılmıştır.

Mikrobiyal Aktivite Testi

CFZ- Na içeren ticari, liyofilize parenteral preparatlar (T1 ve T2) için yapılan mikrobiyal aktivite testleri, toz madde de olduğu gibi yapılmıştır. Işınlanan ve ışınlanmayan T1 ve T2 ticari preparatlarının *S. aureus* ve *E. coli* suşlarına karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Işınlanmayan preparatlarla antimikrobiyal aktivite yönünden farklı dozlarda ışınlanan preparatlar arasında fark olmadığı gözlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3'te gösterilmiştir.

Etkin madde	MİK ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)									
	Işınlanmamış	<i>S. aureus</i>				Işınlanmamış	<i>E. coli</i>			
		5	10	25	40		5	10	25	40
CFZ-Na	1	1	1	1	1	4	4	4	4	4

Tablo 3. Işınlama önce ve sonrası ticari parenteral preparatların antimikrobiyal aktiviteleri.

Preparat	MİK ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)									
	<i>E. coli</i>					<i>S. aureus</i>				
	Işınlanmamış	5	10	25	40	Işınlanmamış	5	10	25	40
T1	4	4	4	4	4	1	1	1	1	1
T2	4	4	4	4	4	1	1	1	1	1

Sterilite Testi

Ticari preparatların sterilite testi, 10^6 cfu/mL⁻¹ oranında *B. pumilus* sporları ilave edilmiş örnekler üzerinde “Soybean-Casein Digest Medium (SCDM)” ve “Fluid Thioglycollate Medium (FTM)” ortamları kullanılarak yapılmıştır. Işınlanan numuneler SCDM ve FTM ortamlarına aktarılmadan önce membran filtrelerden, aseptik şartlarda süzülerek ticari preparatların etkin maddesi olan CFZ-Na ortamdan uzaklaştırılarak uygulanan radyasyonun mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin belirlenmesi sağlanmıştır.

FTM testi: Anaerop mikroorganizmalar için kullanılmıştır. 59.6 g FTM 200 mL’lik balon-jojede distile su ile süspanse edildikten sonra FTM 100°C’lik su banyosunda ısıtılarak çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavda sterilizasyonun sonunda soğumaya bırakılmıştır. Son pH’nın 7.1 olup olmadığı kontrol edilerek steril cam tüplere 15’er mL olacak şekilde bölünmüştür. Örneklerden 1’er mL ekim işlemi bek alevi yanında gerçekleştirilmiştir. Ekim işlemi tamamlanan tüpler 35°C’de iki hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İki haftalık süre boyunca ve sonunda tüplerde üreme olup olmadığı incelenmiştir.

FTM içeriği: 1 L için;

Maya ekstratı	5.0 g
Trypton	15 g
Dekstroz	5.5 g
Sodyum tiyoglikolat	0.5 g
L-sistein	0.5 g
Sodyum klorür	2.5 g
Rezasurin	0.001 g
Agar No: I	0.5 g

SCDM testi: Aerop mikroorganizma ve mantarlar için kullanılmıştır. 60 g SCDM 200 mL’lik balon-jojede distile su kullanılarak çözülmüş ve FTM ortamı gibi otoklavda sterilite edilerek hazırlanmıştır. Son pH’nın 7.3 olup olmadığı kontrol edilmiştir. FTM testinde yapılan işlemler aynen tekrarlanmış ve ekim sonrası tüpler farklı olarak oda ısısında 2 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

SCDM içeriği: 1 L için;

Kazeinin pankreatik özütü	17 g
Soya fasulyesi papaik özütü	3 g
Sodyum klorür	5 g
Dipotasyum fosfat	2.5 g
Dekstroz	2.5 g

Işınlanmadan önce *B. pumilus* sporları ile sterilitesi bozulan ticari ürünlerin ışınlama sonrasında steril oldukları gözlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4'te gösterilmiştir. Her iki ticari preparat için iki ortamda da üreme olmadığı belirlenmiştir.

Pirojenite Testi

Gama radyasyonu ile sterilize edilen ticari preparatların apirojenik olup olmadığı LAL testi ile incelenmiştir (22).

Bu test, ticari olarak liyofilize halde bulunan 10 testlik 0.25 IU/mL⁻¹'lik ticari LAL kitleri kullanılarak ve steril cam deney tüplerinde yapılmıştır. 5, 10, 25 ve 40 kGy radyasyon dozlarında ışınlanan örnekler üzerine, 0.1 mL LAL örneği eklenecek tüpte karıştırılmış ve 1 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca deneyde kullanılan pirojensiz su içinde kontrol amacı ile aynı işlemler tekrarlanmıştır. Deneyler pirojen içermeyen-steril malzemeler kullanılarak laminar flow kabinlerde gerçekleştirilmiştir. Deney süresi sonunda tüm örnekler için jel oluşumuna bakılmıştır.

Gama radyasyonu ile sterilizasyonu amaçlanan ticari ürünlerin ışınlama sonucunda yapılan pirojenite testi ile apirojen oldukları tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 5'te verilmiştir.

SAL Dozunun Belirlenmesi

Klinik uygulamalarda özellikle antibiyotikler için parenteral kullanım şekli oldukça yaygındır. Parenteral yolla, ilaç direkt sistemik dolaşıma geçtiği için uygun sterilite şartlarını sağlamalıdır. Bu şartlar, SAL yani geçerli sterilizasyon işlemi sonrasında, ürünün beklenen maksimum steril olma olasılığı şeklinde açık-

Tablo 4. Işınlanma sonrası ticari parenteral preparatların sterilite testi sonuçları.

Preparat	Mikrobiyal üreme									
	FTM ortamı (35°C)					SCDM ortamı (25°C)				
	Işınlanmamış	5	10	25	40	Işınlanmamış	5	10	25	40
T1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
T2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Tablo 5. Işınlama sonrası parenteral preparatların pirojenite testi sonuçları.

Preparat	Mikrobiyal üreme test sonucu**				
	Işınlanmamış	5*	10*	25*	40*
T1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
T2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

* kGy (ışınlama dozu)
** Test süresi (1 saat, inkübasyon sıcaklığı 37°C)
(-) Jelleşme gözlenmemiştir.

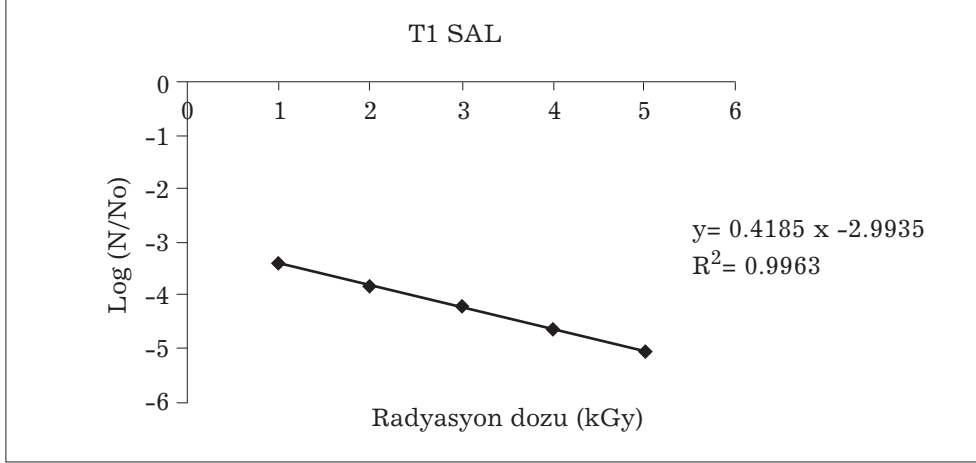
lanabilir. Son ürün parenteral olarak kullanılacaksa SAL 10^{-6} 'dır. Bu değer ürünün kullanım şekline göre: Parenteral preparatlar, göz damlaları ve göz merhemleri için 10^{-6} , parenteral dışı kullanım için ise SAL 10^{-3} olarak bildirilmiştir (23).

Kullanılan ticari preparatlarda (T1 ve T2) SAL 10^{-6} 'yı sağlayacak radyasyon dozunun bulunması için, radyasyona en az duyarlı olan *B. pumilus* sporları preparatlara ilave edilmiştir. Daha sonra çalışmanın başında 5, 10, 25 ve 40 kGy olarak belirlenen radyasyon dozlarında ışınlanmışlardır. Sterilite testinde belirtildiği gibi, membran filtrasyon tekniği kullanılarak filtre üzerinde toplanan mikroorganizmaların ölüm oranları logaritmik olarak belirtilmiştir.

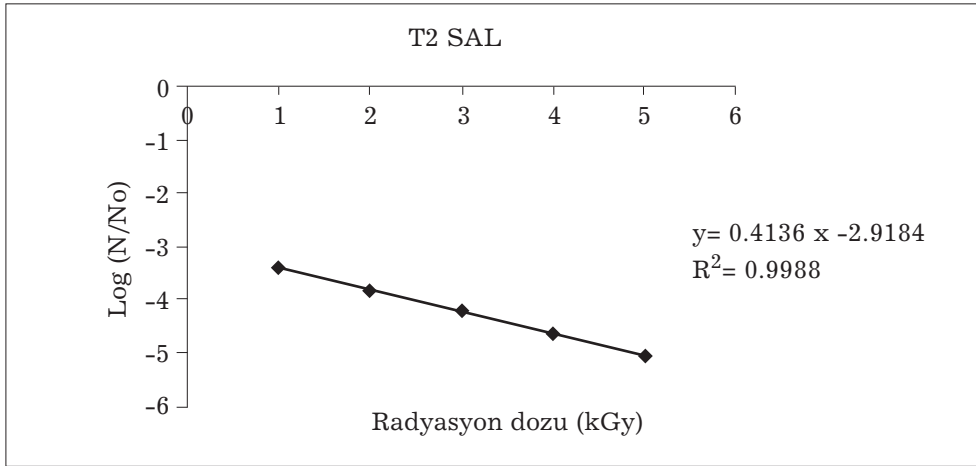
B. pumilus sporlarının oluşturulması: Tek doz *B. pumilus* bakterisi "nutrient broth"da 37°C'de 24 saat üretildikten sonra kültür Soybean agarda 37°C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Elde edilen sporlar steril su ile karıştırılmıştır. Oluşan süspansiyon 3 kez 15 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek yıkanmıştır. Tekrar distile su ile süspansiyon edildikten sonra süspansiyon, yaşayan vejetatif bakterileri inhibe etmek için 80°C'ye ısıtılmış ve aniden soğutulmuştur. Elde edilen süspansiyondaki spor sayısı hesaplanmıştır.

Mikroorganizmaların ölüm oranlarının tespit edilmesi: Örnekler radyasyona tabi tutulmadan önce konsantrasyonu bilinen *B. pumilus* sporlarıyla infekte edilmiştir. Bakteri sporları ilave edilen örnekler, belirlenen 5, 10, 25 ve 40 kGy radyasyon dozlarında ışınlanmıştır. Daha sonra örneklerdeki mikroorganizmalar sayılarak radyasyon dozuna karşı log mikroorganizma ölüm oranları grafiklenerek her bir preparat için SAL 10^{-6} 'yı sağlayacak radyasyon dozu saptanmıştır. Parenteral çözeltiler için sterilizasyonu sağlayan radyasyon dozu, Doz-Log (ölüm) oranı grafiklerinden bulunmuştur. Her iki ticari ürün için elde edilen grafikler Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Çizilen grafikler yardımıyla bulunan SAL dozları T1 ve T2 preparatları için sırasıyla 7.18 ve 7.45 kGy olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu iki preparat için ortamda bulunan mikroorganizma sayısını 10 faktörü ile azaltan dozu ifade eden D_{10} değerleri de hesaplanmıştır. Buna göre T1 ve T2 preparatları için D_{10} değerleri sırasıyla 2.38 ve 2.41 kGy'dir.



Şekil 1. T1 ticari preparatına ait doz-log (ölüm) oranı grafiği.



Şekil 2. T2 ticari preparatına ait doz-log (ölüm) oranı grafiği.

TARTIŞMA

Farmasötik ürün üzerinde uygulanacak sterilizasyon işleminin seçimi oldukça önemlidir. Sterilizasyonun gerektirdiği ortam şartları, ürün veya hammaddenin fizikokimyasal özelliklerini ve farmakolojik aktivitesini değiştirmemelidir.

Işınlama yeni toksik radyolitik ürünlerin oluşmasına, dolayısıyla ışınlanmış yapının saflık profilinin değişmesine neden olabilir (24). Maddede meydana gelen değişikliklerin aktivitesi üzerinde oluşturabileceği değişiklikler incelenmelidir. Radyasyonla sterilizasyonun etkin ve güvenli şekilde kullanılması için ürünün fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve biyolojik olarak incelenmesi gerekir. Ürünün ste-

rilizasyonunu sağlayan radyasyon dozunun belirlenmesi için yapılan fizibilite çalışmalarında yapılması gereken testler şöyle sıralanmaktadır (25).

Fizikokimyasal testler: Etkin madde ve radyoliz ürünlerinin belirlenmesi, farmasötik dozaj formuna ait dansite, pH ve partiküler madde gibi kalite kontrol testleri ile meydana gelen değişikliklerin incelenmesi.

Mikrobiyolojik testler: Sterilite testleri, SAL dozunun belirlenmesi ve mikrobiyolojik aktivite testleri.

Biyolojik testler: Toksikite, mutajenite, irritasyon ve antiinflamatuvar etki testleri olarak özetlenmektedir.

Toz CFZ-Na ve ticari liyofilize parenteral preparatları üzerinde, gama radyasyonu ile sterilizasyon işlemi (5, 10, 25 ve 40 kGy) ardından fizikokimyasal (organoleptik değerlendirme, pH ölçümü, UV, İTK, NMR, ESR, IR ve HPLC çalışmaları) ve mikrobiyolojik incelemeler yapılmıştır. Işınlanmayan örneklerin kontrol grubu olarak kullanıldığı deneysel çalışmalarla gama radyasyonu ile sterilizasyonun, toz madde ve ticari ürünler üzerinde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Böylece gama radyasyonu ile sterilizasyonun CFZ-Na üzerinde uygulanabilirliği belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre; radyasyona tabi tutulan CFZ-Na etkin maddesinin toz ve ticari liyofilize parenteral preparatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin artan radyasyon dozundan etkilenmediği gözlenmiştir. Ticari preparatlarında (T1 ve T2) yapılan sterilizasyon işlemi sonunda steril ve apirojen oldukları belirlenmiştir. Sterilizasyonu sağlayan gama radyasyon dozu (SAL) ise 10 kGy civarındadır. Ayrıca, bu iki preparat için ortamda bulunan mikroorganizma sayısını 10 faktörü ile azaltan dozu ifade eden D_{10} değerleri de hesaplanmıştır. Buna göre T1 ve T2 preparatları için D_{10} değerleri sırasıyla 2.38 ve 2.41 kGy'dir.

T1 ve T2 ticari preparatlarının SAL dozunun tayininde *B. pumilus* bakterisi kullanılmıştır. Bu nedenle devamında hesaplanan D_{10} dozu da *B. pumilus* türleri için geçerli olan gama radyasyon dozudur. Açık havada bulunan söz konusu bakteri türleri için hesaplanan D_{10} değeri 1.7 kGy olarak belirtilmiştir (27). İki ticari ürün için de bulunan değerler 1.7'den yüksektir.

D_{10} değeri radyasyon direncini değiştiren faktörlerle değişmektedir. Bu faktörler arasında liyofilizasyon işlemi de yer almaktadır. Kurutarak dondurma olarak ifade edilen liyofilizasyon ortamda bulunan nemin uzaklaşmasına neden olarak radyasyon direncinin artmasına yol açar. Liyofilizasyonla hazırlanan T1 ve T2 ticari parenteral preparatlarının D_{10} değerlerinin *B. pumilus*'un açık hava için tespit edilen D_{10} değerlerinden yüksek olması bu şekilde açıklanabilmektedir.

CFZ-Na etkin madde ve ticari liyofilize parenteral preparatları üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bu madde ve ürünlerin farmakopelerce kabul edilen sterilizasyon dozu olan 25 kGy'den daha düşük ve valide edilmiş radyasyon dozlarında (10 kGy) gama radyasyonu ile sterilizasyon yapılabilmektedir. Elde edilen sonuçlar mikrobiyal aktivite, pirojenite ve sterilite testleri ve SAL dozu tayinlerinin yapıldığı mikrobiyolojik çalışmalarla da desteklenmektedir (20).

KAYNAKLAR

1. Yun EK, Prince AJ, McMillin JE, Welch LE. HPLC separation and electrochemical detection of cephalosporins. *J Chromatogr B* 1998;712:145-52.
2. Gilman AG, Goodman LS, Gilman A. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6th ed. New York: Macmillan, 1980:1147.
3. Cefamezin (i.v.-i.m. 1000 mg) Prospektüs, Eczacıbaşı İlaç ve Tic. A.Ş, 2003.
4. *European Pharmacopeia* 3. Basım, France, 1997:573-5.
5. Olguner G, Özer AY. Radyasyonla sterilizasyon: II ilaçların radyasyonla sterilizasyonu, *FABAD. J Pharm Sci* 2000;25:53-73.
6. Gopal NGS. Radiation sterilization of pharmaceuticals and polymers. *Radiat Phys Chem* 1978;12:35-50.
7. Reid BD. Gamma Processing Technology: an alternative technology for terminal sterilization of parenterals PDA. *J Pharm Sci & Technology* 1995;9:83-9.
8. Miyazaki T, Kaneko T, Yoshimura T, Crucq AS, Tilquin B. ESR study of radiosterilization of antibiotics: ceftazidime. *J Pharm Sci* 1994;83:68-71.
9. *The British Pharmaceutical Codex (B.P.C.)*. The Pharmaceutical Press, London: Appendix XVIII, 1993:A197.
10. *United States Pharmacopeia (USP) XXVI/NF XXI <1211>*, United States Pharmacopeial Convention Inc, USA, 2003:2434.
11. Jacobs GP. The gamma irradiation of cephalosporins. *Trans. Israel. Nuclear Soc* 1978;6:14E-6E.
12. Jacobs GP. Cephalosporin powders sterilized by gamma-rays. *J Pharm Pharmacol* 1979;31:56-65.
13. Jacobs GP. A review: radiation sterilization of pharmaceuticals. *Radiat Phys Chem* 1985;26:133-42.
14. Fleuretti JS, Madler S, Transy MJ. Active bacteriostatique de differentes antibiotiques epres irradiat par rayans gama, in radiosterilization of medical products IAEA. Vienna, IAEA SM 192/15, 1974:239-51.
15. Jacobs GP. A review of the effects of gamma radiation on pharmaceutical materials. *J Biomat Appl* 1995;10:59-96.
16. Abuirjeie MA, Abdel-Aziz AA, Abdel-Hamid ME. Feasibility Studies on Radiation Sterilization of Cephradine. *Drug Dev Ind Pharm* 1990;16:1661-73.
17. Zegota H, Koprowski M, Zegota A. Stability of cefuroxime following gamma - irradiation in the solid state. *Radiat Phys Chem* 1994;43:343-8.
18. Jacobs GP. Radiosterilization of cefoxitine sodium. *Int J Pharm* 1981;7:279-83.
19. Dam AM, Gazso LG, Kaewpila S, Maschek I. Radiation treatment of pharmaceuticals. *Radiat Phys Chem* 1996;47:515-7.
20. Liman V. Hacettepe Univ., Inst. Health Sci., Master Thesis in Radiopharmacy, Ankara, 2005.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standarts, Jan 1998, Vol: 18.
22. *United States Pharmacopeia (USP) XXIII*. The Limulus Amoebocyte Lysate Test. USA: Conv Inc, 1995:1696-7.
23. Gopal NGS. Radiation Sterilization and Treatment of Medical Products: Current Practices, Regulations and Standarts. Consultants Meeting Training Guidelines for Industrial Radiation Sterilization Israel, 1995:7-25.

24. Barbarin N, Tilquin B. Study of nonvolatile degradation compounds produced by radiosterilization of cefotaxime. *Radiat Phys Chem* 2001;60:359-67.
25. Gopal NGS, Patel KM, Sharma G, Bhalla HL. Guide for radiation sterilization of pharmaceuticals and decontamination of raw materials. *Radiat Phys Chem* 1988;32:619-22.
26. Jacobs GP. Stability of cefazolin and other new cephalosporins following gamma irradiation. *Int J Pharm* 1983;17:29-38.
27. Manual on Radiation Sterilization of Medical and Biological Materials, IAEA, Austria, 1973: 6-16.