



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ NESİL KOLONLAR KULLANILARAK
BAZI FLOROKİNOLON GRUBU
ANTİBİYOTİKLERİN BİYOLOJİK SIVILARDA
EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN SIVI
KROMATOĞRAFİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Sercan YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ NESİL KOLONLAR KULLANILARAK
BAZI FLOROKİNOLON GRUBU
ANTİBİYOTİKLERİN BİYOLOJİK SIVILARDA
EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN SIVI
KROMATOĞRAFİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Sercan YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

Prof. Dr. Münevver SÖKMEN (İkinci Danışman)

TRABZON-2020

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Sercan YILDIRIM'ın hazırladığı “Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu Antibiyotiklerin Biyolojik Sıvılarda Eş Zamanlı Tayini İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu” başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR
(Danışman)

Prof. Dr. Nurettin YAYLI

Prof. Dr. Duri Şehvar ÜNAL

Doç. Dr. Soner ÇUBUK

Doç.Dr. Dilek KUL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

3/1/2020
Sercan YILDIRIM

İthaf

*Aramızdan çok erken ayrılan, bu günleri görmeyi en çok hak eden adama...
fedakâr, iyi yürekli, canım babam Yılmaz YILDIRIM'a...*



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince, bilgi ve deneyimi ile bana çok şey katan, bütün isteklerime evet diyerek beni yüreklendiren, her zaman arkamda olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a,

Kendini ifade etme şekline hayran kaldığım ve her zaman örnek aldığım, doktora çalışmalarım boyunca çok şey öğrendiğim 2. danışmanım Sayın Prof. Dr. Münevver SÖKMEN'e,

Tez izleme komitesinde yer alarak, bu çalışmaya önemli katkılarda bulunan kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI ve Sayın Doç. Dr. Dilek KUL'a,

Tez çalışmasının planlanmasında yol gösteren ve klinik uygulamaların yapılmasına olanak tanıyan Sayın Prof. Dr. İftihar KÖKSAL'a,

Çalışmanın planlanmasında, hastaların çalışmaya dâhil edilmesinde ve örneklerin toplanmasında verdiği katkıdan ve gösterdiği özenden dolayı Sayın Arş. Gör. Hanife Nur KARAKOÇ'a,

Tezin yazımı sırasında faydalı önerileri ile katkıda bulunan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hasan Erdinç SELLİTEPE'ye

Analitik Kimya Anabilim Dalı hocalarımdan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma AĞIN'a ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Tez çalışmamı, TDK-2018-7342 kodlu proje ile destekleyen, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Son olarak; benim için yaptıklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bana olan inançlarını hep diri tutan ve her zaman destekleyen sevgili kız kardeşim Özge Nur YILDIRIM ve canım annem Şengül YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xvii
ÖZET	xxi
ABSTRACT	xxii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	4
2.1.1. Doğal Antibiyotikler	4
2.1.2. Sentetik Antibiyotikler	5
2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları	6
2.2.1. Hücre Duvarını Hedef Alanlar	6
2.2.2. Protein Sentezini İnhibe Edenler	6
2.2.3. Folik Asit Metabolizması İnhibitörleri	6
2.2.4. DNA Replikasyonu İnhibitörleri	7
2.3. Florokinolon Grubu Antibiyotikler	7
2.3.1. Florokinolonların Yapı-Aktivite İlişkileri	8
2.3.2. Direnç Gelişimi	9
2.3.3. Yan Etki	10
2.4. Çalışmalarda Kullanılan Maddelerin Kimyasal, Fiziksel, Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri	11
2.4.1. Siprofloksasin	11
2.4.1.1. Fizikokimyasal Özellikleri	11
2.4.1.2. Tanım	12

2.4.1.3. Farmakokinetik	12
2.4.2. Levofloksasin	13
2.4.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri	13
2.4.2.2. Tanım	13
2.4.2.3. Farmakokinetik	14
2.4.3. Moksifloksasin	14
2.4.3.1. Fizikokimyasal Özellikleri	14
2.4.3.2. Tanım	15
2.4.3.3. Farmakokinetik	15
2.4.4. Gemifloksasin	16
2.4.4.1. Fizikokimyasal Özellikleri	16
2.4.4.2. Tanım	16
2.4.4.3. Farmakokinetik	17
2.5. Florokinolonların Analizi İçin Literatürdeki Analiz Yöntemleri	17
2.6. İlaç Analizlerinde Örnek Hazırlama İşleminin Önemi	34
2.6.1. Protein Çöktürme	35
2.7. Kromatografi	35
2.7.1. Analitik Ayırımların Sınıflandırılması	36
2.7.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi	36
2.7.1.2. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi	37
2.7.1.3. İyon Çifti Kromatografisi	39
2.7.1.4. İyon Değişimi Kromatografisi	40
2.7.1.5. Moleküler Eleme Kromatografisi	41
2.7.1.6. Afinite Kromatografisi	42
2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	43
2.8.1. HPLC Cihazları	44
2.8.2. Hareketli Faz Hazneleri, Çözücü Filtrasyonu ve Gaz Giderimi	45
2.8.3. Pompalama Sistemleri	47
2.8.4. Piston Pompalar	48
2.8.5. Çözücülerin Karıştırılması	49
2.8.6. Otomatik Örnekleyiciler	50
2.8.7. Dedektörler	50
2.9. Saptama Teknikleri	51

2.9.1. UV-Görünür Bölge Dedektörleri	52
2.9.2. Floresans Dedektör (FD)	54
2.10. Kolon	55
2.10.1. Core-Shell Kolonlar	57
2.10.2 Monolitik Kolonlar	59
2.11. Kromatografide Temel Parametreler	60
2.11.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü	60
2.11.2. Seçicilik Faktörü	61
2.11.3. Kolon Etkinliği	62
2.11.4. Ayırma Gücü (Resolüsyon)	62
2.11.5. Asimetri Faktörü ve Kuyruklanma Faktörü	64
3. GEREÇ ve YÖNTEM	65
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	65
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	65
3.3. Kullanılan Etken Maddeler	66
3.4. Kullanılan Kolonlar	66
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması	66
3.6. Etik Kurul İzni	68
3.7. Çalışma Grupları	68
3.7.1. Yöntem Geliştirme ve Validasyon Grubu	68
3.7.2. Hasta Grubu	68
3.8. Örneklerin Analiz Edilmesi	69
3.8.1. Örnek Hazırlanması	69
3.8.2. Kromatografik Şartlar	69
3.9. Yöntem Validasyonu	70
3.9.1. Sistem Uygunluk Testi	70
3.9.2. Doğrusallık	70
3.9.3. Duyarlılık	71
3.9.4. Seçicilik	71
3.9.5. Doğruluk ve Kesinlik	72
3.9.6. Geri Kazanım	72
3.9.7. Kararlılık	72
4. BULGULAR	74

4.1. FD Dalga Boyu Seçimi	74
4.2. DAD Dalga Boyu Seçimi	74
4.3. Yöntem Geliştirilmesi	74
4.3.1. Ayırım Üzerine pH'ın Etkisinin Araştırılması	75
4.3.1.1. Raptor C ₁₈ kolon	75
4.3.1.2. Poroshell 120 EC-C ₁₈ Kolon	77
4.3.1.3. Inertsil ODS-3 Kolon	79
4.3.1.4. Chromolith High Resolution RP 18e Kolon	82
4.3.1.5. Poroshell 120 PFP Kolon	84
4.3.2. Organik Çözücü Yüzdesinin Ayırım Üzerine Etkisinin İncelenmesi	86
4.3.2.1. Raptor C ₁₈ Kolon	86
4.3.2.2. Poroshell 120 EC-C ₁₈ Kolon	88
4.3.2.3. Inertsil ODS-3 Kolon	89
4.3.2.4. Chromolith High Resolution RP 18e Kolon	91
4.3.2.5. Poroshell 120 PFP Kolon	92
4.3.3. Gradient Şartlarının Belirlenmesi	94
4.3.4. Sıcaklığın Ayırım Üzerine Etkisinin Araştırılması	96
4.3.5. Kolon Temizleme ve Kolon Şartlandırma Basamaklarının Gradient Programına Eklenmesi	98
4.3.6. Örnek Hazırlama İşleminin Optimizasyonu	98
4.4. Yöntem Validasyonu	98
4.4.1. Sistem Uygunluk Testi	98
4.4.2. Yöntem Geçerliliğinin İdrar Analizinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları	99
4.4.2.1. Doğrusallık	99
4.4.2.2. Duyarlılık	100
4.4.2.3. Seçicilik	100
4.4.2.4. Doğruluk ve Kesinlik	103
4.4.2.5. Geri Kazanım	105
4.4.2.6. Kararlılık	105
4.4.3. Yöntem Geçerliliğinin Plazma Analizinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları	107
4.4.3.1. Doğrusallık	107

4.4.3.2. Duyarlılık	108
4.4.3.3. Seçicilik	109
4.4.3.4. Doğruluk ve Kesinlik	112
4.4.3.5. Geri Kazanım	114
4.4.3.6. Kararlılık	114
4.4.4. Yöntemin Uygulanması	116
4.4.4.1. İdrar Örneklerinin Analizi	117
4.4.4.2. Plazma Örneklerinin Analizi	119
5. TARTIŞMA	121
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	130
7. KAYNAKLAR	131
EKLER	150
EK 1. Etik Kurul Onayı	151
EK 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-1	154
EK 3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-2	156
ÖZGEÇMİŞ	158

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan kolon ve kolon dolgu materyali boyutları, yüzey alanları, karbon yüzdeleri ve faz tipleri	66
Tablo 2. Analizde uygulanan gradient program	70
Tablo 3. FD’de kullanılan dalga boyu programlaması	70
Tablo 4. Analitler için bulunan sistem uygunluk parametreleri	98
Tablo 5. Yöntemin idrarda doğrusallığı ile ilgili kalibrasyon sonuçları	99
Tablo 6. Analitler için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri	100
Tablo 7. Florokinolonların idrarda tayini için yürütülen doğruluk ve kesinlik çalışmaları sonuçları	104
Tablo 8. Florokinolonların idrardan geri kazanım sonuçları	105
Tablo 9. İdrarda yürütülen kararlılık çalışmaları sonuçları	106
Tablo 10. Yöntemin plazmada doğrusallığı ile ilgili kalibrasyon sonuçları	107
Tablo 11. Analitlerin plazmada tayininde belirlenen LOD ve LOQ değerleri	108
Tablo 12. Florokinolonların plazmada tayini için yürütülen doğruluk ve kesinlik çalışmaları sonuçları	113
Tablo 13. Florokinolonların plazmadan geri kazanım sonuçları	114
Tablo 14. Plazmada yürütülen kararlılık çalışmaları sonuçları	115
Tablo 15. Oral olarak CIP, LEV ve MOX kullanan hastaların tedavi rejimleri ve birlikte kullandıkları ilaçlar	116
Tablo 16. Oral olarak CIP ve LEV kullanan hastaların ilk ilaç uygulamasından sonra 2., 4., 6., 8., 10. ve 12. saatlerde toplanan idrar örneklerinin analiz sonuçları	117
Tablo 17. Oral olarak florokinolon kullanan hastaların farklı zamanlarda toplanan plazma örneklerinde saptanan CIP, LEV ve MOX konsantrasyonları	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Antibiyotik ilaçların sınıflandırılması	5
Şekil 2. CIP'in yapısı	11
Şekil 3. LEV'in yapısı	13
Şekil 4. MOX'un yapısı	14
Şekil 5. GEM'in yapısı	16
Şekil 6. Analitlerin destek materyali yüzeyine adsorbe olmalarına dayanarak ayırımın gerçekleştirilmesi	37
Şekil 7. Analitlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılması temeline dayanarak ayırım yapılması	39
Şekil 8. İyon çifti kromatografisi	40
Şekil 9. Destek materyali yüzeyindeki yüklere bağlanarak iyonların ayrılması	41
Şekil 10. Analitlerin molekül büyüklüklerine göre porlara girmesinden faydalanılarak ayırımın gerçekleştirilmesi	42
Şekil 11. İlgili bağlanma ajanı ile etkileşimlerine dayanarak analitlerin ayrılması	43
Şekil 12. HPLC cihazının şematik olarak gösterimi	44
Şekil 13. Zamana karşı dedektör sinyalinin kaydedilmesi ile elde edilen kromatogram örneği	44
Şekil 14. Hareketli faz haznesinin şematik olarak gösterimi	45
Şekil 15. İki çözücü için tasarlanmış membran gaz giderme cihazının diyagramı	47
Şekil 16. Tek pistonlu bir pompanın şematik gösterimi	49
Şekil 17. Z-tipi bir dedektör hücresinin kısımları	52
Şekil 18. Işığın absorpsiyonu prensibine dayanan dedektörlerin şematik gösterimi	54
Şekil 19. FD'nin şematik olarak gösterimi	55
Şekil 20. Core-shell silika partiküllerin katman-katman yaklaşımı ile oluşturulmasının şematik gösterimi	58
Şekil 21. HPLC'de ayırım sürecinin gösterimi	61

Şekil 22. <i>R</i> değerine bağlı olarak piklerin birbirine göre konumlarındaki değişiklikler	63
Şekil 23. As ve T'nin hesaplanmasını gösteren diyagram	64
Şekil 24. Raptor C ₁₈ kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi	75
Şekil 25. Raptor C ₁₈ kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar	76
Şekil 26. MOX-GEM pik çifti arasındaki <i>R</i> değerinin Raptor C ₁₈ kolonda pH'a bağlı olarak değişimi	77
Şekil 27. Poroshell 120 EC-C ₁₈ kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar	78
Şekil 28. Poroshell 120 EC-C ₁₈ kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi	79
Şekil 29. MOX-GEM pik çifti arasındaki <i>R</i> 'nin Poroshell 120 EC-C ₁₈ kolonda pH'a bağlı olarak değişimi	79
Şekil 30. Inertsil ODS-3 kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar	80
Şekil 31. Inertsil ODS-3 kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi	81
Şekil 32. MOX-GEM pik çifti arasındaki <i>R</i> 'nin Inertsil ODS-3 kolonda pH'a bağlı olarak değişimi	81
Şekil 33. Chromolith High Resolution RP 18e kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar	82
Şekil 34. Chromolith High Resolution RP 18e kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi	83
Şekil 35. MOX-GEM pik çifti arasındaki <i>R</i> 'nin Chromolith High Resolution RP 18e kolonda pH'a bağlı olarak değişimi	83
Şekil 36. Poroshell 120 PFP kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi	84
Şekil 37. Poroshell 120 PFP kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar	85
Şekil 38. MOX-GEM pik çifti arasındaki <i>R</i> 'nin Poroshell 120 PFP kolonda pH'a bağlı olarak değişimi	86
Şekil 39. Raptor C ₁₈ kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi	86

Şekil 40.	Raptor C ₁₈ kolonda %15-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar	87
Şekil 41.	Poroshell 120 EC-C ₁₈ kolonda %15-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar	88
Şekil 42.	Poroshell 120 EC-C ₁₈ kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi	89
Şekil 43.	Inertsil ODS-3 kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi	89
Şekil 44.	Inertsil ODS-3 kolonda %17.5-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar	90
Şekil 45.	Chromolith High Resolution RP 18e kolonda %15-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar	91
Şekil 46.	Chromolith High Resolution RP 18e kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi	92
Şekil 47.	Poroshell 120 PFP kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi	92
Şekil 48.	Poroshell 120 PFP kolonda %12.5-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar	93
Şekil 49.	Florokinolonların 5 farklı kolon kullanılarak gradient şartlar altında elde edilen kromatogramları	95
Şekil 50.	Sıcaklığın 25-50 °C aralığında florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi	96
Şekil 51.	Poroshell 120 PFP kolon kullanılarak 25-50 °C aralığında elde edilen kromatogramlar	97
Şekil 52.	Florokinolonların idrarda analizinde doğrusallık kontrol grafikleri	100
Şekil 53.	Yöntem seçiciliğinin idrarda kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar	101
Şekil 54.	Yöntem seçiciliğinin idrarda kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar	102
Şekil 55.	Florokinolonların plazmada analizinde doğrusallık kontrol grafikleri	108
Şekil 56.	Yöntem seçiciliğinin plazmada kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar	110
Şekil 57.	Yöntem seçiciliğinin plazmada kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar	111

- Şekil 58.** Oral olarak CIP kullanan Hasta 1-3'ün ve LEV kullanan Hasta 4'ün, ilk ilaç uygulamasından sonra farklı zamanlarda toplanan idrar örneklerinin analizi ile elde edilen örnek kromatogramlar 118
- Şekil 59.** Florokinolon kullanan hastaların farklı zamanlarda toplanan plazma örneklerinin analizi ile elde edilen örnek kromatogramlar 120



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

A	Eddy difüzyonu terimi
ACN	Asetonitril
As	Asimetri faktörü
AŞ	Anonim şirketi
AU	Absorbans ünite
AUC	Plazma derişimi-zaman eğrisi altında kalan alan
B	Boyuna difüzyon terimi
BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
C	Celcius
C	Kütle transferi terimi
C₈	Oktil
C₁₈	Oktadesil
CIP	Siprofloksasin
CYP	Sitokrom P450
DAD	Diyot dizinli dedektör
DANO	Danofloksasin
dL	Desilitre
dk	Dakika
ENOX	Enoksasin
ENRO	Enrofloksasin
FD	Floresans dedektör
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FKN	Flumekuin
GATI	Gatifloksasin
GEM	Gemifloksasin
g	Gram
GREP	Grepafloksasin
H	Teorik tabaka yüksekliği
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPTLC	Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi

Hz	Hertz
IR	İnfrared
k	Kapasite faktörü
kg	Kilogram
L	Litre
L	Kolon uzunluğu
LEV	Levofloksasin
LOD	Teşhis alt sınırı
LOME	Lomefloksasin
LOQ	Tayin alt sınırı
m	Eğim
M	Molar
MARBO	Marbofloksasin
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MOX	Moksifloksasin
MS	Kütle spektrometrisi
MS/MS	Tandem kütle spektrometrisi
m/z	Kütle/yük
N	Teorik tabaka sayısı
NA	Nalidiksik asit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NOR	Norfloksasin
OFLO	Ofloksasin
OKSO	Oksolinik asit
PAZU	Pazufloksasin
PEFLO	Peflofloksasin
PFP	Pentaflorofenil

PIPE	Pipemidik asit
pKa	Asitlik ayrışma sabiti
r	Korelasyon katsayısı
R	Resolüsyon
R²	Determinasyon katsayısı
SARA	Sarafloksasin
SİNO	Sinoksasin
SPAR	Sparfloksasin
SS	Standart sapma
T	Kuyruklanma faktörü
t₀	Ölü zaman
TEMA	Temafloksasin
t_R	Alıkonma zamanı
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
u	Doğrusal hız
UHPLC	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole
v	Hacim
w	Pik genişliği
Simgeler	
≥	Büyük eşittir
≤	Küçük eşittir
≈	Yaklaşık
±	Artı eksi işareti
°	Derece
α	Seçicilik faktörü
β	Beta
π	Pi
Formüller	
C₁₇H₁₈FN₃O₃	Siprofloksasin
C₁₈H₂₀FN₃O₄	Levofloksasin

$C_{21}H_{24}FN_3O_4$	Moksifloksasin
$C_{18}H_{20}FN_5O_4$	Gemifloksasin
$CH_3COONa.3H_2O$	Sodyum asetat trihidrat
HCl	Hidroklorik asit
$NaH_2PO_4.2H_2O$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
Na_2HPO_4	Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit



ÖZET

Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu Antibiyotiklerin Biyolojik Sıvılarda Eş Zamanlı Tayini İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Bu çalışmada, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan florokinolonlardan levofloksasin, siprofloksasin, moksifloksasin ve gemifloksasinin insan plazması ve idrarında tayini için ilk defa bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Florokinolonların ayırımında 5 farklı kolonun etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Organik çözücü yüzdesi, pH, sıcaklık, gradient şekli, dedektör dalga boyu gibi ayırımı etkileyen deneysel parametreler adım adım optimize edilmiştir. Gradient elüsyon modunda fosfat tamponu (pH 2, 20 mM) ve asetonitril karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Pentaflorofenil çekirdek-kabuk (core-shell) kolon (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) kullanılarak 4 analitin ayırımı 7.5 dakikadan kısa süre içerisinde başarılmıştır. Toplam analiz süresi kolon temizleme ve kolon şartlama basamakları dâhil 22 dakikadır. Floresans dedektör eş zamanlı olarak iki farklı kanalda çalıştırılmıştır. Diyot dizinli dedektör 280 nm'ye ayarlanmıştır. Akış hızı 1.0 mL/dk ve kolon sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem analitlerin hem idrar hem de plazmada saptanması için duyarlılık, seçicilik, doğrusalılık ($r \geq 0.9989$), geri kazanım (%79.46-102.69), doğruluk (%89.55-111.94), kesinlik (%0.35-8.05) ve kararlılık (%85.79-111.07) parametrelerine göre valide edilmiştir. Ardından oral olarak levofloksasin, siprofloksasin ya da moksifloksasin kullanan hastaların idrar ve plazma örnekleri analiz edilerek yöntemin uygulanabilirliği kanıtlanmıştır. Geliştirilen yöntem bu florokinolonların terapötik ilaç izlemi için uygundur ve farmakokinetik ve toksikolojik çalışmalara uygulanabilir.

Anahtar Sözcükler: Çekirdek-kabuk kolonlar, Florokinolonlar, Pentaflorofenil sabit faz, Validasyon, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ABSTRACT

Development and Validation of Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Some Fluoroquinolone Antibiotics in Biological Fluids Using New Generation Columns

In this study, a liquid chromatography method for the determination of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin and gemifloxacin which are the fluoroquinolones used in the treatment of infectious diseases was developed for the first time. Efficiency of 5 different columns in the separation of fluoroquinolones was compared. Experimental parameters that affect the separation such as percentage of organic solvent, pH, temperature, gradient shape and detector wavelength were optimized by employing a step-by-step approach. Phosphate buffer (pH 2, 20 mM) and acetonitrile mixture was employed as mobile phase in the gradient elution mode. Using a pentafluorophenyl core-shell column (100 mm x 4.6 mm, 2.7 μ m), the separation of four analytes was accomplished in less than 7.5 min. Total analysis time was 22 min, including column clean-up and column conditioning steps. Fluorescence detector was operated simultaneously on two different channels. The diode array detector was set to 280 nm. Flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 25 °C. The developed method was validated for determination of analytes in both urine and plasma with respect to sensitivity, specificity, linearity ($r \geq 0.9989$), recovery (%79.46-102.69), accuracy (%89.55-111.94), precision (%0.35-8.05), and stability (%85.79-111.07). Afterwards, feasibility of method was demonstrated by analysing urine and plasma samples of patients receiving orally levofloxacin, ciprofloxacin or moxifloxacin. Developed method is suitable for therapeutic drug monitoring of these fluoroquinolones and can be applied to pharmacokinetic and toxicological studies.

Keywords: Core-shell columns, Fluoroquinolones, High performance liquid chromatography, Pentafluorophenyl stationary phase, Validation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nalidiksik asit (NA) türevi olan florokinolonlar, sentetik antibiyotiklerin önemli alt gruplarından birini oluştururlar. Florokinolonlar, naftiridin halkasının altıncı pozisyonunda flor içeren kinolonlardır ve bakteriyel DNA giraz ve topoizomerez IV'ü hedef alırlar. Konsantrasyona bağlı antibakteriyel etki gösteren florokinolonlar idrar yolu, solunum yolu ve gastrointestinal kanal enfeksiyonları dâhil birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar.

Florokinolonların büyük bir bölümü, değişmeden glomerüler filtrasyon veya tübüler sekresyon yoluyla idrarla atılır. Diğer taraftan moksifloksasin (MOX), ağırlıklı olarak karaciğerde metabolize edilir. Gemifloksasin (GEM) ise orta derecede karaciğerde metabolize edilirken, önemli oranda renal eliminasyona uğrar. Karaciğerde biyotransformasyona dâhil oldukları zaman, florokinolonlar molekül yapısındaki karboksilli asit grubundan glukronidasyona uğrayarak inaktive edilirler. Florokinolonlar yüksek oranda proteinlere bağlanmadıkları ve bu ilaçların sitokrom P450 (CYP) sistemi ile biyotransformasyonları CYP1A2 izoenzimi ile sınırlı olduğu için, diğer ilaçlarla metabolizma düzeyinde etkileşimleri nispeten azdır (1–4).

Florokinolonların etkinliklerini artırırken toksisitelerinin önüne geçmek, enfeksiyonların tedavisinde önemli bir basamaktır. Öte yandan, etkinliğin optimizasyonu ve toksisitenin minimizasyonu, kullanılan ilacın farmakokinetiğinin ve hastalığa sebep olan patojenin duyarlılığının iyi anlaşılmasını gerektirir. Antimikrobiyal ilaçlara direnç gelişimi, ilaç maliyetlerindeki artış ve hastanın tedaviye uyuncu göz önünde bulundurulduğunda, antimikrobiyal ajanın seçimi ve doz optimizasyonuna yönelik yöntemlerin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Uygun ajan, doz ve tedavi süresinin seçilmesi, tedavi başarısızlığından kaçınılması ve bakteriyel direnç gelişiminin önüne geçilmesi için florokinolonların farklı terapötik ortamlardaki farmakokinetik davranışları ve etkinlikleri sürekli olarak izlenmelidir. Bu bağlamda; hızlı, seçici, duyarlı, kesin ve doğru analitik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Florokinolon analizinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) günümüze kadar sıklıkla kullanılmıştır ve ayırım çoğunlukla geleneksel kolonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (5–7). Geleneksel yaklaşıma alternatif olarak, core-shell ve monolitik kolonlar kullanılarak daha etkin ayırımların yapılması mümkündür. Kapsamlı literatür araştırması göstermiştir ki; florokinolonların insan plazması ve idrarında analizi için core-

shell ve monolitik kolonların ve pentaflorofenil (PFP) sabit fazların kullanıldığı sadece birkaç yöntem geliştirilmiştir (8, 9). Buna ilaveten, ülkemiz piyasasında bulunan ve sıklıkla kullanılan florokinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasin (CIP), levofloksasin (LEV), MOX ve GEM'in biyolojik sıvılarda eş zamanlı tayini için geliştirilmiş bir sıvı kromatografik yöntem literatürde bulunmamaktadır. Bu eksikliğin giderilmesi adına, bu tez kapsamında, CIP, LEV, MOX ve GEM'in, core-shell, monolitik ve geleneksel kolonlar dâhil, 5 HPLC kolonunda alıkonma davranışlarının incelenmesi ve kolon etkinliklerinin karşılaştırılması tasarlanmıştır. En etkin bulunan kolon kullanılarak CIP, LEV, MOX ve GEM'in idrar ve plazmada tayini için ilk defa bir sıvı kromatografik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmalarının ardından, geliştirilen yöntemin, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Servisi'nde yatmakta olan hastaların plazma ve idrar florokinolon seviyelerinin izlenmesi ve tedavi etkinliğinin artırılmasında kullanılması planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

“Antibiyotik” terimi ilk olarak, Albert Schatz ve Elizabeth Bugie ile streptomisini keşfeden Selman Waksman tarafından öne sürülmüştür. Waksman’a göre bir antibiyotik, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve bir ortam içerisinde seçici şekilde başka mikroorganizmaların üremesini engelleyen hatta öldüren kimyasal maddedir. Kısa süre sonra bilim adamları antibiyotik özelliklere sahip sentetik bileşikler geliştirmiştir. Waksman’ın da aralarında bulunduğu bazı bilim insanları “antibiyotik” teriminin yanlış kullanımına karşı çıkmasına rağmen, tanım yine de sentetik antibiyotikleri de kapsayacak şekilde değişmiştir. Günümüzde antibiyotik, mikroorganizmaların büyümesini seçici şekilde engelleyen ve konak hücrede minimum hasara sebep olan kimyasal madde olarak tanımlanmaktadır (10).

Antibiyotiklerin tarihi, insan sağlığına zararlı olan, ancak doğru dozlarda kullanıldığında, frengiye sebep olan *Treponema pallidum*’a daha toksik olan ağır metaller olan cıva ve bizmuta kadar dayanır. Frengi tedavisinde cıva ilk olarak 1400’lerde kullanılmaya başlanmıştır ve ağır metaller on dokuzuncu yüzyılın sonuna kadar yaygın şekilde kullanılmıştır. Bu elementlerin tedavide etkili olup olmadıkları açık değildir çünkü o dönemlerde, bugün kullanılan sistematik çalışmalar yürütülmemiştir.

Frenginin tavşan modelinde etkinlikleri kanıtlandıktan sonra arsenik içeren bileşikler sentezlenmiştir. Arsenik bazlı salvarsan, 1908 yılında Paul Ehrlich ve çalışma arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve 1910 yılında ticarileştirilmiştir. Salvarsan “Ehrlich’in sihirli mermisi” olarak adlandırılmıştır ve Ehrlich bu keşfi ile Nobel Ödülü’nü kazanmıştır. Ancak, salvarsan arsenik içerdiği için toksiktir ve kullanımı sınırlı kalmıştır.

Bayer firması tarafından 1932 yılında sülfonamid antibiyotiklerinin keşfi, antibiyotikler için bir sonraki büyük sıçrama olmuştur. İlk ilaç prontosil olarak adlandırılmıştır. Prontosil bir ön-ilaçtır ve insan vücudunda aktif formu olan sülfanilamide dönüşür. İlk olarak Bayer kimyacıları Josef Klarer ve Fritz Mietzsch tarafından sentezlenen prontosil, 1939 yılında Nobel Tıp Ödülü’nü kazanan Gerhard Domagk tarafından bazı önemli bakteriyel enfeksiyonlara karşı test edilmiş ve etkili bulunmuştur. Birçok enfeksiyonun tedavisinde kullanılan prontosil önemli sayıda hayat kurtarmıştır (11).

Penisilinin bulunması ise çok daha büyük etki yaratmıştır. Bakterioloji uzmanı Alexander Fleming, Eylül 1928’de yaz tatilinden döndükten sonra laboratuvarına gitmiş ve tezgâhın üzerinde bıraktığı *Staphylococcus aureus* kolonisinin bir mantar (*Penicillium*

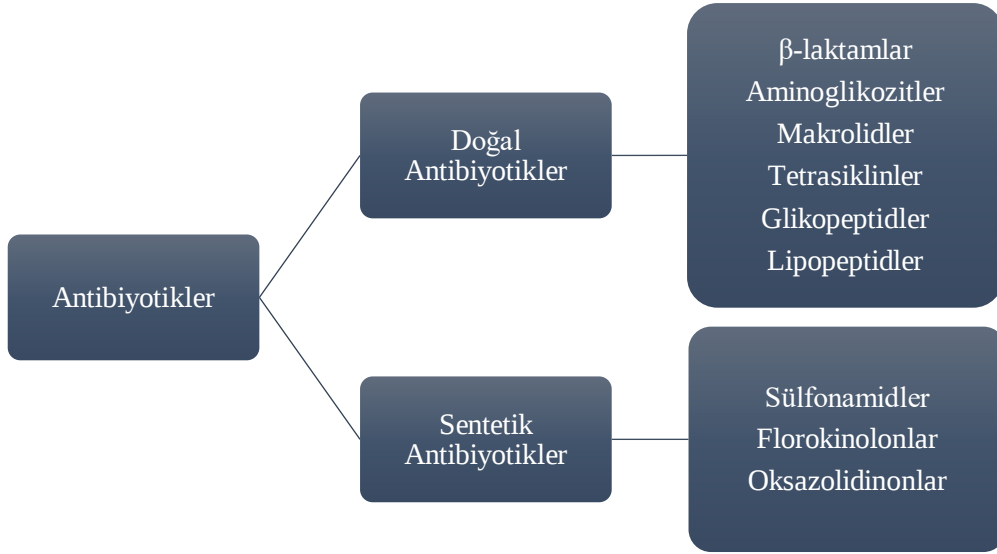
notatum) ile ilginç bir şekilde kontamine olduğunu gözlemlemiştir. Fleming küfe yakın bölgedeki *Staphylococci*'lerin lizise uğradığını, daha uzaktakilerin ise normal olduğunu ve etkilenmediğini fark etmiştir. Fleming mantarı saf bir kültür olarak büyötmeye devam etmiş ve daha önce *Staphylococci* üzerinde gözlemlediğine benzer etkileri araştırmak için mantardan elde ettiğı ekstre ile bir dizi patojenik bakteri türünü muamele etmiştir. Bu bulgular ışığında, mantarın bakteriyi öldüren bir bileşik salgıladığı sonucuna varmıştır ve 1929'da bu bileşigi penisilin olarak adlandırmıştır. Fleming, penisilini izole etmek ve büyük ölçekte üretmek için birçok araştırma grubu ile ortak çalışmıştır. İkinci Dünya Savaşı'nın başlamasıyla, savaş meydanlarında yaralanan ve enfeksiyondan ölen askerlerin kurtarılması amacıyla Anglo-Amerikan Penisilin Projesi başlatılmıştır. 1945 yılında penisilin ordu için özel bir ihtiyaç olmaktan çıkmış ve sonraki yıllarda halkın kullanımına sunularak milyonlarca hayat kurtarılmıştır (12).

2.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Geçtiğimiz yüzyılda, antibiyotiklerin keşfi için iki alanda yapılan araştırmalar faydalı olmuştur. Bunlardan biri antibakteriyel etkili doğal bileşiklerin araştırılmasıdır. Buna paralel olarak yeni kimyasallar sentezlenmiş ve test edilmiştir (13). Doğal ve sentetik antibiyotik sınıfları Şekil 1'de verilmiştir.

2.1.1. Doğal Antibiyotikler

Geçtiğimiz yüzyılda yüzlerce antibiyotik saptanmıştır. Doğal antibiyotik araştırmalarındaki önemli yaklaşımlardan biri, etil asetat ve metanol (MeOH) gibi organik çözücülerle ekstre edilmiş toprak örneklerinin incelenmesidir. Elde edilen ekstrelerin fraksiyonlanması doğal antibiyotiklerin saflaştırılmasına olanak tanımıştır. İlaç şirketlerinde mikrobiyal araştırma grupları, 1930'lu yılların ortalarından 1950'li yılların sonuna kadar 25 yıl boyunca, yeni doğal antibiyotikler keşfetmek için dünyanın farklı bölgelerinden toprak örnekleri toplamıştır. Bu dönem doğal antibiyotiklerin altın çağıdır ve birçok antibiyotik sınıfı bu dönemde keşfedilmiştir. Antibiyotiklerin en bilinen sınıfı tripeptid yapısına bağlanan β -laktam iskeleti içerir. İki önemli alt sınıf; penisilinler ve sefalosporinler bu dönemde keşfedilmiştir.



Şekil 1. Antibiyotik ilaçların sınıflandırılması

Buna ilaveten karbapenemler doğal antibiyotikler olarak izole edilmişlerdir. Selman Waksman'ın 1923 yılında streptomisini keşfetmesi ile aminoglikozitler olarak adlandırılan yeni bir sınıf ortaya çıkmıştır. O yıllarda tanımlanan üçüncü bir doğal antibiyotik sınıfı makrolidlerdir ve bu sınıfın ilk terapötik ajanı eritromisindir. Klinik enfeksiyon tedavisinde önemli olan antibiyotik sınıflarından biri tetrasiklinlerdir. *Streptomyces* suşlarından izole edilen klortetrasiklin bu sınıfın ilk üyelerinden biridir. Beşinci grup vankomisin ve teikoplanin ile temsil edilen glikopeptid antibiyotiklerdir ve bu ilaçlar geniş spektrumlu birer antibiyotiğe dönüşmüştür. Bu dönemde bulunan diğer peptid bazlı antibiyotik sınıfı hücre zarı bütünlüğünü bozan ve protein sentezini durduran lipopeptidlerdir. Klinik kullanımdaki doğal antibiyotiklerin son sınıfı 1940-1960 arası keşfedilen rifamisinlerdir. Doğal rifamisinlerin farmakokinetikleri yarı sentetik modifikasyonlarla geliştirilmiş ve bu sınıfın en yaygın kullanılan üyesi olan rifampin elde edilmiştir. Rifamisinler bakteriyel RNA polimeraz enzimini inhibe eder ve böylelikle DNA'nın RNA'ya transkripsiyonunu engellerler. Rifamisinler, tüberküloz enfeksiyonlarının tedavisi için kombinasyon tedavi rejimlerinde dayanak noktasıdır.

2.1.2. Sentetik Antibiyotikler

Sentetik antibiyotikler üç farklı alt sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlardan ilki 1930'lu yıllarda bulunan sülfonamidlerdir. Sonraki kuşak sülfonamidler, 80 yıl sonra günümüzde hala daha kullanılmaktadırlar. Bu ilaçlar, DNA sentezi için gerekli dört maddeden biri olan folik asitin bakteriyel sentezindeki ana enzimi inhibe eder.

İkinci sınıf sentetik antibiyotikleri oksazolidinonlar oluşturur. Bu sınıftaki birinci nesil antibiyotik linezolidir. Oksazolidinonlar ilk olarak kimyasal tarımda kullanılmak üzere tasarlanmışlardır ancak daha sonra bakteriyel protein sentezini engelledikleri kanıtlanmıştır (14). Üçüncü ve son sınıf florokinolonlardır. Tez çalışması kapsamında florokinolonlar kullanıldığı için bu sınıfa ait detaylı bilgi Bölüm 2.3'te verilmiştir.

2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

2.2.1. Hücre Duvarını Hedef Alanlar

β -laktamlar ve glikopeptidler hücre duvarı sentezini inhibe ederler. β -laktamlar için öncelikli hedefler penisilin bağlayıcı proteinlerdir. β -laktam halkası, normalde penisilin bağlayıcı proteine bağlanan peptid zincirinin D-alanil-alanin kısmını taklit eder. Bağlayıcı protein ile β -laktamlar etkileşir ve yeni peptidoglikanın sentezi mümkün olmaz. Peptidoglikan tabakasının bozulması bakterinin lizise uğramasına sebep olur. Glikopeptidler, prekürsör peptidoglikan alt ünitenin peptid yan zincirinin D-alanil-alanin kısmına bağlanır ve böylece hücre duvarı sentezini inhibe eder (15, 16).

2.2.2. Protein Sentezini İnhibe Edenler

Hücre içerisinde protein sentezi ribozomlar ve sitoplazmik faktörlerle yürütülür. Bakteriyel 70S ribozom, 30S ve 50S olmak üzere iki ribonükleoprotein alt ünitelerden oluşur. Antibiyotikler bakteriyel ribozomun 30S veya 50S alt ünitelerini hedef alarak protein sentezini engeller. Aminoglikozitler ve tetrasiklinler 30S alt ünitesini hedef alırken, makrolidler, oksazolidinonlar ve kloramfenikol 50S alt ünitesini hedef alarak etki ederler (16, 17).

2.2.3. Folik Asit Metabolizması İnhibitörleri

Sülfonamidler ve trimetoprim, folik asit metabolizmasının farklı aşamalarını inhibe ederler. Aynı biyolojik yolağın farklı aşamalarında inhibisyon sergileyen sülfonamidlerin ve trimetoprime kombine olarak kullanılması sinerjistik etki gösterir ve direnç için gerekli olan mutasyon oranını azaltır. Sülfonamidler, doğal substrat olan *p*-aminobenzoik asitten daha yüksek afinite ile dihidropteroat sentezini yarışmalı olarak inhibe eder. Trimetoprim ise folik asit sentezinin daha sonraki aşamalarında rol alan dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder (16, 18).

2.2.4. DNA Replikasyonu İnhibitörleri

Florokinolonlar etkilerini DNA replikasyonunu inhibe ederek sergilerler (16). Tez çalışması kapsamında florokinolonlar kullanıldığından dolayı, bu grup ile ilgili detaylı bilgi aşağıda sunulmuştur.

2.3. Florokinolon Grubu Antibiyotikler

George Lesher tarafından antimalaryal etkili kinin türevleri sentezlenmesi amaçlanmış, yapılan çalışmalar sonucunda antibakteriyel ajan olarak 1962 yılında NA keşfedilmiştir (19). Bu grubun prototipi olan NA üriner sistem antibakteriyel ajanı olarak kullanılmıştır. Bu bileşik, sadece gram-negatif bakterilere karşı yüksek etkinliği, oral uygulama sonrası düşük serum ve doku konsantrasyonu ve *Enterobacteriaceae* türlerine karşı sınırlı spektrumu ile karakterize edilir. Florokinolonların spektrumunda devrim 6-floro analogların keşfinden sonra meydana gelmiştir (20).

Florokinolonlar farmakokinetik profillerine ve aktivite spektrumlarına dayanarak sınıflandırılırlar. Birinci nesil florokinolonlar olan NA, oksolinik asit (OKSO), pipemidik asit (PIPE) ve rosoksasin gram-negatif bakterilere karşı aktivite gösterir ancak hızlı renal eliminasyon ve kısa serum yarı ömürlerinden dolayı kullanımları sınırlı kalmıştır. Bu sebeple birinci nesil florokinolonlar sadece gram-negatif bakterilerin sebep olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır ve günümüzde çok nadir kullanılırlar (21).

Nadifloksasin, rufloksasin, norfloksasin (NOR), enoksasin (ENOX), pefloksasin (PEFLO), lomefloksasin (LOME), ofloksasinin (OFLO) ve CIP'in dâhil olduğu ikinci nesil florokinolonlar C-6 konumuna flor eklenmesi ile elde edilmiştir ve bu durum birinci nesil florokinolonlar ile kıyaslandığında aktivitelerinde önemli bir artış ile sonuçlanmıştır. Böylelikle, ikinci nesil florokinolonlar *Pseudomonas aeruginosa* dâhil gram-negatif bakterilere karşı daha yüksek aktivite ve gram-pozitif bakterilere iyi aktivite göstermişlerdir. Buna ilaveten daha uzun serum yarı ömürleri sergilemişlerdir. Bu nesile ait ilaçlar, komplike mesane enfeksiyonları, piyelonefrit, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, spesifik pnömoni tipleri, deri enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (22).

Tosufloksasin, balofloksasin, pazufloksasin (PAZU), temafloksasin (TEMA), sparfloksasin (SPAR), grepafloksasin (GREP) ve LEV'in dâhil olduğu üçüncü nesil florokinolonlar birinci ve ikinci nesil florokinolonlardan daha geniş aktivite spektrumu

sergilerler. Bu grubun bazı üyeleri *P. aeruginosa* dâhil gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumda aktivite göstermiştir. Diğer üyeler ise gram-pozitif bakterilere karşı aktiftir. Üçüncü nesil florokinolonlar daha uzun serum yarı ömrüne ve anaeroblara karşı iyi aktiviteye sahiptir (23, 24).

Prulifloksasin, alatrofloksasin, delafloroksalin, klinafloroksalin, besifloksasin, sitafloroksalin, finafloksasin, trovafloksasin (TROV), gatifloksasin (GATI), GEM ve MOX'un dâhil olduğu dördüncü nesil florokinolonlar başta *Streptococcus pneumoniae* ve *Enterobacteriaceae* türleri olmak üzere gram-pozitif organizmalara karşı daha iyi aktivite sergilerler. Bu gruptaki florokinolonlar atipik bakterilere ve anaeroblara karşı değişken aktivite göstermekle beraber uzun serum yarı ömrüne sahiptirler. Dördüncü nesil florokinolonlar hem DNA giraz'ı hem de topoizomerez IV'ü inhibe etmeleri ve yavaş direnç gelişimi ile karakterize edilirler (25, 26).

2.3.1. Florokinolonların Yapı-Aktivite İlişkileri

Günümüze kadar, kinolonların klinik kullanımı büyük ölçüde idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi ile sınırlı kalmıştır. İdrar yolu enfeksiyonları için iyi oral absorpsiyon, yaygın gram-negatif idrar patojenlerine karşı iyi aktivite ve nispeten daha yüksek idrar (plazma ve doku ile karşılaştırıldığında) konsantrasyonları önemli yararlı özelliklerdir. Detaylı yapı-aktivite çalışmaları, genişletilmiş aktivite spektrumu ve geliştirilmiş absorpsiyon ve dağılım özelliklerinin sonucu olarak bu sınıf, bazı yeni üyelerin çeşitli ciddi sistemik enfeksiyonların tedavisi için yararlı olduğu noktaya kadar evrimleşmiştir.

Yapı aktivite çalışmaları 1,4-dihidro-4-okso-3-piridin-2-karboxilik asit yapısının antimikrobiyal aktivite için gerekli olduğunu göstermiştir. Karbon atomlarının azot ile iki, beş, altı ve sekizinci pozisyonlarda yer değiştirmesi antimikrobiyal aktivitenin sürdürülmesi ile uyumludur. İkinci pozisyona fonksiyonel grupların bağlanması aktiviteyi büyük oranda azaltmasına rağmen, beş, altı, yedi ve sekizinci pozisyonlara fonksiyonel grupların bağlanması aktivite üzerine olumlu etki gösterebilir. Örneğin, yedinci pozisyona piperazin ve 3-aminopirrolidin gruplarının bağlanmasının *P. aeruginosa*'ya karşı kinolon grubu bileşiklerin aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Altıncı pozisyona flor atomu bağlanması antimikrobiyal aktivitenin önemli ölçüde artması ile ilişkilidir. Birinci pozisyona alkil bağlanması aktivite için gereklidir. Kısa zincirli alkil gruplarının (metil, etil, siklopropil) bağlanması daha yüksek aktivite ile sonuçlanır. Birinci pozisyona aril grubu bağlanması da

antimikrobiyal aktiviteyi artırır. Kinolon sınıfının ilk üyelerinin etkin antimikrobiyal spektrumu *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella* ve *Providencia* dâhil olmak üzere büyük oranda gram-negatif bakteriler ile sınırlıdır. *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Haemophilus influenzae* gram-pozitif ve anaerob oldukları için dirençlidirler. Bu sınıfın altıncı pozisyona flor ve yedinci pozisyona piperazin bağlanmış yeni üyeleri gram-pozitif patojenlere karşı da etkin geniş bir aktivite spektrumu sergilerler. Kinolonlar genellikle anaerobik bakterilere karşı zayıf aktivite sergilerler (27–29).

2.3.2. Direnç Gelişimi

Florokinolonlar hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı etkinliklerinden dolayı insanlarda ve hayvanlarda önemli oranda kullanılmıştır (30). Günümüzde reçete yazma kılavuzları florokinolon kullanımının sınırlandırılmasını tavsiye etmesine rağmen, direnç artmaya ve klinikte önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. İngiltere’de florokinolonlara dirençli *E. coli* izolatlarının yüzdesi 2001 yılından 2006 yılına %6’dan %20’ye yükselmiştir ve günümüzde yaklaşık %17’dir (31). Diğer türlerin direncinde de benzer yükselişler gözlemlenmiştir. Örneğin, florokinolonlara dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının oranı İtalya’da 2005 yılından 2012 yılına kadar yaklaşık beş katlık bir artışla %11’den %50’ye yükselmiştir (32).

Florokinolonlara direnç yaygındır ve birçok farklı mekanizma ile meydana gelebilir. Florokinolon direncinin en yaygın mekanizması, bu ilaçların birincil ya da ikincil hedeflerini (tip II topoizomerazlar) kodlayan genlerdeki mutasyonlardan dolayıdır. Bu genlerdeki mutasyonların meydana geldiği bölge kinolon direnç belirleyici bölge olarak bilinmektedir. Aminoasit substitüsyonu ile sonuçlanan bu bölgedeki mutasyonlar, hedef protein yapısını ve buna bağlı olarak enzimin florokinolona bağlanma afinitesini değiştirerek ilaç direncine sebep olur (33).

Farklı direnç mekanizmalarını kodlayan çeşitli genler florokinolonlara duyarlılığı azaltabilir. Bunlar genellikle plazmidlerde kodlanır ve plazmid aracılı kinolon direnç genleri olarak bilinirler. Bu genlerden ilk keşfedileni olan Qnr proteininin, son zamanlarda gerçekleştirilen yapısal analizinden elde edilen veriler, florokinolonlara karşı direncin bu proteinin topoizomeraza bağlanması ve bunun sonucunda antibiyotik ile hedef enzimin etkileşiminin fiziksel olarak engellenmesi ile meydana geldiğini ileri sürmektedir (34).

Hücre zarının geçirgenliği ve dolayısıyla antibiyotığın hücre içerisine girebilme yeteneği, hedef molekülleri hücre içerisinde olan florokinolonlar gibi ilaçların etkinliğini belirleyen önemli bir faktördür. Çift zar yapısından dolayı, dış membrandan geçişin dış membran porin proteinleriyle sağlandığı gram-negatif hücre duvarı hidrofilik moleküller için önemli bir bariyerdir. Bu proteinlerin daha az duyarlı hale gelmesi ile sonuçlanan mutasyonlar florokinolonların minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin artmasına sebep olur (35).

2.3.3. Yan Etki

Florokinolonlar çok sık kullanılmalarına ve klinik başarılarına rağmen yan etkilerinden (örn. şiddetli anaflaksi, QT intervali uzaması ve potansiyel kardiyotoksisite) dolayı birçok florokinolon (örn. TEMA ve GREP) piyasadan çekilmek zorunda kalmıştır veya kullanımları katı şekilde sınırlandırılmıştır (örn. TROV). Ciddi idiyosenkratik reaksiyon profilinin TROV, TEMA ve tosufloksasini karakterize eden immünolojik olarak aktif 2,4-diflorofenil yapısıyla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür.

“Temafloksasin sendromu” olarak adlandırılan ciddi yan etkilerin gözlemlenmesinin ardından 1992’de TEMA kullanımdan kaldırılmıştır. Yaklaşık 3 500 hastadan birinde hemoliz, böbrek fonksiyon bozukluğu, koagülopati ve hepatik fonksiyon bozukluğu gibi yan etkilerin meydana geldiği tahmin edilmiştir. Karşılaştırma yapmak gerekirse, bu yan etkilerin görülme sıklığı CIP ile tedavi edilen hastalarda 17 000’de bir ve ofloksasin ile tedavi edilen hastalarda 33 000’de birdir.

Ölümcül hepatik hasara yol açtığı ile ilgili raporların ardından, TROV 1999’da piyasadan çekilmiştir. Klinafloksasin, fototoksisite ve hipoglisemiden dolayı ve SPAR fototoksisiteden dolayı kullanımdan kaldırılmıştır.

Kamuoyu tarafından bilinen geniş ölçüdeki negatif deneyimlere rağmen çoğu florokinolon güvenlidir ve yan etkiler diğer antibiyotik grupları ile kıyaslandığında nadirdir (36). Çok merkezli çift-kör bir çalışmada 7-10 gün için LEV kullananların %8.9’unda ve CIP kullananların %8.2’sinde ilaçlar ile ilgili yan etkilerin gözlemlendiği rapor edilmiştir (37).

Florokinolonların yan etkilerinden etkilenen başlıca sistemler deri, karaciğer ve sinir sistemidir. En iyi bilinen yan etkileri fototoksisitedir ve bu risk kullanılan florokinolona bağlı olarak önemli oranda değişmektedir. Fototoksisitenin meydana gelmesi, ilaç ve ışığın

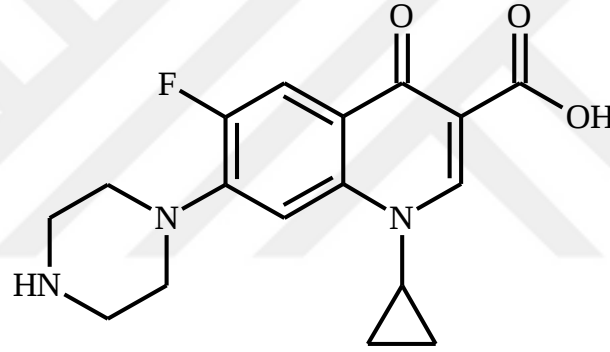
etkileşmesine dayanmaktadır. Anaflaktik şok ve anaflaktoid reaksiyonları içeren hipersensitivite reaksiyonları florokinolonlarda nadirdir. Hipersensitivite kaynaklı organa özel reaksiyonlar karaciğer ve böbrekleri kapsamaktadır. Uzun süreli kullanımda bile neoplastik hastalık riski minimumdur ancak ultraviyole (UV) ışığa maruziyet ile bu risk artabilir (36).

2.4. Çalışmalarda Kullanılan Maddelerin Kimyasal, Fiziksel, Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri

2.4.1. Siprofloksasin

2.4.1.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Analitlerden CIP'in açık formülü Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 2. CIP'in yapısı

Sistemik adı	: 1-Siklopropil-6-floro-4-okso-7-(piperazin-1-il)-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilik asit
Kapalı formülü	: $C_{17}H_{18}FN_3O_3$
Molekül ağırlığı	: 331.34 gram (g)/mol
Görünüm	: Uçuk sarıdan açık sarıya değişen renkte kristaller halinde bulunur.
Çözünürlük	: Suda çözünürlüğü nispeten düşüktür, asetik asit ve metil alkolde hafifçe çözünür; etanolde çok hafif çözünür; pratik olarak aseton, ACN, etil asetat, hekzan ve metilen klorürde çözünmez (38).

2.4.1.2. Tanım

CIP hem oral hem de parenteral kullanım için Bayer firması tarafından geliştirilmiş bir florokinolondur ve ikinci nesil florokinolonlara dâhildir. NOR'dan sonra geliştirilmiş olmasına rağmen, CIP kullanımı ile elde edilen başarılı klinik tecrübeler, bu ilacın geniş ölçüde kullanımına olanak sağlamıştır. Diğer ikinci nesil florokinolonlara benzer şekilde CIP günde iki defa kullanımına olanak sağlayan uzun yarı ömre sahiptir. Hücre içine penetrasyonu iyidir ve bu sayede intraselüler patojenlere karşı yüksek aktivite sergiler. Genel olarak CIP çoğu gram-negatif basile karşı NOR'dan iki-dört kat daha iyi, sefalosporin ve aminoglikozitlerden önemli derecede daha yüksek aktivite gösterir. Genellikle iyi oral absorpsiyonundan dolayı CIP yüksek dozlarda kullanıldığında intravenöz uygulama ile erişilen serum seviyelerine ulaşılabilir (39).

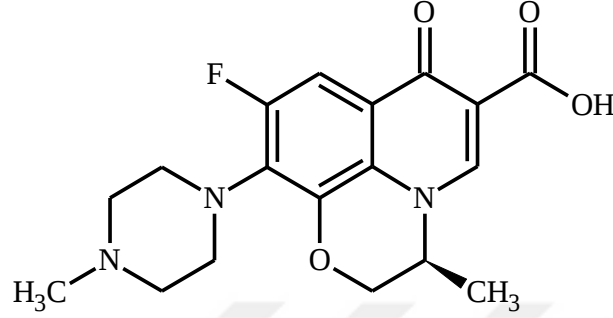
2.4.1.3. Farmakokinetik

Oral olarak kullanıldığında CIP gastrointestinal kanaldan hızla absorbe olur. Karaciğerdeki ilk geçiş etkisi minimumdur. Sağlıklı yetişkin bireylerde aç karnına alındığında ortalama %70 (± 15) oranında absorbe olur ve serum doruk konsantrasyonuna 0.5-2.3 saat içinde ulaşılır. Tablet halindeki CIP yemekle birlikte kullanılırsa maksimum konsantrasyona ulaşma süresi yaklaşık bir saat gecikir. Besinler genel olarak CIP absorpsiyonunu etkilemez. Oral olarak verilen 500 miligram (mg) CIP'e ait serum doruk konsantrasyonları 1.6-2.9 mikrogram/mililitre ($\mu\text{g/mL}$) aralığında değişir. İntravenöz olarak 400 mg CIP uygulandığında maksimum serum konsantrasyonları 4.6 $\mu\text{g/mL}$ 'ye ulaşır. CIP proteinlere düşük oranda bağlandığından (%20-40) geniş ölçüde dokulara dağılır. Safra, akciğer, böbrek, safra kesesi, uterus, seminal sıvı, prostat dokusu, tonsiller, endometriyum, fallop tüpleri ve overlerde seruma göre daha yüksek konsantrasyonda bulunur. Oral yoldan verilen bir dozun yaklaşık %50'si değişmeden idrar yoluyla atılır. Sağlıklı bireylerde eliminasyon yarı ömrü üç-beş saat arasında değişir ancak böbrek yetmezliği olan hastalarda bu süre 12 saate kadar uzayabilir. Bazı metabolitlerinin düşük de olsa antimikrobiyal aktivitesi mevcuttur (38).

2.4.2. Levofloksasin

2.4.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Analitlerden LEV'in açık formülü Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. LEV'in yapısı

Sistemik adı	: (-)-(S)-9-Floro-3-metil-10-(4-metilpiperazin-1-il)-7-okso-2,3-dihidro-7H-pirido[1,2,3-d,e] [1,4]benzoksazin-6-karboksilik asit
Kapalı formülü	: C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄
Molekül ağırlığı	: 361.37 g/mol
Görünüm	: Açık sarımsı-beyazdan sarı-beyaza değişen renkte kristaller halinde bulunur.
Çözünürlük	: Molekül ince bağırsak pH koşullarında zwitteriyonik haldedir. Sudaki çözünürlüğü pH 0.6'dan 5.8'e kadar sabittir (yaklaşık 100 mg/mL). Ortam pH'ı 5.8'in üzerine çıkarıldığında çözünürlüğü hızlı bir şekilde artar ve maksimum çözünürlüğe (272 mg/mL) pH 6.7'de ulaşılır. Ortam pH'ı 6.7'nin üzerine çıktığında çözünürlüğü azalır (38).

2.4.2.2. Tanım

İlk olarak Japonya'da Daiichi Seiyaku İlaç Şirketi tarafından geliştirilen LEV, OFLO'nun optikçe S-(-) izomeridir. OFLO iki optik izomerin karışımıdır, ancak S-izomeri, R-izomerinden 32-128 kat daha iyi antibakteriyel etki sergilemektedir. Bu sebeple OFLO'nun antibakteriyel etkisinin büyük bir kısmından S-izomeri sorumludur ve bu izomer LEV'i oluşturur. Bu bileşiğin artırılmış antibakteriyel potansiyelinden ve iyileştirilmiş toksisite profilinden faydalanmak için LEV geliştirilmiştir (40).

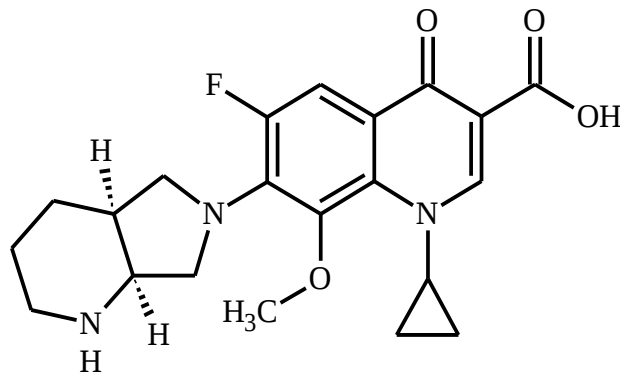
2.4.2.3. Farmakokinetik

LEV oral ya da intravenöz olarak kullanılır. Oral yoldan kullanıldığında hızla absorbe olur ve biyoyararlanımı yaklaşık %99'dur. Besinlerle önemli ölçüde etkileşime girmez. Oral olarak kullanıldığında maksimum plazma konsantrasyonuna yaklaşık bir-iki saat içinde ulaşır. Oral olarak düzenli şekilde günde tek sefer 500 mg kullanıldığında maksimum plazma konsantrasyonu 5.7 µg/mL ve en düşük plazma konsantrasyonu 0.5 µg/mL'dir. İntravenöz olarak kullanıldığında maksimum plazma konsantrasyonu 6.4 µg/mL ve en düşük plazma konsantrasyonu 0.6 µg/mL'dir. LEV'in plazma proteinlerine bağlanma oranı %24-38 arasındadır ve vücut sıvılarına geniş ölçüde dağılır. Akciğer dokusunda, plazma konsantrasyonları ile kıyaslandığında iki-beş kat yüksek konsantrasyonda bulunur. LEV vücutta çok az metabolize edilir ve uygulanan dozun yaklaşık %87'si değişmeden idrarla atılır. Başlıca desmetil ve N-oksid metabolitleri belirlenmiştir ve bu metabolitler uygulanan dozun %5'inden küçük bir kısmı oluştururlar. Renal klirensi glomerüler filtrasyonuna göre daha yüksektir ve bu durum aktif tübüler salgılanmaya uğradığını işaret eder. LEV'in ortalama eliminasyon yarı ömrü altı-sekiz saattir ve bu süre böbrek yetmezliği olan hastalarda uzar (38).

2.4.3. Moksifloksasin

2.4.3.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Analitlerden MOX'un açık formülü Şekil 4'te sunulmuştur.



Şekil 4. MOX'un yapısı

Sistematik adı	: 1-Siklopropil-6-floro-8-metoksi-7-[(4 <i>aS</i> ,7 <i>aS</i>)-oktahidro-6 <i>H</i> -pirolo[3,4- <i>b</i>]piridin-6-il]-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilik asit
Kapalı formülü	: C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₄
Molekül ağırlığı	: 401.43 g/mol
Görünüm	: Açık sarıdan sarıya değişen renkte kristalize bir maddedir.
Çözünürlük	: MOX bir sekonder amin, iki tersiyer amin ve karboksilik asit fonksiyonel grubu içeren amfoterik bir bileşiktir. Karboksilik asit ve sekonder amin grupları için ölçülen asitlik ayrışma sabiti (pKa) değerleri sırasıyla 6.25 ve 9.29'dur (41). MOX 0.1 Molar (M) NaOH çözeltisinde çözünür, su ve MeOH'da kolay çözünür, 0.1 M HCl ve dimetilformamid içerisinde az çözünür ve metilen klorür, aseton ve etil asetatta pratikte çözünmez (38).

2.4.3.2. Tanım

Bayer ilaç şirketi tarafından 1990'lı yılların başında geliştirilen MOX dördüncü nesil sentetik bir florokinolondur ve geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir. Akut bakteriyel sinüzit, kronik bronşitin akut bakteriyel alevlenmesi, toplum kökenli pnömoni ve komplike olmayan cilt ve cilt yapısı enfeksiyonlarında kullanımı onaylanmıştır. MOX ayrıca tüberküloz tedavisinde ikinci sıradaki ajan olarak komplike intra-abdominal enfeksiyonlarda kullanılır. MOX, GATI'ninkine benzer antibakteriyel aktivite spektrumuna sahip olmasına rağmen, böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması gerektirmez ve bu bakımdan daha güvenli bir profil sergiler (39).

2.4.3.3. Farmakokinetik

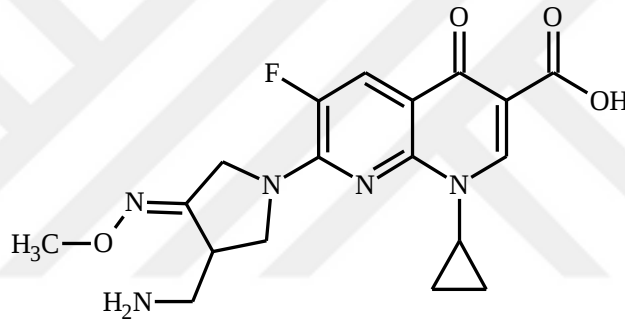
Oral, intravenöz ve göze topikal olarak MOX uygulanabilir. Oral yoldan uygulama sonrasında absorpsiyonu iyidir. Mutlak biyoyararlanımı yaklaşık olarak %90'dır. Sağlıklı bireylerde, kalsiyum preparatları MOX'a ait plazma derişimi-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) değerini önemli ölçüde etkilememesine rağmen, ortalama maksimum plazma konsantrasyonu değerini hafifçe düşürür. Demir ve antiasitler, MOX'un biyoyararlanımını önemli ölçüde düşürür. Yağdan zengin bir diyetle birlikte kullanılması absorpsiyonunu etkilemez. Oftalmik çözeltisi her iki göze uygulandığında absorpsiyonu çok düşüktür. MOX sistemik dolaşıma girdiğinde, konsantrasyondan bağımsız olarak, serum proteinlerine %30-50 oranında bağlanır. MOX'un dağılım hacmi geniştir. Solunum sistemini oluşturan

dokulara ve sıvılara iyi penetre olur. Doku konsantrasyonları çoğu zaman plazma konsantrasyonlarından yüksektir. Glukronit ve sülfat konjugasyonu ile MOX metabolize edilir ve CYP enzimleri MOX metabolizmasında rol oynamazlar. Glukronit ve sülfat konjugatları verilen dozun, sırasıyla, yaklaşık %14 ve %38’ni oluşturur. Değişmemiş ilaç idrar (yaklaşık %20) ve feçes (yaklaşık %25) ile atılır. İlacın verilen toplam oral dozunun %97’si değişmemiş ilaç veya bilinen metabolitleri halinde elimine edilir. Eliminasyon yarı ömrü MOX için yaklaşık 12 saattir (38).

2.4.4. Gemifloksasin

2.4.4.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Analitlerden GEM’in açık formülü Şekil 5’te sunulmuştur.



Şekil 5. GEM’in yapısı

Sistemik adı	: 7-[(4Z)-3-(Aminometil)-4-metoksimino-pirolidin-1-il]-1-siklopropil-6-floro-4-okso-1,4-dihidro-1,8-naftiridin-3-karboksilik asit
Kapalı formülü	: C ₁₈ H ₂₀ FN ₅ O ₄
Molekül ağırlığı	: 389.38 g/mol
Görünüm	: Beyazdan kahverengiye değişen renkte bir tozudur (38).
Çözünürlük	: GEM nötral pH’da suda serbestçe çözülür (pH 7’de 350 µg/mL). MeOH’da, 0.1 M HCl’de ve 0.1 M NaOH’da çözünür .

2.4.4.2. Tanım

Teknik olarak bir 6-floronaftiridon olmasına rağmen GEM, florokinolon sınıfı içinde yer alır ve 4. nesil bir florokinolondur. Başlangıçta LB20304 kodu verilen GEM Kore’de LG Kimyasal şirketi tarafından sentezlenmiştir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 320 mg GEM’e eşdeğer GEM mesilat tuzunun antibakteriyel ajan olarak oral uygulama için

tablet formunda kullanılmasını 2003'te onaylamıştır. Bazı atipik organizmalar dâhil olmak üzere GEM, geniş çapta gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı *in vitro* aktivite gösterir. Diğer florokinolonlarla karşılaştırıldığında gram-pozitif koklara karşı etkinliği daha güçlüdür. GEM toplum kaynaklı pnömoninin tedavisi için Birleşmiş Milletler kılavuzlarında “solunum sistemi florokinolonları” grubuna dâhil edilmiştir. Fotosensitiviteye yol açma riski düşüktür. Diğer florokinolonlar gibi GEM de bakteriyel topoizomerazlar olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü hedef alır (39, 42).

2.4.4.3. Farmakokinetik

Oral tablet olarak verilen GEM gastrointestinal kanaldan hızlıca absorbe olur. Oral uygulamayı takiben maksimum plazma konsantrasyonu 0.5-2 saat aralığında gözlemlenir. Tablet (320 mg) biyoyararlanımı yaklaşık olarak %71'dir. Yağdan zengin diyet ile kullanılması GEM'in farmakokinetiğini anlamlı ölçüde değiştirmez. Konsantrasyondan bağımsız olarak sağlıklı bireylerde GEM proteinlere yaklaşık %60-70 oranında bağlanır. Oral uygulamanın ardından GEM vücutta geniş ölçüde dağılır (43). Bronkoalveolar lavaj sıvısındaki GEM konsantrasyonu plazma konsantrasyonunun üzerindedir. Akciğer dokusu ve sıvılarına iyi penetre olur. Karaciğer, GEM metabolizmasında önemli rol oynamaz. İlaç uygulamasından 4 saat sonraya kadar, plazmada ilaçla ilgili ana bileşen değişmemiş ilaçtır (yaklaşık %65). Meydana gelen bütün metabolitler küçük miktardadır ve uygulanan oral dozun %10'dan daha az bir kısmını temsil ederler. N-Asetil GEM ve GEM'in karbamil glukroniti ana metabolitlerdir. CYP enzimleri GEM metabolizmasında önemli rol oynamazlar. GEM ve metabolitleri vücuttan iki farklı yol ile atılır. Sağlıklı bireylere oral olarak GEM verilmesinin ardından, dozun ortalama %61.0±9.5'i feçes ile ve %36.0±9.3'ü idrar ile değişmemiş ilaç ya da metabolitleri olarak atılır. Sağlıklı bireylere 320 mg ilaç verilmesinin ardından ortalama plazma eliminasyon yarı ömrü 7±2 saattir.

2.5. Florokinolonların Analizi İçin Literatürdeki Analiz Yöntemleri

Vybíralová ve ark. CIP'in insan plazmasında tayini için iç standart olarak NOR kullanarak bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (44). ACN ve pH 3 fosfat tamponu hareketli faz bileşiminde kullanılarak Discovery HS F5 [250 milimetre (mm) x 4.6 mm, 5 mikrometre (µm)] kolon üzerinde gradient elüsyon gerçekleştirilmiştir. Floresans dedektör (FD) 280 nanometre (nm) uyarma ve 446 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Örnek hazırlama işleminde oktadesil (C₁₈) katı faz ekstraksiyon kartuşu kullanılmıştır ve %72.3 geri kazanım elde edilmiştir. Yöntemin doğruluğu %88.4'ten büyüktür ve bütün

seviyelerde gerçekleştirilen deneylerin % bağıl standart sapması (% BSS) %7.74'ten küçüktür. Geliştirilen yöntemin tayin alt sınırı (LOQ) 50 pikomol/mL'dir.

Rambla-Alegre ve ark. CIP, LEV, OFLO, LOME ve MOX'un idrarda tayini için bir miseller sıvı kromatografisi tekniği geliştirmiş ve valide etmişlerdir (45). İdrar örnekleri herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan direkt sisteme enjekte edilmiştir. Tek enjeksiyonda bütün analitlerin ayırımı başaramadığı için iki farklı hareketli faz kullanılmıştır. CIP ve LEV için 0.15 M sodyum dodesil sülfat, %12.5 propanol ve %0.5 trietilamin karışımı pH 3'te hareketli faz olarak kullanılmıştır. FD 285 nm uyarma ve 465 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. LOME, OFLO ve MOX için 0.05 M sodyum dodesil sülfat, %12.5 propanol ve %0.5 trietilamin karışımı pH 3'te hareketli faz olarak kullanılmıştır. FD 295 nm uyarma ve 485 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Yöntemin LOQ değeri bütün florokinolonlar için 1 nanogram (ng)/mL'dir. Günler arası deneylerin % BSS'si ve % bağıl hata değerleri sırasıyla %1.0-8.4 ve %0.11-1.5 aralıkları içerisindeydir.

Srinivas ve ark. GATI, SPAR ve MOX'un tayini için iç standart olarak LEV kullanarak bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (46). Florokinolonlar etil asetat kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile ekstre edilmiştir. Fosfat tamponu (pH 2.5)-ACN karışımı [80:20, hacim/hacim (v/v)] kullanılarak 1 mL/dakika (dk) akış hızında ayırım gerçekleştirilmiştir. Analitik kolon olarak Kromasil C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Bütün florokinolonlar için LOQ 100 ng/mL olarak saptanmıştır. UV dedektör 293 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Analitlerin üç farklı konsantrasyon seviyesinde geri kazanımları %56.39-79.79 aralığındadır. Geliştirilen yöntemin doğruluğu %94.7-111.0 aralığındadır. Dört konsantrasyon seviyesinde yürütülen günler arası kesinlik çalışmaları sonucunda ölçümlerin BSS değerleri %1.33-14.9 arasındadır.

Espinosa-Mansilla ve ark. ENOX, NOR, OFLO ve enrofloksasinin (ENRO) insan idrarı ve serumunda tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (47). İdrar örnekleri 1'e 500 oranında seyreltilerek sisteme enjekte edilmiştir. Serum örnekleri ise 1'e 10 oranında pH 3 fosfat tamponu ile seyreltilmiş, filtrelenmiş ve analiz edilmiştir. Hareketli faz %92 pH 3 fosfat tamponu ve %8 tetrahidrofuran karıştırılarak oluşturulmuştur. Analiz Nova-pak C₁₈ (150 mm x 3.9 mm, 4 µm) kolon kullanılarak 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Bütün florokinolonlar 270 nm dalga boyunda uyarılmıştır. ENOX için 407 nm, NOR ve ENRO için 444 nm ve OFLO için 490 nm emisyon dalga boyu seçilmiştir. Aynı gün içinde 10 farklı örneğin analizi ile elde edilen deney sonuçlarının BSS'si %1.6'dan küçüktür.

Yöntemin doğruluğu dört konsantrasyon seviyesinde incelenmiş ve %88-110 aralığında bulunmuştur.

Cavazos-Rocha ve ark. CIP, MOX, SPAR, torezolid ve torezolidin ön ilacının (DA-7218) plazmada tayini için HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (48). Protein çöktürmek amacıyla 50 mikrolitre (μL) plazma örneğine 150 μL ACN ilave edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra filtrelenen örnek sisteme enjekte edilmiştir. %0.1 trifloroasetik asit ve ACN'nin hareketli faz olarak kullanıldığı bir gradient program ile florokinolonların ayırımı sağlanmıştır. Analiz, Atlantis dC₁₈ kolon (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) kullanılarak 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. UV dedektör kullanılarak 278 nm dalga boyunda saptama yapılmıştır. FD ise 292 nm uyarma ve 525 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi 30 dk'dır. Geliştirilen yöntemin geri kazanımı üç konsantrasyon seviyesinde incelenmiş ve %96-114 aralığında bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinlik incelenmiş ve yürütülen deneylerin BSS'si sırasıyla %2.42-13.80 ve %5.0-15.8 aralıklarında bulunmuştur. Yöntemin LOQ değerleri 0.04-0.40 $\mu\text{g/mL}$ aralığındadır.

Maia ve ark. OFLO, NOR, CIP ve MOX'un laboratuvar ölçekli bir mikrokozmosda biyobozunmalarını incelemek amacıyla HPLC-FD tekniği geliştirmişlerdir (49). Çalışmada 4 florokinolonun bozunmaları 60 gün boyunca ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC)-tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ile değerlendirilmiştir. Hareketli faz trifloroasetik asit ile pH 2.2'ye ayarlanmış %0.1'lik trietilamin çözeltisi ve MeOH'dan (64:36, v/v) oluşturulmuştur. Analitik kolon olarak Luna PFP (150 mm x 4.6 mm, 3 μm) kullanılmıştır. Akış hızı 0.6 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı 38 °C'ye ayarlanmıştır. Uyarma dalga boyu 290 nm'ye ve emisyon dalga boyu 460 nm'ye ayarlanmıştır. Analiz sonucunda dört florokinolon için LOQ değerleri 5.0-20.0 ng/mL aralığında bulunmuştur. Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluğu %86.4-104.7 aralığındadır. Gün içi ve günler arası üç farklı konsantrasyonda yürütülen deneylerin BSS'si sırasıyla %2.51 ve %2.74'ten küçüktür. Hesaplanan geri kazanım değerleri dört florokinolon için %90.1-108.4 aralığındadır.

Watabe ve ark. PAZU, CIP ve LEV'in insan serumunda tayini için bir HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (50). Örnek hazırlama işlemi için protein çöktürme tekniği tercih edilmiş ve bu amaçla %6'lık perklorik asit ve MeOH kullanılmıştır. Hareketli faz %1 trietilamin çözeltisi (pH 3) ve ACN'den (86:14, v/v) oluşturulmuştur. Analiz Inertsil oktil (C₈) guard kolon (10 mm x 4.0 mm, 5 μm) ve Inertsil C₈-3 kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) analitik kolon kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk'ya

ayarlanmış, FD 300 nm uyarma ve 450 nm emisyon dalga boyunda çalıştırılmıştır. Toplam analiz süresi 18 dk'dır. Bütün florokinolonlar için doğrusal aralık 0.1-20.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bütün florokinolonlar için gün içi ve günler arası kesinlik değerleri dört konsantrasyon seviyesinde %7'den küçük bulunmuştur. Hesaplanan gün içi ve günler arası bağıl hata değerleri %1.6 ile %9.3 aralığındadır. Ortalama geri kazanımlar PAZU, LEV ve CIP için sırası ile %96-99, %86-91 ve %85-90 aralıkları içerisinde. Yöntemin LOQ değeri bütün analitler için kalibrasyon eğrisinin en alt sınırı olan 0.1 µg/mL olarak bulunmuştur.

Arroyo-Manzanares ve ark. DANO, NOR, PIPE, ENOX, LOME, CIP, ENRO, MOX, OKSO, sarafloksasin (SARA), difloksasin (DİFLO), flumequin (FKN) ve marbofloksasin (MARBO) dâhil olmak üzere insan ve hayvan hastalıklarında kullanılmakta olan 13 florokinolonun süt, idrar ve çevresel sularda tayini için bir UHPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (51). Örnek hazırlama basamağı modifiye edilmiş bir tuz ile çöktürme (salting out) destekli sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminden oluşturulmuştur. Poroshell 120 EC-C₁₈, (50 mm x 2.1 mm, 2.7 µm) kolon kullanılmıştır. Ayırım %0.1 formik asit çözeltisi (pH 4.75) ve MeOH gradienti ile sağlanmıştır. Akış hızı 0.5 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. Uyarma ve emisyon dalga boyları zamana bağlı olarak değiştirilmiştir. FKN hariç bütün kinolonların tayininde FD ilk 6.5 dk için 278 nm uyarma ve 466 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Diğer analit FKN ise 325 nm uyarma ve 366 nm emisyon dalga boyunda tayin edilmiştir. Çalışılan üç matrikste yöntemin farklı florokinolonlar için LOQ değerleri 0.17-192 µg/litre (L) aralığındadır. 3 farklı seviyede yöntemin gün içi ve günler arası kesinliği her 3 matriks için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Süt, idrar ve çevresel su matriksleri için yöntemin kesinliği sırası ile %2.4-10.5, %2.8-10.9 ve %1.9-10.3 aralığındadır. Yöntem doğruluğunu kanıtlamak amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmış ve bütün analitler için %71.2-103.8 aralığında geri kazanımlar elde edilmiştir.

Morales-Cid ve ark. danofloksasin (DANO), OFLO, MARBO, ENRO ve DİFLO'nun idrarda tayini için kapiler elektroforez-kütle spektrometresi (MS) tekniği geliştirmişlerdir (52). Analitlerin analize hazırlanmasında paketlenmiş sorbentlerle mikroekstraksiyon tekniği kullanılmış ve sisteme entegre edilmiştir. Ekstraksiyon basamağı hariç, analiz 6 dk'dan kısa sürede tamamlanmıştır. Yöntem bütün analitler için 12.5-500 µg/L aralığında doğrusal bulunmuştur. Teşhis alt sınırı (LOD) değerleri 6.3-10.6 µg/L aralığındadır. Yöntemin tekrar edilebilirliği aynı örneğin dört defa analiz edilmesiyle

değerlendirilmiştir. Pik alanlarının ve göç zamanlarının BSS'si sırasıyla %5.9 ve %1.5'ten küçüktür. Florokinolonların geri kazanımı %70.8-109.3 aralığında bulunmuştur.

Rote ve Pingle GEM'in insan plazmasında tayini için HPLC ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi tekniği (HPTLC) geliştirmişlerdir (53). GEM plazmadan kloroform:asetik asit karışımı (5.4:0.1, v/v) kullanılarak ekstre edilmiştir. Eurosphere-100 C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolon olarak kullanılarak 25 °C sıcaklıkta ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak MeOH:sodyum asetat (%1):orto-fosforik asit karışımı (65:35:0.5, v/v/v, pH 2.1) kullanılmış ve akış 0.8 mL/dk'ya ayarlanmıştır. UV dedektör 263 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Yöntem 30-600 ng/mL aralığında doğrusaldır. Geri kazanım %80.06-84.88 aralığındadır. Gün içi ve günler arası yürütülen deneylerin üç konsantrasyon seviyesinde BSS'si, HPLC tekniği için %5.88'den küçüktür ve bağıl hatalar (BH) %1.10-2.67 aralığındadır. Yöntem kesinliği HPTLC tekniği için %1.75-9.20 ve BH değerleri %0.83-19.1 aralığındadır. HPLC ve HPTLC yöntemlerinin LOQ değerleri sırası ile 30 ng/mL ve 50 ng/nokta'dır. Kısa süreli (6 ve 12 saat), donma-erime döngülerinden sonra ve uzun süreli olarak GEM'in kararlılığı değerlendirilmiş ve analit kararlı bulunmuştur.

Sagiri ve ark. GEM'in anne sütünde tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (54). Örnekler hareketli faz ile karıştırılıp filtrelendikten sonra direkt kolona enjekte edilmiştir. Kromatografik ayırım Thermo Hypersil Gold C₁₈ kolon (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) ve aynı materyalden üretilmiş guard kolon (4 mm x 3 mm, 5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MeOH:50 milimolar (mM) orto-fosforik asit karışımı (40:60, v/v) hareketli faz olarak seçilmiş ve 1 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Florokinolonların tayininde, FD 272 nm uyarma ve 395 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Yöntem 0.1-2.5 µg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. GEM'in ortalama geri kazanımı %98.85'tir. Üç konsantrasyon seviyesinde 5 tekrar yapılarak yürütülen gün içi ve günler arası kesinlik deneylerinin BSS'si sırasıyla %1.30-1.91 ve %0.85-2.01 aralıkları içerisinde. Ortalama BH %1.18-1.93 aralığında bulunmuştur. Oda sıcaklığında 24 saat, otomatik örnekleyici içerisinde 24 saat ve 4 °C'de bir ay bekletilmiş GEM çözeltilerinin kararlılığı incelenmiştir ve analit bu şartlar altında kararlı bulunmuştur. Yöntemin uygulanabilirliği tek doz (320 mg) GEM kullanan anneden alınan örneğin analiz edilmesiyle kanıtlanmıştır.

Araújo ve ark. GEM'in sıçan böbrek, akciğer ve karaciğer mikrodializatlarında tayini için bir sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir (55). Shimadzu Shim-Pack C₁₈ kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılarak 1.1 mL/dk akışta analiz gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak trietilamin çözeltisi (pH 3, %0.5, v/v), MeOH ve ACN karışımı (71:15:14, v/v/v) kullanılmıştır. Florokinolonların tayininde, FD 344 nm uyarma ve 399 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. LOQ, 50 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntem 50-2 000 ng/mL aralığında doğrusaldır. Üç konsantrasyonda yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si sırasıyla %6.06 ve %4.10'dan küçüktür. Doğruluk %90.0-106.5 aralığındadır. Analiz süresi 9 dk'dır. Ekstraksiyon etkinliği ve retrodializ olarak belirlenen bağlı geri kazanımlar sırasıyla %29.24±3.67 ve %23.67±3.31'dir. Mikrodializatlar içerisinde GEM kararlılığı, oda sıcaklığında 8 saat bekletildikten sonra, üç donma-erime döngüsünden sonra, -80 °C'de 14 gün bekletildikten sonra ve otomatik örnekleyicide sekiz saat bekletildikten sonra gösterilmiştir. Geliştirilen yöntem serbest GEM'in sıçan böbrek akciğer ve karaciğerine penetrasyonunu araştırmak için başarılı şekilde kullanılmıştır.

Al-Hadiya ve ark. GEM'in plazmada tayini için bir HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (56). İç standart olarak kullanılan CIP ve GEM ultrafiltrasyon yöntemi ile ekstre edilmelerinin ardından direkt olarak sisteme enjekte edilmiştir. Symmetry LC-18 kolon (150 mm x 3.9 mm, 5 µm) kullanılarak ayırım 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Trifloroasetik asit çözeltisi (%0.1):ACN karışımı (80:20, v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Florokinolonların tayininde, FD 269 nm uyarma ve 393 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Yöntem doğrusallığı 25-5 000 ng/mL arasında kanıtlanmıştır. LOD 10 ng/mL'dir. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %7.29'u aşmamıştır. Gün içi ve günler arası BH değerleri sırası ile %4.52 ve %7.22'den küçüktür. Geri kazanım %97'den büyük bulunmuştur. Kararlılık, altı saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, dört donma-erime döngüsünden sonra ve -70 °C'de üç ay bekletildikten sonra değerlendirilmiş ve analit kararlı bulunmuştur. Geliştirilen yöntem GEM'in klinik bir çalışmasına uygulanmıştır.

Czyrski ve ark. MOX'un plazmada tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (57). LiChroCART 4-4 RP-18 guard kolon ve LiChroCART 125-4 RP-18 analitik kolon (125 mm x 4 mm, 5 µm) kullanılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak LEV kullanılmıştır. Trietilamin çözeltisi (pH 3, %0.4, v/v) ve ACN karışımından (74:26, v/v) oluşan hareketli faz 1 mL/dk akış hızında sisteme verilmiştir. Saptama UV dedektör ile

295 nm dalga boyunda yapılmıştır. Yöntem 0.2-10 µg/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si dört konsantrasyon seviyesinde sırasıyla %2.71-3.57 ve %5.71-9.07 arasındadır. BH değerleri %0.13-9.00 arasındadır. LOD 0.05 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem geri kazanımı %96-104 aralığındadır. Otomatik örnekleyici içerisinde 24 saat bekletildikten sonra, üç donma-erime döngüsünden sonra ve -20 °C'de üç ay bekletildikten sonra MOX kararlı bulunmuştur. Geliştirilen yöntem farmakokinetik bir çalışmada kullanılarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Cañada-Cañada ve ark. PIPE, MARBO, ENOX, OFLO, NOR, CIP, DANO, LOME, ENRO, SARA, DIFLO, OKSO, NA, FKN ve piromidik asitin idrarda ve farmasötik preparatlarda tayini için HPLC-DAD-FD yöntemi geliştirmişlerdir (58). Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolon olarak kullanılmıştır. Kromatografik ayırım hareketli faz olarak MeOH, ACN, 10 mM sitrat tamponu (pH 3.5) ve 10 mM sitrat tamponu (pH 4.5) kullanılarak gradient elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1.5 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Analitlerin saptanmasında DAD, 280 nm'de çalıştırılmıştır. İlaveten FD, 280/450, 280/495, 280/405, 320/360 olmak üzere dört farklı uyarma/emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Elde edilen 0.9981-0.9996 aralığındaki korelasyon katsayıları (r) 15 analit için yöntemin doğrusallığını kanıtlamıştır. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.3-18 ve 0.8-61 ng/mL aralığında bulunmuştur. Pik alanlarının gün içi ve günler arası deneylerle elde edilen kesinliği %6'dan düşüktür. Yöntem doğruluğu %93-117 aralığında bulunmuştur.

Kumar ve ark. NA, OFLO, LOME ve sinoksasinin (SİNO) idrar, yeraltı suları, tavuk eti, hastane atık suyu ve ilaçlarda tayini için Dionex RP C-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) ve Supelco ters faz amid kolonların (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) etkinliklerini karşılaştırarak bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir (59). ACN, MeOH, sitrat tamponu (0.001 M, pH 4.5) gradienti kullanılarak 1 mL/dk akış hızında ayırım gerçekleştirilmiştir. Analizde UV dedektör 280 nm'ye ayarlanmıştır. En iyi sonuçlar ters faz amid kolon ile elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem 5-1 000 ng/mL aralığında doğrusaldır. Bütün matrikslerde florokinolonların geri kazanımı %90'ın üzerindedir. Yöntem kesinliğinin incelenmesi için yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %2.73'ten küçüktür.

Yaroshenko ve ark. MOX'un insan plazmasında tayini için YMC-Triart C₁₈ (150 mm x 2.0 mm, 3 µm) kolon kullanarak bir HPLC-MS yöntemi geliştirmişlerdir (60). Sep-Pak katı faz ekstraksiyon kartuşları kullanılarak örnekler analize hazırlanmıştır. İç standart olarak

OFLO kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 1 mM amonyum format içeren ACN:su:formik asit karışımı (65:35:0.1) kullanılmıştır. Akış hızı 0.2 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Yöntem 1-2 500 ng/mL aralığında doğrusaldır. Kromatogramlar pozitif polaritede seçilmiş iyon izleme modunda, MOX ve OFLO'nun protonlanmış moleküler iyonlarına karşılık gelen kütle/yük (m/z) 402.2 ve m/z 362.2 için kaydedilmiştir. Yöntem doğruluğu %92.0-105.9 aralığındadır. Yöntem kesinliği ise %0.019-0.098 aralığında bulunmuştur. Kararlılık, üç donma-erime döngüsünden sonra, -25 °C'de 1 ay saklandıktan sonra, 22 °C'de 18 saat saklandıktan sonra ve otomatik örnekleyici içerisinde 4 °C'de 18 saat bekletildikten sonra değerlendirilmiş ve MOX kararlı bulunmuştur. Geliştirilen yöntem, biyoeşdeğerlik çalışmasında kullanılarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Sousa ve ark. LEV, PAZU, GATI, MOX ve TROV'un insan plazmasında tayini için bir HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (61). Analitler plazmadan ACN kullanılarak protein çöktürme işlemiyle ekstre edilmiştir. Analitler ve iç standart olarak kullanılan NOR gradient elüsyonla Purospher Star C₁₈ kolon (55 mm x 4 mm, 3 µm) kullanılarak ayrılmıştır. Trietilamin ile pH 3'e ayarlanmış %0.1'lik formik asit çözeltisi, ACN ve MeOH'dan oluşturulan hareketli faz 1 mL/dk akış hızında sisteme verilmiştir. Florokinolonların tayininde, FD 260/455 nm uyarma/emisyon dalga boylarına ayarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi bütün analitler için doğrusaldır [determinasyon katsayısı (R^2) ≥ 0.9923]. Gün içi ve günler arası kesinlik %7.32'yi geçmemiştir. Gün içi ve günler arası doğruluk %88.27-108.92 aralığındadır. Yöntemin LOQ değerleri 0.005-0.04 µg/mL arasındadır. Kinolonların kararlılığı, kısa süreli, uzun süreli ve donma-erime döngülerinden sonra değerlendirilmiş, analitler kararlı bulunmuştur. Yöntem MOX ve LEV kullanan yetişkin hastalardan alınan örneklerin analizi için kullanılarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Helmy linezolid, tinidazol, NOR, MOX, LEV ve GATI'nin plazmada tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirmiştir (62). Örnekler ACN:MeOH karışımı (1:1) ile protein çöktürme işlemi uygulanarak analize hazırlanmıştır. Fosfat tamponu (20 mM, pH 3.2): ACN karışımı (75:25, v/v) hareketli faz olarak kullanılarak Hypersil BDS C₁₈ kolonda (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) 1.5 mL/dk akış hızında ayırım yürütülmüştür. Saptama için UV dedektör 260 nm'ye ayarlanmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik %12.5'i geçmemiştir. Gün içi ve günler arası doğruluk %92-112 aralığındadır. Yöntemin LOQ değerleri, NOR hariç bütün analitler için 0.1 µg/mL'dir, NOR için ise LOQ 0.05 µg/mL'dir. Kısa süreli, uzun süreli ve donma-erime kararlılıkları değerlendirilmiş ve analitler kararlı bulunmuştur. Yöntem

terapötik ilaç izleme ve farmakokinetik çalışmalarda kullanılarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Pena ve ark. NOR, CIP ve ENRO'nun çevresel sularda tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (63). Tetrabütilamonyum bromür ile pH 3'e ayarlanmış 0.025 M fosforik asit çözeltisi:MeOH karışımı (960:40, v/v) hareketli faz olarak kullanılarak, Chromolith Performance RP-18e kolonda (100 mm x 4.6 mm) 2.5 mL/dk akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Uyarma/emisyon dalga boyları 278/450 nm'ye ayarlanmıştır. Su örnekleri Oasis HLB kartuşu kullanılarak ekstre edilmiştir. Bütün analitler için yöntem 0.05-1 µg/mL arasında doğrusaldır ve LOQ 25 ng/mL'dir. Analitlerin geri kazanımları üç konsantrasyon seviyesinde %76.5-97.2 arasındadır. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %11.8'den düşüktür.

Seifrtová ve ark. OFLO, NOR, CIP, ENRO'nun atık sularda tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (64). Analitler AccuBOND II SAX anyon değiştirici ve Oasis HLB kartuş ile art arda ekstre edilmiştir. Tetrabütilamonyum bromür ile pH 3'e ayarlanmış 0.025 M fosforik asit çözeltisi:MeOH:ACN karışımı (920:70:10, v/v/v) hareketli faz olarak kullanılarak, Chromolith Performance RP-18e kolonda (100 mm x 4.6 mm) 1.2 mL/dk akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Uyarma/emisyon dalga boyları 278/450 nm'ye ayarlanmıştır. Geliştirilen yöntem bütün analitler için doğrusaldır ($R^2 \geq 0.9975$). Yöntemin LOQ değerleri 25-250 ng/L aralığındadır. Üç konsantrasyon seviyesinde florokinolonlar için hesaplanan geri kazanımlar %75-121 arasındadır. Yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si üç farklı konsantrasyon seviyesinde %10'dan küçüktür. Yöntemin uygulanabilirliği 14 farklı çevresel su örneği analiz edilerek kanıtlanmıştır.

Laban-Djurdjević ve ark. MOX'un plazmada tayini için bir HPLC-FD yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (65). Analitik kolon olarak Supelco LC-Hisep (150 x 4.6 mm, 3 µm) kullanılmıştır. Fosfat tamponu (25 mM, pH 3.0):ACN karışımı (95:5, v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Uyarma/emisyon dalga boyları 290/500 nm'ye ve akış hızı 1 mL/dk'ya ayarlanmıştır. İç standart olarak OFLO kullanılmıştır. Seyreltme işleminin ardından plazma örnekleri direkt olarak sisteme enjekte edilmiştir. Yöntem 3-1 300 µg/L aralığında doğrusaldır. Ortalama geri kazanım %92.5 ve LOQ 3 µg/L olarak hesaplanmıştır. Aynı gün içerisinde üç konsantrasyon seviyesinde altışar örneğin analiz edilmesi ile elde edilen sonuçların BSS'si %0.82'den küçüktür. MOX (400 mg tablet, oral) kullanan hastaların plazma örnekleri analiz edilerek yöntem uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Hong Xu ve ark. MOX'un plazmada tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (66). Plazma örneklerinden MOX diklorometan kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile ekstre edilmiştir. GATI iç standart olarak kullanılmıştır. Kromasil C₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. ACN:MeOH:%1 trietilamin içeren 20 mM fosfat tamponu (pH 3.0) karışımı (15:20:65, v/v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'ye ve akış hızı 1 mL/dk'ya ayarlanmıştır. 296 nm dalga boyunda saptama yapılmıştır. Yöntem 0.05-5 µg/mL aralığında 0.9997 *r* ile doğrusaldır. LOQ ve LOD değerleri sırası ile 0.05 ve 0.015 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem kesinliği %3.84-9.61 aralığındadır. Yöntem doğruluğu ise %99.37-108.17 aralığındadır. Kararlılık, kısa süreli, uzun süreli ve 3 donma-erime döngüsünden sonra değerlendirilmiştir ve MOX kararlı bulunmuştur. Yöntem uygulanabilirliği 12 gönüllünün plazma örnekleri analiz edilerek kanıtlanmıştır.

Kumar ve Ramachandran MOX'un plazmada tayini için bir HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (67). Plazma örnekleri analize hazırlanırken %7'lik perklorik asit çözeltisi kullanılarak protein çöktürme işlemi uygulanmıştır. Lichrospher 100 RP-18e (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Hareketli faz 50 mM fosfat tamponu (pH 2.6) ve ACN'den oluşmuştur (80:20, v/v). Uyarma/emisyon dalga boyları 290/460 nm'ye ayarlanmıştır. Yöntem 0.125-10 µg/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %10'dan küçüktür. Ortalama geri kazanım %101 olarak bulunmuştur. Yöntem doğruluğu %97-106 arasındadır. Yöntemin uygulanabilirliği oral olarak 400 mg MOX kullanan hastalardan alınan kan örnekleri analiz edilerek kanıtlanmıştır.

Lee ve ark. MOX ve LEV'in serumda tayini için bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir (68). Analitik kolon olarak Atlantis dC₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Hareketli faz %0.1'lik formik asit çözeltisi ve %0.1 formik asit içeren ACN'den oluşmuştur (60:40, v/v). Enjeksiyon hacmi 5 µL ve akış hızı 500 µL/dk'ya ayarlanmıştır. Çoklu reaksiyon izleme modunda belirlenen öncül iyonlardan sonuç iyonlarına seçilmiş kütle geçişlerinin görüntülenmesi ile tayin yapılmıştır (MOX için *m/z* 402.2 → 384.2 ve LEV için *m/z* 362.2 → 318.2). Yöntem MOX için 0.23-1 000 ng/mL aralığında, LEV için ise 0.13-1 000 ng/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası doğruluk %92.1-104 aralığındadır. Ortalama geri kazanım MOX ve LEV için sırası ile %96.0 ve %95.5'tir. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %9'dan küçüktür. Kararlılık, kısa süreli, uzun süreli ve üç donma-erime döngüsünden sonra değerlendirilmiştir ve MOX

kararlı bulunmuştur. Çok ilaca dirençli tüberküloz hastalarından alınan örnekler analiz edilmiş ve geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Ashfaq ve ark. OFLO, CIP, SPAR, MOX ve GEM'in hastane atık sularında tayini için HPLC-UV tekniği geliştirmişlerdir (69). Analitler kloroform kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile analize hazırlanmıştır. Ayırım Discovery C₁₈ kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fosfat tamponu (20 mM, pH 3.9):MeOH karışımı (60:40, v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk olup, UV dedektör 279 nm'ye ayarlanmıştır. Yöntem bütün analitler için 0.05-40 µg/mL aralığında doğrusaldır. Analitlerin geri kazanımı %70'ten büyüktür. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %2.8-5.9 aralığındadır.

Nemutlu ve ark. ENOX, LEV, PEFLO, CIP, LOME, MOX ve oksolonik asitin plazmada ve amniyotik sıvıda tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (70). Polibenzilpiperidon temelli polimerik bir sorbent kullanılarak katı faz ekstraksiyon işlemi yürütülmüştür. Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolonun önüne Phenomenex C₁₈ guard kolon (4 mm x 3.0 mm) yerleştirilerek ayırım gerçekleştirilmiştir. Sitrat tamponu (15 mM, pH 3.2), ACN, MeOH ve 5 mM tetrametilamonyum bromür gradienti kullanılarak 1.5 mL/dk akış hızında, 40 °C kolon sıcaklığında ayırım sağlanmıştır. Yöntem bütün analitler için doğrusaldır ($r \geq 0.9974$). Yöntemin LOQ değerleri 0.020-0.035 µg/mL aralığındadır. Geri kazanım değerleri %95'in üzerindedir. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %10'dan küçüktür. Gün içi ve günler arası deneyler ile yürütülen doğruluk çalışmalarında BH değerleri %0.1-7.4 aralığında bulunmuştur. Analitlerin kararlılığı kısa süreli, otomatik örnekleyici içerisinde ve uzun süreli olarak değerlendirilmiş ve analitler kararlı bulunmuştur. Yöntem, altı gönüllü hamile kadından alınan plazma ve amniyotik sıvı örneklerinin analizinde kullanılarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Lara ve ark. PİPE, OKSO, NA, FKN, PEFLO, NOR, LOME, SİNO, MOX, CIP, ENRO, DANO, SARA, DİFLO, MARBO ve orbifloksasinin musluk suyunda ve idrarda tayini için online katı faz ekstraksiyon-HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (8). Örnek hazırlamada HyperSep Javelin Direct-Connect Retain-AX and HyperSep Uniguard Retain-AX katı faz ekstraksiyon kolonları kullanılmıştır. Ayırım Kinetex C₁₈ kolonda (150 mm x 4.6 mm, 2.6 µm), sitrat tamponu (10 mM, pH 4.00) ve ACN gradienti kullanılarak 1.2 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. İdrar ve musluk suyu için yürütülen gün içi ve

günler arası deneylerin BSS'si %13'ten küçüktür. Bağlı geri kazanımlar %94-109 aralığındadır.

Wang ve ark. fleroksasin, OFLO, NOR, CIP ve ENRO'nun idrar ve plazmada tayini için yöntem geliştirmişlerdir (71). Ultrason destekli tuz ile indüklenen sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniği geliştirilerek örnek hazırlama basamağında kullanılmıştır. Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ kolonda (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) ayırım yapılmıştır. Hareketli faz olarak litresine 3.4 mL fosforik asit ve 6 mL trietilamin eklenen MeOH:ACN:su karışımı (14:7:79, v/v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 0.8 mL/dk'ya, kolon sıcaklığı ise 40 °C'ye ayarlanmıştır. Uyarma/emisyon dalga boyları 290/455 nm'ye ayarlanmıştır. Yöntemin LOD değerleri 0.12-0.67 µg/L aralığında bulunmuştur. Çalışılan beş kinolon için yöntem doğrusaldır ($R^2 \geq 0.9991$). Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %0.89-6.52 aralığındadır. İdrar ve plazma matriksleri için bağlı geri kazanımlar sırası ile %92.8-110.9 ve %92.6-108.8 arasındadır.

Wang ve ark. sinafloksasinin sıçan plazmasında tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir (72). Protein çöktürme işlemi 96 kuyucuklu plakalarda yapılarak örnekler analize hazırlanmıştır. Çöktürücü olarak 1:1 oranında ACN kullanılmıştır. Analiz Halo fused-core C₁₈ kolonda (50 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak orto-fosforik asit ile pH 3'e ayarlanmış %0.5'lik trietilamin çözeltisi:ACN karışımı (80:20, v/v) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C'ye ve akış hızı 1 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Uyarma/emisyon dalga boyları 295/505 nm'ye ayarlanmıştır. Yöntem 5-500 ng/mL aralığında doğrusallık göstermiştir ($r=0.9996$). Yöntemin LOD'si 2 ng/mL olarak belirlenmiştir. Yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin doğruluğu dört konsantrasyon seviyesinde %100.3-106.9 arasında, BSS'si ise %11'den küçüktür. Sinafloksasinin ortalama geri kazanımı üç konsantrasyon seviyesinde %74'ten büyük bulunmuştur. Sinafloksasinin kararlılığı kısa süreli, uzun süreli, otomatik örnekleyicide bekletildikten sonra ve üç donma-erime döngüsünden sonra incelenmiş ve analit kararlı bulunmuştur. Geliştirilen yöntem sıçanlarda sinafloksasinin farmakokinetiklerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

Locatelli ve ark. CIP ve LEV'in sputumda tayini için HPLC-DAD yöntemi geliştirmişlerdir (73). Analitlerin analize hazırlanmasında paketlenmiş sorbentlerle mikroekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Discovery C₈ kolonda (250 mm x 4.6 mm, 5µm) ayırım yürütülmüştür. İç standart olarak ENRO kullanılmıştır. LEV, CIP ve ENRO için sırasıyla 295, 279 ve 278 nm dalga boylarında saptama yapılmıştır. Hareketli faz olarak

%1 trietilamin içeren 30 mM fosfat tamponu (pH 2.5):%1 trietilamin içeren ACN karışımı (86:14, v/v) kullanılmıştır. Analiz 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Yöntem iki analit için de 0.05-2 µg/mL aralığında doğrusaldır. Yöntemin LOQ değeri her iki analit için de 0.05 µg/mL'dir. Gün içi ve günler arası BH değerleri %7.25 ile %11.8 arasındadır. Yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si sırasıyla %10.4 ve %11.1'den küçüktür. Yöntemin uygulanabilirliği kistik fibrozis hastalarından alınan sputum örneklerinin analiz edilmesi ile kanıtlanmıştır.

Mannemala ve ark. OFLO, NOR, ornidazol, tinidazolün plazma ve idrarda tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (74). Hem idrar hem de plazma için Polimerik Strata X kartuşu kullanılarak katı faz ekstraksiyonu yapılmıştır. Phenomenex fenil hekzil kolon (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılarak 1.1 mL/dk akış hızında ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak su:ACN:trietilamin karışımı (74:26:0.15, v/v/v) kullanılmıştır. Yöntem bütün analitler için doğrusaldır ($r \geq 0.9947$). İdrar ve plazma için LOQ değerleri 0.2-0.5 µg/mL aralığındadır. Her iki matriks için de gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %8'in altındadır. Yöntemin doğruluğu %94.7-107.4 aralığındadır. Analitlerin geri kazanımı %93.9-102.3 aralığındadır.

Jiménez ve ark. MARBO, NOR, CIP, DANO, ENRO, SARA, DİFLO, OKSO ve FKN'nin yumurtalarda tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (75). Basınçlı sıvı ekstraksiyonu tekniği örneklerin analize hazırlanmasında kullanılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak 50 mM fosfat tamponu (pH 3):ACN (1:1, v/v) karışımı kullanılmıştır. Inertsil C₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) ve Kinetex C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 2.6 µm) kolonlarda ayırım gerçekleştirilmiş ve kolon performansları karşılaştırılmıştır. Kinetex kolon kullanıldığında çözücü tüketimi azalmış ve analiz süresinde düşüş meydana gelmiştir. Florokinolonlar 10 mM oksalik asit çözeltisi ve ACN gradienti ile ayrılmıştır. Ayırım 25 °C'de gerçekleşmiştir. Kalibrasyon eğrileri bütün analitler için doğrusaldır ($r \geq 0.997$). Geri kazanımlar %29-122 aralığında bulunmuştur. Yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %23'ten küçüktür. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri iki kolon için 0.2-33.5 µg/kg (kilogram) aralığındadır.

Moema ve ark. ENRO, CIP, NOR, DANO, SARA ve MARBO'nun tavuk ciğerinde tayini için HPLC-DAD yöntemi geliştirmişlerdir (76). Örnek hazırlama basamağında dispersif sıvı-sıvı mikroeekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Dispersiyon çözücüsü olarak MeOH, ekstraksiyon çözücüsü olarak ise triklorometan kullanılmıştır. Ayırım XTerra MS

C₁₈ kolonda (150 mm x 3.0 mm, 3.5 µm) 40 °C’de ve 0.35 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Saptama için UV dedektör 280 nm’ye ayarlanmıştır. Formik asit çözeltisi (%0.1) ve ACN gradient program içerisinde kullanılmıştır. Yöntem 30-500 µg/kg aralığında doğrusaldır ($0.9974 \geq R^2 \geq 0.9945$). Yöntemin LOQ değerleri 23-62 µg/kg aralığındadır. Bütün analitler için geri kazanım %83-102 arasında bulunmuştur. Yürütülen deneylerin üç konsantrasyon seviyesinde BSS’si %1.7-8.5 aralığındadır.

Denadai ve Cass CIP, ENRO, GEM, MOX, NOR ve OFLO’nun çevresel sularda tayini için HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir (77). Örnekler sisteme direkt enjekte edilmiştir. Analiz başına çözücü tüketiminde ve dolayısı ile toksik atık miktarında azalma sağlanmıştır. Analizde sığır serum albümini yüklenmiş C₈ kolon (50 mm x 2.1 mm, 10 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Elde edilen 0.990’dan yüksek *r* değerleri yöntemin doğrusallığını kanıtlamıştır. Analiz sonucunda %79.5-112 aralığında geri kazanımlar elde edilmiştir. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS’si %15’in altındadır. Yöntem doğruluğu üç konsantrasyon seviyesinde %79.5-116 aralığındadır. Yöntem nehir ve atık su arıtım tesisleri sularının analizinde kullanılarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Mirzajani ve Kardani CIP, OFLO, NOR ve LEV’in biyolojik sıvılarda ve tabletlerde tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (78). Örnek hazırlanması işleminde katı faz mikroekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla paslanmaz çelik bir telin yüzeyi moleküler olarak CIP baskılanmış polimer ile kaplanmıştır. Eurosphere C₁₈ (250 mm x 4.6 mm) analitik kolon olarak kullanılmıştır. ACN:10 mM fosfat tamponu (pH 3) karışımı (82:18, v/v) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Analiz 25 °C’de ve 0.8 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Florokinolonların tayininde, UV dedektör 280 nm’ye ayarlanmıştır. Yöntem bütün analitler için 0.1-40 µg/L aralığında doğrusal bulunmuştur. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.03-0.023 µg/L ve 0.075-0.113 µg/L aralıkları içerisinde. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS’si %1.1-6.7 aralığındadır. Florokinolonların geri kazanımları %95’in üzerindedir. Oral olarak CIP ya da OFLO kullanan hastaların örnekleri analiz edilerek yöntem uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Liang ve ark. LEV, CIP, GATI, MOX, TROV ve SİNO’nun plazmada tayini için bir HPLC-UV-DAD yöntemi geliştirmişlerdir (79). Analitler %0.5 sodyum dodesil sülfat içeren fosfat tamponu (pH 7.5):ACN karışımı (4:1, v/v) ile ekstre edilmiştir. İç standart olarak CIP tercih edilmiştir. Adsorbosphere HS C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolon olarak kullanılmıştır. Analiz 1 mL/dk akış hızında ve yaklaşık 23 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Hareketli faz olarak 10 mM sodyum dodesil sülfat, 10 mM tetrabütülamonyum asetat ve 25 mM sitrik asit içeren ACN:su karışımı (43:57, v/v, pH 3.5) kullanılmıştır. Yöntem LEV için valide edilmiştir. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %7.55'ten düşüktür. Bağlı hata değerleri %3.63 ile %5.67 aralığındadır. LEV'in kısa süreli, uzun süreli ve donma-erime kararlılığı değerlendirilmiş ve analit kararlı bulunmuştur.

Wang ve ark. MOX'un plazmada tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (80). Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi ACN ile uygulanarak örnekler analize hazırlanmıştır. Kromasil C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) analitik kolon olarak kullanılmıştır. Hareketli faz olarak %0.1'lik trietilamin çözeltisi (pH 4.8):ACN karışımı (80:20, v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk'ya ve UV dedektör 296 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. İç standart olarak CIP kullanılmıştır. Yöntem 0.0025-5 µg/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %4.70'ten küçüktür. Ekstraksiyon geri kazanımı %69.88-78.51 aralığındadır. Yöntem doğruluğu ise %96.6-101.8 aralığındadır. İntravenöz olarak 400 mg MOX kullanan 37 hastaya ait örnekler analiz edilerek yöntem uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Raju ve ark. MOX ve ketolorakın sıçan plazmasında tayini için HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir (81). Analitlerin plazmadan ekstraksiyonunda ACN kullanılarak protein çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Analitik kolon olarak Kromasil C₁₈ (100 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak ACN:amonyum asetat çözeltisi (10 mM, pH 2.5):%0.1'lik formik asit karışımı (50:25:25, v/v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 0.5 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Kromatogramlar pozitif polaritede seçilmiş iyon izleme modunda, MOX ve ketolorakın protonlanmış moleküler iyonlarına karşılık gelen *m/z* 402 ve *m/z* 256 için kaydedilmiştir. Yöntem MOX için 5-100 ng/mL ve ketolorak için 10-6 000 ng/mL aralığında doğrusaldır. Yöntem kesinliği %0.97-5.33 aralığındadır, doğruluk ise %93.91-101.58 aralığında bulunmuştur. Farklı konsantrasyon seviyelerinde geri kazanım %75'in üzerindedir. Yöntem sıçanlarda yürütülen bir farmakokinetik çalışmada kullanılarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Borràs ve ark. CIP, DANO, DİFLO, ENRO, MARBO ve SARA'nın hayvan yemlerinde tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (82). Analitler 50 mM HCl çözeltisi:ACN karışımı (1:1, v/v) ile ekstre edilmiştir. Analiz 10 mM oksalik asit (pH 4.0) ve ACN gradienti ile gerçekleştirilmiştir. Akış hızı ve kolon sıcaklığı sırası ile 1.2 mL/dk ve 25 °C'ye ayarlanmıştır. FD çok adımlı saptama modunda çalıştırılmış ve 297/507 nm ile

280/450 nm uyarma/emisyon dalga boylarında saptama yapılmıştır. Yöntem 2-80 µg/L aralığında bütün analitler için doğrusaldır ($r \geq 0.999$). Yöntemin LOQ değerleri 0.06-1.6 mg/kg aralığındadır. Birçok matrikste yürütülen deneylerin BSS'si üç konsantrasyon seviyesinde %12'den küçüktür. Ortalama geri kazanımlar %80-105 aralığındadır.

He ve Blaney CIP, DIFLO, ENRO, GATI, LEV, LOME, MOX, NOR, OFLO, SARA, orbifloksasin ve fleroksasinin çevresel ve atık sularda tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (83). Zayıf katyon değiştirici Oasis WCX kartuş kullanılarak katı faz ekstraksiyonu yapılmıştır. MeOH, ACN ve 20 mM fosfat tamponu (pH 2.4) gradienti kullanılarak Accucore PFP kolonda (150 mm x 4.6 mm, 2.6 µm) ayırım gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk'ya ve kolon sıcaklığı 50 °C'ye ayarlanmıştır. Uyarma ve emisyon dalga boyları her bir florokinolon için optimize edilmiştir. Analitlerin geri kazanımı %78'in üzerindedir.

Payán ve ark. MARBO, NOR, CIP, DANO, ENRO, GATI, GREP ve FKN'nin biyolojik ve çevresel örneklerde tayini için HPLC-FD-DAD yöntemi geliştirmişlerdir (84). Örnekler analizden önce, geliştirilen oyuk fiber temelli sıvı faz mikroekstraksiyon tekniği ile ekstre edilmiştir. Analitik kolon olarak Purosphere STAR RP-18e (75 mm x 4.0 mm, 3 µm) kullanılmıştır. Ayırım %0.1'lik formik asit çözeltisi (pH 2.6) ve ACN gradienti ile gerçekleştirilmiştir. Akış hızı ve kolon sıcaklığı sırası ile 0.8 mL/dk ve 10 °C'ye ayarlanmıştır. Yöntem bütün analitler için doğrusaldır ($r \geq 0.999$) ve LOQ değerleri 1-50 ng/L aralığındadır. Sığır idrarı ve çevresel sularda elde edilen geri kazanımlar sırası ile %76.0-100.5 ve %86.7-100.1 aralığındadır.

Toi ve ark. LEV'in plazmada ve serebrospinal sıvıda tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (85). Örnekler Evolute ABN 96 kuyucuklu plakada katı faz ekstraksiyonu uygulanmıştır. İç standart olarak ENOX kullanılmıştır. Hareketli faz olarak %0.025 trietilamin içeren fosfat tamponu (10 mM, pH 3):ACN (88:12, v/v) karışımı kullanılmıştır. Ayırım Purosphere RP-8e (125 mm x 4.0 mm, 5 µm) kolonda 1.2 mL/dk akış hızında ve 35 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Uyarma/emisyon dalga boyları LEV için 294/500 nm'ye ayarlanmıştır. Yöntem 0.02-20 µg/mL aralığında doğrusaldır. Yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin dört konsantrasyon seviyesinde BSS'si %7'den küçüktür. Yöntem doğruluğu plazmada %96.75-101.9, serebrospinal sıvıda ise %93.00-98.67 aralığında

bulunmuştur. Geliştirilen yöntem ile 232 tüberküloz menenjit hastasından alınan örnekler analiz edilmiştir.

Montesano ve ark. MARBO'nun sinovial sıvıda tayini için HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir (86). Örnekler analizden önce santrifüj tipi ultrafiltrasyon aparatları kullanılarak hızlı bir şekilde filtre edilmiş ve sisteme enjekte edilmiştir. Ayırım Ascentis Express C₁₈ (20 mm x 2.1 mm, 5 µm) kolonda 0.8 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Her ikisi de 5 mM formik asit içeren ACN ve su kullanılarak gradient elüsyon programı optimize edilmiştir. Yöntem doğrusallığı 5-2 500 ng/mL aralığında değerlendirilmiştir. İç standart olarak OFLO kullanılmıştır. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırası ile 1 ve 5 ng/mL'dir. Yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %2-15 aralığındadır. Yöntem doğruluğu üç konsantrasyon seviyesinde %87-114 aralığında bulunmuştur. Ortalama geri kazanım %96'dır. Yöntem hayvan hastalıkları ile ilgili bir çalışmada 10 sığırdan alınan örneklerin analizinde kullanılmıştır.

Djurdjevic ve ark. MOX ve bozunma ürünlerinin tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (87). MOX ve sentez kaynaklı safsızlıkların ayırımı Waters C₁₈ XTerra (50 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak fosforik asitle pH 6'ya ayarlanmış %2'lik trietilamin çözeltisi:ACN karışımı (90:10, v/v) kullanılmıştır. UV dedektör 290 nm'ye ayarlanmıştır. Analiz 1.5 mL/dk akış hızında ve 45 °C'de gerçekleştirilmiştir. Yöntem 0.2-2 µg/mL aralığında doğrusaldır ($R^2 \geq 0.9986$). Analitlerin geri kazanımı %97.3-102.8 aralığındadır. Yürütülen deneylerin BSS'si %4'ten küçüktür.

Aufartová ve ark. NOR, CIP, ENRO, DANO ve SARA'nın balıklarda tayini için UHPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (88). Mikrodalga destekli ekstraksiyonun ardından katı faz ekstraksiyonu yapılarak florokinolonlar analize hazırlanmıştır. Waters Acquity BEH C₁₈ kolonda (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm) ayırım sağlanmıştır. Gradient analiz programında MeOH ve su (pH 2.5) kullanılmıştır. Akış hızı 0.3 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Uyarma ve emisyon dalga boyları sırası ile 280 ve 450 nm olarak seçilmiştir. Yöntemin LOD değerleri 0.1-6.0 ng/g arasındadır. İki konsantrasyon seviyesinde elde edilen geri kazanımlar %90'ın üzerinde ve BSS değerleri %8.7'nin altındadır. Yöntem çiftlik balıklarından elde edilen örneklerin analizinde kullanılmıştır.

Sousa ve ark. NOR, LOME ve CIP'in insan plazmasında tayini için HPLC-FD yöntemi geliştirmişlerdir (89). Protein çöktürme işlemi %20'lik trikloroasetik asit çözeltisi ile yapılmıştır. İç standart olarak LEV kullanılmıştır. Analitik kolon olarak Purospher Star-

C₁₈ (55 mm x 4 mm, 3 µm) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak %1'lik formik asit çözeltisi (pH 3):MeOH karışımı (82:18, v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 1.2 mL/dk'ya ayarlanmıştır. Uyarma/emisyon dalga boyları 278/450 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrileri 0.02-5.0 µg/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %8.19'u geçmemiştir. Ortalama geri kazanımlar %90.1-111.5 aralığında bulunmuştur.

Nemutlu ve ark. MOX ve LEV'in kürtaj materyalinde tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir (90). Polimerik ters faz Strata X kartuşlar kullanılarak analitler katı faz ekstraksiyon tekniği ile ekstre edilmiştir. Analitik kolon olarak Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 5 mM tetrametilamonyum bromür içeren sitrat tamponu (15 mM, pH 3.2), MeOH ve ACN kullanılarak gradient akış uygulanmıştır. Ayırım 40 °C'de ve 1.5 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. UV dedektör 280 nm'ye ayarlanmıştır. Yöntem 0.01-30 µg/g aralığında doğrusaldır ($R^2=0.9999$). Yöntemin LOQ değerleri 0.010 µg/g olarak bulunmuştur. Yöntem kesinliğini incelemek için yürütülen gün içi ve günler arası deneylerin BSS'si %2.24-6.40 aralığındadır. Gün içi ve günler arası BH değerleri %7.38'den küçüktür. Geri kazanım altı konsantrasyon seviyesinde %94'ün üzerindedir. Analitlerin kısa süreli, uzun süreli ve donma-erime döngülerinden sonra kararlılıkları incelenmiş ve kararlı bulunmuşlardır.

2.6. İlaç Analizlerinde Örnek Hazırlama İşleminin Önemi

İlaç analizleri birçok farklı analitik cihaz ile yapılıyor olmasına rağmen, bu cihazların büyük kısmı ile örnekler direkt olarak analiz edilememektedir. Çünkü biyolojik örnekler analitlere benzer yapıdaki asitler, bazlar, tuzlar, proteinler ve diğer organik bileşikler içerir. İlâveten, bu kompleks matriksler içerisindeki analitler çoğunlukla düşük konsantrasyondadır. İlaçların farmasötik preparatlarda ve biyolojik örneklerde tayini için son derece etkili analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen, örnek hazırlama işlemi kompleks matrikslerden ilgili analitlerin ekstraksiyonu, izolasyonu ve zenginleştirilmesi için gereklidir. Genel olarak, örnek alma ve örnek hazırlama basamakları toplam analiz süresinin %80'ini oluşturmaktadır ve bu basamaklar kompleks matrikslerde analiz başarısının belirlenmesinde önemlidir (91).

Örnek hazırlamada; matriks kaynaklı bozucu veya istenmeyen endojen bileşikler azaltmak ya da ortadan kaldırmak, hedeflenen analitler için seçiciliği artırmak, duyarlılığı artırmak için ön-deriştirme yapmak ve örneği inert bir çözücü içerisinde yeniden çözerek kararlı hale getirmek amaçlanmaktadır (92). Bu çalışma kapsamında plazma örnekleri

protein çöktürme işlemi ile analize hazırlandığından dolayı bu teknik ile ilgili bilgi aşağıda verilmiştir.

2.6.1. Protein Çöktürme

Basitlik, hız ve spesifik ekipman gerektirmeme gibi avantajlarından ötürü protein çöktürme önde gelen ve popüler örnek hazırlama tekniklerinden birisidir. Çöktürme işlemi endojen proteinlerin ve hedef moleküllerin farklı çözünürlükte olmalarına dayanır. Biyolojik örneğe çöktürücü ajan eklemek proteinlerin denatürasyonuna sebep olur ve böylelikle, önceden proteine bağlı olsun ya da olmasın, analitler sıvı faz içerisinde çözünür ve protein topağından ayrılır. Çöktürücü ajan olarak organik çözücüler (ACN, MeOH, etanol, aseton), asitler (perklorik, trikloroasetik veya fosforik asit), derişik tuzlar veya sodyum dodesil sülfat kullanılabilir. Sıklıkla kullanılan örnek:çöktürücü çözücü oranları 1:1, 1:2, 1:4, 1:5'tir (93). Organik çözücüler plazma proteinlerinin %95'ten daha büyük kısmını çöktürebilir. Bunların içerisinde MeOH en sık kullanılanıdır. ACN bazı biyolojik örneklerde MeOH'dan daha yüksek çökme sağlamaktadır. Asitler de çok iyi çöktürme ajanlarıdır. Düşük pH değerlerinde, pozitif yüklenen aminoasitler çözünmeyen tuzlar haline gelir ve bu tuzlar protein yüzeyinden suyu uzaklaştırır. Sonuç olarak, proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimlerin sonucu olarak agregasyon meydana gelir (94). Geri kazanımlar her grup için farklıdır. Organik çözücüler kullanıldığında analitler çökelti içerisinde daha az sıkışır. Asitler ve tuzlar süpernatantta yeterli miktarda analitin çözülmesinde başarısızdır (95).

2.7. Kromatografi

Kromatografi, 1903 yılında Rus botanikçi Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919) tarafından bulunan ve günümüzde birçok farklı alanda sıklıkla kullanılan bir ayırım tekniğidir. Tswett klorofil bulunduran bitkilerin temsil ettiği doğal sistemler ile ilgileniyordu ve amacı bu pigmentleri doğal hallerine mümkün olduğunca yakın şekilde incelemektir. Bitki materyalinden klorofili ayırmaya çalıştığı sırada, sadece polar çözücülerin klorofili ekstre edebildiğini fark etti. Ancak klorofil bitki materyalinden izole edildikten sonra, apolar çözücüler ile kolaylıkla çözülebiliyordu. Tswett pigmentlerin bitkilerde adsorpsiyon kompleksleri halinde bulunduğu ve apolar çözücülerin bu bağları kıramadığı sonucuna vardı. Tswett'in çalışmaları sonucunda, çeşitli çözücülerin kullanıldığı akan bir sistemde seçici adsorpsiyon ve desorpsiyona dayanan kromatografi tekniği doğmuştur (96). Kromatografinin biyokimyasal ayırımlarda yeniden kullanılmaya başlandığı 1931 yılına kadar Tswett'in tekniğine olan ilgi düşüktü. Archer J.P. Martin ve Richard L.M. Synge

tarafından 1941’de yapılan öncü çalışma sıvı-sıvı partiyon kromatografisinin önemini ortaya koymuş ve kromatografik ayırımlar için bir teori geliştirilmesine sebep olmuştur. Martin ve Synge bu çalışmalarından dolayı 1952 Nobel Ödülü’ne layık görülmüşlerdir. O zamandan günümüze, kromatografi çok önemli ve sıklıkla kullanılan bir ayırım tekniği olmuştur.

2.7.1. Analitik Ayırımların Sınıflandırılması

Analitik ayırımlar,

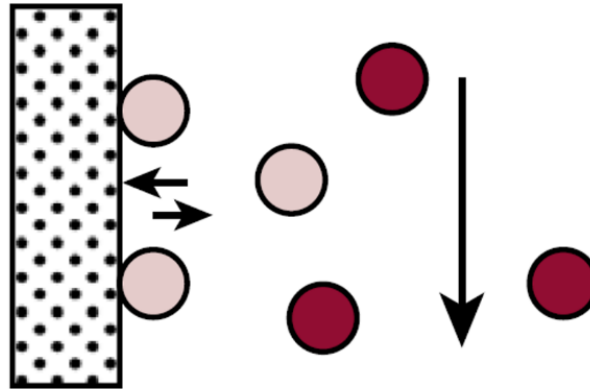
- Hareketli ve sabit fazın tipine göre,
- Uygulama biçimine göre,
- Örnek bileşenlerinin ayrılmasından sorumlu fiziksel ya da kimyasal mekanizmaya göre üç başlık altında sınıflandırılırlar.

Hareketli faz çoğu zaman bir sıvı ya da bir gazdır. Sabit faz ise bir katı ya da katı bir yüzey üzerine kaplanmış bir sıvıdır. Kromatografik teknikler genellikle hareketli fazın tipi ve ardından sabit fazın tipi söylenerek isimlendirilir. Yani, gaz-sıvı kromatografisinde hareketli faz gaz ve sabit faz sıvıdır. Eğer, sadece bir fazdan bahsediliyorsa (örn: gaz kromatografisi), hareketli faz olduğu varsayılır. Uygulama biçimi açısından bakıldığında, kromatografide iki yaygın yaklaşım kullanılmaktadır. Kolon kromatografisinde, sabit faz dar bir kolon içerisine yerleştirilir ve içinden yer çekimi ya da basınç yardımı ile hareketli faz geçirilir. Sabit faz bir katı ya da katı bir dolgu materyali yüzeyine veya kolon duvarına kaplanmış ince bir sıvı filmidir. Düzlemsel kromatografide sabit faz düz bir cam, metal ya da plastik plaka üzerine kaplanır. Hareketli fazı içeren bir rezervuar sabit faz ile temas ettirilir ve hareketli faz kapiler etki ile hareket eder. Ayırım mekanizmasına göre sıvı kromatografisi: Adsorpsiyon, dağılma, iyon çifti, iyon değiştirme, moleküler eleme ve afinite kromatografisi olarak sınıflandırılır (97).

2.7.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Kromatografi tekniğinin geliştirildiği ilk yıllarda çalışmalar analitin bir katı yüzeyine adsorpsiyonuna dayanırdı. Bu mekanizmada; sabit faz çok ince toz haline getirilmiş polar katılardır. Adsorpsiyon kromatografisinde analit, dolgu maddesinin yüzeyinde hareketli faz ile adsorpsiyon yarışına girer. Kolondaki alıkonma zamanı analitin yüzeydeki adsorpsiyon kuvvetine bağlıdır (Şekil 6). Alıkonmayı etkileyen faktörler, analitin sabit faza bağlanma kuvveti, sabit fazın yüzey alanı, analit tarafından sabit fazdan uzaklaştırılan hareketli faz miktarı ve hareketli fazın sabit faza bağlanma kuvvetidir. Elektrostatik etkileşimler, hidrojen

bağları, dipol-dipol etkileşimleri ve Van der Waals bağları alıkonmayı etkilemektedir (98). Hareketli fazın sabit faz ile bağlanma gücü adsorpsiyon kromatografisinde elüotropik güç olarak adlandırılır. Belirlenen sabit faz için yüksek elüotropik güce sahip bir hareketli faz, sabit faza hızlıca bağlanacak ve bu yüzden analit hareketli faz içerisinde daha fazla zaman geçireceğinden dolayı hızlıca kolonu terk edecektir. Adsorpsiyon kromatografisinde 3 tip adsorban kullanılmaktadır: polar asidik materyaller, polar bazik materyaller ve apolar materyaller. Adsorpsiyon kromatografisinde en sık kullanılan polar asidik destek materyali silikadır. Silika yüzeyindeki silanol grupları polar molekülleri adsorplama eğilimindedir ve özellikle bazik moleküllerde iyi performans gözlemlenir. Silikaya benzer şekilde alümina da polar bileşikleri tutar ama alümina özellikle asidik moleküllerde iyi performans gösterir. Adsorpsiyon kromatografisinde kullanılabilecek diğer sabit fazlar aktif kömür ve polistiren gibi apolar adsorbanlardır.



Şekil 6. Analitlerin destek materyali yüzeyine adsorbe olmalarına dayanarak ayırımın gerçekleştirilmesi

2.7.1.2. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi

Partisyon kromatografisi analitlerin katı bir destek materyali yüzeyine kaplanmış ya da bağlanmış bir sabit faz ve bir hareketli faz arasında dağılmasına dayanan bir ayırım tekniğidir (Şekil 7). Farklı tipte destek materyalleri kullanılıyor olmasına rağmen, çoğunlukla silika tercih edilmektedir. Bu yöntem başlangıçta istenen hareketli faz ile karışmayan sabit fazın destek yüzeyine kaplanmasını içermekteydi. Diğer taraftan, günümüzde partisyon kromatografisinde kullanılan kolonlarda destek materyali yüzeyine bağlanmış sabit fazlar kullanılmaktadır. Bu bağlı fazlar partisyon kromatografisinin ilk yıllarında kullanılan kaplanmış sabit fazlardan daha stabildir ve daha yüksek performans

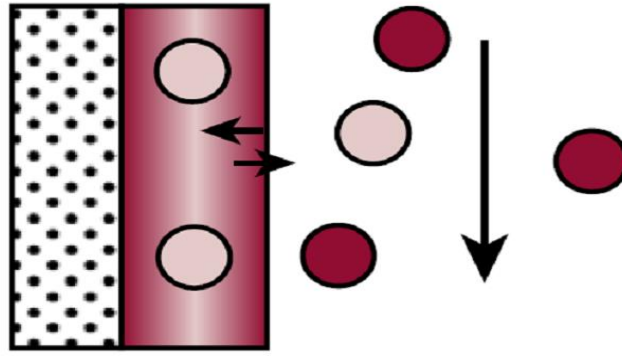
sergilerler. Normal faz kromatografisi ve ters faz kromatografisi olmak üzere sabit fazın polaritesine dayanan iki ana partisyon kromatografisi tipi vardır. Normal faz kromatografisi sabit fazın polar karakterde olduğu partisyon kromatografisi tipidir. Bu teknikte sabit faz genellikle, hidrojen bağları oluşturabilecek ya da dipol-dipol etkileşimlerine uğrayacak gruplar içerir. Normal faz kromatografisinde kullanılan bağlı sabit fazlar aminopropil, siyano ve diol gibi yapıya polar karakter katan grupları içerir. Bu yöntem polar sabit faz içerdiği için, polar bileşikler için maksimum alıkonma gözlemlenir. Yöntemde zayıf hareketli fazlar apolar sıvılardır. Normal faz kromatografisinde kuvvetli hareketli fazlar MeOH ve su gibi polar çözücülerdir.

Partisyon kromatografisinin ikinci ana tipi ters faz kromatografisidir. Ters faz sıvı kromatografisi apolar sabit fazların kullanıldığı partisyon kromatografisi tipidir. Bu teknik sıvı kromatografisinin en sık kullanılan şeklidir ve klinik laboratuvarlarda yoğun şekilde bu teknikten yararlanılır. Bu durumun sebeplerinden bir tanesi ters faz sıvı kromatografisinde zayıf hareketli fazın su gibi bir polar çözücü olmasıdır. Bu özellik, serum, idrar ve kan gibi su temelli matrislerde kimyasalların analizi ve ayrılmasında ters faz sıvı kromatografisini güvenilir kılmaktadır. Bu teknikte kuvvetli hareketli faz ACN ya da MeOH gibi sudan daha apolar bir sıvıdır. Sabit faz apolar olduğundan dolayı, apolar bileşikler ters faz sıvı kromatografisinde daha uzun süre kolonda tutulmaktadır. Ters faz sıvı kromatografisi, biyomedikal araştırmalarda ve klinik kimyada birçok uygulamaya sahiptir. İlaçlar, ilaç metabolitleri, aminoasitler, peptitler, proteinler, karbohidratlar ve lipidler ters faz sıvı kromatografisi ile analiz edilmektedir. Kolonda çok zayıf şekilde tutulan şekerler ve aminoasitler gibi polar bileşiklerin ve silika ile etkileşime girerek kuyruklanmış pikler halinde kolonu terk eden bazik bileşiklerin ters faz sıvı kromatografisinde ayırımı oldukça güçtür. Kolonda tutulmayı artırmak için bazı bileşikler (örneğin aminoasitler) türevlendirilmektedir.

Ters faz sıvı kromatografisi için nispeten fazla sayıda sabit faz ve destek materyali bulunmaktadır (99). En yaygın şekilde kullanılan sabit fazlar silika gibi bir destek materyaline bağlanmış C₁₈, C₈, fenil ya da bütül grupları içerenlerdir. Silika bazlı kolonlarda tutunma karakteristikleri: bağlı fazın yapısına, bağlı fazın miktarına, destek materyalinin yüzey alanına, destek materyalinin por büyüklüğüne ve destek materyali yüzeyindeki ulaşılabilir fonksiyonel grupların miktarına bağlıdır. Grafit, florlu hidrokarbonlar ve yapısında polar gruplar içeren hidrofobik sabit fazlar gibi alternatif ters faz materyalleri, C₈

ve C₁₈'den farklı seçicilik sunar. Silika pH 2'nin altında ve 8'in üstünde yavaşça çözülme eğilimindedir. Bu sebeple, silika yüzeyine müdahale ile stabil hale getirilmediği sürece, ayırımlar pH 2-8 aralığında yapılmaktadır. Ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan polistiren ve grafit gibi destek materyalleri daha geniş bir pH aralığında stabildirler.

Örnekler genellikle sulu çözeltiler ya da düşük oranda organik çözücü içeren organik çözücü:su karışımları halinde sisteme enjekte edilir. Zayıf asit ya da zayıf baz karakterdeki analitlerin dağılma davranışları, bu bileşiklerin yüklü hale gelmesini önlemek için pH değiştirilerek ayarlanabilir. Normal ya da ters faz sıvı kromatografisinde hareketli faz kuvveti çözücülerin ve çözeltilerin oranları analiz sırasında değiştirilerek sıklıkla ayarlanır. Ters faz sıvı kromatografisinde buna ilaveten sulu çözeltinin polaritesi hareketli fazdaki tuz konsantrasyonu değiştirilerek ayarlanabilir.

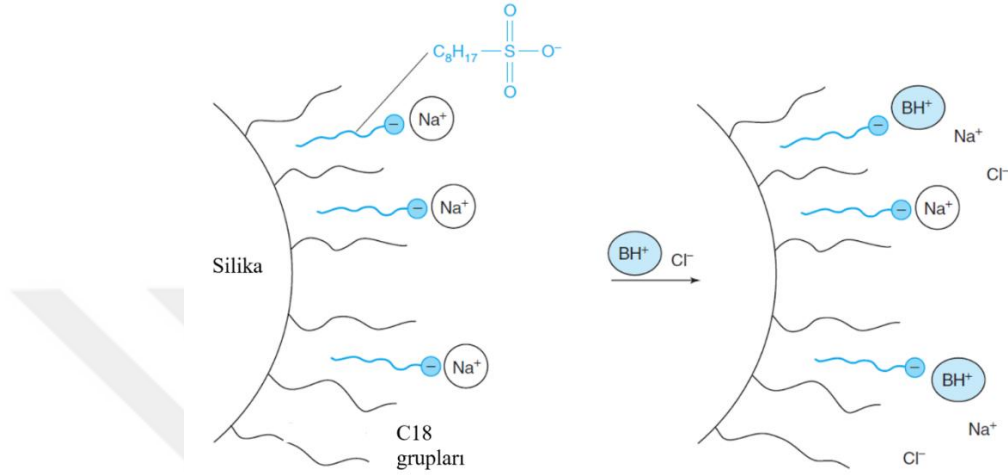


Şekil 7. Analitlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılması temeline dayanarak ayırım yapılması

2.7.1.3. İyon Çifti Kromatografisi

İyon çifti kromatografisi organik iyonların ve kısmen iyonize olmuş organik analitlerin ayrılması için kullanılan etkili bir ters faz sıvı kromatografisi tekniğidir. Ters fazda kullanılanlarla aynı tipte sabit ve hareketli fazlar kullanılır. Ters faz sıvı kromatografisinden ayıran özelliği, hareketli faza bir iyon çifti reaktifi eklenmesidir. Bu işlemin amacı iyonik analitlerin alıkonma zamanlarını değiştirmektir. Reaktif konsantrasyonu değiştirilerek, analitin alıkonma faktörü iyon çifti reaktifinin hiç eklenmediği durum ile kıyaslandığında 10-20 kat artırılabilir. Yüksüz analitlerin alıkonmaları iyon çifti reaktifi varlığından büyük oranda etkilenmez (100). İyon çifti reaktifi çoğunlukla bir alkilsülfonat, alkilsülfat ya da alkilamonyum tuzudur.

Süpfaktanlar sabit faza yerleşir ve böylelikle sabit fazı bir iyon değıştiriciye dönüştürür (Şekil 8). Analit katyonları süpfaktan anyonlarına bağlanır. Ayırım mekanizması, ters faz ve iyon değışimi etkileşimlerinin karışımıdır. Tetrabütülamonyum tuzları ise anyonların ayırılmasında hareketli faza eklenmektedir.



Şekil 8. İyon çifti kromatografisi. Hareketli faza eklenen sodyum oktansülfonat apolar sabit faza bağlanır. Sabit fazdaki negatif yüklü sülfonat grupları, analit katyonları (BH^+) için iyon değışimi bölgeleri olarak davranırlar.

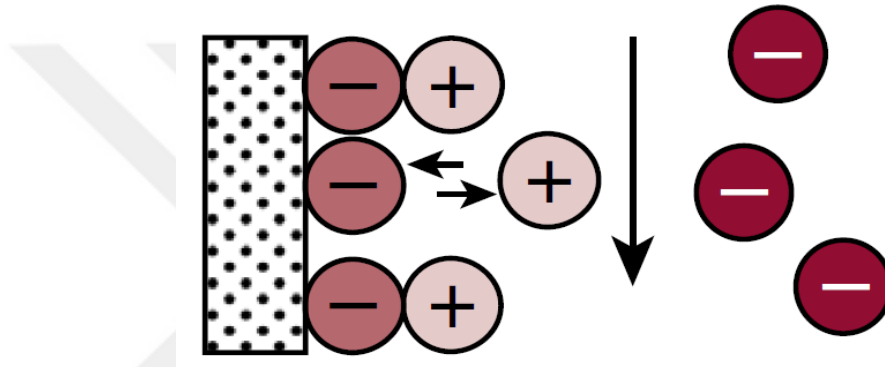
2.7.1.4. İyon Değışimi Kromatografisi

İyon değışimi kromatografisi iyonların, yüzeyinde sabit yükler içeren destek materyaline adsorpsiyonu ile ayırımın gerçekleştirildiğı bir sıvı kromatografisi tekniğidir. Bu yöntem hareketli faz ya da örnekteki iyonların, sabit faz olarak davranan ve bir destek materyaline bağlanmış zıt yüklü sabit iyonik gruplar ile etkileşimine dayanır (Şekil 9). Sabit fazı oluşturan grupların yüküne bağlı olarak, kolona bağlanan iyonların tipleri anyon ya da katyon olabilir. Bu iki yönteme katyon değışim kromatografisi ve anyon değışim kromatografisi adı verilir.

Katyon değışim kromatografisinde sabit faz negatif yüklü fonksiyonel gruplar içerir. Bu gruplar, kuvvetli ya da zayıf asitlerin konjuge bazları olabilir. Anyon değışim kromatografisinde kullanılan sabit fazlar çoğunlukla bazik kuaterner aminlerin ya da zayıf bazların konjuge asitlerini içerir. İyon değışim kromatografisinde kuvvetli hareketli faz, analit ile bağlanma yöresi için yarışan iyonları yüksek konsantrasyonda içerir. Bağlanma yöresi için yarışan iyonların bulunması, analitin iyon değıştiriciye bağlanmasını güçleştirir. Yarışan iyonların konsantrasyonunun değıştirilmesi iyon değışim kromatografisinde

alikonmanın ayarlanmasında en sık kullanılan yaklaşımdır. Bu teknikte iyonların alikonması pH, analit ile iyon değiştirici için yarışan iyonun tipi, sabit faz yüzeyindeki iyon değiştiricinin tipi ve yüzeydeki iyon değiştiricilerin yoğunluğundan etkilenir (97).

İyon değişimi kromatografisinin birçok klinik uygulaması vardır. Örneğin, aminoasitlerin ve hemoglobin varyantlarının analizlerinde iyon değişim kromatografisi kullanılmaktadır. Buna ilaveten, iyon değişim kromatografisi proteinler, peptidler ve nükleotidlerin saflaştırılması için yürütülen biyomedikal araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

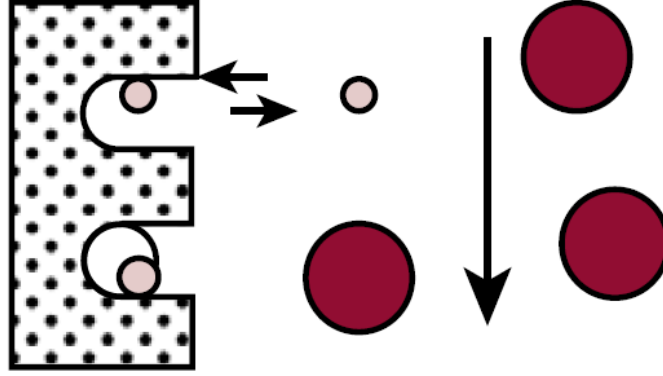


Şekil 9. Destek materyali yüzeyindeki yüklere bağlanarak iyonların ayrılması

2.7.1.5. Moleküler Eleme Kromatografisi

Moleküler eleme kromatografisi analitlerin molekül büyüklüklerine göre ayrıldığı bir sıvı kromatografisi tekniğidir. Bu teknikte inert bir yüzeye sahip ve örnek bileşenleri ile etkileşime girmeyen porlu bir destek materyali kullanılır. Örnek kolonda ilerledikçe, küçük moleküller destek materyalinin içerisindeki bütün porlara ya da büyük bir kısmına girer. Büyük moleküller ise az sayıda pora girebilir. Sonuç olarak büyük moleküllerin kolonu daha erken terk ettiği, büyüklük ve molar kütle farkına dayanan bir ayırım gerçekleştirilir (Şekil 10). Birçok farklı gözenekli destek materyali moleküler eleme kromatografisinde kullanılmaktadır. Dekstran ve agaroz gibi çapraz bağlı karbohidrat temelli destek materyalleri, protein ve nükleik asitler gibi biyomoleküller ile çalışmak için sıklıkla kullanılır. Poliakrilamid jel ve silika da sulu örnekler ve biyomoleküller için kullanılabilir. Sentetik polimerlere ya da organik çözücü içeren örneklerle moleküler eleme kromatografisi uygulanacağı zaman genellikle polistiren kullanılmaktadır. Destek materyalinin gözenek

büyüklüğü aralığı, bu yöntem kullanılarak ayırımı sağlanabilecek analitlerin molekül büyüklüğü aralığını belirler (97).

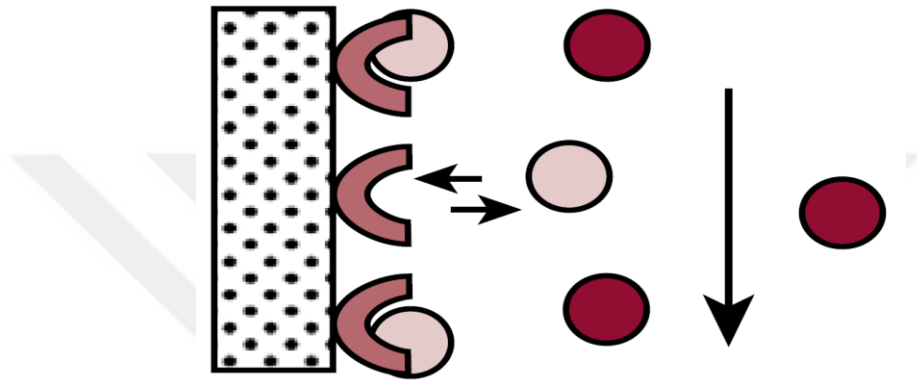


Şekil 10. Analitlerin molekül büyükliklerine göre porlara girmesinden faydalanılarak ayırımın gerçekleştirilmesi

2.7.1.6. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi analitlerin ayırımı ve tutunmasında biyolojik etkileşimlerin kullanıldığı bir sıvı kromatografisi tekniğidir. Bu yöntemde, bir antijenin bir antikora bağlanması, enzim ile substrat etkileşimi ya da bir reseptöre ilgili hormonun bağlanması gibi biyolojik sistemlerde bulunan tersinir ve seçici etkileşimlerden yararlanılır. Sabit faz olarak kullanılan destek yüzeyine, enzim ya da reseptör gibi grupların sabitlenmesi ile bu seçici etkileşimler afinite kromatografisinde kullanılır. Sabitlenen bu ajana “afinite ligandı” adı verilir ve uygulanan örnek içerisindeki analiti seçici bir şekilde bağlayan ve yakalayan kolonlar üretimde kullanılır (101). Afinite kromatografisi, afinite ligandının hedef moleküle spesifik ve güçlü bir şekilde bağlanmasına olanak tanıyan şartlar altında, örneğin kolona verilmesi ile gerçekleştirilir. Bu işlem, uygulama tamponu olarak bilinen ve afinite ligandı ile hedef molekül arasındaki bağlanma için gerekli olan ortam şartlarına ve pH’a uygun hareketli fazın varlığında yapılır. Bu etkileşimin seçici doğasından ötürü, analit kolona bağlanırken örnekteki diğer bileşikler tutunmaz (Şekil 11). Kolona tutulmuş analitin daha sonra elüsyon tamponu ile kolonu terk etmesi sağlanır. Analiti sabit fazdan ayırmak için yarışmacı bir ajan kullanılabilir ya da pH, iyonik şiddet ve hareketli faz polaritesi gibi parametreler değiştirilebilir. Hedef molekülün kolondan uzaklaştırılmasının ardından, bir sonraki analize kolonu hazırlamak için kolondan uygulama tamponu geçirilir.

Afinite kromatografisinde farklı tipte destek materyalleri kullanılabilir. Preparatif çalışmalar için çeşitli modifiye selüloz türleri ve çapraz bağlı agaroz gibi karbohidrat temelli materyallerin kullanımı çok yaygındır. Silika ve cam da afinite kromatografisinin hem analitik hem de preparatif uygulamalarında destek materyali olarak kullanılmaktadır. Afinite kromatografisinin gücü seçiciliğinden ve bu yöntemde kullanılabilecek bağlayıcı ajanların sayısının çokluğundan gelir.



Şekil 11. İlgili bağlanma ajanı ile etkileşimlerine dayanarak analitlerin ayrılması

2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

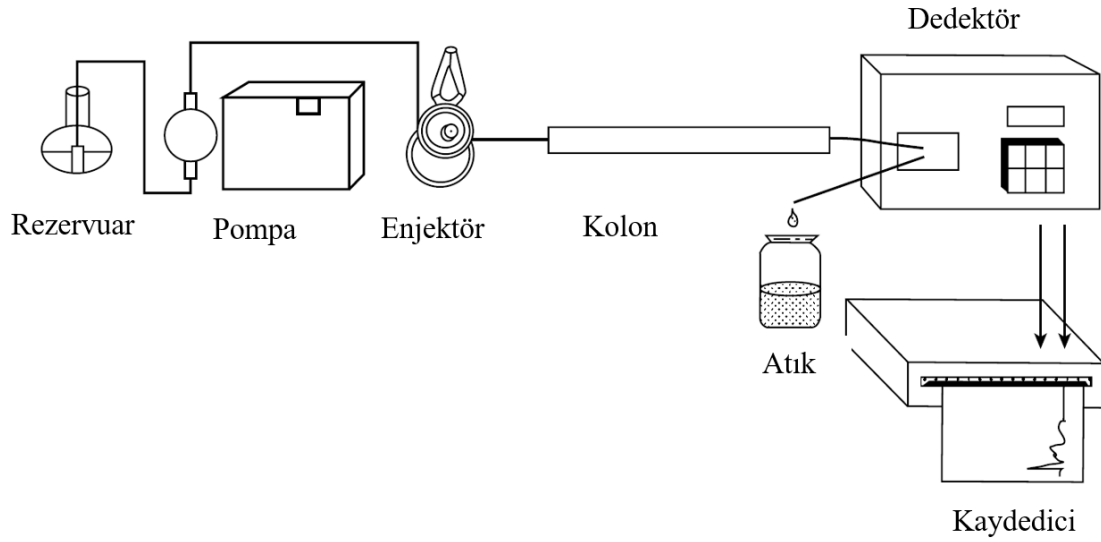
HPLC karışımların analizinde ve ayrılmasında kullanılan birçok kromatografik teknikten birisidir. Diğer ayırım teknikleri ile kıyaslandığında aşağıdaki özellikleri ile HPLC fark yaratmaktadır:

- Neredeyse evrensel uygulanabilirlik; HPLC'nin uygulanamadığı çok az sayıda örnek vardır.
- İyi yöntem kesinliği (çoğu durumda $\pm\% 0.5$ veya daha iyi BSS).
- Piyasada bulunan geniş yelpazedeki ekipman, kolon ve diğer materyaller HPLC'nin neredeyse bütün uygulamalarda kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır.
- Karışımların analizini yapan çoğu laboratuvarında HPLC cihazı bulunmaktadır ve genellikle analizde ilk tercih edilen tekniktir.

Sonuç olarak günümüzde HPLC en kullanışlı ve geniş ölçüde kullanılan analitik tekniklerden biridir. Özellikle MS ile kullanımı, HPLC'yi çok güçlü bir alternatif haline getirmektedir.

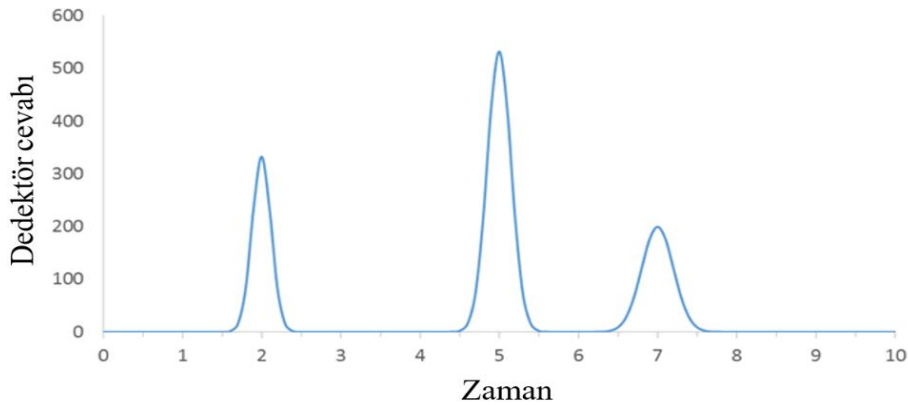
2.8.1. HPLC Cihazları

HPLC, sıvı kromatografisinin gelişmesinde zirveyi temsil etmektedir. Tipik bir HPLC cihazı şematik olarak Şekil 12’de gösterilmiştir. Kullanıcı kolona gönderilmek üzere otomatik örnekleyiciye numunesini koyarak analize başlar.



Şekil 12. HPLC cihazının şematik olarak gösterimi

Hareketli faz kolondan devamlı olarak pompalanır ve ayrılan bileşikler kolonu terk ettikçe bir dedektör yardımı ile saptanır. Dedektör sinyali zamana karşı kaydedilir ve buna kromatogram adı verilir (Şekil 13).

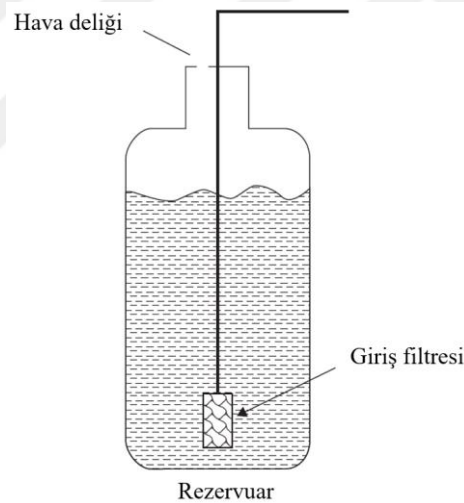


Şekil 13. Zamana karşı dedektör sinyalinin kaydedilmesi ile elde edilen kromatogram örneği

Bütün sistem bir bilgisayarla kontrol edilir yani sisteme elle yapılan tek müdahale örneğin otomatik örnekleyiciye konulmasıdır. Bu sürecin otomasyonundan ayrı olarak HPLC, daha hızlı ayırımlar için yüksek basınca dayanıklı pompaların kullanımı, güçlendirilmiş ayırım için tekrar kullanılabilir ve daha etkin kolonlar ve tekrar üretilebilir sonuçlar için daha iyi sistem kontrolü ile karakterize edilir (102). HPLC sisteminin çeşitli bileşenlerine aşağıda değinilmiştir.

2.8.2. Hareketli Faz Hazneleri, Çözücü Filtrasyonu ve Gaz Giderimi

Hareketli faz hazneleri HPLC sisteminin basit ama önemli parçalarındandır (Şekil 14). Önceden karıştırılmış hareketli fazların kullanıldığı izokratik uygulamalarda tek hazne kullanılır. Gradient uygulamalar ve hareketli fazın online olarak karıştırıldığı izokratik uygulamalarda ise birden fazla hazneye ihtiyaç duyulur. Hareketli faz partikül içermemelidir. Bu sebeple hazne doldurulmadan önce hareketli faz filtrelenmelidir.

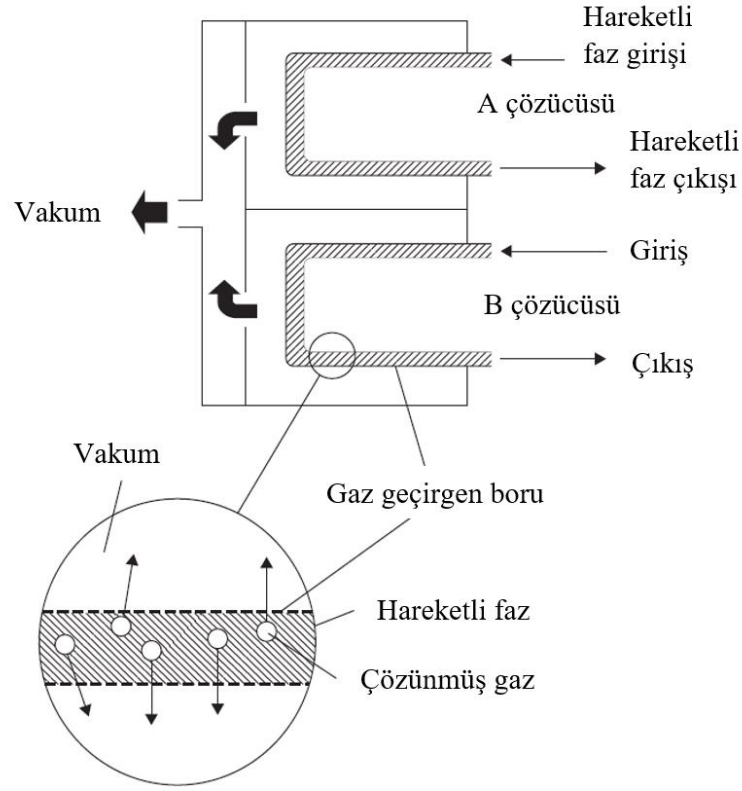


Şekil 14. Hareketli faz haznesinin şematik olarak gösterimi

Çoğu hazne cam malzemeden yapılmasına rağmen, Na^+ iyonunun iyon kromatografisi ile saptanması gibi bazı durumlarda camdan yapılmayan malzemelere ihtiyaç duyulur. Hareketli faza karşı inert olmasına ilaveten, haznelerin temiz olması en önemli gereksinimdir. Cam malzemeler standart laboratuvar yıkama teknikleri ile rutin olarak temizlenmelidir. Haznenin üzeri hareketli faza partikül girmesini önlemek için kapatılmalıdır ancak hareketli faz pompalandığında vakum oluşmaması için çok sıkıca kapatılmamalıdır. Hazneyi pompaya bağlayan borunun giriş ucuna filtre bağlanır. Filtre, bağlantı tüpünü haznenin dibinde tutmak için bir ağırlık görevi görür. Diğer taraftan filtrenin

asıl fonksiyonu, haznede bulunabilecek toz gibi partiküllerin sisteme girişinin engellenmesidir. Hareketli fazın filtreden serbestçe geçebilmesi ve akışın etkilenmemesi için filtre por büyüklüğünün 10 µm'den büyük olması tavsiye edilir. Paslanmaz çelik, seramik veya polietilen eter ketondan yapılmış farklı tipte birçok filtre bulunmaktadır.

Hareketli faz partikül içerdiği zaman HPLC sisteminin birçok parçası bozulabilir. Bu kısımlar; oranlama valfleri, kontrol valfleri, borular ve kolon girişleridir. Bu sebeple partikül içermeyen hareketli faz kullanılması önemlidir. Satıcı tarafından filtrelenmiş çözücülerin kullanılması hareketli faza partikül girmesinden kaçınmada en basit seçenektir. Ticari olarak satılan HPLC saflığındaki çözücüler paketlenmeden önce 1 µm'den düşük por çaplı filtrelerden süzülür. Laboratuvarlarda hazırlanan HPLC saflığındaki su, saflaştırmanın son aşamasında 0.2 µm por çaplı filtreden süzülür. Eğer hareketli fazda sadece HPLC saflığındaki sıvılar kullanılıyorsa, kullanmadan önce genellikle ilave olarak filtreleme yapılmaz. Diğer taraftan, HPLC saflığında olmayan kimyasallar veya katı reaktifler hareketli fazda kullanıldığında, kullanmadan önce hareketli faz karışımı filtrelenmelidir. Hareketli faz bileşimine uygun filtre seçimi önemlidir. Politetrafloretillen filtreler hidrofobik karakterdedir ve MeOH, ACN gibi saf organik çözücülerle kullanılır ancak sulu çözeltilerin hızlı şekilde filtrasyonu için uygun değildir. Sulu çözeltilerin filtrasyonunda ise daha çok selüloz asetat filtreler tercih edilmektedir. Hareketli fazda hava kabarcıklarının bulunması, istenmeyen sonuçlara sebep olabilir. Bu kabarcıklar pompa ile ilgili sorunlara ve dedektör çıkışında sahte piklere sebep olabilir. Bu sebeple hareketli fazdaki gazlar analiz öncesi uzaklaştırılır. Hareketli faz içerisinden helyum geçirilmesi, çözülmüş gazların uzaklaştırılmasında en etkili tekniktir ve çözülmüş gazların yaklaşık %80-90'ı uzaklaştırılır (102, 103). Günümüzde en popüler gaz giderme tekniği, HPLC sistemlerine entegre edilmiş gaz gidericilerin kullanılmasıdır. HPLC sistemine dâhil bir gaz gidericinin çalışma prensibi Şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 15. İki çözücü için tasarlanmış membran gaz giderme cihazının diyagramı

İşlem bir polimerik tüpün gazlara karşı seçici geçirgenliğine dayanır. Hareketli faz, pompa veya çözücü oranlama valflerinden önce gaz gidericiye girer. Çözücü bir vakum haznesi içerisindeki bir parça polimerik borudan geçirilir. Vakum çözülmüş gazı borunun duvarlarından dışarı çekerken, hareketli faz borunun içerisinde kalır. Helyum geçirme kadar etkili olmasa da bütünleşmiş gaz giderici sistemler güvenilirlikleri ve helyumun yüksek maliyeti göz önünde bulundurularak çoğu kullanıcı tarafından helyum ile gaz gidermeye tercih edilmektedir. Bu tekniklere ilaveten, birçok kullanıcı hazırladıkları hareketli fazları ultrasonik banyoda bekleterek çözülmüş gazları uzaklaştırmaktadır.

2.8.3. Pompalama Sistemleri

Günümüzde piyasada bulunan neredeyse bütün HPLC pompalama sistemlerinde piston pompalar kullanılmaktadır. Hidrolik-amplifikatör pompalar öncelikli olarak kolonların doldurulmasında ve preparatif uygulamalarda kullanılmaktadır. Şırınga pompalar HPLC-MS sistemlerde infüzyon pompaları olarak kullanılmaktadır ancak yüksek basınçlı çözücü iletiminde kullanılmamaktadır. Piston pompalar bakım gerektirmeksizin yüzlerce saat sorun yaşanmadan kullanılabilir güvenilir HPLC parçaları olarak görülmektedir. Bu

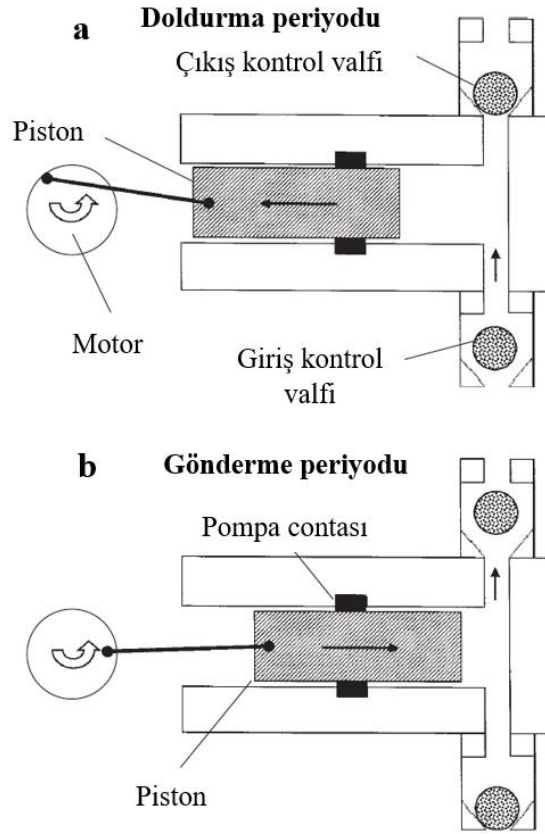
pompaların yüksek doğruluğu ve bu pompalarda kullanılan hareketli faz karıştırma sistemleri analitik bir araç olarak HPLC'nin başarı sağlamasında anahtar görev üstlenmiştir.

Rutin analitik çalışmalar için satılan çoğu HPLC cihazı 6000 psi (400 bar) basınca kadar çalışabilecek şekilde tasarlanmıştır, fakat analizciler genellikle 2000-3000 psi (150-200 bar) aralığında çalışmaktadır.

2.8.4. Piston Pompalar

Ticari olarak satılan HPLC cihazlarının büyük çoğunluğunda tek pistonlu pompalar kullanılmaktadır (Şekil 16). Bu pompaların ana bileşenleri motor, piston, pompa contaları ve kontrol valfleridir.

Pompa motorunun dönüşü pistonu ileri ve geri yönde hareket ettirir. Hareketli fazın pompadan sızmasını engellemek için polimerik pompa contaları kullanılır. Giriş ve çıkış kontrol valfleri hareketli faz akışının yönünü belirler. Doldurma periyodu sırasında piston, pompa başlığından dışarı doğru çekilir ve bu durum pompa içerisinde düşük basınçlı bir bölge yaratır. Çıkış kontrol valfleri kapatılır ve giriş kontrol valfleri açılır. Böylelikle hareketli faz pompaya girer. Hareketli fazın kolona iletilmesi sırasında piston, pompa başlığına doğru hareket eder. Giriş kontrol valfleri kapanır, çıkış kontrol valfleri açılır ve böylelikle hareketli fazın kolona akışı sağlanır (102, 104).



Şekil 16. Tek pistonlu bir pompanın şematik gösterimi. **(a)** Doldurma periyodu. **(b)** Gönderme periyodu

2.8.5. Çözücülerin Karıştırılması

İzokratik yöntemler için HPLC sistemi içerisinde karıştırmaya gerek duyulmadan hareketli faz analiz öncesinde karıştırılabilir. Diğer taraftan birçok kullanıcı HPLC sisteminin güvenilirliğinden dolayı hareketli fazın cihaz tarafından karıştırılmasını tercih etmektedir. İlaveten, gradient yöntemler için hareketli fazın cihaz tarafından karıştırılması gerekmektedir. Hareketli faz HPLC cihazları tarafından üç teknikten biri kullanılarak karıştırılır: yüksek basınçlı karıştırma, düşük basınçlı karıştırma ve hibrit sistemler. Yüksek basınçlı karıştırma sistemlerinde, her çözücü kendine ait bir pompa yardımı ile karıştırıcıya gönderilir. Hareketli fazdaki çözücülerin oranları pompaların bağıl akış hızları ile kontrol edilir. Örneğin, 1 mL/dk akış hızında MeOH:su karışımı (60:40, v/v) seçilmiş ise MeOH pompası 0.6 mL/dk ve su pompası 0.4 mL/dk akış hızında çalışmaktadır. Düşük basınçlı karıştırma sistemleri ile kıyaslandığında yüksek basınçlı karıştırma sistemlerinin avantajı minimum sistem hacmi gerektiren LC-MS gibi uygulamalarda karıştırıcının mikro-karıştırıcı ile değiştirilebilmesidir.

Düşük basınçlı karıştırma sistemlerinde hareketli faz bileşenleri pompaya ulaşmadan önce karıştırılır. Dolayısı ile bu sistemlerde hareketli fazın kolona iletilmesi için tek bir pompaya gerek duyulur. Çözücülerin karıştırılması genellikle dört farklı çözücüyü karıştırma kapasitesindeki bir oranlama manifoldunda gerçekleştirilir. Pompa sabit akış hızında çalıştırılır ve her çözücü için oranlama valfi belirli aralıklarla açılarak hareketli fazı karıştırır.

2.8.6. Otomatik Örnekleyiciler

Örneğin kolona verilmesi, belli miktardaki örneğin akış halindeki ve yüksek basınçlı hareketli faza eklenmesini gerektirir. Açık bir kolon kullanımında veya bazı preparatif ayırımlarda manuel örnek enjeksiyonu tatmin edici bulunabilir. Diğer taraftan analizin otomatize edildiği, sistemin başında durulmadan gün içerisinde yüzlerce analizin gerçekleştirildiği durumlarda örnek enjeksiyonu kesin, doğru ve otomatik olmalıdır. Bu sebeple günümüzde HPLC analizlerinin büyük çoğunluğunda otomatik örnekleyiciler kullanılmaktadır. Başlangıçta manuel kullanım için tasarlanan örnek enjeksiyon valfi bir otomatik örnekleyicinin ana bileşenidir. Farklı tasarımlar da bulunmasına rağmen 6 girişli, döner valf en sık kullanılanıdır. Enjeksiyon hacminin 5 μL 'den yüksek olduğu analizlerde %0.5'ten daha düşük BSS elde edilmektedir. Örnekler genellikle 1-3 mL hacimdeki küçük şişelere konur. Bu şişeler de üzerinde çok sayıda kuyucuk bulunduran plakalara yerleştirilir. Otomatik örnekleyici iğnesi x, y ve z eksenlerinde hareket ederek belirlenen miktardaki örneği çeker (genellikle 1-100 μL) ve kolona gönderir (102, 105).

2.8.7. Dedektörler

Kromatografik dedektör, kolonu terk eden bir analitin fiziksel ya da kimyasal bir özelliğini analit konsantrasyonu ile ilgili olan bir elektrik sinyaline dönüştüren bir sistem bileşenidir. Gaz kromatografisinde kullanılan alev iyonizasyon dedektörü gibi evrensel ve duyarlı bir dedektörün eksikliğine rağmen, genel veya spesifik uygulamalarda başarı ile kullanılan çok sayıda HPLC dedektörü bulunmaktadır. İdeal bir HPLC dedektörünün sahip olması gereken özellikler aşağıda sıralanmıştır:

- Yüksek duyarlılık
- Bütün analitlere cevap verme ya da öngörülebilir analit-cevap ilişkisi
- Akış hızından ya da sıcaklıktan etkilenmeme
- Hareketli fazdan bağımsız olarak cevap verme
- Ekstra kolon pik genişlemesine katkıda bulunmama

- Güvenilir olma
- Analit miktarı ile doğrusal olarak artan cevap verme
- Analitin yapısını bozmama
- Saptanan pik hakkında kalitatif bilgi sağlama

2.9. Saptama Teknikleri

HPLC’de saptama için 4 genel teknik kullanılmaktadır;

- Toplu özellik veya diferansiyel ölçüm
- Örnek spesifik
- Hareketli faz modifikasyonu
- Kombine teknikler

Bir toplu özellik dedektörü bütün analitlerde yaygın olan bir özelliği ölçen evrensel bir dedektör olarak düşünülebilir. Dedektör bu özellikteki değişikliği örneği içeren ve içermeyen hareketli fazın diferansiyel ölçümünü yaparak belirler. En çok bilinen toplu özellik dedektörü refraktif indeks dedektörüdür. Bu tip dedektörlerin avantajı bütün analitlere cevap vermeleridir.

Bir örneğin bazı özellikleri o örneğe özgüdür ya da en azından bütün analitler o özelliğe sahip değildir. Örneğe spesifik dedektörler o özelliğe cevap verir. UV dedektörler en çok kullanılan örneğe spesifik dedektörlerdir. UV dedektör belirlenen dalga boyunda UV ışığı absorplayan analitlere cevap verir. Floresans, elektrokimyasal, radyoaktivite, iletkenlik, kemilüminesans ve kiral dedektörler de bu gruba dâhildirler.

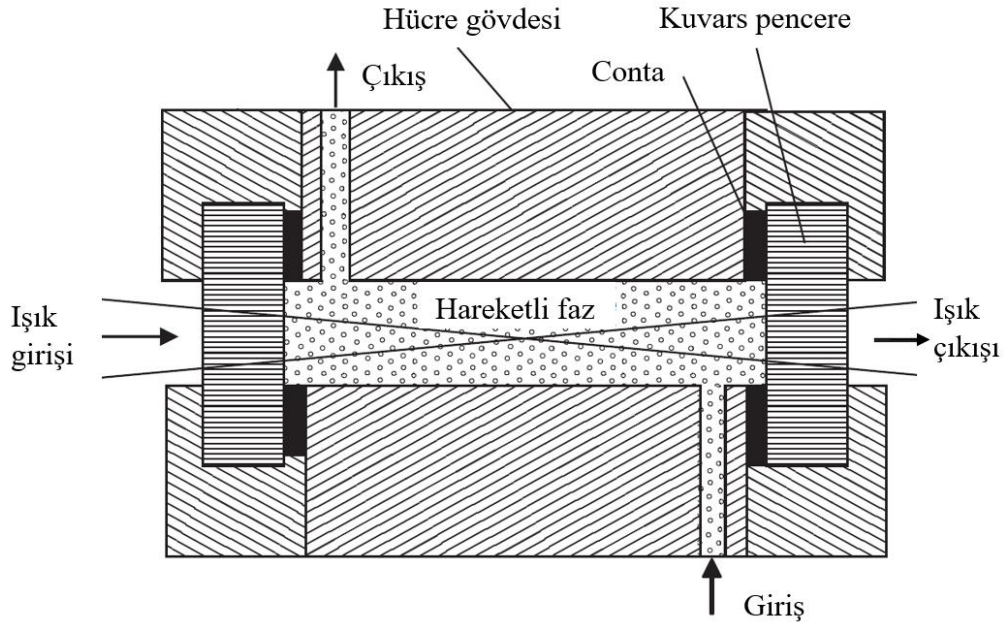
Hareketli faz modifikasyon dedektörleri analitin özelliğinde bir değişiklik yapmak için kolondan çıktıktan sonra hareketli fazın yapısını değiştirir. Evaporatif ışık saçılması dedektörleri bu sınıfa aittir.

Saptama işlemi için HPLC ile farklı analitik enstrümanların birlikte kullanılması kombine teknikler olarak adlandırılır. HPLC’de analitlerin saptanmasında MS, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve infrared (IR) spektroskopisi kullanılabilir.

Bu çalışmada UV-görünür bölge dedektörü ve FD kullanıldığından bu dedektörler hakkında bilgi verilecektir.

2.9.1. UV-Görünür Bölge Dedektörleri

Modern sıvı kromatografisinde en sık kullanılan dedektörler UV ve görünür ışığın absorpsiyonuna dayanan fotometrelerdir. Örnekler UV veya görünür bölgede absorpsiyon gösterdikleri takdirde, bu dedektörler birçok analit için yüksek duyarlılıkta saptamaya imkân vermektedir. Lambert-Beer yasasına göre; akış hücresindeki analit konsantrasyonu hücreden absorplanmadan geçen ışığın fraksiyonu ile ilişkilidir. UV-görünür bölge dedektörleri akış hücresindeki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak absorbans cinsinden cevap üretir. Uygun şekilde tasarlanmış UV-görünür bölge dedektörleri akış ve sıcaklıktaki değişikliklere karşı nispeten duyarsızdır. Gürültü büyüklüğü 1×10^{-5} absorbans üniteden (AU) küçük olan ve 2 AU'ya kadar doğrusal olan UV fotometreler piyasada bulunmaktadır. Bu performans ile, düşük absorptiviteye sahip analitler UV dedektör ile görüntülenebilmekte ve orta seviyede UV absorbans gösteren analitlerin birkaç nanogramının saptanması mümkün olabilmektedir. UV-görünür bölge dedektörlerinin geniş doğrusal aralıkları ($\approx 10^5$) sayesinde hem eser hem de ana bileşenlerin analizi aynı yöntem ile gerçekleştirilebilmektedir. UV-görünür bölge dedektörlerinde yaygın olarak Z şeklinde tasarlanmış, 1 mm iç çaplı ve 10 mm uzunlukta akış hücreleri kullanılır (Şekil 17).

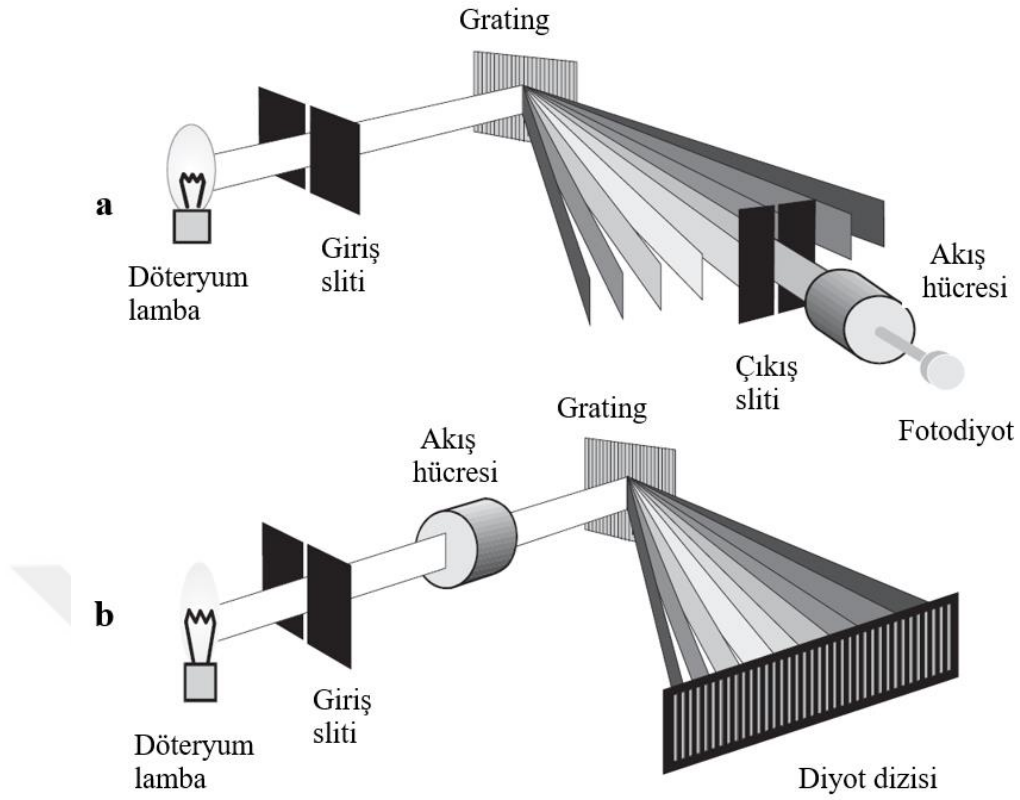


Şekil 17. Z-tipi bir dedektör hücresinin kısımları

Bu hücre hacmi $\geq 100 \times \geq 4.6$ mm boyutlarında ve ≥ 3 μ m partiküllerle doldurulmuş kolonlar için idealdir. Daha küçük boyutlarda ve daha küçük partiküllerle doldurulmuş kolonlarda 8 μ L akış hücreli dedektörler kullanılarak analiz gerçekleştirildiğinde ekstra kolon bant genişlemesi kabul edilemez düzeye ulaşabilir. Analizde daha küçük hacimli akış hücreleri kullanılabilir ancak elde edilen sinyal, akış hücresi uzunluğu ile doğru orantılıdır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, duyarlılık ile ekstra kolon bant genişlemesi arasında bir tercih yapılarak optimum sonuçların elde edilmesi sağlanabilir. UV-görünür bölge dedektörünün şematik gösterimi şekil 18a’da verilmiştir.

UV-görünür bölge dedektörleri geniş bir dalga boyu aralığı boyunca cevap verebilirler (190-800 nm). Bu durum, birçok farklı tipte bileşiğin saptanmasına olanak tanır. Neredeyse bütün aromatik bileşikler 260 nm dalga boyunun altında ışığı kuvvetli şekilde absorplar. Bir veya iki tane çifte bağ içeren bileşikler 215 nm’den küçük dalga boylarında, alifatik bileşiklerin çoğunluğu ise 205 nm’den küçük dalga boylarında saptanabilmektedir. ACN, su, fosfat tamponu gibi ters faz hareketli fazları 200 nm’de saptama yapılırken rutin olarak kullanılabilir. Diğer taraftan, MeOH içeren hareketli fazlar 210-220 nm’den düşük dalga boylarında kullanılamaz. Hareketli fazın uygun olarak seçilmesi ile UV-görünür bölge dedektörü çoğu organik bileşiğin absorbans gösterdiği 200-215 nm bölgesinde neredeyse evrensel saptama modu olarak kullanılabilir. Su, ACN ve MeOH’un absorpsiyon farkının küçük olmasından dolayı, UV-görünür bölge dedektörleri gradient ayırımlarda oldukça kullanışlıdır. UV absorbansları birbirlerinden oldukça farklı olan tetrahidrofuran ve su gibi bileşiklerin gradient elüsyonda birlikte kullanılmaları uygun değildir.

Diyot dizinli dedektörler (DAD) günümüzde en sık kullanılan UV-görünür bölge dedektör tiplerinden biridir. DAD’ın şematik gösterimi şekil 18b’de verilmiştir. DAD kullanıldığında, lambadan gelen beyaz ışık akış hücresini geçtikten sonra diyot dizisinde dalga boylarına ayrılır. Bu dedektörlerin 512 ya da 1024 diyot içeren versiyonları oldukça yaygındır. Bu diyotlardan gelen sinyaller işlenir ve analitin spektrumu oluşturulur. Kantitatif bilgiye ilaveten kalitatif bilgi de sunması sebebiyle DAD pik tanımlanmasında güvenilir şekilde kullanılmaktadır. DAD kullanılarak birçok dalga boyunda kromatogram boyunca veri toplanabilir. Buna ilaveten, DAD, pik saflığının belirlenmesinde de kullanılmaktadır (102, 106).

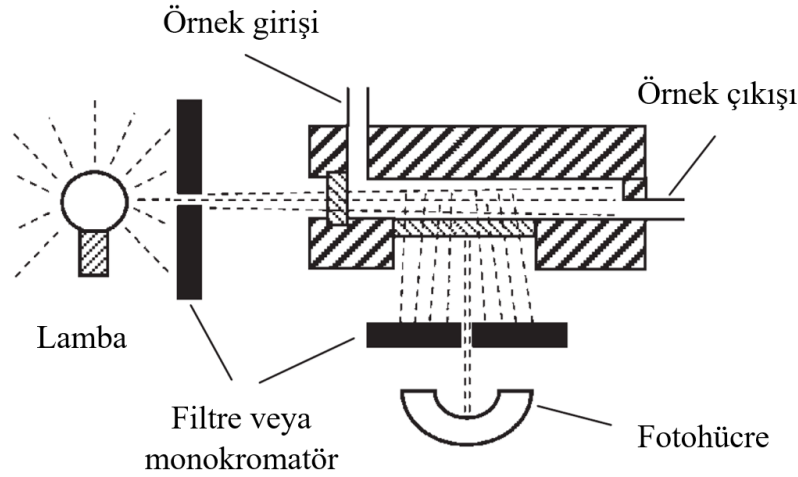


Şekil 18. Işığın absorpsiyonu prensibine dayanan dedektörlerin şematik gösterimi. **(a)** UV-görünür bölge dedektörü. **(b)** DAD

2.9.2. Floresans Dedektör (FD)

UV ışık ile uyarıldığında daha yüksek dalga boylarında ışık yayan bileşikler için FD çok duyarlı ve seçicidir. Floresans karakterde olmayan örnek bileşenleri dedektör sinyali oluşturmaz bu sebeple örnek hazırlama işlemi basitleştirilebilir. Örneğin, 30 pikogram kadar küçük miktardaki riboflavinin gıda örneklerinde HPLC-FD ile tayininde basit bir ACN/tampon ekstraksiyonu yeterlidir (107).

FD'nin şematik gösterimi Şekil 19'da verilmiştir. Işık kaynağı çoğunlukla UV dedektörlerde kullanılan döteryum lamba ya da ksenon lamba gibi geniş spektrumlu bir UV lambadır. Uyarma dalga boyu bir filtre ya da bir monokromatör ile seçilir ve örnek akış hücresinden geçtiği sürece ortama gönderilir. Bir bileşik ışık yaydığı zaman, istenilen emisyon dalga boyu bir filtre ya da monokromatör ile izole edilir ve veri analizi için elektrik sinyaline çevrileceği fotodedektöre yönlendirilir. Floresans bütün yönlerde yayıldığı için, akış hücresine giren ışık ve fotodedektöre gelen ışık birbirine dik olarak konumlandırılır. Bu sayede gürültü azaltılır.



Şekil 19. FD'nin şematik olarak gösterimi. Kesikli çizgiler optik yolu göstermektedir.

Çoğu örnek için FD, UV-görünür bölge dedektörleri ile kıyaslandığında 100 kat daha duyarlıdır. Yüksek duyarlılığından dolayı FD özellikle eser analizlerinde çok kullanışlıdır. UV-görünür bölge dedektörleri ile kıyaslandığında FD'nin doğrusal aralıkları daha dardır ancak çoğu uygulama yeterli doğrusal aralığa sahiptir. Diğer saptama teknikleri ile kıyaslandığında, floresansta genellikle cihaz kararsızlığı ile ilgili daha az problemle karşılaşılır (örn: sıcaklık ve akış değişiklikleri). Eğer çözücüler ve kullanılan kimyasallar floresans özellik göstermiyorsa, FD gradient elüsyonda kullanılabilir. Bütün bileşiklerin floresans özellik göstermemesi FD'nin ana problemidir. Bu problemi çözmek amacıyla, örnek hazırlama prosedürü uzasa da analitler türevlendirilerek floresans karakterli bileşikler oluşturulabilir ve analiz duyarlı bir şekilde gerçekleştirilebilir.

2.10. Kolon

HPLC sisteminde “ayırımın kalbi” olarak nitelendirilen kolon HPLC'nin başladığı 1960'ların ortalarından günümüze önemli oranda değişmiştir. Hızlı ayırımların yapılabilmesi adına kolon etkinliği artırılmıştır. Kolon stabilitesi ve tekrar üretilebilirliği ile ilgili problemler giderilmiştir. Günümüzde 30-250 mm uzunluğunda, 1.5-5 μm boyutunda partiküllerle doldurulmuş kolonlar sıklıkla tercih edilmektedir. Analitik HPLC kolonları, partiküllerle doldurulmuş ve monolitik kolonlar olarak gruplandırılabilir. Bu partiküller tamamen gözenekli, core-shell ya da gözeneksiz olabilir.

Rutin ayırımlar için 1980'lerden 2000'li yıllara kadar genellikle 5 μm çapında partiküller tercih edilmiştir. Bu büyüklükteki partiküller uygun kolon etkinliği, basınç, güvenilirlik ve uzun kolon ömrü sunmuşlardır. Diğer taraftan, 3 μm ve daha düşük çaptaki

partiküller analiz süresini kısalttıkları ve iş verimliliğini artırdıkları için günümüzde daha popülerdir. Bu partiküller kullanıldığında çok dar pikler gözlemlendiği için ekstra kolon bant genişlemesine sebep olabilecek etkenler minimize edilmelidir. Daha küçük partiküllerle (<2 µm) doldurulmuş kolonlar 1000 bar basınca kadar çalışabilen UHPLC cihazlarıyla kullanılmaktadır.

Partikül ya da monolit halindeki silika, HPLC kolonlarının üretiminde en sık kullanılan materyaldir. Yüksek mekanik dayanıklılıkları sebebiyle dolduruldukları yataklarda yüksek basınç altında uzun süre stabil kalmaları silika partiküllerin önemli avantajlarıdır. Silika temelli kolonlar ayrıca diğer destek malzemeleri ile kıyaslandığında daha yüksek sayıda teorik tabaka üretirler. Silikanın dezavantajı ise ortam pH'ı 8'in üzerine çıktığı zaman çözölmeye başlamasıdır. Ancak yüksek pH'da stabil olan özel bağlı fazlı silika kolonlar piyasada bulunmaktadır. Silikaya ilaveten zirkonya, alümina ve grafitleşmiş karbon da kolon dolgu materyali olarak kullanılmaktadır.

Kolonda alıkonma ve seçiciliği sabit fazlar belirler. Sabit fazlar stabilite, tekrar üretilebilirlik, pik şekli ve kolon etkinliği gibi bazı kritik gereksinimleri sağlamalıdır. Çoğu sabit faz organik yapıdadır. Sabit fazlar partiküle ya kovalent şekilde bağlanır ya da mekanik olarak biriktirilir. Silika yüzeyine sabit faz olarak 3, 4, 5, 8, 18 ve 30 karbonlu düz zincirli alkiller kovalent şekilde bağlanır. C₈ ve C₁₈ en sık kullanılan alkil zincirleridir. Düz zincirli alkillere ilaveten; fenil, amid, karbamat, üre, PFP, siyano, amino ve diol grupları silika yüzeyine kovalent şekilde bağlanarak sabit faz olarak kullanılmaktadır.

Bazı durumlarda modifiye edilmemiş partikülün yüzeyi sabit faz olarak kullanılır. Silikanın normal faz kromatografisinde sabit faz olarak kullanımı bu duruma örnek gösterilebilir.

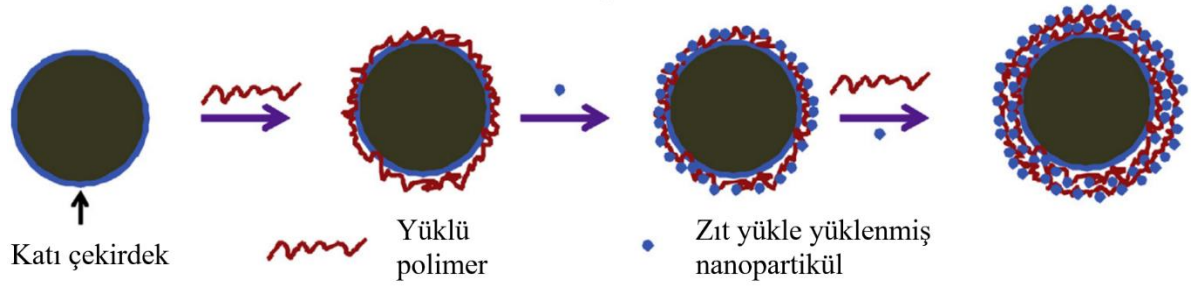
Amaçlanan uygulamaya bağlı olarak kullanılmak üzere, piyasada farklı boyutlarda kolonlar bulunmaktadır. Rutin analiz yöntemleri çoğunlukla 3-4.6 mm iç çapında ve 2.5-5 µm'lik partiküllerle doldurulmuş kolonlarla geliştirilir. Bu tip kolonlar yeterli seviyede güvenilirlik, etkinlik ve kolon ömrü sunmaktadır. MS ile çalışılırken çoğunlukla 2.1 mm iç çaplı kolonlar tercih edilmektedir. Daha küçük iç çaplı kolonlarla çalışılırken, ekstra kolon bant genişlemesinin daha büyük olması sebebiyle kolon etkinliğinde yaklaşık %15-25 düşüş gözlemlenmektedir.

Bu çalışmada geleneksel kolonlara ilaveten core-shell ve monolitik kolonların etkinlikleri karşılaştırıldığı için bu kolonlar hakkında bilgi verilecektir.

2.10.1. Core-Shell Kolonlar

Katı bir çekirdek (core) ve onu saran kabuktan (shell) oluşmalarından dolayı core-shell partiküller, sıklıkla kullanılan tamamen gözenekli partiküllerden farklıdır. Bu materyallerin geliştirilmesi 1960'lı yıllarda Horvath ve Lipsky'nin iyon değişimi ayırımları için büyük çaptaki ilk core-shell partikülleri kullanması ile başlamıştır (108). O zamandan günümüze, bu partiküller birkaç aktif ve durgun gelişme döneminden geçmiştir (109). Bu teknolojiye en büyük gelişme Kirkland'ın 2006'da modern core-shell partikülleri ticarileştirmesi ile gerçekleşmiştir. Günümüzde birçok farklı üretici 2 ve 3 µm'den düşük çaplı core-shell partikülleri üretmektedir (110). Üstün kromatografik etkinlikleri nedeniyle core-shell partiküller analitik laboratuvarlarda hızla popülerlik kazanmaktadır. Bu partiküllerin tercih edilmesinin bir diğer sebebi, küçük modifikasyonlar yapılarak geleneksel HPLC cihazlarında kullanılabilmeleridir. Bu sayede, geleneksel HPLC cihazları kullanılarak UHPLC seviyesinde hızlı ve etkin ayırımlar düşük maliyetler ile gerçekleştirilebilmektedir (111). HPLC'de kullanılan core-shell partiküllerin yapısı iki farklı kısımdan oluşur. Birincisi, 0.9-3.7 µm çapında, içte bulunan katı silika çekirdektir. Nadiren, diğer inorganik (alüminyum ve altın) ya da organik (bir polimer ya da polimer karışımı) materyaller çekirdeği oluşturmada kullanılmaktadır. İkinci kısım, gözenekliliği kontrol edilen, kimyasal olarak modifiye edilmiş birçok silika katmanından oluşturulan kabuktur.

Piyasada bulunan core-shell partiküllerin büyük kısmı katman-katman (layer-by-layer) hazırlanmaktadır. Bu yaklaşımda, çoklu tabakalar bir araya getirilmek için pozitif yüklü ve negatif yüklü türler arasındaki elektrostatik etkileşimler kullanılır. Core-shell partiküller üretilirken ilk olarak çekirdek bir polielektrolit ile kaplanır. Polielektrolitin fazlası çalkalanarak uzaklaştırılır. Kaplanmış çekirdek partikülleri daha sonra organik polielektrolitin tersi yükle yüklenmiş bir nanopartikül süspansiyonuna daldırılır. Bu işlem, polielektrolit çözeltisi ve nanopartikül süspansiyonunun arasındaki daldırmalar değiştirilerek, istenen kalınlığa ulaşılan kadar tekrar edilir (Şekil 20). Elde edilen partiküller organik polielektroliti uzaklaştırmak için termal olarak işlem görür ve core-shell partiküller elde edilir (109, 112).



Şekil 20. Core-shell silika partiküllerin katman-katman yaklaşımı ile oluşturulmasının şematik gösterimi

Benzersiz yapıları sebebi ile core-shell partiküller birçok avantaj sunmaktadır:

- Kolon geçirgenliği artırılmıştır ve bunun sonucu olarak düşük basınçlarda daha yüksek akış hızlarına ulaşılabilir.
- Bu yöntem ile elde edilen partiküllerin yüksek homojenite ve sertlikte olması kolonun doldurulma sürecini geliştirir, partikül içi çoklu yollardan kaynaklanan bant genişlemesini azaltır.
- Kıatı ve gözeneksiz çekirdek, boyuna difüzyonu azaltır.
- Partiküllerin gözenekli kısımlarının azaltılmış olması partikül içi yollardan ve difüzyon sürecinden kaynaklanan bant genişlemesini azaltır.
- Gözeneksiz silika çekirdekten kaynaklanan yüksek termal iletkenlik sayesinde ısı yayılımı kolaylaşır. Bunun sonucu olarak, bant genişlemesine sebep olan radyal sıcaklık gradientleri azalır (113).

Core-shell partiküllerde analitlerin kütle transfer kinetiklerini tanımlamak için kullanılan modeller ve denklemler literatürde mevcuttur (114–116). Kolonda göç eden aynı analitin moleküllerinin hızları arasındaki farklılıklar pik genişlemesine sebep olur. Pik genişlemesini meydana getiren farklı sebepler klasik van Deemter eşitliği ile modellenir (Eşitlik 1).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Eşitlikte;

A: Eddy difüzyonu terimi

B: Boyuna difüzyon terimi

C: Kütle transferi terimi

H: Teorik tabaka yüksekliği

u: Doğrusal hızdır.

Core-shell partiküllerin yüksek etkinliklerinin sebebi, aynı boyuttaki tamamen gözenekli partiküllerle kıyaslandığında (2.0) düşük teorik tabaka yüksekliği (1.2-1.5) değerleri sergilemeleridir.

Core-shell partiküllerin *A* terimi, tamamen gözenekli partiküllerde gözlemlenenen yaklaşık %40 daha küçüktür ve kolon etkinliğindeki artışa en çok bu terim katkıda bulunur. Bu durumun sebebi core-shell partiküllerin düşük partikül boyutu dağılımları (%5-7) olabilir. Buna ilaveten, core-shell partiküllerin yüzey sertliğinin eddy difüzyonunu azaltacak şekilde daha homojen olarak doldurulmuş bir kolon yatağına sebep olabileceği ileri sürülmüştür (109, 117).

Core-shell partiküllerin üstün performansının bir diğer nedeni, gözeneksiz çekirdek yapısından kaynaklanan düşük partikül porozitesinden dolayı boyuna difüzyon teriminin azalmasıdır. Yürütülen deneylerde, core-shell partiküllerin van Deemter *B* teriminin tamamen gözenekli partiküllere kıyasla %30-50 daha küçük olduğu gözlemlenmiştir (109, 118, 119).

Küçük moleküller için core-shell partiküllerin ortalama *C* terimleri aynı boyuttaki tamamen gözenekli partiküllere benzerdir. Core-shell partiküllerin geliştirilme sebebinin partikül içi difüzyon uzaklığının kısaltılması ve böylece kütle transferine direncin azaltılması olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu durum beklenmediktir. Gritti ve ark. bu durumu detaylı olarak çalışmış ve küçük moleküller için ortalama *C* terimine en çok etki eden faktörün partikül içi kütle transferi değil, dış film kütle transfer direnci olduğu sonucuna varmıştır (120).

2.10.2. Monolitik Kolonlar

Monolitik silika materyallerin hazırlanma prosedürleri Nakanishi ve ark. tarafından başlangıç maddeleri olarak bir organik alkoksisilan ve suda çözünür polimer kullanılarak oluşturulmuştur (121–123). Bu araştırmacılar, tetrametoksisilan ve metiltrimetoksisilan gibi silika öncüllerinin hidroliziyle indüklenen sol-jel geçişi kullanarak spinodal bozunmaya dayalı bir yapı oluşturmayı başarmıştır. Katılaşma ve çözücü değişim işleminden sonra, polieter eter keton tüpe yerleştirilen malzeme HPLC kolonu olarak kullanılmaktadır.

Monolitik silika kolonlar ile partiküllü kolonlar karşılaştırıldığında, monolitik silika yapısının por büyüklüğü/silika iskelet büyüklüğü oranı (1-2) partiküllü kolonunkine (0.25-0.4) göre daha fazladır. Bu sebeple monolitik kolonların kolon gözenekliliği daha yüksektir. Por büyüklüğü/silika iskelet büyüklüğü oranı kolonların hazırlama koşulları değiştirilerek ayarlanabilmektedir (121, 124, 125). İç çapı 4.6 mm olan monolitik silika kolon ilk olarak 2000 yılında Merck şirketi tarafından ticarileştirilmiştir (126). Çapı 5 µm olan partiküllerle doldurulmuş bir kolonla kıyaslandığında, aynı akış hızında hareketli faz geçirmek için birinci jenerasyon monolitik bir kolonun 2.7 kat daha az basınç gerektirdiği gösterilmiştir. Buna ilaveten, birinci jenerasyon bir monolitik silika kolon 3.5 µm çaplı partiküllerle doldurulmuş bir kolonunkine eşdeğer verim sağlamaktadır (127).

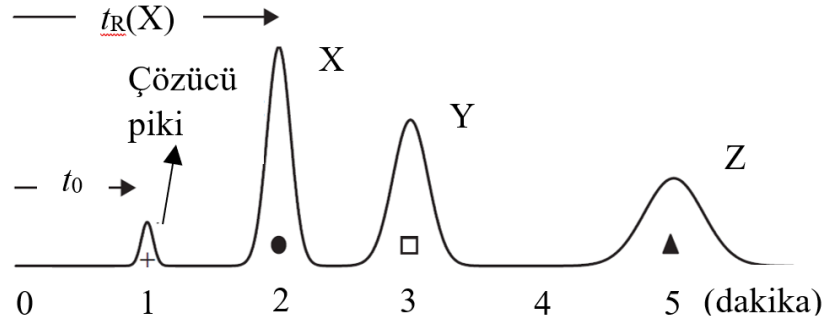
2004 yılında UHPLC'nin ve 2 µm'den düşük çaplı partiküllerin piyasaya sunulmasıyla, birinci jenerasyon monolitik silika kolonların performansları düşük kalmıştır. Kolon etkinliğini artırmak için kolon hazırlama prosedürlerinde yapılan değişiklikler ile monolitik silikanın por çapı azaltılarak ve yapısal homojenliği artırılarak ikinci jenerasyon monolitik kolonlar piyasaya sürülmüştür. İkinci jenerasyon monolitik kolonlar birinci nesile göre oldukça yüksek kolon etkinliği ve geliştirilmiş pik simetrisi sunmaktadır (128–130). Bu kolonlar 2.6 µm çapındaki core-shell partiküllere yakın kolon etkinliği sergilemektedir (131). Günümüzde, monolitik kolonlar; ters faz, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi, anyon değişimi, katyon değişimi ve kiral ayırım modlarında kullanılabilecek sabit fazlar ile üretilmektedir.

Monolitik kolonların avantajları; yüksek geçirgenlik ve kolon etkinliği, yüksek akış hızlarında kararlı yapı, çok yüksek kolon etkinliğine ulaşılmasına olanak tanıyan uzun kapiler kolonlar, birçok yüzey modifikasyonunun kolay şekilde yapılabilmesi ve UHPLC cihazları kullanılmadan geleneksel HPLC cihazları ile kullanılabilmeleri şeklinde sıralanabilir.

2.11. Kromatografide Temel Parametreler

2.11.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Bir analit için alıkonma zamanı (t_R) örneğin enjeksiyonundan pikin en yüksek noktasının kromatogramda gözüktüğü ana kadar geçen zaman olarak tanımlanır. Şekil 21'de X, Y ve Z analitlerinin alıkonma zamanı sırası ile 2, 3 ve 5 dk'dır. Birinci dk'da gözlemlenen çözücüye ait pikin alıkonma zamanı, ölü zaman (t_0) olarak adlandırılır. Bu terim kolon tarafından tutulmayan bir bileşiğin kolonu terk etme süresini ifade etmektedir.



Şekil 21. HPLC’de ayırım sürecinin gösterimi

Kapasite faktörü (k) analitin kolon tarafından ne ölçüde tutulduğunun bir ölçüsüdür ve sabit fazdaki analit miktarının hareketli fazdaki analit miktarına oranı olarak ifade edilir. Eşitlik 2 yardımı ile k hesaplanır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Uygun şartlar altında k ’nin yaklaşık olarak 1-10 arasında olması istenir. Ters faz sıvı kromatografisinde; organik çözücü yüzdesi, sıcaklık, sabit faz tipi ve hareketli faz pH’ı k değerini değiştirir. Diğer taraftan kolon uzunluğu, partikül boyutu ve akış hızı k değerini etkilemez. Hareketli faz bileşimindeki organik çözücü yüzdesinde yapılacak %10’luk bir artış k değerinde 2-3 katlık bir azalmaya sebep olmaktadır.

2.11.2. Seçicilik Faktörü

Seçicilik faktörü (α), kromatografik sistemin örnek bileşenlerini kimyasal olarak ayırt edebilme yeteneğidir. Kolonu art arda terk eden iki analitin k değerlerinin birbirine oranlanması ile seçicilik faktörü elde edilir. Kolonu geç terk eden analitin k değeri paya yazıldığı için seçicilik faktörü her zaman 1’den büyüktür. Seçicilik faktörü Eşitlik 3 ile hesaplanır.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

2.11.3. Kolon Etkinliği

Kromatografik ayırımın başlangıcında analit, küçük genişlikteki dar bir bant olarak kolonda yer tutar. Analit kolonda ilerledikçe, analit bandının genişliği devamlı olarak artar. Bu duruma bant genişlemesi adı verilir.

Kromatografinin başlangıçtaki teorik modelinde, Martin ve Synge kromatografik kolonu, analitin sabit ve hareketli faz arasında partisyona uğradığı birbirinden ayrı kesitlerden oluşuyormuş gibi ele almışlardır (132). Araştırmacılar bu kesitlerin her birini teorik tabaka olarak adlandırmış ve kolon etkinliğini teorik tabaka sayısı (N) ya da teorik tabaka yüksekliği (H) olarak ifade etmişlerdir. Kolon uzunluğu (L) ve H kullanılarak N Eşitlik 4 yardımı ile hesaplanabilir.

$$N = \frac{L}{H} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

İlaveten, pik genişliği (w) ve t_R kullanılarak N Eşitlik 5 ile de hesaplanabilir.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (\text{Eşitlik 5})$$

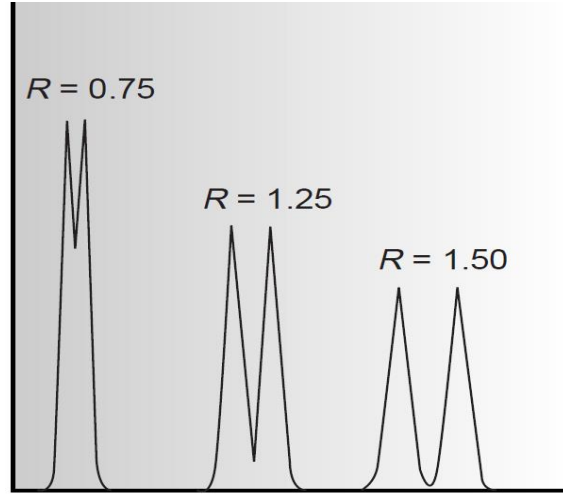
Bir kolonun etkinliği teorik tabaka sayısı arttığında ya da teorik tabaka yüksekliği azaldığında yükselir.

2.11.4. Ayırma Gücü (Resolüsyon)

Kromatografinin amacı örnek bileşenlerini bir dizi kromatografik pik şeklinde ayırmaktır. Ayırma gücü, ardışık iki kromatografik pikin birbirinden ayrılma derecesinin kantitatif ölçüsüdür. Resolüsyon (R) Eşitlik 6 yardımı ile hesaplanır.

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5(w_2 + w_1)} \quad (\text{Eşitlik 6})$$

Şekil 22'den görülebileceği gibi R değeri arttıkça iki pik birbirinden daha iyi ayrılır. Eşit büyüklükteki iki pik için, R değeri 1.5 olduğuunda, iki pikin alanları %0.13 oranında çakışır. Bu sebeple, kromatografik ayırımlarda, iki pik arasındaki R değerin 1.5 ve üzerinde olması istenir.



Şekil 22. R değerine bağlı olarak piklerin birbirine göre konumlarındaki değişiklikler

N , α ve k 'nin R üzerine etkisi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilebilir (Eşitlik 7).

$$R = \frac{1}{4} \times \left[\frac{\alpha-1}{\alpha} \right] \times \left[\frac{k}{k+1} \right] \times \sqrt{N} \quad (\text{Eşitlik 7})$$

Ayırımada R değerini geliştirmenin en kolay yolu analit için k 'nin ayarlanmasıdır. Eşitlik 7'deki diğer bütün değişkenlerin sabit kaldığı varsayılırsa, k değerini artırmak R 'yi artırır. Diğer taraftan başlangıçtaki k değeri küçük ise etki fazladır. Örneğin, k değerini birden 10'a çıkarmak, R 'de %82 oranında bir iyileşmeye sebep olur. İlaveten, k değeri 15'e çıkarıldığında ise R değerindeki artış sadece %87.5 oranında olacaktır. Ayırımada k kullanılarak R değerinin artırılmasının dezavantajı ise analiz süresinin uzamasıdır.

Kromatografide R 'yi artırmanın bir diğer yolu seçiciliğin ayarlanmasıdır. Seçiciliği temsil eden α değeri 1'e çok yakın olduğu zaman k ya da N değiştirilerek R 'nin artırılması çok zordur. Seçicilik, R üzerine çoğu zaman k 'dan daha şiddetli etki eder. Örneğin, α değerinin 1.1'den 1.5'e çıkarılması R 'yi %267 oranında artırır. Sıvı kromatografisinde pH'ın değiştirilmesi iyonize olabilen analitler için seçiciliği genellikle değiştirir.

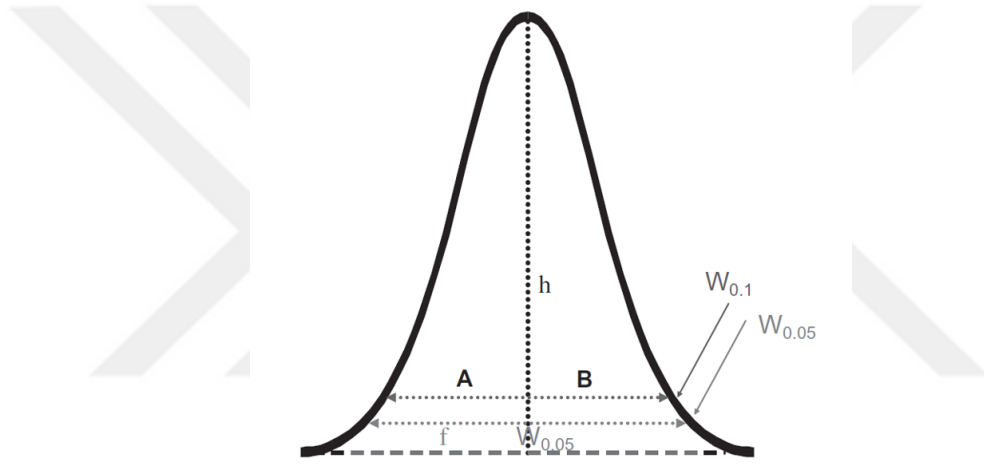
Son olarak R , N artırılarak geliştirilebilir. Örneğin, kritik bant çifti için R 'nin 1 olarak hesaplandığı bir ayırımada, N iki katına çıkarıldığında R 1.4 olacaktır. Partikül boyutu küçültülerek ya da kolon boyu uzatılarak N değeri artırılabilir. Diğer taraftan, kolon boyunun uzatılması analiz süresini de uzatmaktadır.

2.11.5. Asimetri Faktörü ve Kuyruklanma Faktörü

İdeal şartlar altında, kromatografik pikler mükemmel derecede simetrik Gauss tipi şekillere sahip olmalıdırlar. Gerçek analizlerde ise çoğu pik simetrik değildir. Asimetri faktörü (As) pik simetrisinin derecesini ölçmede kullanılır ve pik yüksekliğinin %10'undaki pik genişliği üzerinden hesaplanır. Kuyruklanma faktörü (T), Amerikan Farmakopesi tarafından tanımlanan asimetri faktörüne benzer bir terimdir ve pik yüksekliğinin %5'indeki pik genişliği üzerinden hesaplanır. As ve T'nin hesaplanması Şekil 23'te gösterilmiştir.

Asimetri Faktörü, $As = B/A$

Kuyruklanma Faktörü, $T = W_{0.05}/2f$



Şekil 23. As ve T'nin hesaplanmasını gösteren diyagram

İlaç analizlerinde T'nin hesaplanması gerekmektedir. T değerinin 1'e eşit olması mükemmel derecede simetrik pikleri işaret eder. T değerinin 2'den büyük olması ise şiddetli pik kuyruklanmasını gösterir ve pik integrasyonu zor olacağından dolayı bu durum kabul edilemez. Çoğu pik için ($0.5 < T < 2.0$), As ve T değerleri birbirine benzerdir. Şiddetli kuyruklanan pikler için ise As, T değerinden büyüktür. Pik kuyruklanması çoğu zaman adsorpsiyon ve ekstra kolon bant genişlemesinden kaynaklanır (106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

➤ Fosforik asit (%85)	Sigma
➤ Sodyum dihidrojen fosfat (%99.0)	Sigma
➤ Disodyum hidrojen fosfat (%98-100.5)	Sigma
➤ Asetik asit (%99)	Sigma
➤ Sodyum asetat (%99)	Sigma
➤ Hidroklorik asit (%37)	Sigma
➤ Sodyum hidroksit (%98)	Sigma
➤ ACN (HPLC saflığında)	Carlo Erba

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

➤ HPLC sistemi	Shimadzu, LC-20AT pompa, DGU-20A5 gaz giderici, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO-10ASVP kolon fırını, SPD20A DAD ve RF20A FD
➤ Hassas terazi	Ohaus, PA214C
➤ Saf su cihazı	Sartorius Stedim, Arium pro UV
➤ pH metre	Hanna Instruments, HI 2211
➤ Santrifüj	Sigma, 3-30K
➤ Ultrasonik su banyosu	Sonica, 3300MH
➤ Vorteks	Isolab, MX-S
➤ Mikropipetler	Socorex
➤ Balon joje	Isolab, 10-1000 mL
➤ Membran filtre	Sartorius Stedim, Selüloz asetat, 0.45 µm
➤ Şırınga ucu filtre	Agilent, Naylor, 0.45 µm
➤ Şırınga	
➤ Eppendorf tüpleri	

3.3. Kullanılan Etken Maddeler

- CIP Hidroklorür (%100.1) Atabay İlaç Fabrikası Anonim Şirketi (AŞ)
- LEV Hemihidrat (%99.9) Nobel İlaç Sanayi ve Ticaret AŞ
- MOX Hidroklorür (>%98) Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret AŞ
- GEM Mesilat Seskihidrat (>%98) Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret AŞ

3.4. Kullanılan Kolonlar

Çalışmada kullanılan kolonlara ait özellikler Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. Kullanılan kolon ve kolon dolgu materyali boyutları, yüzey alanları, karbon yüzdeleri ve faz tipleri

Kolon Adı	Uzunluk x İç Çap	Partikül Boyutu	Yüzey Alanı	Karbon Yüzdesi	Sabit Faz
Poroshell 120 PFP	100 mm x 4.6 mm	2.7 µm	130 m ² /g	%5.1	PFP
Poroshell 120 EC-C ₁₈	100 mm x 4.6 mm	2.7 µm	130 m ² /g	%10	C ₁₈
Raptor C ₁₈	100 mm x 4.6 mm	2.7 µm	130 m ² /g	%7	C ₁₈
Inertsil ODS-3	150 mm x 4.6 mm	5 µm	450 m ² /g	%15	C ₁₈
Chromolith High Resolution RP 18e	100 mm x 4.6 mm	Monolitik	250 m ² /g	%18	C ₁₈

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

1 000 µg/mL stok CIP çözeltisinin hazırlanması: 111.0 mg CIP hidroklorür tartılıp 100 mL’lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra, deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır.

1 000 µg/mL stok LEV çözeltisinin hazırlanması: 102.5 mg LEV hemihidrat tartılıp 100 mL’lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra, deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır.

1 000 µg/mL stok MOX çözeltisinin hazırlanması: 109.08 mg MOX hidroklorür tartılıp 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış, 15 mL MeOH'da çözüldükten sonra, deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır.

1 000 µg/mL stok GEM çözeltisinin hazırlanması: 133.25 mg GEM mesilat seskihidrat tartılıp 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra, deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır.

Bütün stok çözeltiler ışıktan korunacak şekilde alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C'de saklanmıştır. Kalibrasyon ve kalite kontrol çözeltileri stok çözeltilerin deiyonize su ile seyreltilmesi ile günlük olarak hazırlanmıştır.

20 mM, pH 2 fosfat tamponu: %86'lık fosforik asit çözeltisinden 0.77 mL ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bileşiğinden 1.36 g alınarak 1 L'lik balon jojede 500 mL deiyonize suda çözüldükten sonra hacme tamamlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi kullanılarak tampon pH'ı 2'ye ayarlanmıştır.

20 mM, pH 3 fosfat tamponu: %86'lık fosforik asit çözeltisinden 0.15 mL ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bileşiğinden 2.77 g alınarak 1 L'lik balon jojede 500 mL deiyonize suda çözüldükten sonra hacme tamamlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi kullanılarak tampon pH'ı 3'e ayarlanmıştır.

20 mM, pH 4 asetat tamponu: %99'luk asetik asit çözeltisinden 0.94 mL ve $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bileşiğinden 0.49 g alınarak 500 mL deiyonize suda çözüldükten sonra 1 L'lik balon jojede hacme tamamlanmıştır. 5 M HCl veya NaOH çözeltisi kullanılarak tampon pH'ı 4'e ayarlanmıştır.

20 mM, pH 5 asetat tamponu: %99'luk asetik asit çözeltisinden 0.34 mL ve $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bileşiğinden 1.92 g alınarak 500 mL deiyonize suda çözüldükten sonra 1 L'lik balon jojede hacme tamamlanmıştır. 5 M HCl veya NaOH çözeltisi kullanılarak tampon pH'ı 5'e ayarlanmıştır.

20 mM, pH 6 fosfat tamponu: 2.74 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0.35 g Na_2HPO_4 alınarak 1 L'lik balon jojede 500 mL deiyonize suda çözüldükten sonra hacme tamamlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi kullanılarak tampon pH'ı 6'ya ayarlanmıştır.

20 mM, pH 7 fosfat tamponu: 1.22 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1.73 g Na_2HPO_4 alınarak 1 L'lik balon jojede 500 mL deiyonize suda çözüldükten sonra hacme tamamlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi kullanılarak tampon pH'ı 7'ye ayarlanmıştır.

5 M NaOH çözeltisi: 5 g NaOH 25 mL'lik balon jojeye aktarılıp bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra hacme tamamlanmıştır.

5 M HCl çözeltisi: İçerisinde yaklaşık 5 mL deiyonize su bulunan 25 mL'lik balon jojeye %37'lik HCl çözeltisinden 10.3 mL alınmış, karıştırıldıktan sonra deiyonize su ile hacme tamamlanmıştır.

3.6. Etik Kurul İzni

Çalışmanın yürütülmesi için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Ek 1) gerekli izin alınmıştır. Çalışmaya katılan bütün gönüllüler ve hastalar bilgilendirilmiş onam formunu okumuş ve imzalamışlardır (Ek 2 ve 3).

3.7. Çalışma Grupları

3.7.1. Yöntem Geliştirme ve Validasyon Grubu

Yöntem geliştirilmesi ve validasyon çalışmalarında sağlıklı, ilaç kullanmayan gönüllülerden alınan kan ve idrar örnekleri kullanılmıştır. Bu gruba 6 gönüllü dâhil edilmiştir. Her gönüllüden 50 mL venöz kan ve 50 mL idrar toplanmıştır. Kan örnekleri heparinli tüplere toplanmıştır. Örnek toplama işleminin hemen ardından 5 000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma örnekleri elde edilmiştir. Bu örnekler validasyon çalışmalarına kadar ışıktan korunarak -20 °C'de saklanmıştır.

İdrar örnekleri gönüllüler tarafından dereceli idrar toplama kaplarına toplanmıştır. Örnekler güneş ışığından korunmuş ve -20 °C'de saklanmıştır.

3.7.2. Hasta Grubu

Yöntemin uygulanabilirliğinin kanıtlanması amacıyla oral yoldan CIP, LEV veya MOX kullanan hastalardan alınan idrar ve kan örnekleri toplanmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü dönemde Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Servisi'nde GEM sıklıkla kullanılmadığından dolayı, GEM kullanan hastalar çalışmaya dâhil edilmemiştir. CIP, LEV ve MOX plazmada analiz edilmiştir. İdrar yolu enfeksiyonlarında kullanılan LEV ve CIP idrarda da analiz edilmiştir. Hasta grubuna CIP kullanan 3 hasta dâhil edilmiştir. LEV ve MOX kullanan birer hasta dâhil edilmiştir.

Kan örnekleri (4 mL), rutin tedavilerinin bir parçası olarak CIP, LEV veya MOX kullanan gönüllü hastalara ikinci ilaç uygulamasından hemen önce ve ikinci ilaç

uygulamasından iki saat sonra heparinli tüplere toplanmış ve 5 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Böylelikle plazma örnekleri elde edilmiştir. Plazma örnekleri analize kadar ışıktan korunmuş ve -80 °C’de saklanmıştır.

CIP veya LEV kullanan hastaların idrar örnekleri (4 mL), ilk ilaç uygulamasından sonra sırasıyla 2., 4., 6., 8., 10. ve 12 saatlerde toplanmıştır. Örnekler analize kadar ışıktan korunarak -80 °C’de saklanmıştır.

3.8. Örneklerin Analiz Edilmesi

3.8.1. Örnek Hazırlanması

Plazma örneklerinin analize hazırlanmasında protein çöktürme tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla, 300 µL plazma örneği bir eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 600 µL ACN eklenmiştir. Tüpün ağzı kapatılmış ve proteinlerin çökmesini sağlamak amacıyla 30 saniye boyunca vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Çöken proteinlerin çözeltiden ayrılması için 15 600 g’de 12 dk santrifüj uygulanmıştır. Üstte kalan berrak kısmın 300 µL’sine 600 µL deiyonize su eklenmiş, karıştırılmış ve şırınga ucu filtreden süzöldükten sonra sisteme enjekte edilmiştir.

İdrar örnekleri ise 1/50 oranında seyreltildikten sonra, süzölmüş ve direkt olarak sisteme enjekte edilmiştir.

3.8.2. Kromatografik Şartlar

Hareketli faz, fosfat tamponu (pH 2, 20 mM) ve ACN’den oluşmuştur. Uygulanan gradient program Tablo 2’de verilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µL ve akış hızı 1.0 mL/dk’dır. Kolon fırını sıcaklığı 25 °C’ye ayarlanmıştır. Analitik kolon olarak Poroshell 120 PFP (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) kullanılmıştır. FD eş zamanlı olarak iki farklı kanalda çalıştırılmıştır. İlk kanalda zamana bağlı olarak uyarma ve emisyon dalga boyları değiştirilmiştir. Uyarma ve emisyon dalga boylarının zamana göre değişimi Tablo 3’te verilmiştir. İkinci kanal ise 272 nm uyarma ve 395 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. DAD 280 nm’ye ayarlanmıştır. Analitlerin UV spektrumları 190-400 nm aralığında kaydedilmiştir. FD ve DAD için örnek alma hızları sırası ile 10 ve 40 Hz olarak belirlenmiştir.

Kromatografik şartların optimizasyonu sırasında sadece DAD kullanılmıştır. Yöntem validasyonu ve örneklerin analizinde ise FD ve DAD seri olarak bağlanmıştır. Kolonu terk eden bileşikler ilk olarak FD’de, daha sonra DAD’da saptanmıştır.

Analize başlamadan önce, ilk olarak 15 dk boyunca 1 mL/dk akış hızında deiyonize su:ACN karışımı (88.5:11.5, v/v) sistemden geçirilmiş, daha sonra zemin düzeline kadar fosfat tamponu (pH 2, 20 mM):su karışımı (88.5:11.5, v/v) ile şartlama yapılmıştır. Hareketli faz 0.45 µm por çaplı membran filtreden süzölmüş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözönmüş gazların uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Tablo 2. Analizde uygulanan gradient program

Zaman (dk)	ACN (%)	Fosfat tamponu (%) (20 mM, pH 2)
0	11.5	88.5
7	20	80
9	80	20
12	80	20
14	11.5	88.5
22	11.5	88.5

Tablo 3. FD’de kullanılan dalga boyu programlaması

Zaman (dk)	Kanal 1		Kanal 2	
	Uyarma dalga boyu (nm)	Emisyon dalga boyu (nm)	Uyarma dalga boyu (nm)	Emisyon dalga boyu (nm)
0	299	498		
4.2	282	451	272	395
6	299	501		

3.9. Yöntem Validasyonu

3.9.1. Sistem Uygunluk Testi

Validasyon aşamasına geçmeden önce, sistemin yeterli ölçüde çalıştığını kanıtlamak için sistem uygunluk testi yapılmıştır. Aynı standart çözeltinin altı defa enjeksiyonu ile elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Enjeksiyon kesinliği, k, ayırma gücü ve T parametreleri kılavuzlarda belirtilen sınır değerler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (133–135).

3.9.2. Doğrusallık

Florokinolonların idrarda analizinde, doğrusallık çalışmaları kapsamında LEV ve MOX için sekiz, CIP için yedi ve GEM için altı konsantrasyon seviyesinde dörder örnek

hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Örnekler 50 µL standart çözeltiye 950 µL, 1/50 oranında seyreltilmiş, sağlıklı ve ilaç kullanmayan gönüllülerden elde edilen idrar örneği eklenerek hazırlanmıştır.

Florokinolonların plazmada analizinde, doğrusallığın araştırılmasında, bütün florokinolonlar için yedi konsantrasyon seviyesinde dörder örnek hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Kalibrasyon örnekleri, 270 µL sağlıklı ve ilaç kullanmayan gönüllülerden alınmış plazma örneğine 30 µL florokinolon standart çözeltisi ilave edilerek elde edilmiştir. Bu örnekler, Bölüm 3.8.1.'de bahsedildiği şekilde hazırlandıktan sonra analiz edilmiştir.

Her bir florokinolon için elde edilen pik alanı değerleri florokinolonların derişimine karşı grafiğe geçirilerek idrar ve plazma matrisleri için ayrı ayrı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen r değerleri incelenerek yöntem doğrusallığı değerlendirilmiştir. Buna ilaveten, kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasında kullanılan pik alanlarının kalibrasyon denklemlerinde yerine konulması ile hesaplanan konsantrasyonların teorik konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesi ile yöntem doğrusallığı değerlendirilmiştir (136).

3.9.3. Duyarlılık

Hem idrar hem de plazma matrisi için LOQ değerleri kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan en düşük konsantrasyon seviyesi olarak belirlenmiştir. LOD değerleri ise Eşitlik 8 yardımı ile kalibrasyon eğrisinin eğimi (m) ve standart sapması (SS) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{3.3 \times SS}{m} \quad (\text{Eşitlik 8})$$

3.9.4. Seçicilik

Olası bozucu bileşiklerin varlığında geliştirilen yöntemin sadece florokinolonlara cevap verdiğini kanıtlamak amacıyla hem idrar hem de plazmada seçicilik deneyleri yürütülmüştür. Bu kapsamda, ilaç kullanmayan altı sağlıklı gönüllüden alınan idrar ve plazma örnekleri analiz edilmiş ve analitlerin alıkonma zamanlarında kolonu terk eden bozucu bileşenlerin olup olmadığı incelenmiştir.

Seçiciliğin kanıtlanması amacıyla, rutin tedavilerinin parçası olarak florokinolon dışında ilaçlar kullanan hastalar çalışmaya dâhil edilmiştir. Birlikte kullanılan ilaçların alınan cevabı etkileyip etkilemediği araştırılmıştır.

Son olarak, FD'ye seri olarak bağlanan DAD yardımı ile pik saflık indeksleri hesaplanmıştır. Pik saflık indeksinin 0.9500'den büyük olması elde edilen pikin saf olduğunu göstermektedir (137).

3.9.5. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntem doğruluğu ve kesinliği hem idrar hem de plazmada gün içi ve günler arası yürütülen deneyler ile araştırılmıştır. Bu amaçla, birisi LOQ olmak üzere dört farklı konsantrasyon seviyesinde hazırlanan kalite kontrol örnekleri analiz edilmiştir. Gün içi doğruluğun ve kesinliğin araştırılmasında aynı gün içinde dört analiz gerçekleştirilmiştir. Günler arası doğruluk ve kesinliğin incelenmesinde ise üç farklı günde toplam 10 analiz yapılmıştır. Doğruluk, % doğruluk olarak, kesinlik ise BSS şeklinde ifade edilmiştir.

3.9.6. Geri Kazanım

Florokinolonların plazmadan ve idrardan geri kazanımı, her bir kinolonun kalibrasyon eğrisi üzerinden seçilen düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç konsantrasyon seviyesinde incelenmiştir.

Plazmada geri kazanım deneyleri yürütülürken belirlenen konsantrasyon seviyelerinde plazma örnekleri hazırlanmış ve Bölüm 3.8.1'de belirtilen örnek hazırlama tekniği uygulanmıştır. Bu örneklerin analizi ile elde edilen pik alanları ile aynı konsantrasyonlarda hazırlanan sulu standart çözeltilerin pik alanları karşılaştırılarak geri kazanım ifade edilmiştir.

İdrar matriksinde geri kazanım çalışmaları yapılırken belirlenen konsantrasyon seviyelerinde idrar örnekleri hazırlanmış ve elde edilen pik alanları aynı konsantrasyonlarda hazırlanan sulu çözeltilerin pik alanları ile karşılaştırılarak geri kazanım ifade edilmiştir.

3.9.7. Kararlılık

Çalışma kapsamında analizi gerçekleştirilen dört florokinolonun plazma ve idrardaki kararlılıkları kısa süreli, uzun süreli ve donma-erime döngüsünde değerlendirilmiştir. Kararlılık, her florokinolon için üç kalite kontrol seviyesinde incelenmiştir. Kararlılık testi uygulanan örneklerin analizi ile elde edilen pik alanları kalibrasyon eğrileri yardımı ile değerlendirilmiştir.

Kısa süreli kararlılığın değerlendirilmesinde, belirlenen konsantrasyonlarda florokinolon içeren kalite kontrol örnekleri +4 °C’de 24 saat bekletildikten sonra oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiş, ardından analiz edilmiştir.

Uzun süreli kararlılık, plazma ve idrar kalite kontrol örneklerinin -80 °C’de iki ay bekletilmesinin ardından oda sıcaklığına getirilerek analiz edilmesi ile değerlendirilmiştir.

Donma-erime kararlılığı değerlendirilirken, hazırlanan kalite kontrol örnekleri -20 °C’de dondurulmuş, ardından oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Bu döngü toplamda üç defa tekrarlandıktan sonra, oda sıcaklığına getirilmiş örnekler analiz edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. FD Dalga Boyu Seçimi

İlgili literatür incelenerek, bütün florokinolonlar için optimum cevabın alındığı uyarma ve emisyon dalga boylarının bulunması için çalışmalar yürütülmüştür.

Bu kapsamda LEV için, 277, 299 ve 300 nm uyarma dalga boyları ile 450, 498 ve 500 nm emisyon dalga boyları denenmiştir (5, 7, 50, 79, 85). En yüksek pikler 299 nm uyarma ve 498 nm emisyon dalga boyu seçildiğinde elde edilmiştir.

CIP için 277 ve 282 nm uyarma dalga boyları ile 449 ve 451 nm emisyon dalga boyları denenmiştir (5, 7, 58, 63, 79). En yüksek pikler 282 nm uyarma ve 451 nm emisyon dalga boyu seçildiğinde elde edilmiştir.

MOX için 277 ve 299 nm uyarma dalga boyları ile 450 ve 501 nm emisyon dalga boyları denenmiştir (5, 7, 50, 79). En yüksek pikler 299 nm uyarma ve 501 nm emisyon dalga boyu seçildiğinde elde edilmiştir.

GEM için 272 ve 350 nm uyarma dalga boyları ile 395 ve 400 nm emisyon dalga boyları denenmiştir (5, 7, 54, 56). En yüksek pikler 272 nm uyarma ve 395 nm emisyon dalga boyu seçildiğinde elde edilmiştir.

4.2. DAD Dalga Boyu Seçimi

Analitlerin, DAD yardımı ile UV spektrumları incelendiğinde LEV, CIP, MOX ve GEM'in sırasıyla 294, 279, 296 ve 274 nm dalga boylarında maksimum absorbands gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu sebeple, DAD'ın, bütün analitlerin yüksek absorbands gösterdiği 280 nm dalga boyunda çalıştırılmasına karar verilmiştir.

4.3. Yöntem Geliştirilmesi

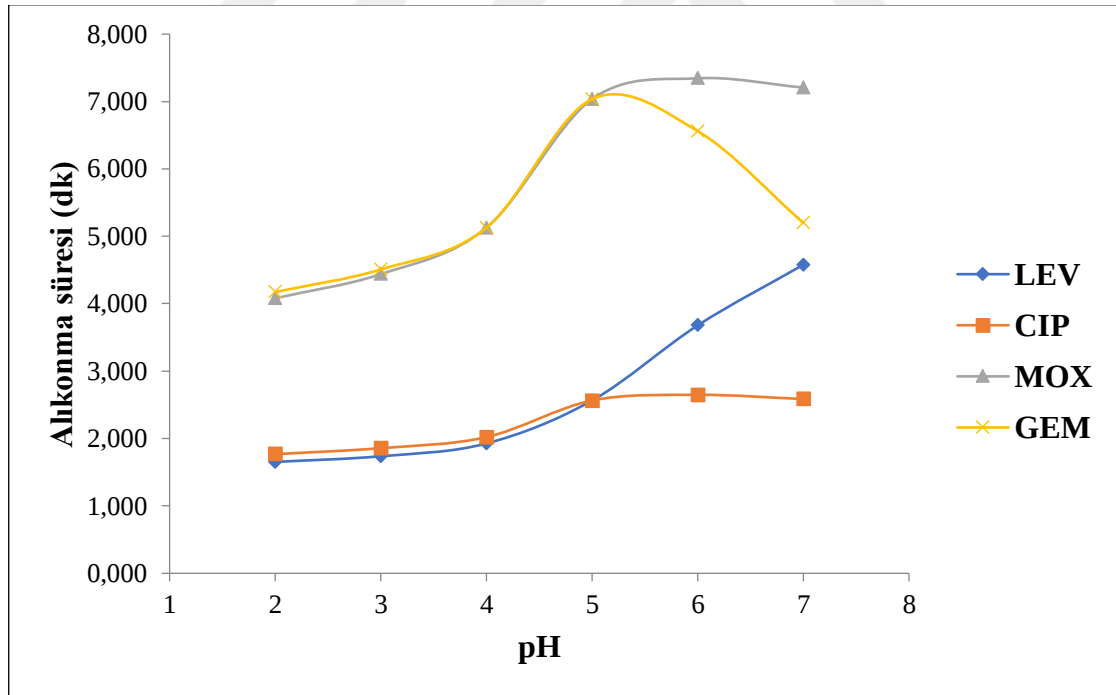
Yöntem geliştirilmesi çalışmaları kapsamında beş farklı kolonun, Poroshell 120 PFP (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm), Poroshell 120 EC-C₁₈ (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm), Raptor C₁₈ (100 mm x 4.6 mm, 2.7 µm), Inertsil ODS-3 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) ve Chromolith High Resolution RP 18e (100 mm x 4.6 mm), florokinolonların ayırımındaki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Organik çözücü yüzdesi ve pH'ın ayırma etkisi bütün kolonlarda değerlendirilmiştir. Sıcaklık ve gradient şekli parametreleri sadece en yüksek performansı gösteren kolonda optimize edilmiştir.

4.3.1. Ayırım Üzerine pH'ın Etkisinin Araştırılması

Alıkonma ve ayırım üzerine pH'ın etkisi 2-7 aralığında izokratik şartlar altında incelenmiştir. Bunun için, fosfat tamponu pH 2, 3, 6 ve 7'de, asetat tamponu pH 4 ve 5'te kullanılmıştır. Fosfat tamponunun %100 ACN içerisindeki çözünürlüğü 20 mM olduğu için bütün tamponlar 20 mM konsantrasyonda hazırlanmıştır. Yapılan analizlerde organik çözücü olarak ACN kullanılmıştır ve oranı %20 olarak belirlenmiştir. Kromatogramlar 280 nm'de DAD yardımı ile kaydedilmiştir. Analitlerin UV spektrumlarından faydalanılarak pik takibi yapılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk ve kolon sıcaklığı 25 °C olarak ayarlanmıştır.

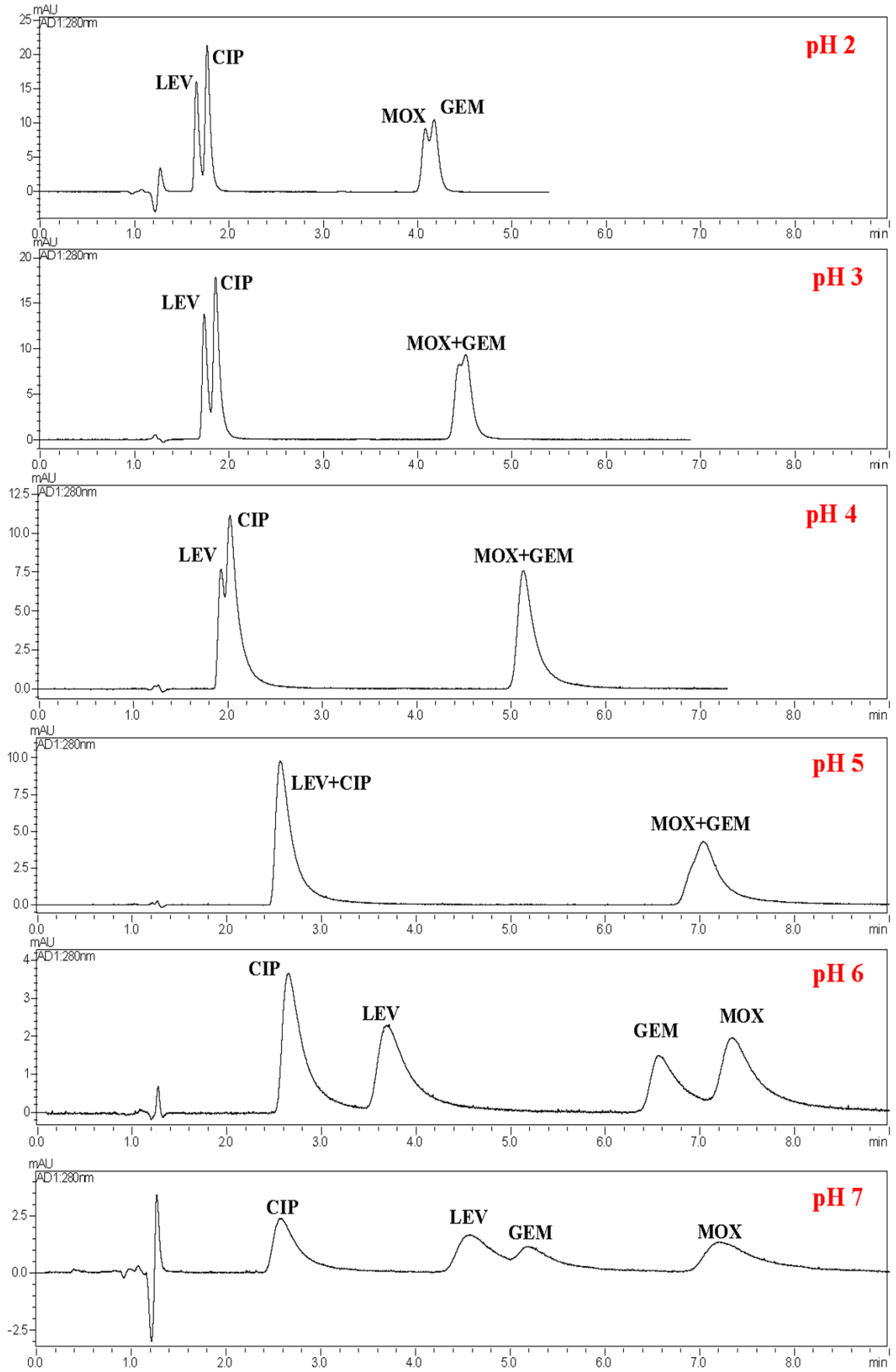
4.3.1.1. Raptor C₁₈ kolon

Raptor C₁₈ kolonda pH 2'den 5'e tüm analitlerin alıkonma zamanlarında artış gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, hareketli faz pH'ı 5'ten 7'ye artırıldığında CIP ve MOX'un alıkonmalarında önemli bir değişim gözlemlenmezken, GEM'in alıkonması azalmış, LEV'in alıkonması ise artmıştır (Şekil 24).



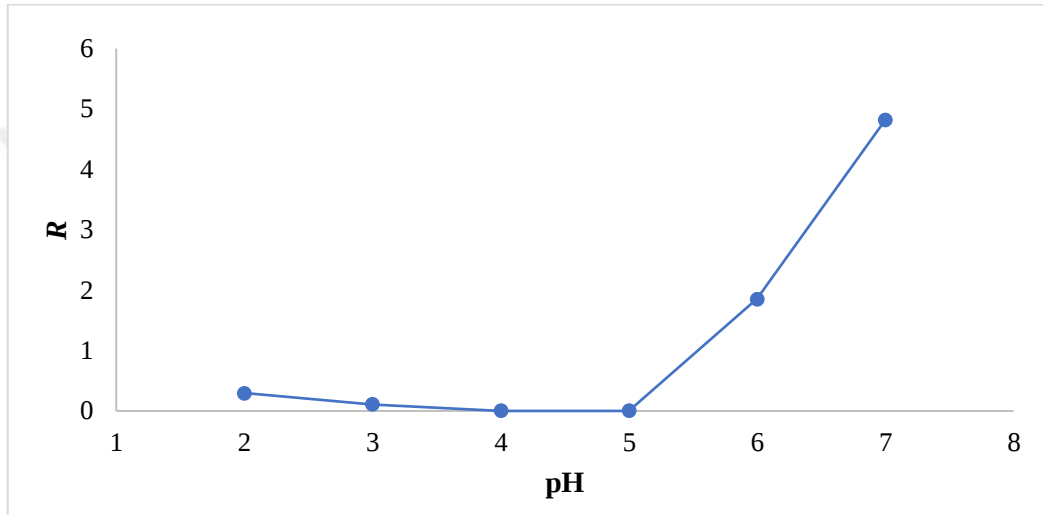
Şekil 24. Raptor C₁₈ kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi

Raptor C₁₈ kolon kullanılarak pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar Şekil 25'te sunulmuştur.



Şekil 25. Raptor C₁₈ kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar

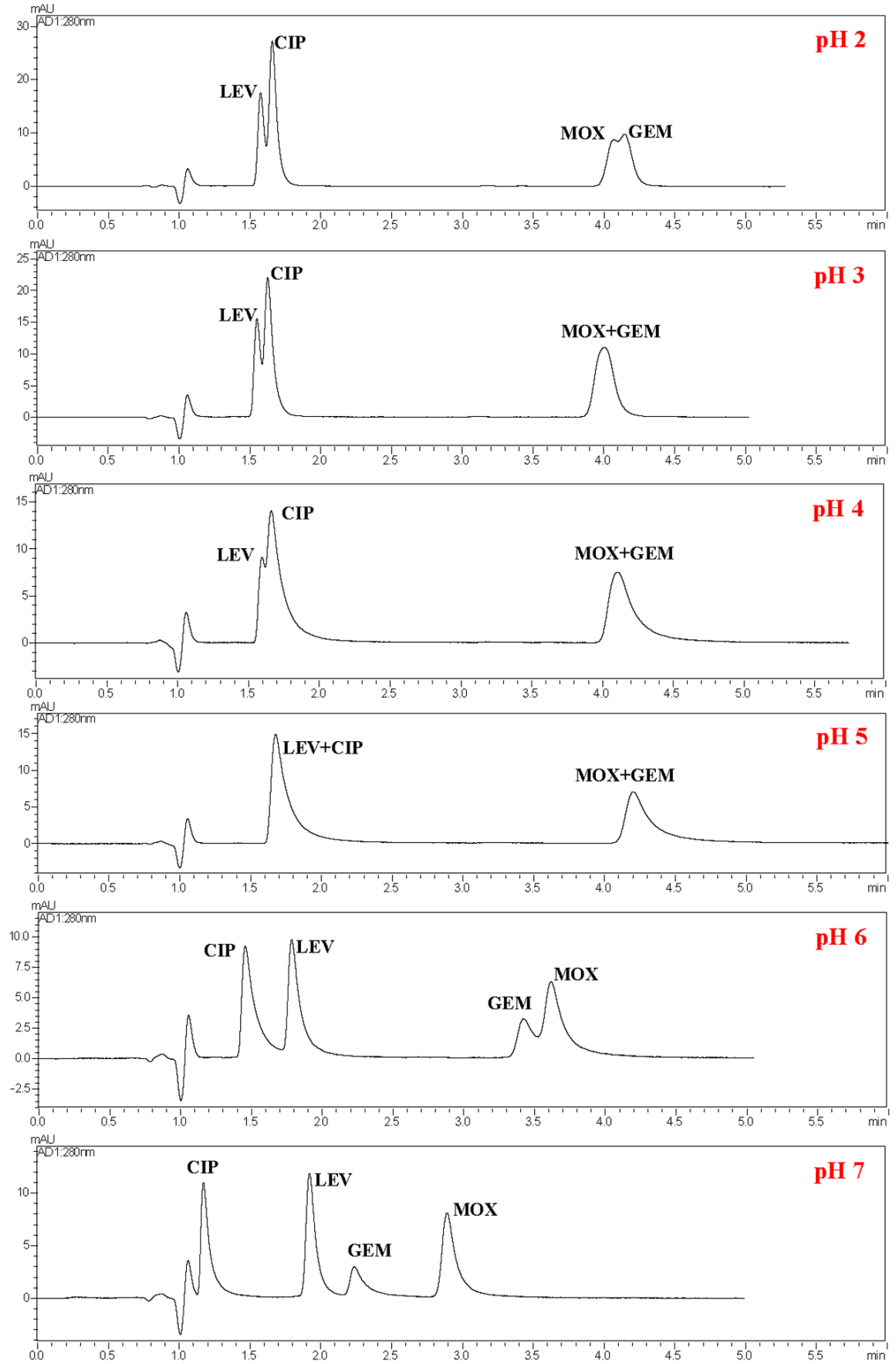
Hareketli faz pH'ı 5'e ayarlandığında LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftleri kolonu birlikte terk etmiştir. Hareketli faz pH'ı 6'ya ayarlandığında ise LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftlerinin elüsyon sırası değişmiştir. Kritik bant çifti olan MOX-GEM arasındaki R 'nin pH'a bağlı olarak değişimi Şekil 26'da verilmiştir. Şekil 25 ve 26'dan görülebileceği üzere pH 6 ve 7'de kritik bant çifti için 1.5' ten yüksek R ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu pH değerlerinde şiddetli pik kuyruklanması ve kolon etkinliğinde düşüş gözlemlenmiştir. Buna ilaveten, pik yükseklikleri önemli ölçüde azalmıştır.



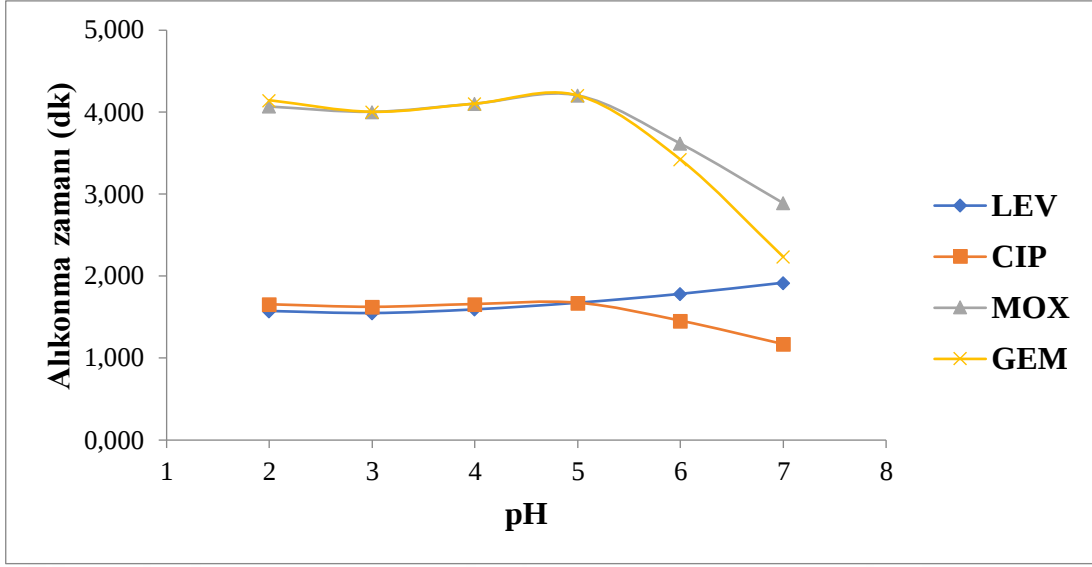
Şekil 26. MOX-GEM pik çifti arasındaki R değerinin Raptor C_{18} kolonda pH'a bağlı olarak değişimi

4.3.1.2. Poroshell 120 EC- C_{18} Kolon

Poroshell 120 EC- C_{18} kolon kullanılarak pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar Şekil 27'de sunulmuştur. Analitlerin alıkonma zamanlarında pH 2-5 aralığında büyük değişiklikler gözlemlenmemiştir. Hareketli faz pH'ı 5'e ayarlandığında LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftleri kolonu birlikte terk etmiştir. pH 6'da ise LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftlerinin elüsyon sırası değişmiştir (Şekil 28).

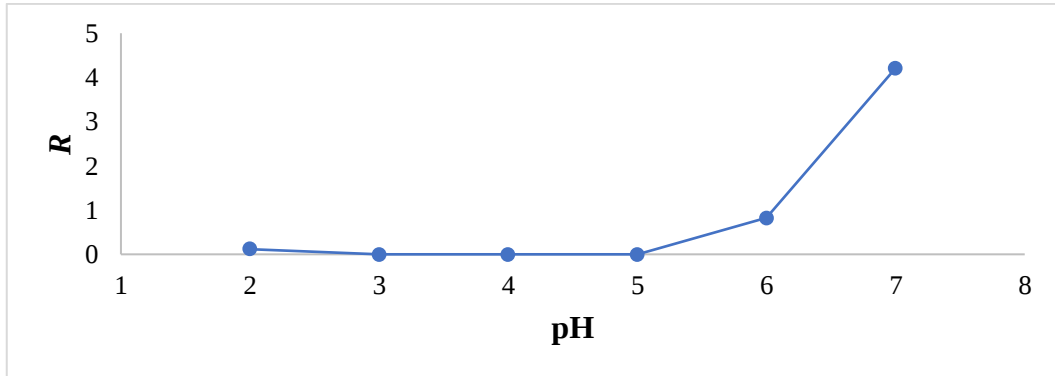


Şekil 27. Poroshell 120 EC-C₁₈ kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar



Şekil 28. Poroshell 120 EC-C₁₈ kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkoma zamanları üzerine etkisi

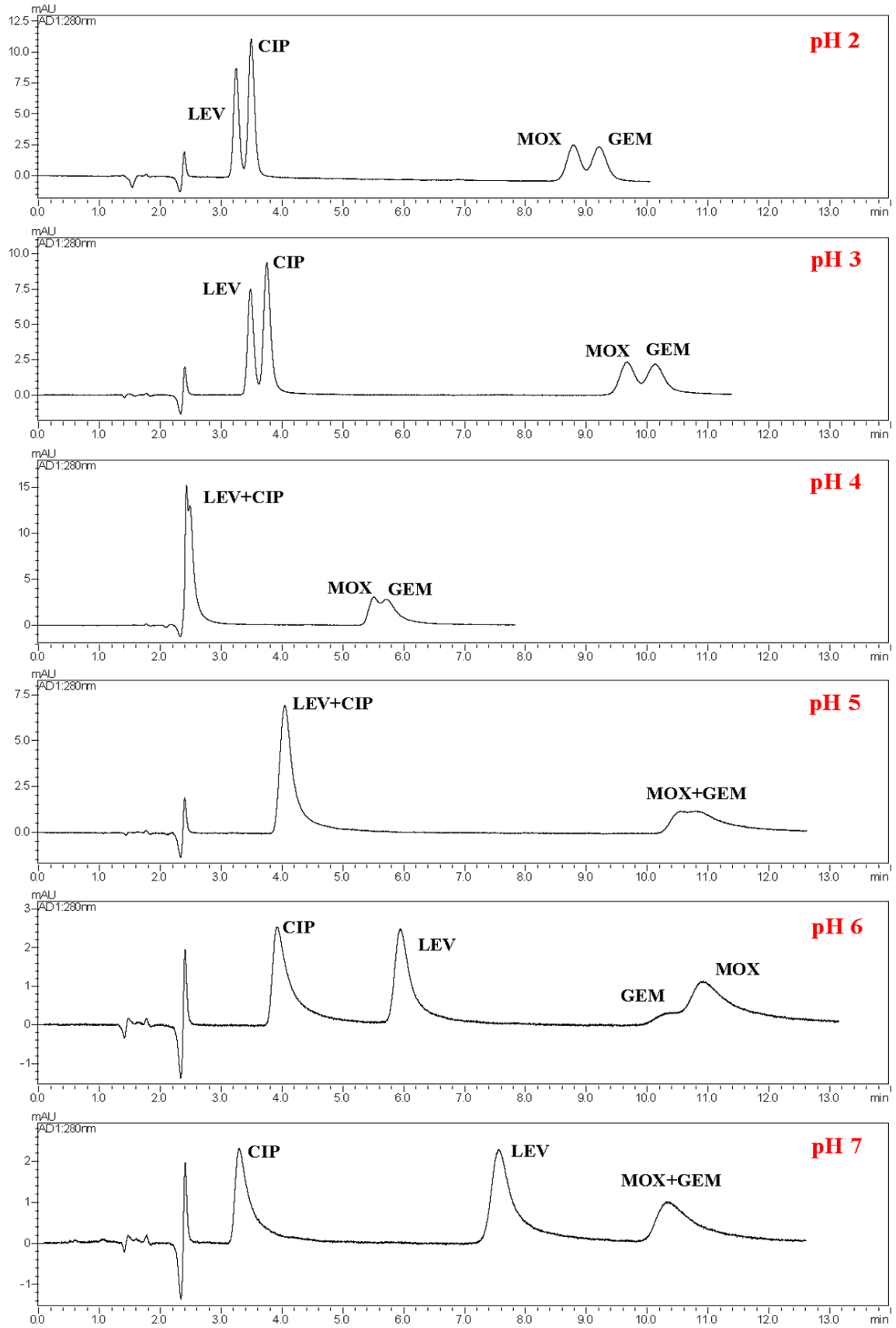
Kritik bant çifti olan MOX-GEM arasındaki R 'nin pH'a bağlı olarak değişimi Şekil 29'da verilmiştir. Kritik bant çifti için gerekli ayırım pH 7'de sağlanmıştır. Diğer taraftan pH artırıldıkça bütün analitler için şiddetli pik kuyruklanması gözlemlenmiş ve analitler kolonu daha geniş pikler halinde terk etmiştir. Buna ek olarak bütün analitler için pik yüksekliklerinde önemli oranda düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 29. MOX-GEM pik çifti arasındaki R 'nin Poroshell 120 EC-C₁₈ kolonda pH'a bağlı olarak değişimi

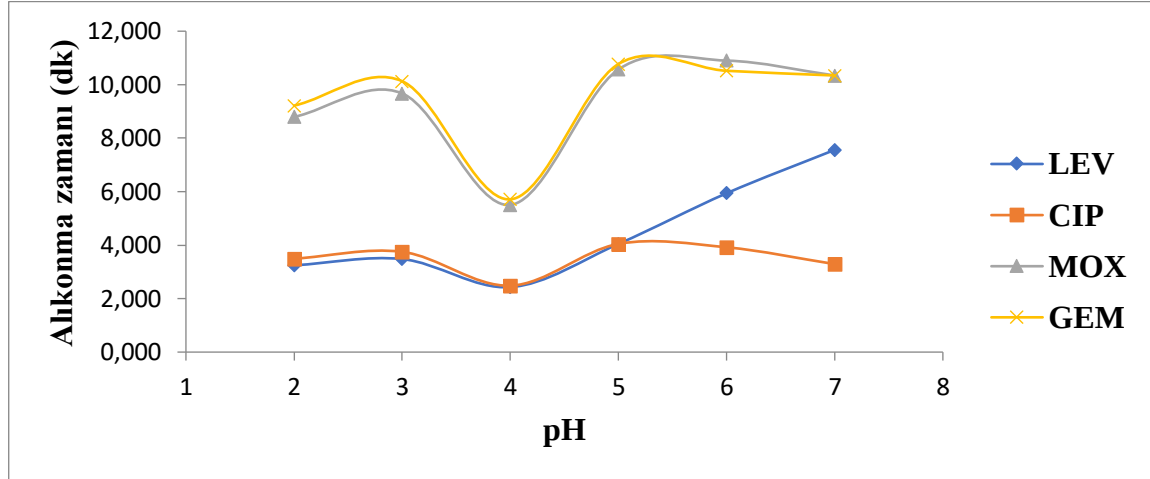
4.3.1.3. Inertsil ODS-3 Kolon

Inertsil ODS-3 kolon kullanıldığında pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar Şekil 30'da sunulmuştur.



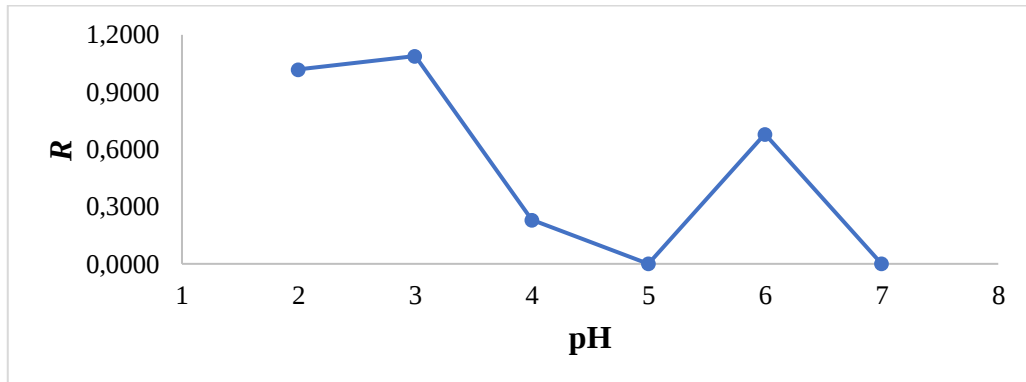
Şekil 30. İnertsil ODS-3 kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar

Alıkonma zamanı üzerine pH'ın etkisi Şekil 31'de gösterilmiştir. Hareketli faz pH'ı 5'e ayarlandığında LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftleri kolonu birlikte terk etmiştir. Son olarak, pH 6'da LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftlerinin elüsyon sırası değişmiştir.



Şekil 31. Inertsil ODS-3 kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi

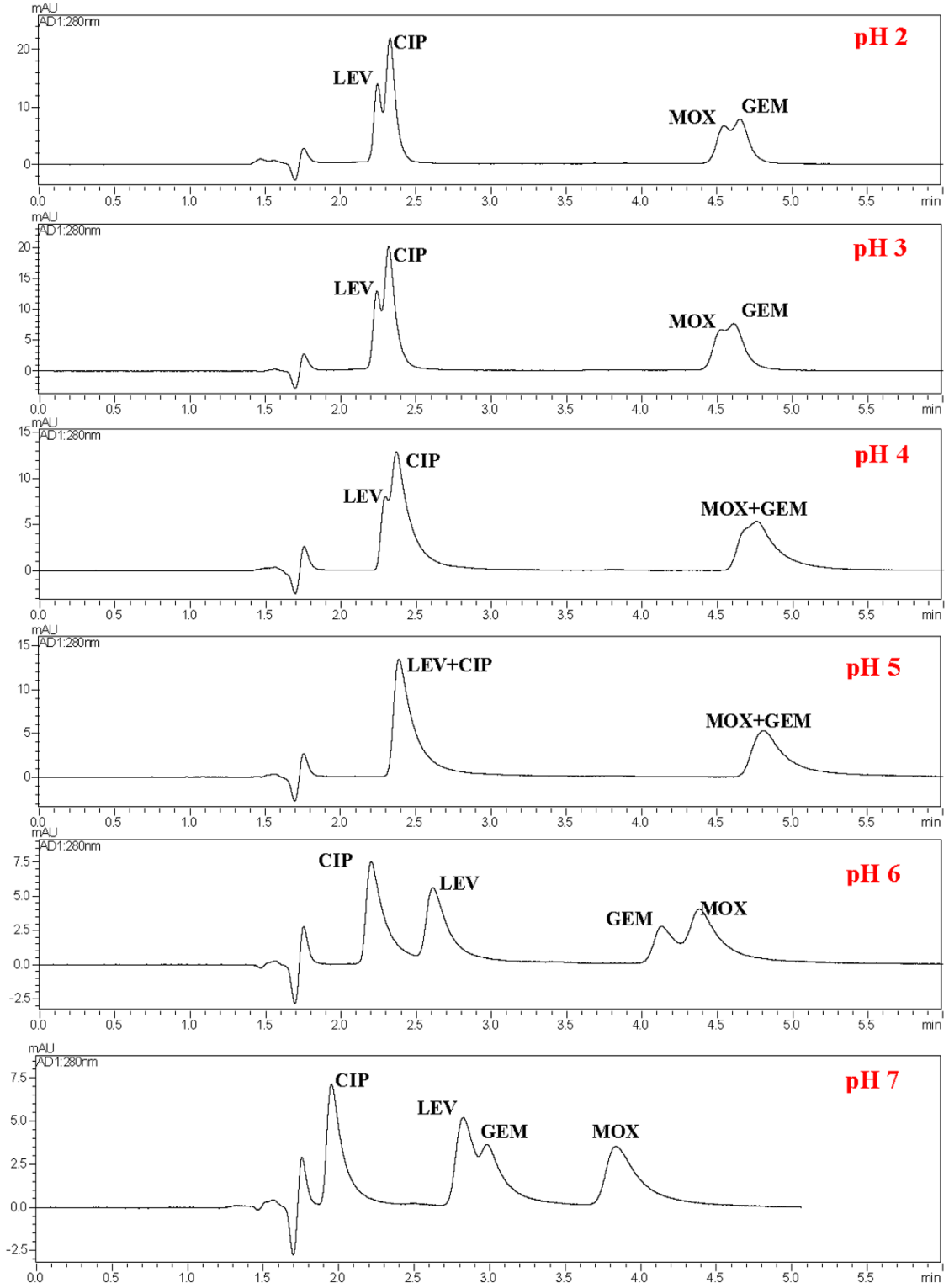
Kritik bant çifti MOX-GEM arasındaki R 'nin pH'a bağlı olarak değişimi Şekil 32'de verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan diğer C_{18} kolonların aksine, Inertsil C_{18} kolon kullanıldığında, kritik bant çifti için en iyi ayırım pH 7 yerine, pH 2 ve 3'te sağlanmıştır. Hareketli faz pH'ının artırılmasıyla, pik yüksekliklerinde önemli ölçüde azalma ve pik simetrisinde bozulma gözlemlenmiştir.



Şekil 32. MOX-GEM pik çifti arasındaki R 'nin Inertsil ODS-3 kolonda pH'a bağlı olarak değişimi

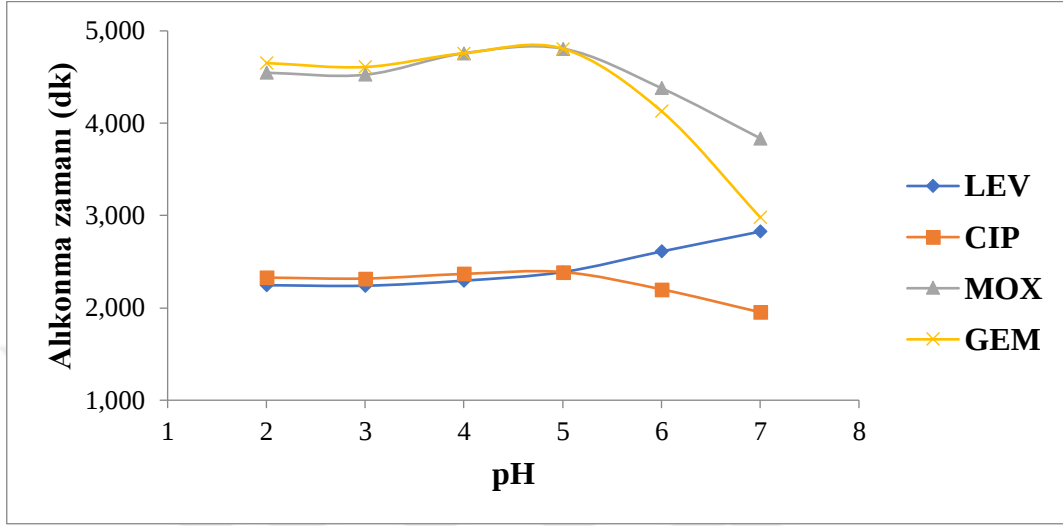
4.3.1.4. Chromolith High Resolution RP 18e Kolon

Chromolith High Resolution RP 18e kolon kullanıldığında pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar Şekil 33'te sunulmuştur.



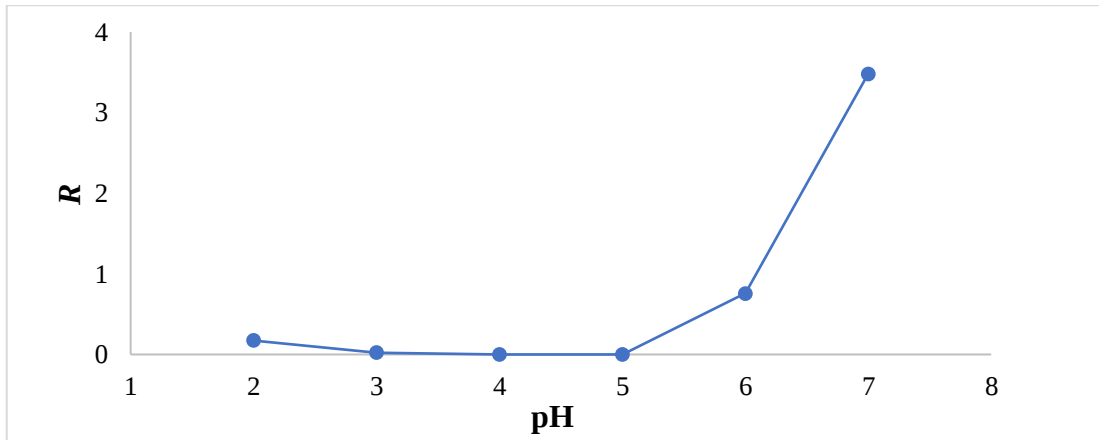
Şekil 33. Chromolith High Resolution RP 18e kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar

Alıkonma zamanı üzerine pH'ın etkisi Şekil 34'te gösterilmiştir. Diğer C₁₈ kolonlarda gözlemlendiği gibi, pH 5'te LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftleri kolonu birlikte terk etmiştir. Bu çiftlerin elüsyon sırası pH 6'da değişmiştir.



Şekil 34. Chromolith High Resolution RP 18e kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi

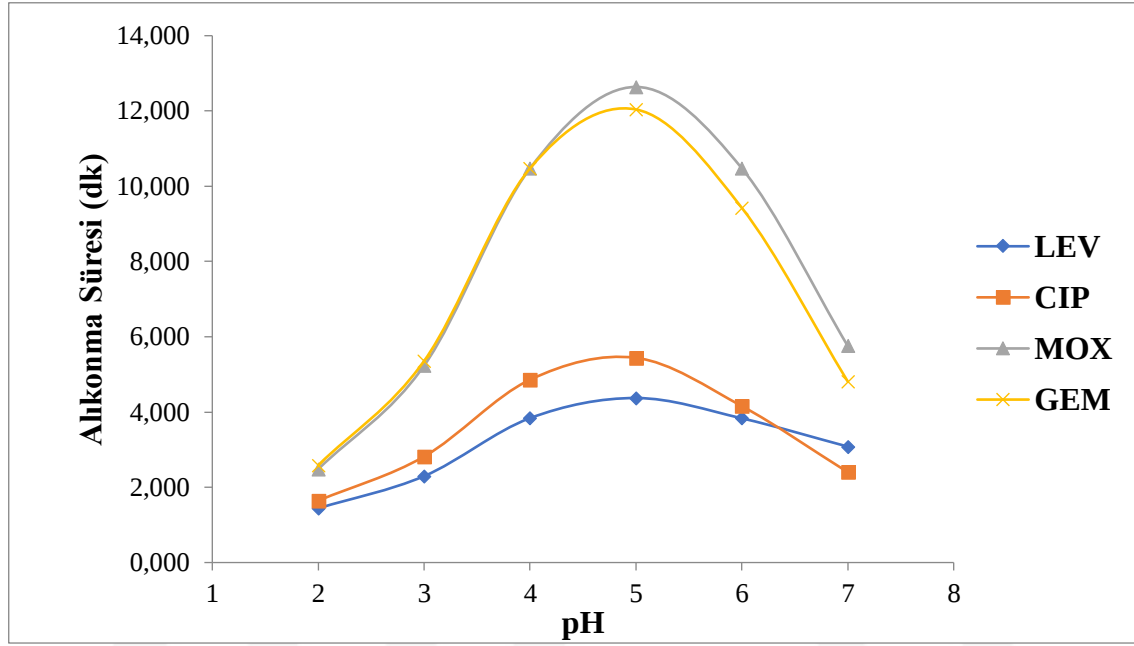
Kritik pik çifti MOX-GEM arasındaki R 'nin pH'a bağlı olarak değişimi Şekil 35'te verilmiştir. Şekilden görülebileceği üzere pH 2 ve 6'da küçük bir ayırım gözlenmekle birlikte, en iyi ayırım pH 7'de sağlanmıştır. Diğer taraftan, pH'ın artırılması ile pikler kuyruklanmaya başlamış ve pik yükseklikleri önemli ölçüde azalmıştır.



Şekil 35. MOX-GEM pik çifti arasındaki R 'nin Chromolith High Resolution RP 18e kolonda pH'a bağlı olarak değişimi

4.3.1.5. Poroshell 120 PFP Kolon

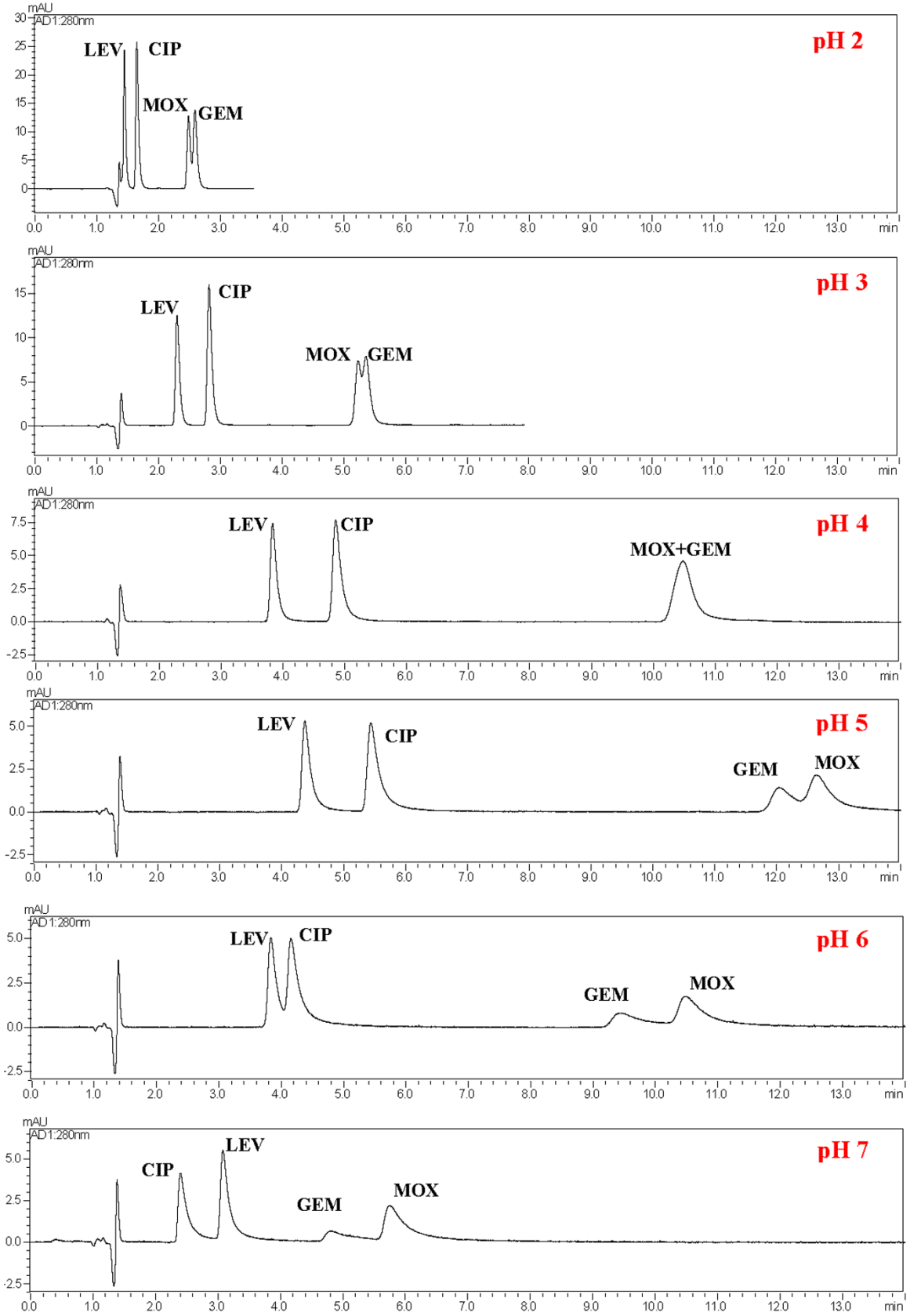
Bütün analitlerin alıkonma zamanlarında pH 2'den 5'e artış gözlemlenmiş ve 5-7 aralığında alıkonmalar azalmıştır. LEV-CIP pik çiftinin elüsyon sırası pH 7'de, MOX-GEM pik çiftinin elüsyon sırası ise pH 5'te değişmiştir (Şekil 36).



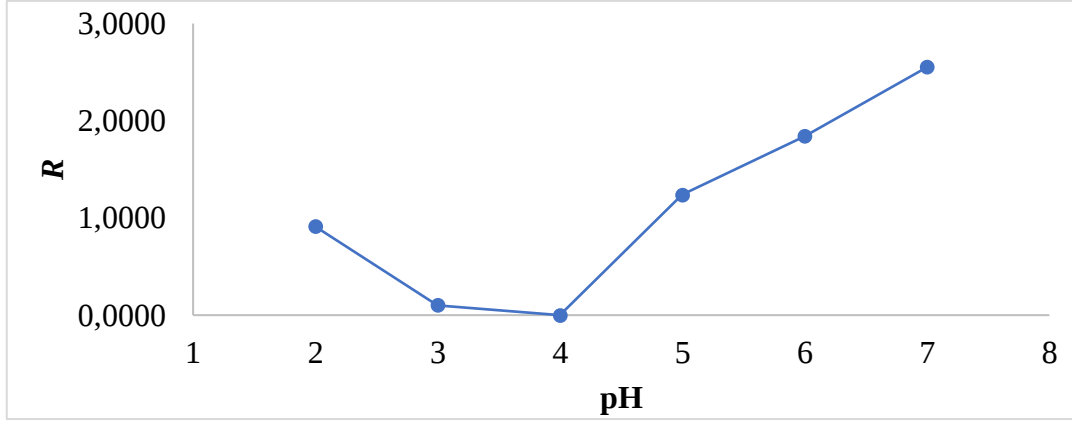
Şekil 36. Poroshell 120 PFP kolon kullanıldığında pH'ın florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi

Poroshell 120 PFP kolon kullanıldığında pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar Şekil 37'de sunulmuştur. MOX-GEM ayırımı üzerine pH'ın etkisi Şekil 38'de gösterilmiştir. Şekilden görüleceği üzere pH 4'ten itibaren kritik bant çifti için *R* artmış ve pH 7'de maksimuma ulaşmıştır. Diğer taraftan pH artırıldıkça kolon performansında önemli bir düşüş gözlemlenmiştir.

Teorik tabaka sayısı pH 2 ile kıyaslandığında pH 5'te MOX ve GEM için artmış, LEV ve CIP için ise azalmıştır. pH 5'ten 7'ye artırıldığında kolon etkinliğinde dramatik düşüş gözlemlenmiştir. İlaveten, pH 2'den 7'ye artırıldıkça bütün analitler için *T* değeri önemli ölçüde artmış ve pik alanları azalmıştır. Hem ayırım gücü hem de kolon performansı göz önünde bulundurularak pH 2'de çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 37. Poroshell 120 PFP kolon ile pH 2-7 aralığında elde edilen kromatogramlar



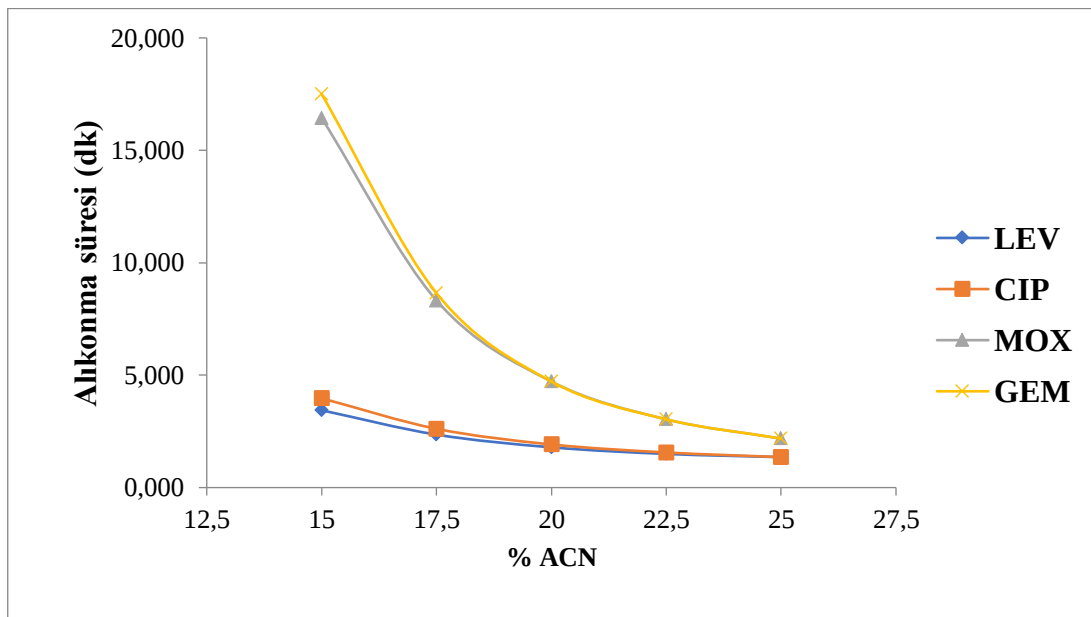
Şekil 38. MOX-GEM pik çifti arasındaki R 'nin Poroshell 120 PFP kolonda pH'a bağlı olarak değişimi

4.3.2. Organik Çözücü Yüzdesinin Ayırım Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmada, hareketli faz bileşiminde organik çözücü olarak ACN kullanılmıştır. ACN yüzdesinin ayırım üzerine etkisi bütün kolonlarda incelenmiştir. Hareketli faz bileşiminde sulu çözelti olarak 20 mM pH 2 fosfat tamponu kullanılmıştır. Analizler DAD kullanılarak 280 nm'de, 1 mL/dk akış hızında ve 25 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

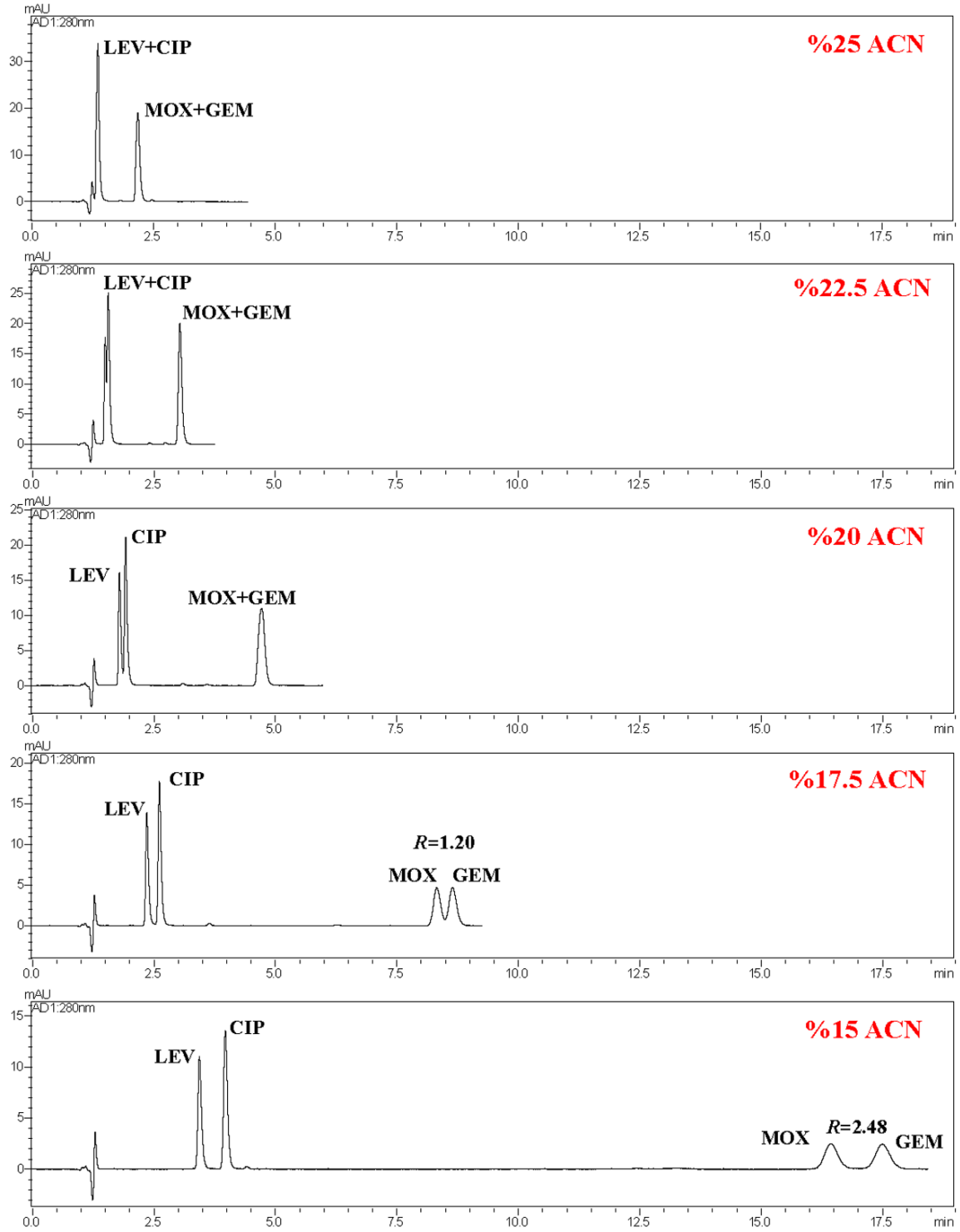
4.3.2.1. Raptor C₁₈ Kolon

Raptor C₁₈ kolon için ACN yüzdesinin ayırım üzerine etkisi %15-25 aralığında araştırılmıştır. ACN yüzdesinin alıkonma zamanları üzerine etkisi Şekil 39'da sunulmuştur.



Şekil 39. Raptor C₁₈ kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi

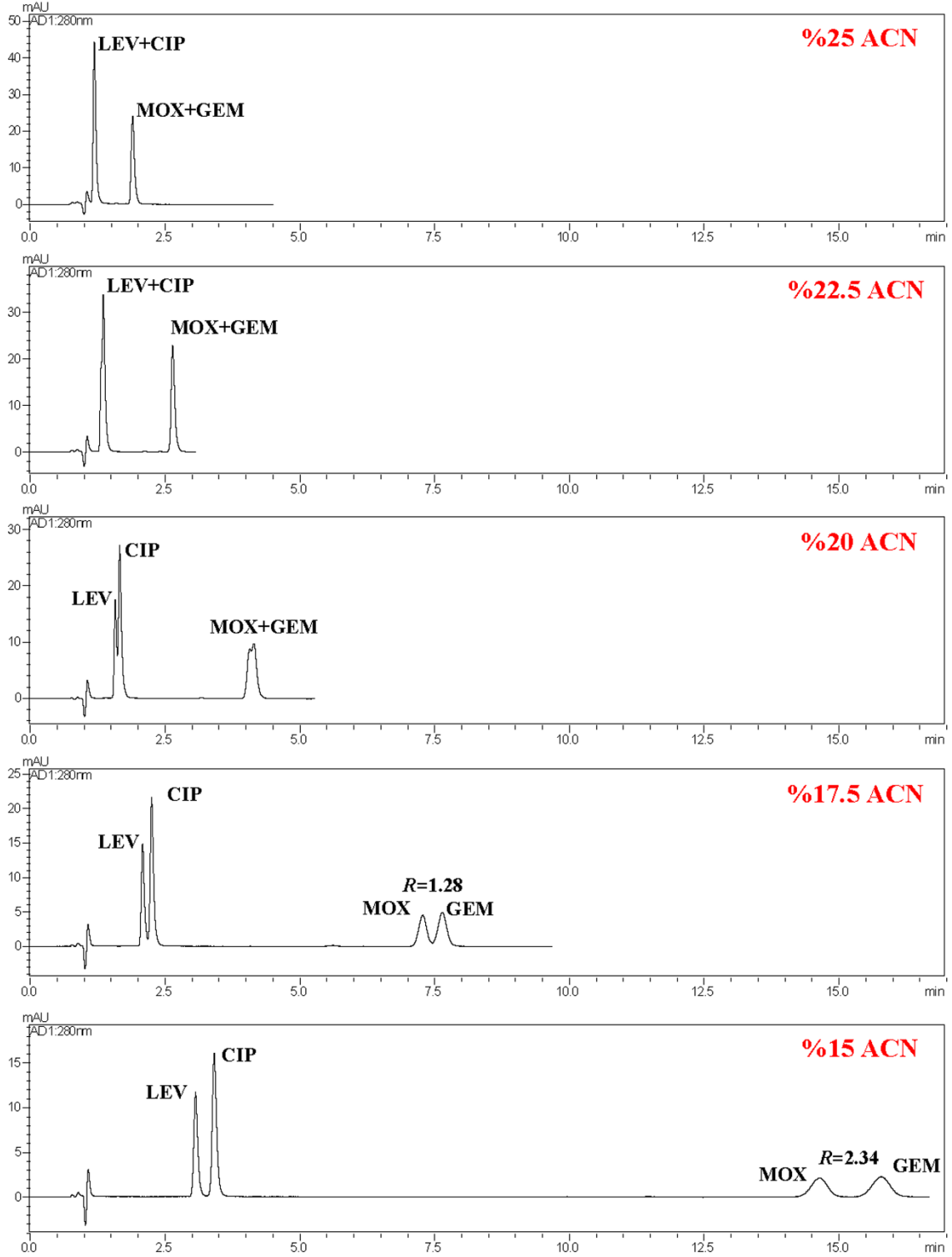
Elde edilen kromatogramlar Şekil 40'ta sunulmuştur. Organik çözücü yüzdesinin artırılması analitlerin kolon tarafından daha az alıkonmasına sebep olmuş ve kritik bant çiftinin ayırımını düşürmüştür. ACN oranı %15'e ayarlandığında MOX-GEM pik çifti 2.48 *R* ile ayrılmıştır ve bu şartlar altında ayırım yaklaşık 18 dk sürmüştür.



Şekil 40. Raptor C₁₈ kolonda %15-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar

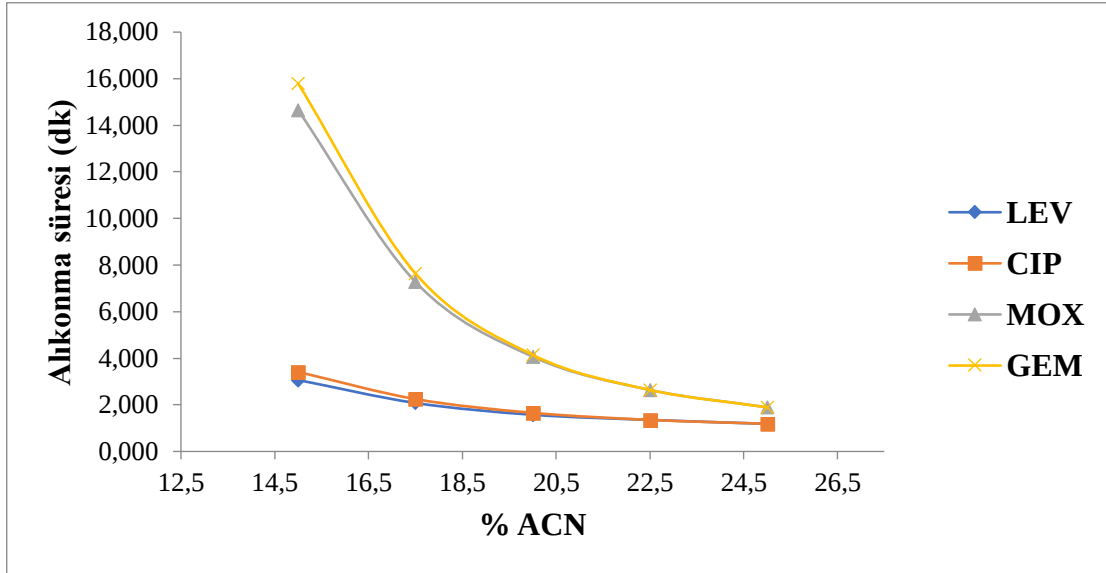
4.3.2.2. Poroshell 120 EC-C₁₈ Kolon

Poroshell 120 EC-C₁₈ kolon için ACN yüzdesinin ayırım üzerine etkisi %15-25 aralığında araştırılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 41’de verilmiştir.



Şekil 41. Poroshell 120 EC-C₁₈ kolonda %15-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar

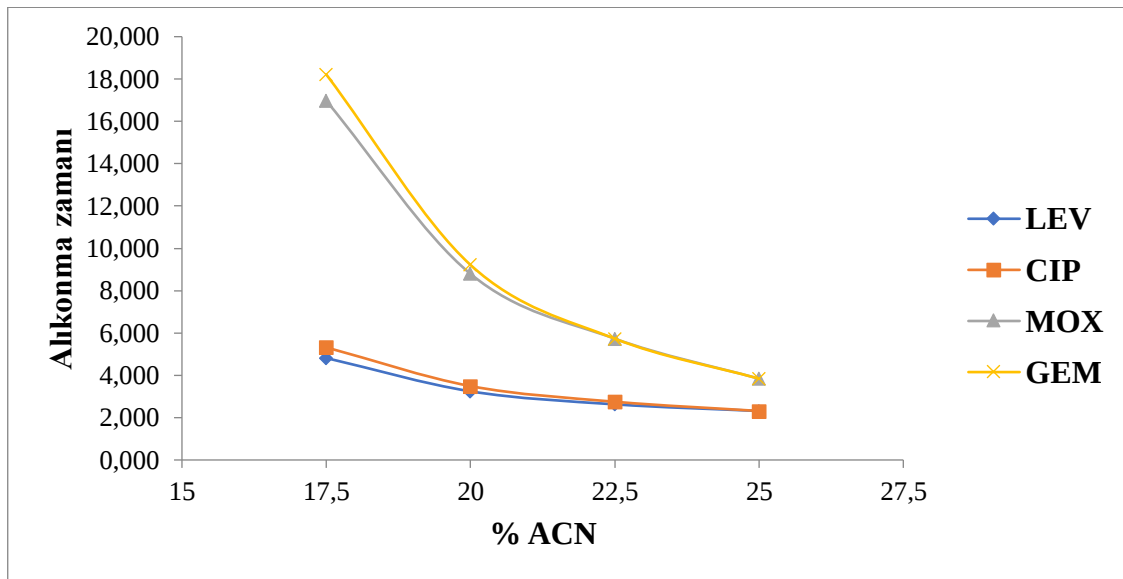
ACN yüzdesinin alıkonma zamanları üzerine etkisi Şekil 42’de verilmiştir. İzokratik ayırım için en uygun ACN oranının %15 olduğu saptanmıştır. %15 ACN kullanıldığında MOX-GEM pik çifti 2.34 *R* ile ayrılmıştır. Analiz süresi bu şartlar altında yaklaşık 16 dk’dır.



Şekil 42. Poroshell 120 EC-C₁₈ kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi

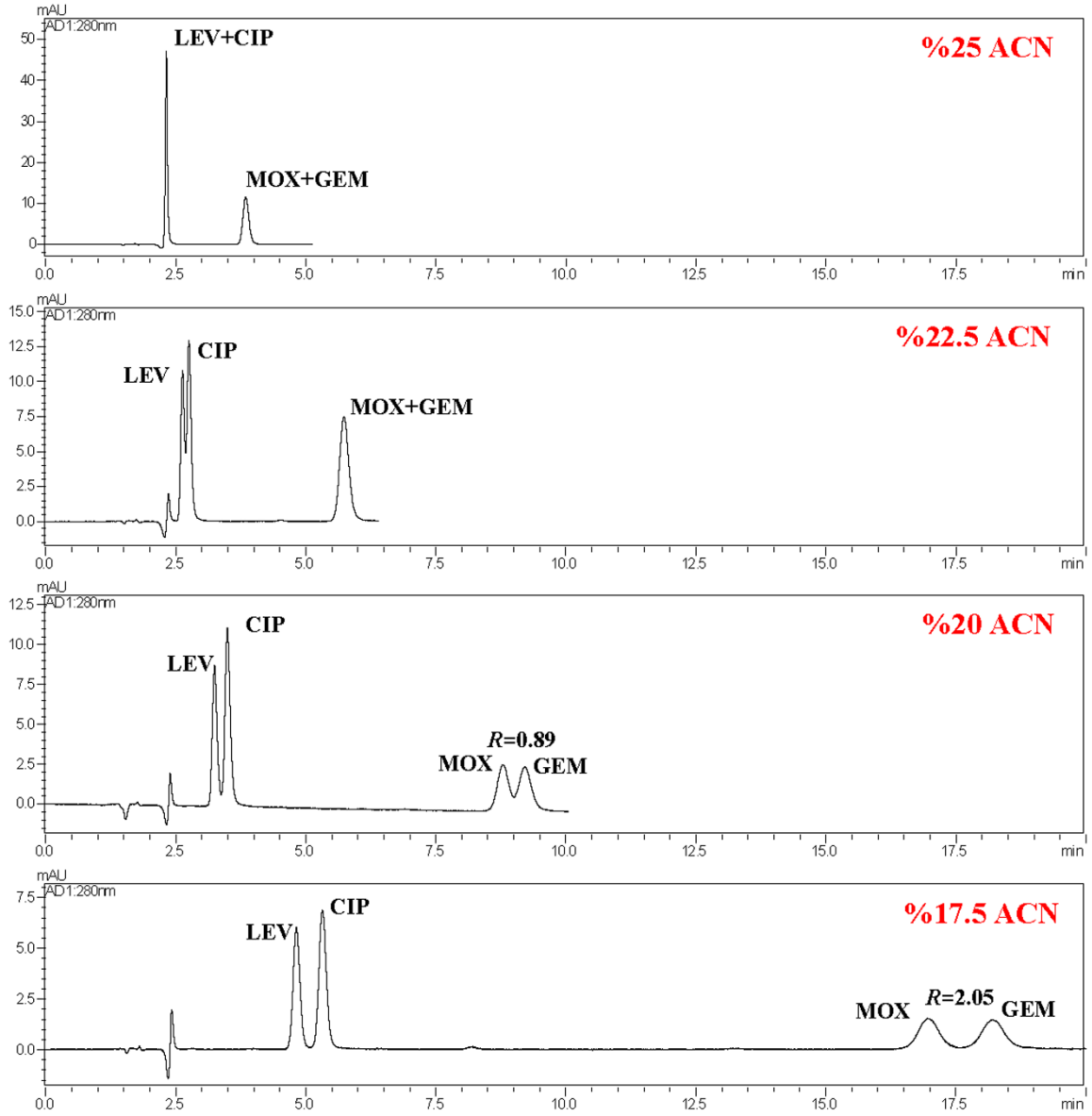
4.3.2.3. İnertsil ODS-3 Kolon

ACN yüzdesinin alıkonma zamanları üzerine etkisi Şekil 43’te verilmiştir.



Şekil 43. İnertsil ODS-3 kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi

Alıkonma profilleri incelenen kolonlar arasında, florokinolonları en fazla Inertsil ODS-3 kolon tutmuştur. %15 ACN kullanıldığında MOX ve GEM'in alıkonması bu kolonda çok yüksek olduğundan dolayı ACN yüzdesinin ayırım üzerine etkisi %17.5-25 aralığında araştırılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 44'te verilmiştir.

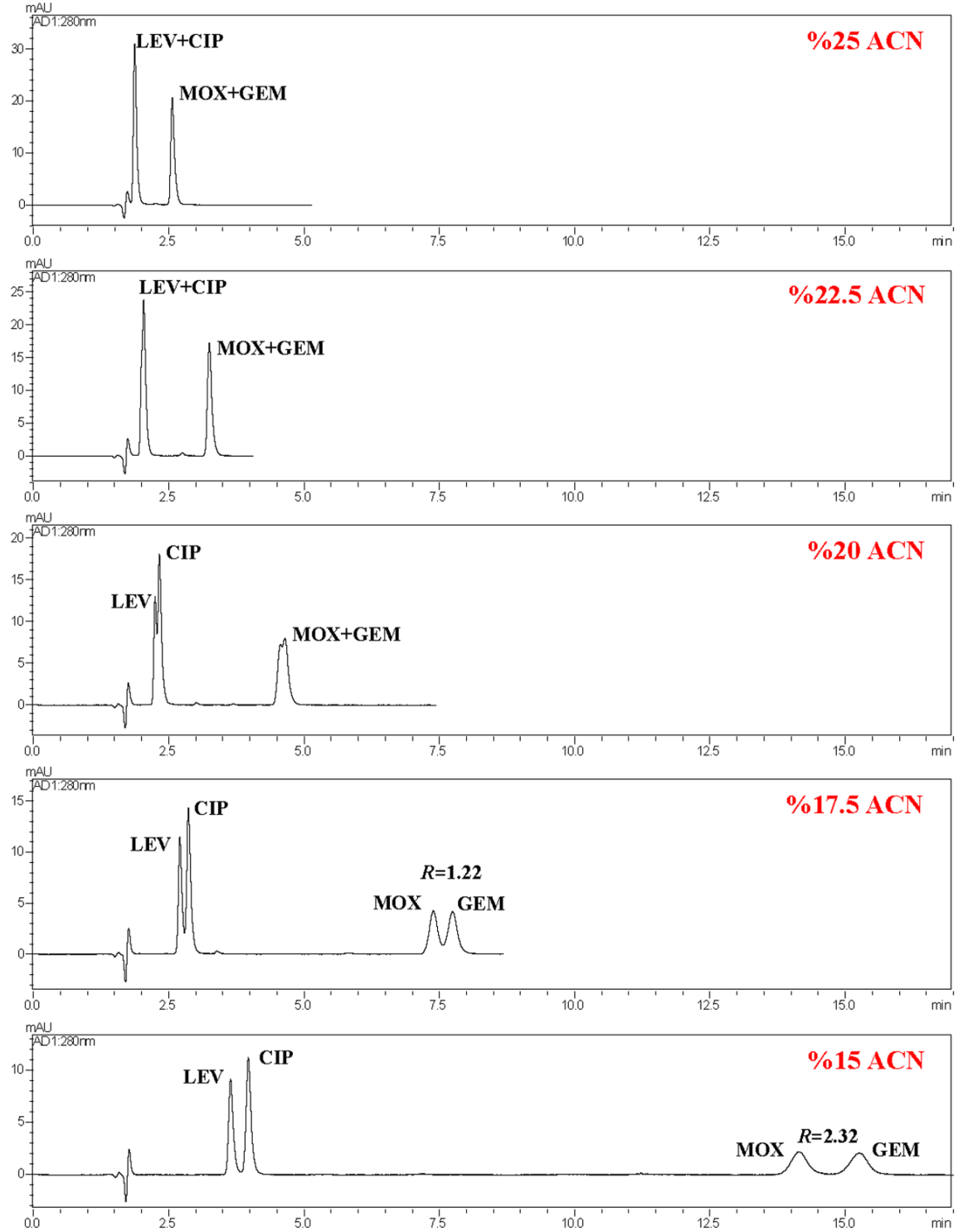


Şekil 44. Inertsil ODS-3 kolonda %17.5-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar

Beklendiği gibi, organik çözücü yüzdesi artırıldıkça analitlerin alıkonma zamanları azalmıştır. Kritik bant çifti için en iyi ayırım %17.5 ACN kullanıldığında gerçekleşmiş ($R=2.05$) ve bu şartlar altında analiz süresi yaklaşık 19 dk olarak bulunmuştur.

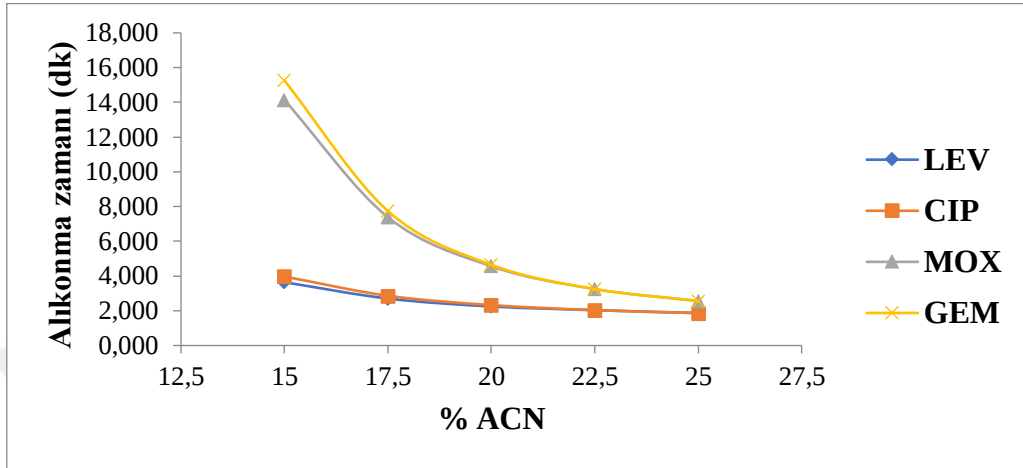
4.3.2.4. Chromolith High Resolution RP 18e Kolon

Chromolith High Resolution RP 18e kolon için ACN yüzdesinin ayırım üzerine etkisi %15-25 aralığında araştırılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 45'te sunulmuştur.



Şekil 45. Chromolith High Resolution RP 18e kolonda %15-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar

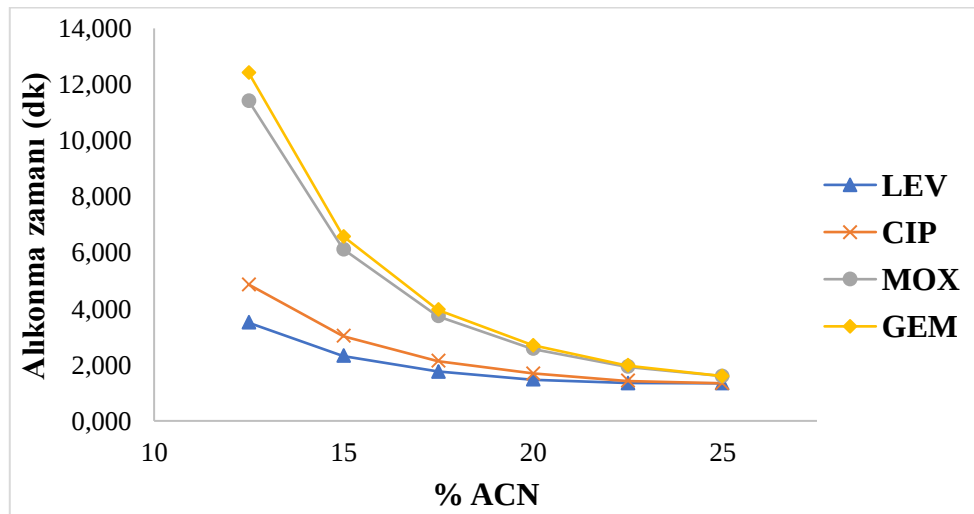
ACN yüzdesinin alıkonma zamanları üzerine etkisi Şekil 46'da sunulmuştur. ACN oranı %15'e ayarlandığında optimum ayırım sağlanmış olup, MOX-GEM pik çifti 2.32 R ile ayrılmıştır. Optimum izokratik şartlar altında ayırım yaklaşık 16 dk'da tamamlanmıştır.



Şekil 46. Chromolith High Resolution RP 18e kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi

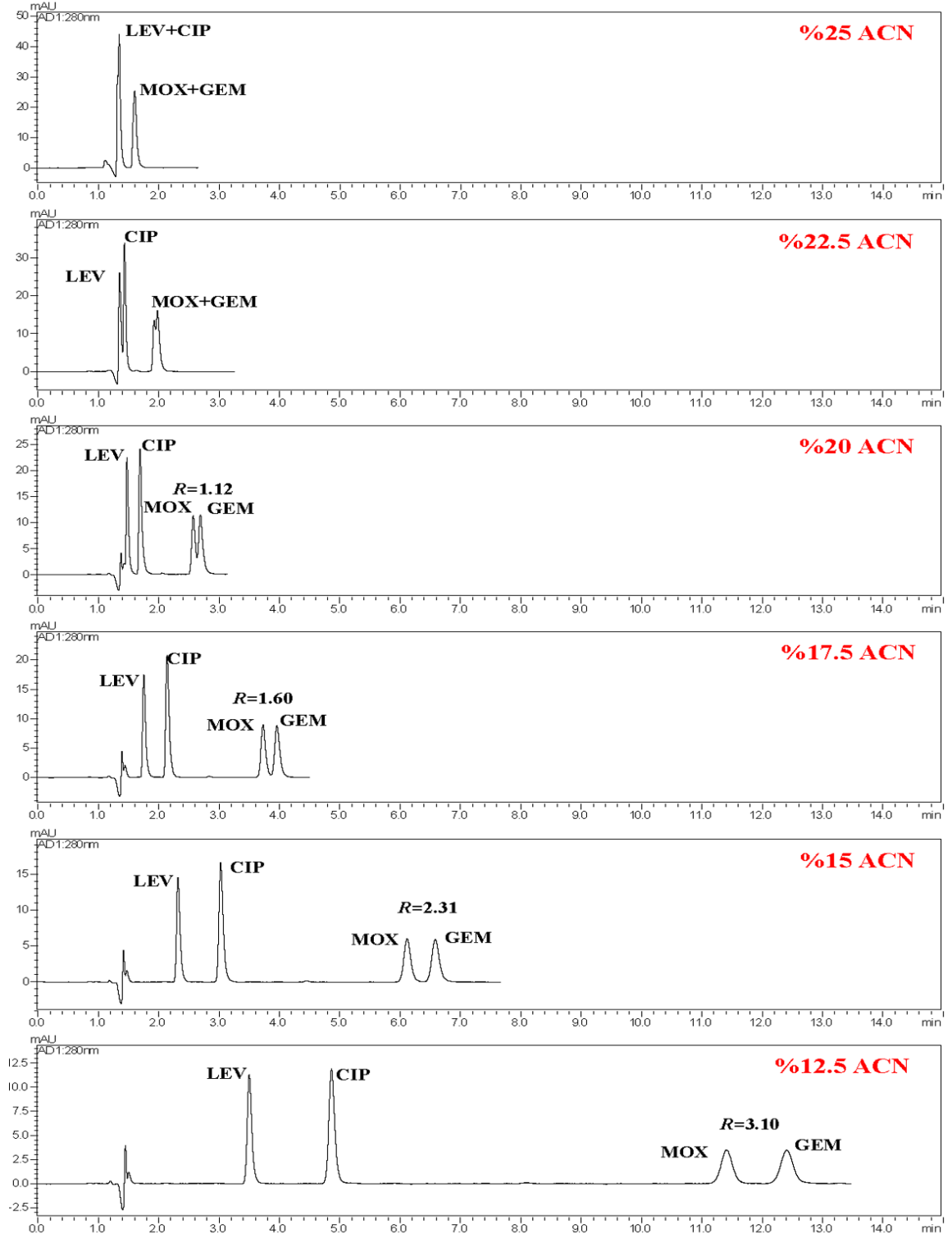
4.3.2.5. Poroshell 120 PFP Kolon

Diğer kolonlara kıyasla, Poroshell 120 PFP kullanıldığında florokinolonların alıkonmalarının daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple, ACN yüzdesinin etkisi 12.5-25 aralığında araştırılmıştır. ACN yüzdesinin alıkonma zamanları üzerine etkisi Şekil 47'de verilmiştir.



Şekil 47. Poroshell 120 PFP kolonda ACN yüzdesinin alıkonma zamanı üzerine etkisi

Elde edilen kromatogramlar Şekil 48’de verilmiştir. Optimum ayırım %12.5 ACN kullanıldığında elde edilmiştir. MOX-GEM pik çifti arasındaki R 3.10 olarak hesaplanmıştır. Optimum şartlar altında ayırım yaklaşık 13 dk içerisinde tamamlanmıştır.



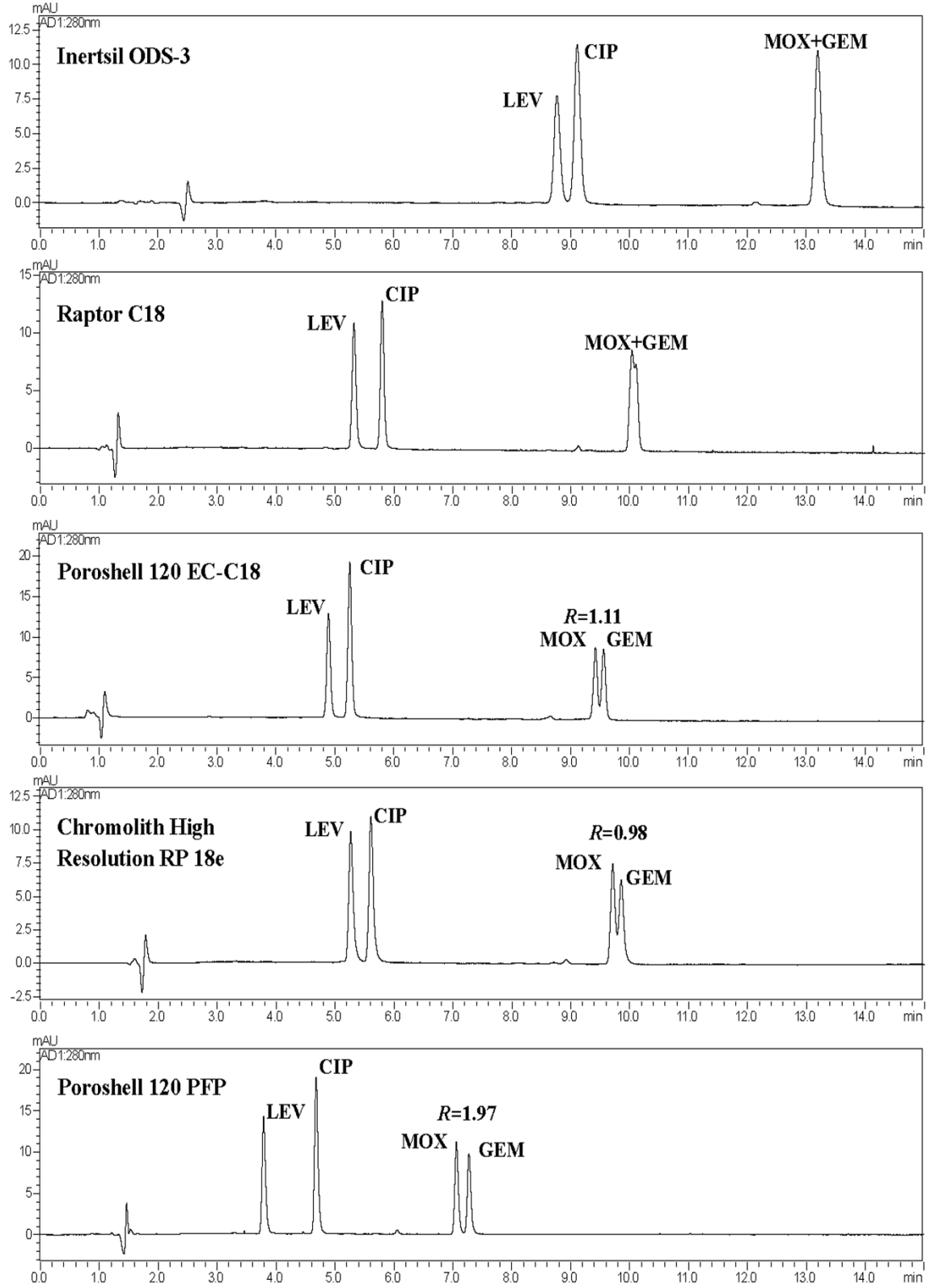
Şekil 48. Poroshell 120 PFP kolonda %12.5-25 ACN ile elde edilen kromatogramlar

Kritik bant çifti olan MOX-GEM için elde edilen *R* değeri, pik şekilleri ve analiz süresi parametreleri göz önünde bulundurulduğunda en uygun kolonun Poroshell 120 PFP olduğuna karar verilmiştir.

4.3.3. Gradient Şartlarının Belirlenmesi

Florokinolonların ayırımının izokratik şartlar altında başarılmasına rağmen, kolonu LEV ve CIP'in erken terk etmesi ve analiz süresinin nispeten uzun olması sebebiyle, gradient analizin yapılmasına karar verilmiştir.

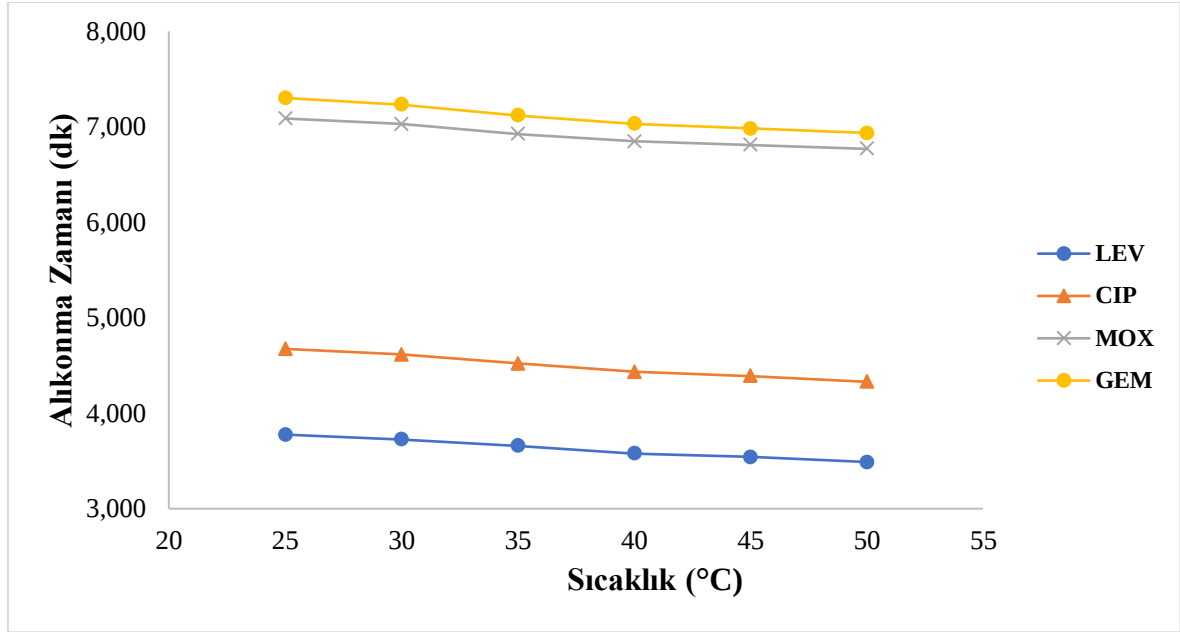
Bu amaçla, çalışmada kullanılan bütün kolonların etkinlikleri gradient şartlar altında incelenmiştir. Kuvvetli organik çözücü olarak ACN ve sulu faz olarak pH 2, 20 mM fosfat tamponu kullanılarak farklı gradient eğimlerde yürütmeler gerçekleştirilmiştir. 0 dk, %11.5 ACN; 15 dk %30 ACN gradienti uygulandığında optimum ayırımın sağlandığı gözlemlenmiştir. Bu gradient kullanılarak bütün kolonlar ile elde edilen kromatogramlar Şekil 49'da verilmiştir. Analiz süresi ve MOX-GEM pik çifti için elde edilen *R* değeri göz önünde bulundurulduğunda Poroshell 120 PFP kolon ile yöntem geliştirme çalışmalarına devam edilmesine karar verilmiştir. Son olarak, Poroshell 120 PFP kolonda GEM'in kolonu terk ettiği zaman göz önünde bulundurularak, ACN yüzdesindeki zamana bağlı artış korunup, 0 dk, %11.5 ACN; 8 dk, %21 ACN olacak şekilde gradient program yapılandırılmıştır.



Şekil 49. Florokinolonların 5 farklı kolon kullanılarak gradient şartlar altında elde edilen kromatogramları. 20 mM, pH 2 fosfat tamponu ve ACN gradienti ile elde edilmiştir. Gradient şekli: 0 dk, %11.5 ACN; 15 dk, %30 ACN. Akış hızı 1 mL/dk, sıcaklık 25 °C.

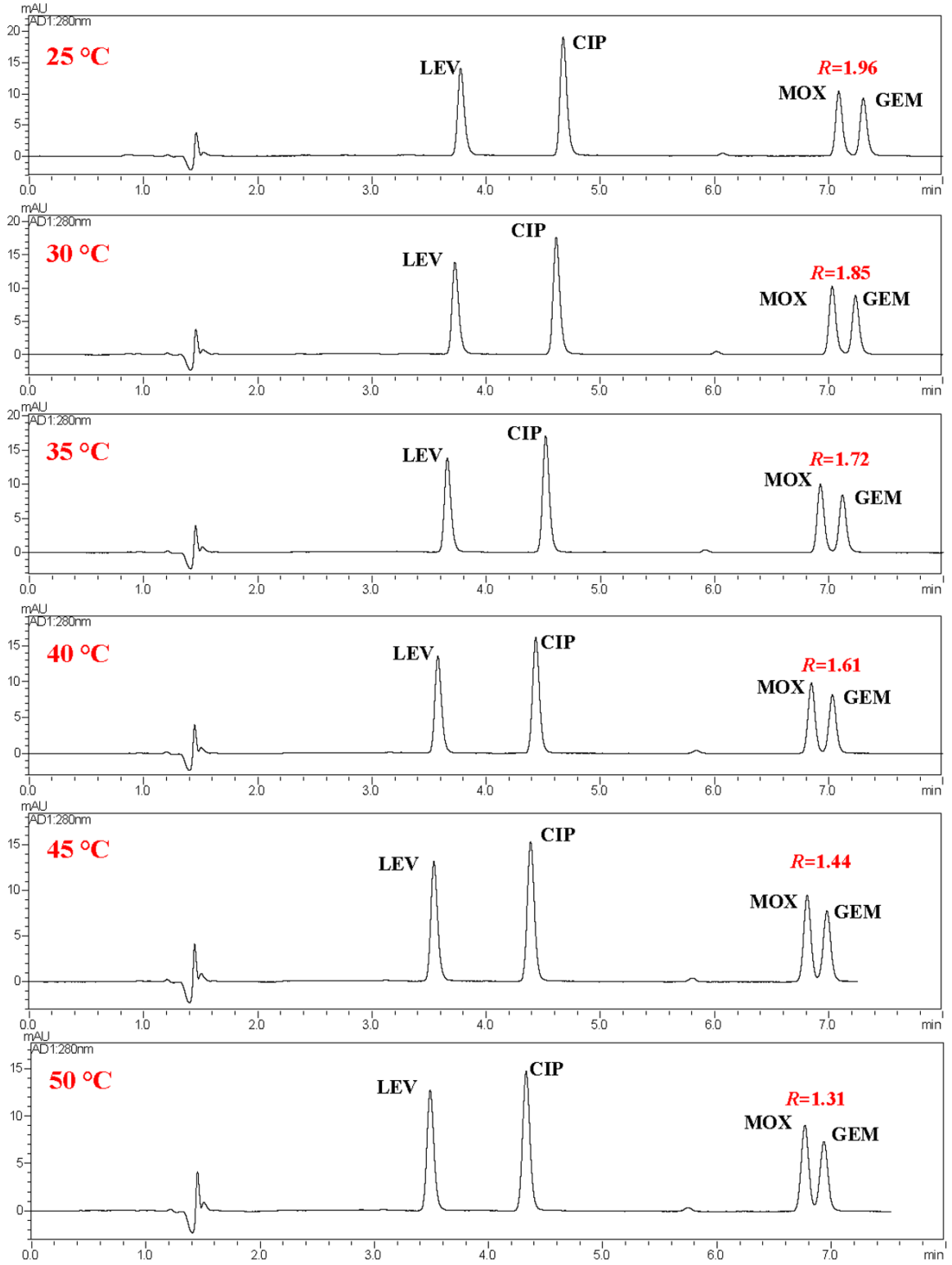
4.3.4. Sıcaklığın Ayırım Üzerine Etkisinin Araştırılması

Sıcaklığın Poroshell 120 PFP kolonda ayırım üzerine etkisi 25-50 °C aralığında incelenmiştir. Beklendiği şekilde sıcaklığın artırılması ile analitlerin alıkonmasında azalma gözlemlenmiştir (Şekil 50). Sıcaklık 25 °C'den 50 °C'ye artırıldığında LEV, CIP, MOX ve GEM'in alıkonma zamanları sırası ile %7.6, %7.38, %4.48 ve %5.01 azalmıştır.



Şekil 50. Sıcaklığın 25-50 °C aralığında florokinolonların alıkonma zamanları üzerine etkisi

Elde edilen kromatogramlar Şekil 51'de sunulmuştur. Sıcaklık 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 °C'ye ayarlandığında, kritik bant çifti için sırası ile 1.96, 1.85, 1.72, 1.61, 1.44 ve 1.31 *R* değerleri elde edilmiş olup, sıcaklığın artırılması ile *R* değerleri azalmıştır.



Şekil 51. Poroshell 120 PFP kolon kullanılarak 25-50 °C aralığında elde edilen kromatogramlar. Gradient şekli: 0 dk, %11.5 ACN; 8 dk, %21 ACN. Akış hızı 1 mL/dk.

4.3.5. Kolon Temizleme ve Kolon Şartlandırma Basamaklarının Gradient Programa Eklenmesi

Kromatografik şartların optimizasyonunda son olarak, sistemin ölü hacmi göz önünde bulundurularak, gradiente 0 dk, %11.5 ACN; 7 dk, %20 ACN şekli verilmiştir. Ayırmadan sonra 3 dk boyunca %80 ACN geçirilecek şekilde kolon temizleme basamağı ve 8 dk %11.5 ACN geçirilecek şekilde kolon şartlandırma basamağı gradient programa eklenmiştir. Deneyler sonucu optimum olduğu belirlenen ACN ve pH 2 fosfat tamponu (20 mM) gradienti Tablo 2’de verilmiştir. Poroshell 120 PFP kolon kullanılarak akış hızı ve kolon sıcaklığı sırasıyla 1 mL/dk ve 25 °C’ye ayarlandığında en iyi ayırımın sağlandığı gözlemlenmiştir.

4.3.6. Örnek Hazırlama İşleminin Optimizasyonu

Örnek hazırlama işlemi basit ve etkili tutulmak istemiş ve bu amaçla protein çöktürme işleminin kullanılmasına karar verilmiştir. Bilinen miktarda kinolon eklenmiş plazma örneklerine 1:2 (v/v) oranında ACN, MeOH ve %6’lık perklorik asit çözeltisi kullanılarak denemeler yapılmıştır. En yüksek geri kazanım ACN kullanıldığında elde edilmiştir.

4.4. Yöntem Validasyonu

4.4.1. Sistem Uygunluk Testi

2.5 µg/mL konsantrasyondaki standart kinolon çözeltisinin 6 defa enjeksiyonu ile sistem uygunluk testi yürütülmüştür. Enjeksiyon kesinliği, *k*, ayırma gücü ve kuyruklanma faktörü Tablo 4’te sunulmuştur.

Tablo 4. Analitler için bulunan sistem uygunluk parametreleri

Analit	Alıkonma Zamanı (dk)	Kapasite Faktörü (<i>k</i>)	Ayırma Gücü (<i>R</i>)	Kuyruklanma Faktörü (<i>T</i>)	Enjeksiyon Kesinliği (<i>t_R</i> , BSS)
LEV	3.879	2.51	-	1.28	0.85
CIP	4.793	3.34	7.29	1.25	0.71
MOX	7.234	5.55	19.43	1.23	0.48
GEM	7.458	5.75	1.77	1.20	0.52

4.4.2. Yöntem Geçerliliğinin İdrar Analizinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları

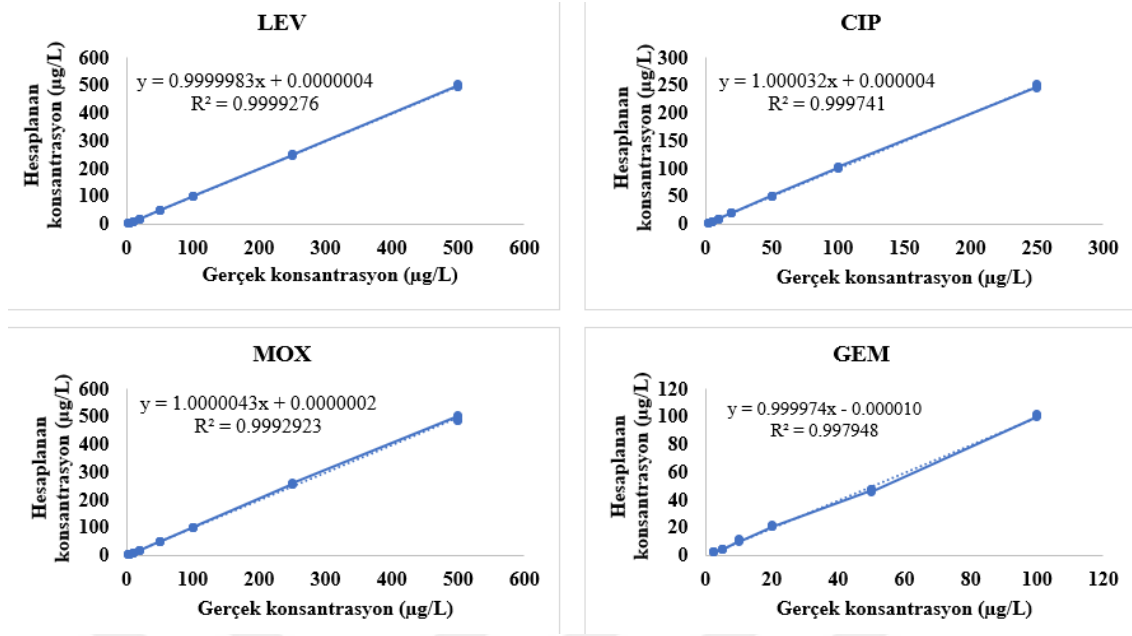
4.4.2.1. Doğrusallık

Doğrusallık idrarda LEV için 2.5-500 µg/L, CIP için 2.5-250 µg/L, MOX için 2.5-500 µg/L ve GEM için 2.5-100 µg/L aralığında oluşturulmuştur. Elde edilen pik alanlarının, gerçek florokinolon konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Yöntemin idrarda doğrusallığı ile ilgili veriler Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Yöntemin idrarda doğrusallığı ile ilgili kalibrasyon sonuçları

Validasyon Parametresi	LEV	CIP	MOX	GEM
Doğrusal Aralık (µg/L)	2.5-500	2.5-250	2.5-500	2.5-100
Eğim	8 129.4	10 707.0	4 017.7	1 783.0
Kesişim	-7 843.1	-1 826.8	-2 287.1	1 147.3
<i>r</i>	0.9999	0.9998	0.9996	0.9989
Eğimin Standart Hatası	12.6	33.8	19.5	17.2
Kesişimin Standart Hatası	2 547.3	3 511.2	2 065.7	803.4

Buna ilaveten, kalibrasyon eğrisinin oluşturulduğu standart çözeltilerin pik alanları kalibrasyon eğrisinde yerine konularak hesaplanan konsantrasyonlar, gerçek konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek yöntem doğrusallığı incelenmiştir (Şekil 52).



Şekil 52. Florokinolonların idrarda analizinde doğrusallık kontrol grafikleri

4.4.2.2. Duyarlılık

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan en düşük konsantrasyon seviyesi LOQ olarak belirlenmiştir. LOD değerleri ise Eşitlik 8 yardımı ile istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Florokinolonların idrarda tayininde LOD ve LOQ değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

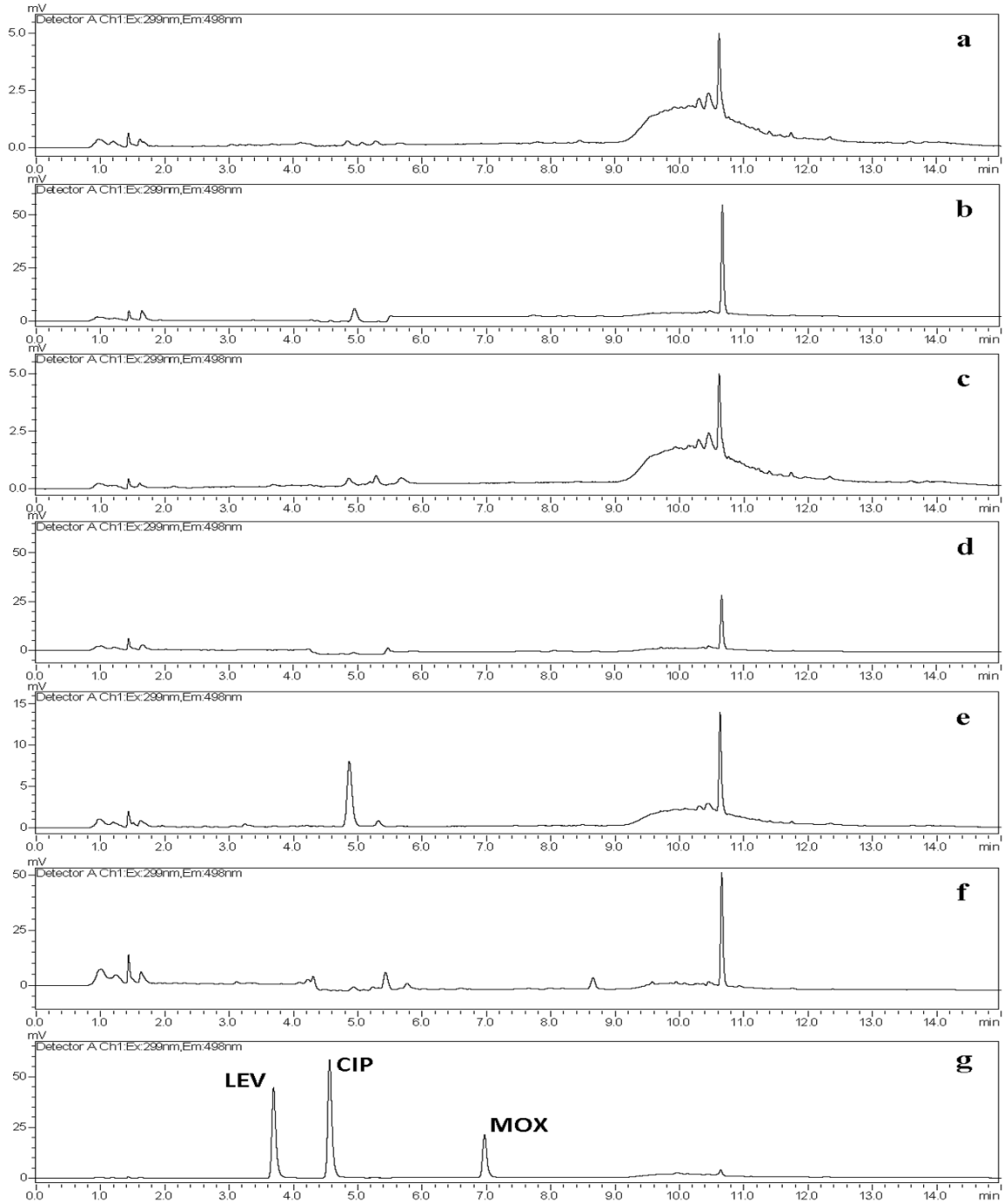
Tablo 6. Analitler için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri

Analit	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
LEV	1.03	2.50
CIP	1.08	2.50
MOX	1.69	2.50
GEM	1.49	2.50

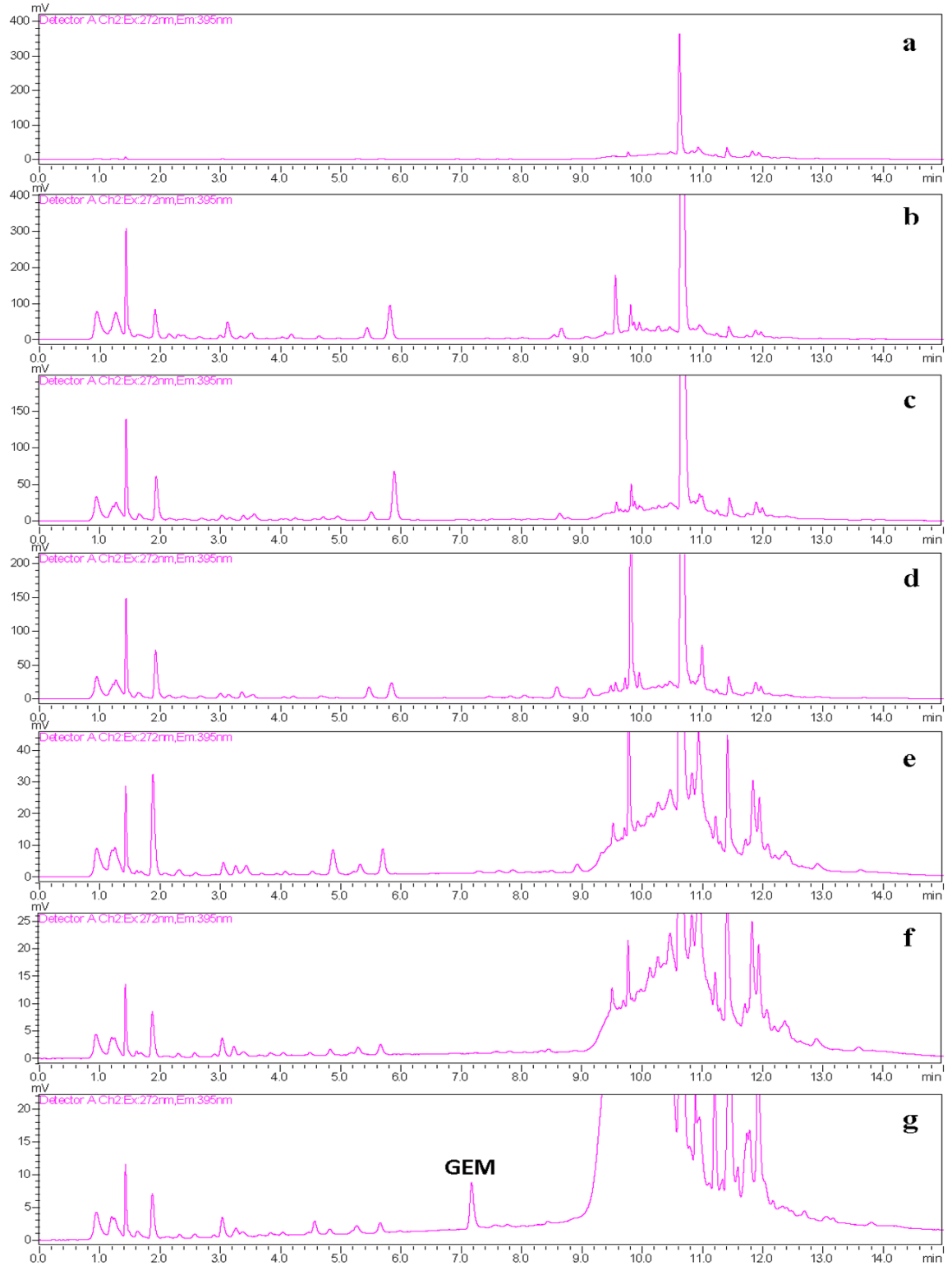
4.4.2.3. Seçicilik

Yöntem seçiciliği, ilaç kullanmayan 6 farklı sağlıklı gönüllüden alınan idrar örnekleri analiz edilerek değerlendirilmiştir. FD 2 farklı kanalda eş zamanlı olarak çalıştırıldığı için, her iki kanalda da analitlerin alıkonma zamanında kolonu terk eden bozucu bileşenlerin olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuç olarak, analitler ile aynı alıkonma zamanına sahip bozucu bileşikler bulunmamıştır (Şekil 53 ve 54).

LEV, CIP, MOX ve GEM için idrarda DAD ile ölçülen pik saflık indeksleri sırası ile 0.999981, 0.999975, 0.999946 ve 0.999989'dur.



Şekil 53. Yöntem seçiciliğinin idrarda kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar. (a-f) Sağlıklı ve ilaç kullanmayan gönüllüler. (g) İçerisine florokinolon eklenmiş düşük kalite kontrol örneği. Kromatografik koşullar: 20 mM, pH 2 fosfat tamponu:ACN (88.5:11.5, v/v), akış hızı 1 mL/dk, sıcaklık 25 °C. Gradient elüsyon Tablo 2'ye göre uygulanmıştır. FD, Tablo 3'te verilen kanal 1'e göre çalıştırılmıştır.



Şekil 54. Yöntem seçiciliğinin idrarda kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar. **(a-f)** Sağlıklı ve ilaç kullanmayan gönüllüler. **(g)** İçerisine florokinolon eklenmiş düşük kalite kontrol örneği. Kromatografik koşullar: 20 mM, pH 2 fosfat tamponu:ACN (88.5:11.5, v/v), akış hızı 1 mL/dk, sıcaklık 25 °C. Gradient elüsyon Tablo 2'ye göre uygulanmıştır. FD, 272 nm uyarma ve 395 nm emisyon dalga boylarında çalıştırılmıştır.

4.4.2.4. Doğruluk ve Kesinlik

Bütün analitler için dört farklı konsantrasyonda, aynı gün içerisinde dörder ve farklı günlerde toplam 10'ar analiz yürütülerek yöntemin idrarda doğruluğu ve kesinliği incelenmiştir. Analiz sonuçları kalibrasyon eğrileri yardımı ile hesaplanmıştır. BSS ve % doğruluk değerleri Tablo 7'de verilmiştir.



Tablo 7. Florokinolonların idrarda tayini için yürütülen doğruluk ve kesinlik çalışmaları sonuçları

Analit	Konsantrasyon Seviyesi (µg/L)	Gün İçi Deneyler (n=4)				Günler Arası Deneyler (n=10)			
		Hesaplanan Konsantrasyon ± Standart Sapma	% Doğruluk	BSS (%)	Hesaplanan Konsantrasyon ± Standart Sapma	% Doğruluk	BSS (%)	BSS (%)	
LEV	2.5	2.74 ± 0.08	109.87	3.09	2.69 ± 0.07	107.65	2.73		
	25	25.68 ± 0.34	102.73	1.34	25.29 ± 0.47	101.17	1.84		
	200	198.97 ± 1.43	99.48	0.72	199.16 ± 1.79	99.58	0.90		
	400	405.17 ± 3.55	101.29	0.88	398.21 ± 6.56	99.55	1.64		
CIP	2.5	2.31 ± 0.11	92.59	4.72	2.23 ± 0.10	89.55	4.68		
	25	25.99 ± 0.31	103.97	1.19	25.20 ± 0.81	100.81	3.21		
	125	127.55 ± 0.76	102.05	0.59	125.72 ± 2.71	100.58	2.16		
	200	207.91 ± 0.73	103.96	0.35	201.61 ± 5.74	100.80	2.85		
MOX	2.5	2.41 ± 0.08	96.40	3.42	2.35 ± 0.09	93.80	3.98		
	25	26.14 ± 0.29	104.57	1.10	25.33 ± 1.05	101.34	4.16		
	200	202.19 ± 2.08	101.09	1.03	200.01 ± 5.44	100.01	2.72		
	400	422.30 ± 2.96	105.57	0.70	413.43 ± 9.93	103.36	2.40		
GEM	2.5	2.54 ± 0.06	101.53	2.35	2.51 ± 0.11	100.35	4.52		
	15	16.01 ± 0.75	106.70	4.67	15.57 ± 1.25	103.85	8.05		
	40	43.06 ± 2.36	107.64	5.48	42.94 ± 1.68	107.35	3.91		
	80	87.06 ± 2.19	108.82	2.52	83.71 ± 3.18	104.63	3.79		

4.4.2.5. Geri Kazanım

Analitlerin idrardan geri kazanımı üç konsantrasyon seviyesinde hazırlanan kalite kontrol örnekleri ve aynı konsantrasyonlardaki sulu çözeltilerin pik alanları karşılaştırılarak incelenmiştir. Hesaplanan % geri kazanımlar Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Florokinolonların idrardan geri kazanım sonuçları

Analit	Konsantrasyon Seviyesi (µg/L)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
LEV	25	99.57	0.57
	200	97.99	2.11
	400	100.29	0.33
CIP	25	100.54	0.39
	125	98.70	3.41
	200	101.60	0.47
MOX	25	100.18	0.60
	200	96.97	3.45
	400	102.22	0.98
GEM	15	102.69	2.35
	40	96.59	3.26
	80	101.21	0.34

4.4.2.6. Kararlılık

Analitlerin idrardaki kararlılıkları kısa süreli (+4 °C’de 24 saat), uzun süreli (-80 °C’de 60 gün) ve donma-erime döngüsünde üç kalite kontrol seviyesinde değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları kalibrasyon eğrisi yardımı ile hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 9’da sunulmuştur.

Tablo 9. İdrarda yürütülen kararlılık çalışmaları sonuçları (n=3)

Analit	Kararlılık Çalışması	Konsantrasyon (µg/L)	Doğruluk (%)	BSS (%)
LEV	Kısa süreli kararlılık	25	99.59	1.50
		200	96.47	1.48
		400	94.08	0.44
	Donma-erime kararlılığı	25	99.72	0.81
		200	95.46	1.97
		400	95.77	1.11
	Uzun süreli kararlılık	25	101.48	0.62
		200	100.37	3.19
		400	96.32	1.11
CIP	Kısa süreli kararlılık	25	98.28	1.56
		125	95.26	2.35
		200	92.48	1.03
	Donma-erime kararlılığı	25	98.45	0.78
		125	90.80	3.07
		200	90.67	0.60
	Uzun süreli kararlılık	25	100.04	1.21
		125	99.63	5.24
		200	93.76	2.08
MOX	Kısa süreli kararlılık	25	98.96	1.45
		200	97.57	1.50
		400	97.03	1.17
	Donma-erime kararlılığı	25	94.58	1.16
		200	88.71	3.73
		400	93.24	2.93
	Uzun süreli kararlılık	25	96.99	2.04
		200	98.46	5.49
		400	94.53	4.43
GEM	Kısa süreli kararlılık	15	105.74	3.05
		40	111.07	1.37
		80	101.48	1.52
	Donma-erime kararlılığı	15	93.72	1.92
		40	96.80	7.43
		80	99.06	2.73
	Uzun süreli kararlılık	15	95.89	5.81
		40	104.38	4.51
		80	98.28	5.25

4.4.3. Yöntem Geçerliliğinin Plazma Analizinde Kanıtlanması İçin Yürütülen Validasyon Çalışmaları

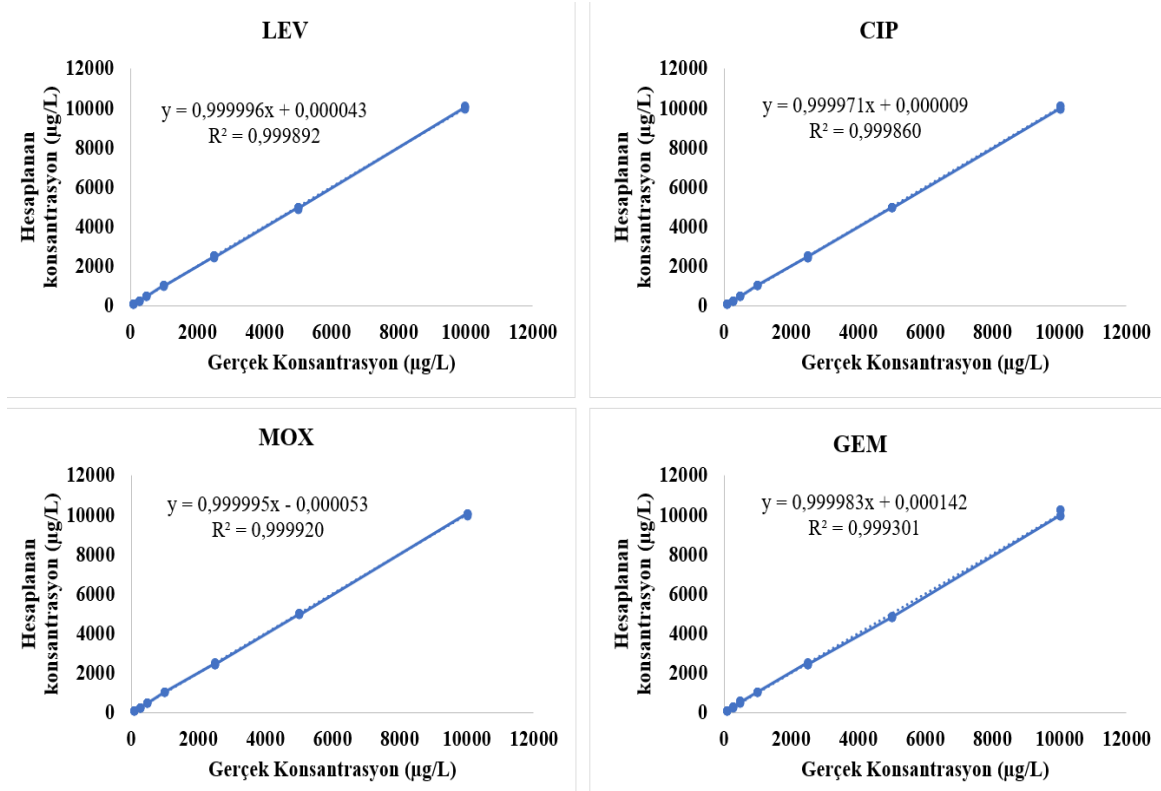
4.4.3.1. Doğrusallık

Doğrusallık plazmada bütün florokinolonlar için 100-10 000 µg/L aralığında oluşturulmuştur. Elde edilen pik alanlarının, gerçek florokinolon konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Yöntemin plazmada doğrusallığı ile ilgili sonuçlar Tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10. Yöntemin plazmada doğrusallığı ile ilgili kalibrasyon sonuçları

Validasyon Parametresi	LEV	CIP	MOX	GEM
Doğrusal Aralık (µg/L)	100-10 000	100-10 000	100-10 000	100-10 000
Eğim	918.6	1 088.3	448.9	260.1
Kesişim	4 506.5	8 391.9	1 910.6	-9 628.5
<i>r</i>	0.9999	0.9999	0.9999	0.9996
Eğimin Standart Hatası	1.9	2.5	0.8	1.3
Kesişimin Standart Hatası	8 150.6	11 002.1	3 424.9	5 870.2

Buna ilaveten, kalibrasyon eğrisinin oluşturulduğu standart çözeltilerin pik alanları kalibrasyon eğrisinde yerine konularak hesaplanan konsantrasyonlar, gerçek konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek yöntem doğrusallığı incelenmiştir (Şekil 55).



Şekil 55. Florokinolonların plazmada analizinde doğrusallık kontrol grafikleri

4.4.3.2. Duyarlılık

Analitlerin plazmada analizinde en düşük kalibrasyon eğrisi noktası LOQ olarak belirlenmiştir. LOD değerleri ise Eşitlik 8 yardımı ile istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Florokinolonların plazmada tayininde belirlenen LOD ve LOQ değerleri Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Analitlerin plazmada tayininde belirlenen LOD ve LOQ değerleri

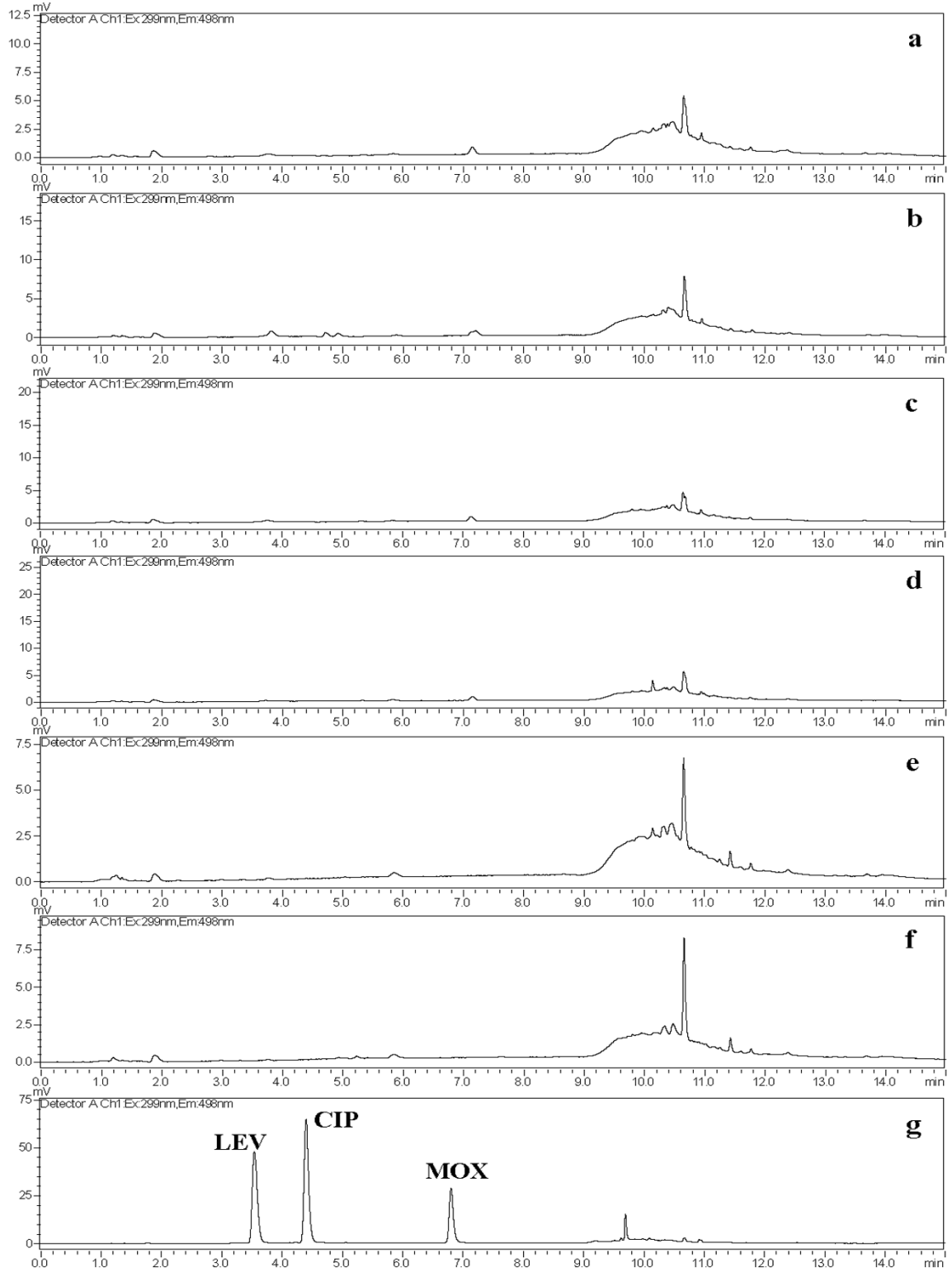
Analit	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
LEV	29.28	100
CIP	33.36	100
MOX	25.18	100
GEM	74.46	100

4.4.3.3. Seçicilik

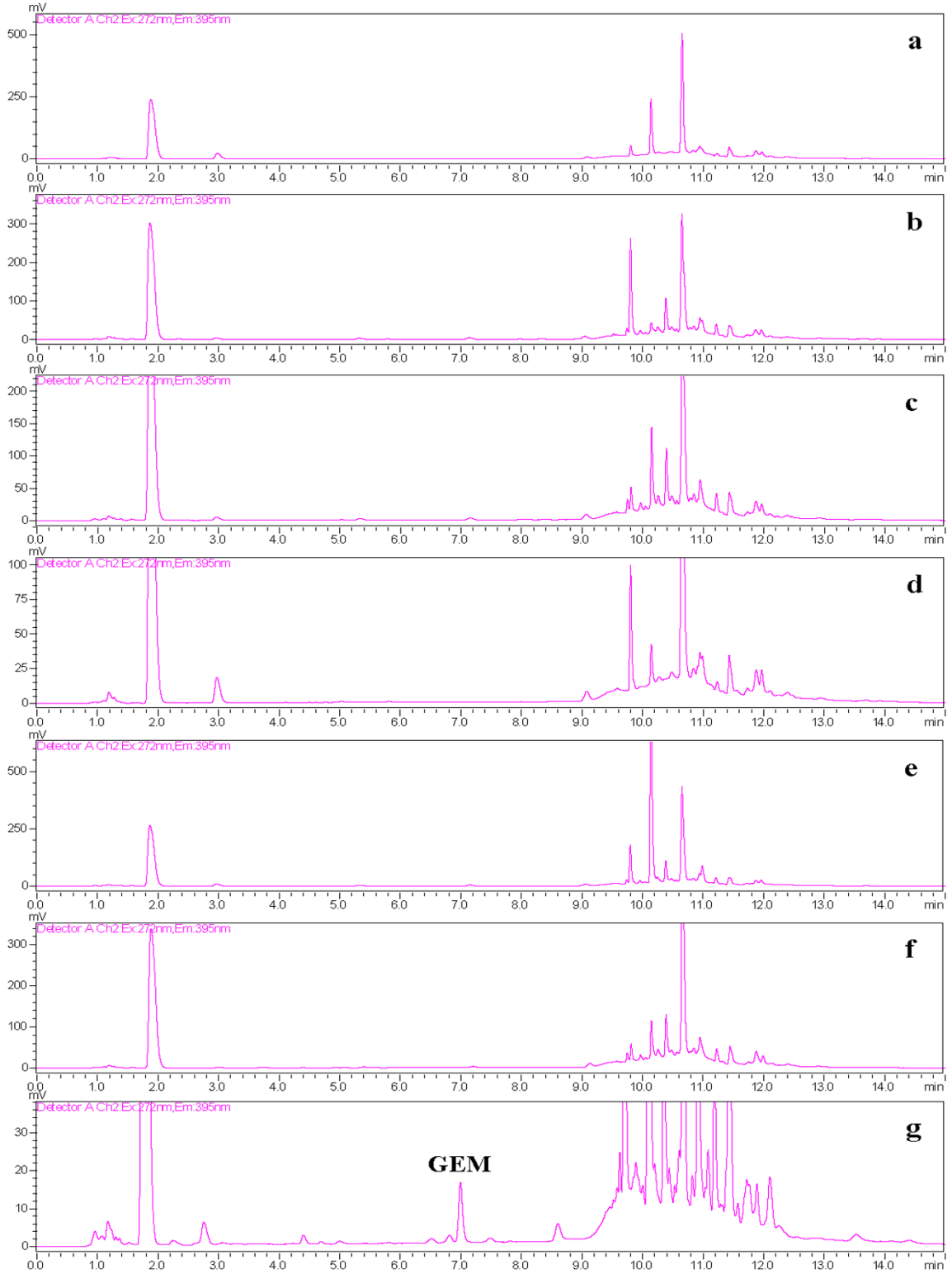
Yöntem seçiciliği, ilaç kullanmayan altı farklı sağlıklı gönüllüden alınan plazma örneklerinin kromatogramları incelenerek değerlendirilmiştir. İki farklı kanalda eş zamanlı olarak FD çalıştırıldığı için, her iki kanalda da analitlerin alıkonma zamanında girişim olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuç olarak, analitler ile aynı alıkonma zamanına sahip bozucu bileşikler bulunmamıştır (Şekil 56 ve 57).

LEV, CIP, MOX ve GEM için plazmada DAD ile ölçülen pik saflık indeksleri sırası ile 0.999997, 0.999999, 0.999980 ve 0.999968'dir.





Şekil 56. Yöntem seçiciliğinin plazmada kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar. **(a-f)** Sağlıklı ve ilaç kullanmayan gönüllüler. **(g)** Bütün analitleri 300 µg/L konsantrasyonda içeren düşük kalite kontrol örneği. Kromatografik koşullar: 20 mM, pH 2 fosfat tamponu:ACN (88.5:11.5, v/v), akış hızı 1 mL/dk, sıcaklık 25 °C. Gradient elüsyon Tablo 2'ye göre uygulanmıştır. FD, Tablo 3'te verilen kanal 1'e göre çalıştırılmıştır.



Şekil 57. Yöntem seçiciliğinin plazmada kanıtlanması kapsamında elde edilen kromatogramlar. **(a-f)** Sağlıklı ve ilaç kullanmayan gönüllüler. **(g)** Bütün analitleri 300 µg/L konsantrasyonda içeren düşük kalite kontrol örneği. Kromatografik koşullar: 20 mM, pH 2 fosfat tamponu:ACN (88.5:11.5, v/v), akış hızı 1 mL/dk, sıcaklık 25 °C. Gradient elüsyon Tablo 2'ye göre uygulanmıştır. FD, 272 nm uyarma ve 395 nm emisyon dalga boylarında çalıştırılmıştır.

4.4.3.4. Doğruluk ve Kesinlik

Plazmada yürütülen doğruluk ve kesinlik çalışmaları kapsamında LEV, CIP, MOX ve GEM için 4 farklı konsantrasyon seviyesinde (100, 300, 4 000 ve 8 000 µg/L) aynı gün içerisinde dörder ve üç farklı günde toplam 10’ar analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları kalibrasyon eğrileri yardımı ile hesaplanmıştır. BSS ve % doğruluk değerleri Tablo 12’de sunulmuştur.



Tablo 12. Florokinolonların plazmada tayini için yürütülen doğruluk ve kesinlik çalışmaları sonuçları

Gün İçi Deneyler (n=4)							Günler Arası Deneyler (n=10)		
Analit	Konsantrasyon Seviyesi (µg/L)	Hesaplanan		Hesaplanan					
		Konsantrasyon ± Standart Sapma	% Doğruluk	BSS (%)	Konsantrasyon ± Standart sapma	% Doğruluk	BSS (%)		
LEV	100	98.02 ± 1.45	98.02	1.48	99.14 ± 3.99	99.14	4.02		
	300	298.14 ± 3.99	99.38	1.33	296.42 ± 2.94	98.81	0.99		
	4 000	4 040.91 ± 89.02	101.02	2.20	4 004.65 ± 61.17	100.12	1.53		
	8 000	8 050.81 ± 77.23	100.63	0.96	8 021.82 ± 216.39	100.27	2.70		
CIP	100	92.44 ± 2.49	92.44	2.49	91.81 ± 5.65	91.81	6.15		
	300	294.32 ± 4.14	98.11	1.41	288.94 ± 5.44	96.31	1.88		
	4 000	4 120.91 ± 111.51	103.02	2.71	4 066.38 ± 80.84	101.66	1.99		
	8 000	8 092.39 ± 95.54	101.15	1.18	8 133.84 ± 299.26	101.67	3.68		
MOX	100	97.12 ± 3.72	97.12	3.83	98.67 ± 5.67	98.67	5.74		
	300	299.62 ± 3.23	99.87	1.08	297.61 ± 3.18	99.20	1.07		
	4 000	4 050.69 ± 106.84	101.27	2.64	4 014.12 ± 70.44	100.35	1.75		
	8 000	8 097.08 ± 73.24	101.21	0.90	8 055.19 ± 113.69	100.69	1.41		
GEM	100	110.82 ± 2.39	110.82	2.16	111.94 ± 3.02	111.94	2.70		
	300	305.30 ± 4.62	101.77	1.51	302.34 ± 4.86	100.78	1.61		
	4 000	3 906.80 ± 120.02	97.67	3.07	3 999.90 ± 108.79	99.99	2.72		
	8 000	7 812.48 ± 79.76	97.66	1.02	7 954.83 ± 204.64	99.43	2.57		

4.4.3.5. Geri Kazanım

Florokinolonların plazmadan geri kazanımı değerlendirilirken üç konsantrasyon seviyesinde (300, 4 000, 8 000 µg/L) Bölüm 3.8.1’de belirtilen şekilde hazırlanan kalite kontrol örneklerinin pik alanları ile aynı konsantrasyonlardaki sulu çözeltilerin pik alanları karşılaştırılmıştır. Hesaplanan % geri kazanımlar Tablo 13’te verilmiştir.

Tablo 13. Florokinolonların plazmadan geri kazanım sonuçları (n=3)

Analit	Konsantrasyon Seviyesi (µg/L)	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
LEV	300	91.88	0.21
	4 000	90.18	1.12
	8 000	93.75	0.72
CIP	300	79.46	0.79
	4 000	80.39	0.92
	8 000	81.39	0.84
MOX	300	87.10	0.36
	4 000	85.40	0.86
	8 000	89.21	0.94
GEM	300	82.19	2.99
	4 000	82.53	2.56
	8 000	81.34	2.53

4.4.3.6. Kararlılık

Analitlerin plazmadaki kararlılıkları kısa süreli (+4 °C’de 24 saat), uzun süreli (-80 °C’de 60 gün) ve donma-erime döngüsünde üç konsantrasyon seviyesinde (300, 4 000 ve 8 000 µg/L) değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları kalibrasyon eğrisi yardımı ile hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 14’te sunulmuştur.

Tablo 14. Plazmada yürütülen kararlılık çalışmaları sonuçları

Analit	Kararlılık Çalışması (n=3)	Konsantrasyon (µg/L)	Doğruluk (%)	BSS (%)
LEV	Kısa süreli kararlılık	300	98.52	0.24
		4 000	97.58	2.05
		8 000	99.71	1.91
	Donma-erime kararlılığı	300	100.69	3.12
		4 000	97.02	0.15
		8 000	95.80	1.10
	Uzun süreli kararlılık	300	96.42	0.50
		4 000	97.31	1.59
		8 000	98.22	1.90
CIP	Kısa süreli kararlılık	300	94.86	1.12
		4 000	98.04	3.24
		8 000	101.29	2.53
	Donma-erime kararlılığı	300	97.08	3.77
		4 000	101.09	0.27
		8 000	95.82	5.21
	Uzun süreli kararlılık	300	90.48	0.71
		4 000	96.64	2.65
		8 000	98.14	2.46
MOX	Kısa süreli kararlılık	300	106.15	1.65
		4 000	99.15	2.02
		8 000	101.03	2.05
	Donma-erime kararlılığı	300	105.99	0.62
		4 000	97.38	0.24
		8 000	97.06	2.05
	Uzun süreli kararlılık	300	104.25	0.98
		4 000	97.76	1.14
		8 000	98.94	2.00
GEM	Kısa süreli kararlılık	300	107.37	1.96
		4 000	100.46	14.29
		8 000	97.54	3.25
	Donma-erime kararlılığı	300	107.66	10.65
		4 000	89.93	0.52
		8 000	100.18	1.23
	Uzun süreli kararlılık	300	102.29	0.40
		4 000	85.79	1.57
		8 000	88.45	3.94

4.4.4. Yöntemin Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen yöntem oral olarak LEV, CIP veya MOX kullanan toplam 5 hastadan alınan idrar ve plazma örneklerine uygulanmıştır. Hastaların tedavi rejimleri ve tedavileri kapsamında florokinolonlara ek olarak kullandıkları ilaçlar Tablo 15’te sunulmuştur.

Tablo 15. Oral olarak CIP, LEV ve MOX kullanan hastaların tedavi rejimleri ve birlikte kullandıkları ilaçlar

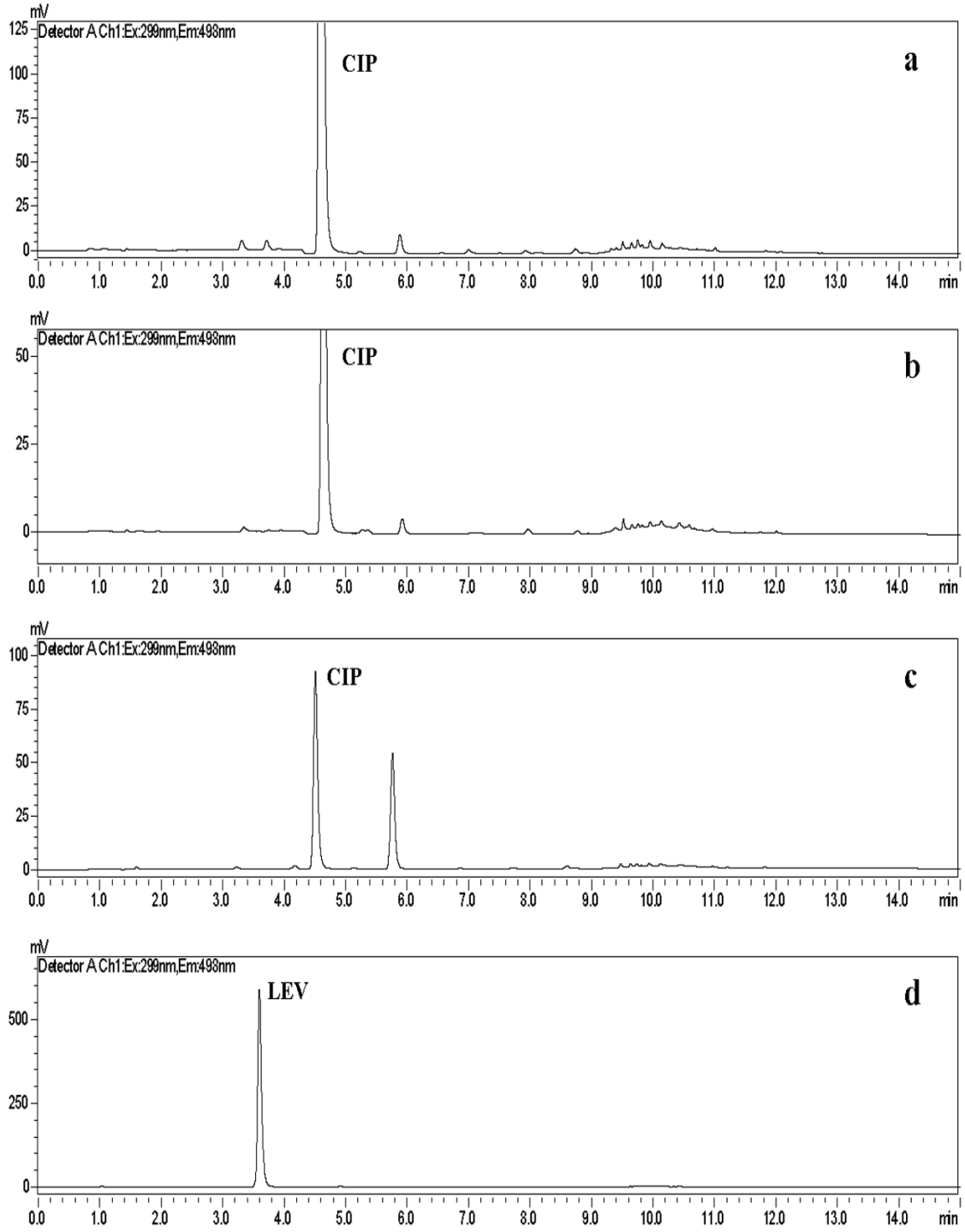
Hasta	Analit	Tedavi Rejimi	Birlikte Kullanılan İlaçlar
1	CIP	500 mg (2x1)	Metamizol sodyum, sodyum fusidat, pantoprazol, parasetamol, ondansetron HCl, teikoplanin, tramadol HCl
2	CIP	500 mg (2x1)	Nifedipin, doksazosin, enoksaparin sodyum, klindamisin, furosemit, pantoprazol, parasetamol, allopurinol
3	CIP	500 mg (2x1)	Enoksaparin sodyum, tramadol HCl, klindamisin, pantoprazol, pentoksifilin, varfarin sodyum
4	LEV	500 mg (1x1)	Pregabalin, diklofenak sodyum, parasetamol
5	MOX	400 mg (1x1)	Rivaroksaban, hidroklorotiyazit, spironolakton, parasetamol, granisetron HCl

4.4.4.1. İdrar Örneklerinin Analizi

CIP ve LEV kullanan hastaların idrar örnekleri, oral olarak ilk ilaç uygulamasından sonra sırasıyla 2., 4., 6., 8., 10. ve 12. saatlerde toplanmıştır. Pik alanlarına bağlı olarak, örnekler 1:1 000 ile 1:4 000 oranları arasında seyreltildikten sonra üçer defa analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 16’da verilmiştir. Analizlere ait örnek kromatogramlar Şekil 58’de sunulmuştur.

Tablo 16. Oral olarak CIP ve LEV kullanan hastaların ilk ilaç uygulamasından sonra 2., 4., 6., 8., 10. ve 12. saatlerde toplanan idrar örneklerinin analiz sonuçları

	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4
	CIP (µg/mL)	CIP (µg/mL)	CIP (µg/mL)	LEV (µg/mL)
2. saat	116.58 ± 9.24	283.62 ± 9.66	60.52 ± 1.28	258.05 ± 9.59
4. saat	471.71 ± 10.57	311.75 ± 10.62	184.81 ± 5.02	403.76 ± 3.89
6. saat	533.99 ± 23.88	107.04 ± 4.40	123.49 ± 2.20	645.40 ± 6.05
8. saat	384.26 ± 15.54	115.55 ± 5.54	119.31 ± 2.25	604. 81 ± 24.49
10. saat	179.38 ± 9.26	94.93 ± 1.43	104.20 ± 3.05	127.08 ± 4.50
12. saat	44.68 ± 0.58	27.04 ± 2.66	79.30 ± 3.06	129.52 ± 3.26



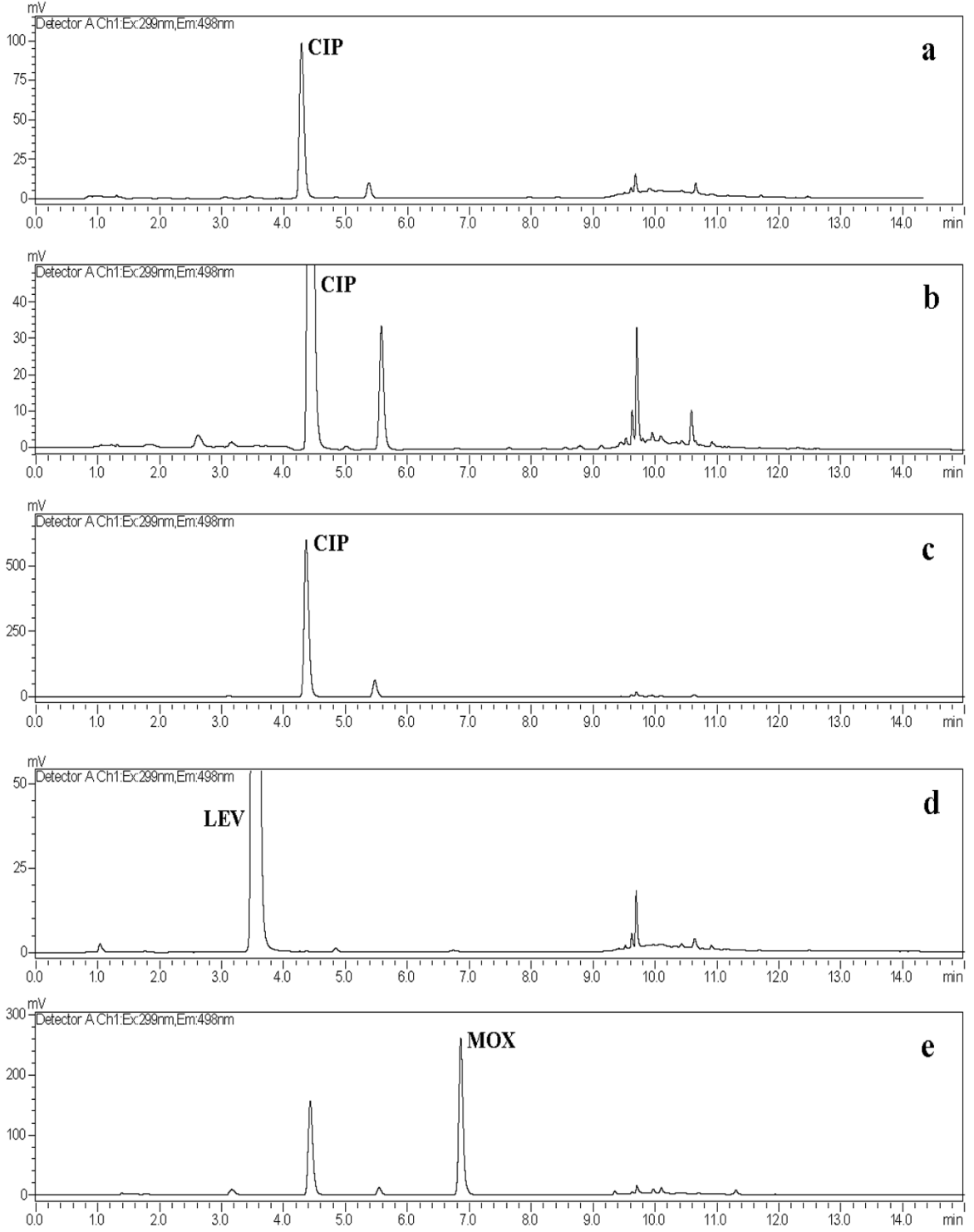
Şekil 58. Oral olarak CIP kullanan Hasta 1-3'ün ve LEV kullanan Hasta 4'ün, ilk ilaç uygulamasından sonra farklı zamanlarda toplanan idrar örneklerinin analizi ile elde edilen örnek kromatogramlar. **(a)** Hasta 1, ilaç uygulamasından sekiz saat sonra, **(b)** Hasta 2, ilaç uygulamasından 10 saat sonra, **(c)** Hasta 3, ilaç uygulamasından 12 saat sonra, **(d)** Hasta 4, ilaç uygulamasından altı saat sonra. Kromatografik koşullar: 20 mM, pH 2 fosfat tamponu:ACN (88.5:11.5, v/v), akış hızı 1 mL/dk, sıcaklık 25 °C. Gradient elüsyon Tablo 2'ye göre uygulanmıştır. FD, Tablo 3'te verilen kanal 1'e göre çalıştırılmıştır.

4.4.4.2. Plazma Örneklerinin Analizi

CIP, LEV ve MOX kullanan hastaların plazma örnekleri, oral olarak ikinci ilaç uygulamasından hemen önce ve uygulamadan iki saat sonra toplanmıştır. Bütün örnekler üçer defa analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 17’de verilmiştir. Analizlere ait örnek kromatogramlar Şekil 59’da verilmiştir.

Tablo 17. Oral olarak florokinolon kullanan hastaların farklı zamanlarda toplanan plazma örneklerinde saptanan CIP, LEV ve MOX konsantrasyonları

Florokinolon		2. Uygulama Öncesi (µg/mL)	2. Uygulamadan 2 Saat Sonra (µg/mL)
Hasta 1	CIP	0.45 ± 0.01	1.94 ± 0.17
Hasta 2	CIP	0.83 ± 0.02	1.63 ± 0.02
Hasta 3	CIP	1.26 ± 0.10	2.85 ± 0.05
Hasta 4	LEV	0.19 ± 0.01	4.56 ± 0.05
Hasta 5	MOX	2.76 ± 0.07	6.08 ± 0.02



Şekil 59. Florokinolon kullanan hastaların farklı zamanlarda toplanan plazma örneklerinin analizi ile elde edilen örnek kromatogramlar. **(a)** Hasta 1, ikinci ilaç uygulamasından hemen önce. **(b)** Hasta 2, ikinci ilaç uygulamasından iki saat sonra. **(c)** Hasta 3, ikinci ilaç uygulamasından iki saat sonra. **(d)** Hasta 4, ikinci ilaç uygulamasından iki saat sonra. **(e)** Hasta 5, ikinci ilaç uygulamasında hemen önce. Kromatografik koşullar: 20 mM, pH 2 fosfat tamponu:ACN (88.5:11.5, v/v), akış hızı 1 mL/dk, sıcaklık 25 °C. Gradient elüsyon Tablo 2'ye göre uygulanmıştır. FD, Tablo 3'te verilen kanal 1'e göre çalıştırılmıştır.

5. TARTIŞMA

LEV, CIP, MOX ve GEM'in ayırımında optimum şartların belirlenmesinde, FD dalga boyu, pH, organik çözücü yüzdesi, gradient şekli ve sıcaklık parametrelerinin ayırım üzerine etkisi araştırılmıştır.

Literatür verileri ışığında bir dizi deney yürütülerek her bir florokinolonun optimum floresans gösterdiği uyarma ve emisyon dalga boyları seçilmiştir. Yöntem duyarlılığını artırmak adına, her bir florokinolon için optimum dalga boylarında saptanma yapılması için FD'nin dalga boyu değiştirme ve çift kanal özellikleri kullanılmıştır (Tablo 3). İlaveten yöntem geliştirme basamaklarında pik takibinin yapılabilmesi için DAD dedektör bütün florokinolonların iyi absorbans gösterdiği 280 nm'de çalıştırılmıştır.

Hareketli faz pH'ındaki değişikliğin, asidik ya da bazik bileşikler içeren bir örneğin ayırımında ve bağlı alıkonmanın (seçicilik) kontrolünde çok güçlü bir parametre olduğu bilinmektedir. Bu tez kapsamında analiz edilen florokinolonların karboksilli asit fonksiyonel grubu ile ilgili pKa değerleri 6.05-6.40 ve bazik pKa değerleri 8.22-9.00 aralığındadır (41, 138-140).

Florokinolonların pKa değerleri, pKa değeri 4.2 olan benzoik asit gibi aromatik karboksilli asitler için genellikle gözlemlenenden yüksektir. Asitlikteki bu düşüş, protonlanmış türlerin kararlı hale gelmesi ile sonuçlanan, komşu keto fonksiyonel grubu ile molekül içi hidrojen bağı oluşumu ile açıklanabilir (41).

Silika yüzeyine bağlanmış hareketli fazlar pH 2'nin altında hidroliz olmakta ve pH 8'in üzerine çıktığında silika çözünmektedir (141, 142). Çalışmada kullanılan bütün kolonlar silika temelli olduğundan dolayı, pH'ın ayırım üzerine etkisi 2-7 aralığında incelenmiştir. Bu aralıkta, florokinolonların bazik uçlarının çalışma boyunca büyük oranda iyonize olduğu söylenebilir. Hem asidik hem de bazik uçlar pH 6 ve 7'de iyonize haldedir ve florokinolonlar zwitteriyonik halleri ile nötral halleri arasında bir denge durumundadır. Florokinolonlar pH 4'ün altında ise tek yüklü katyonlar halindedir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde kritik bant çifti için en büyük R değerlerine Inertsil ODS-3 kolon hariç pH 7'de ulaşıldığı görülmektedir. Ancak bu pH değeri pKa₁ değerine çok yakındır ve moleküller pH 7'de yüksek oranda zwitteriyonik haldedirler. Bu durumun olumsuz sonuçları saptanmıştır. İlk olarak, pKa değerine yakın noktada bir pH seçilmesi, hareketli faz pH'ındaki küçük bir değişikliğin analitlerin alıkonma süresini önemli oranda değiştirmesine sebep olmakta ve bu durum yöntem sağlamlığını olumsuz etkilemektedir.

Buna ilaveten, pH 4'ün üzerinde yüksek oranda iyonize hale gelen kolon yüzeyindeki silanol gruplarının, iyonize haldeki analitler ile etkileşmesi sonucu pik morfolojilerinde bozulma saptanmıştır ve kuyruklanma meydana gelmiştir. Bütün bu gözlemler değerlendirildiğinde, orta seviyede seçiciliğin sağlandığı ve simetrik piklerin elde edildiği hesaba katılarak yöntem optimizasyonunun ilerleyen basamaklarında pH 2'de çalışılmasına karar verilmiştir.

Sıvı kromatografik ayırmalarda en sık kullanılan organik çözücüler ACN ve MeOH'tur (143, 144). ACN orta derecede polariteye sahiptir ve zayıf hidrojen bağı akseptörüdür. MeOH ile kıyaslandığında, daha kuvvetli bir hareketli faz bileşenidir ve viskozitesi daha düşüktür. Bu sebeple hareketli faz bileşiminde ACN kullanıldığında gözlemlenen basınç MeOH'a göre daha düşüktür (145, 146). Bu tez kapsamında, nispeten küçük çaptaki partiküllerle (2.7 µm) doldurulmuş core-shell kolonlar kullanıldığından dolayı, daha düşük basınç gözlemlenmesini sağlayan ACN kullanılarak organik çözücü yüzdesinin ayırım üzerine etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen veriler incelendiğinde, analitleri en çok tutan kolonun Inertsil-C₁₈ olduğu belirlenmiştir (Şekil 39, 42, 43, 46, 47). Bu durumun sebebi, Inertsil-C₁₈ kolonun diğer kolonlar ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda (%15) karbon içermesi olabilir. Core-shell kolonlar gözeneksiz bir silika çekirdek ve bu çekirdeği saran gözenekli bir kabuktan oluştuklarından dolayı, sabit faz sadece kabuk kısmına yüklenebilmektedir. Bu durum da core-shell kolonların analitleri daha düşük kuvvetle tutmalarına sebep olmaktadır.

Kritik bant çifti için elde edilen maksimum *R* değerleri göz önünde bulundurulduğunda Poroshell 120 PFP kolon en iyi performansı göstermiştir. İlaveten, analiz süresinin Poroshell 120 PFP kolon kullanıldığında diğer kolonlara kıyasla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. PFP sabit fazlı kolonlar organik çözücü yüzdesine bağlı olarak normal faz ya da ters faz ayırma olarak tanımlanmaktadır. Düşük oranda organik çözücü kullanıldığında ters faz davranışı sergilerlerken, yüksek oranda organik çözücü kullanıldığında normal faz davranışı gözlemlenmektedir (147, 148). Florokinolonlar polar karakterde bileşikler olduklarından hareketli fazda yüksek oranda organik çözücü kullanılmamıştır. Organik çözücü yüzdesinin %12.5'ten %25'e çıkarılmasıyla, analitlerin alıkonmaları azalmıştır. Sonuç olarak ayırımın ters faz mekanizmasına dayandığı söylenebilir. Geleneksel C₁₈ kolonlarda ayırım büyük oranda hidrofobik etkileşimlerle yürürken, PFP kolonlarda hidrofobik etkileşimlere ilaveten dipol-dipol, π - π , yük transferi ve iyon değişimi ve florofilik etkileşimler ayırımı etkilemektedir (149–151). PFP kolonun

araştırılan diğer kolonlardan daha iyi ayırma olanak tanınması, farklı tipte etkileşimlerin ayırımı belirlemesinden kaynaklanmaktadır. Yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı, yöntem optimizasyon çalışmalarına Poroshell 120 PFP kolon ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Poroshell 120 PFP kolonda, %12.5 ve %15 ACN kullanıldığında MOX-GEM pik çifti için sırasıyla 3.10 ve 2.25 *R* değerleri elde edilmiştir. Kritik bant çifti için minimum *R* değerinin 2 olarak tavsiye edildiği göz önünde bulundurulduğunda, bu şartların uygun olduğu düşünülebilir. Diğer taraftan, kromatogramlar incelendiğinde bazı dezavantajlarla karşılaşılabilirdiği öngörülmüştür. Ayırimda %12.5 ACN kullanıldığında, LEV'in kolonda nispeten az tutulduğu söylenebilir ($k \approx 2$). Bu durum, biyolojik örnek içerisindeki polar karakterli matriks bileşenlerinin LEV cevabına girişim yapmasına ve yanlış sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir. İlaveten, hareketli faz bileşiminde %12.5-15 gibi düşük oranlarda organik çözücü kullanılması, matriks kaynaklı apolar karakterdeki bileşenlerin kolondan uzaklaştırılması için yeterli kuvvette değildir. Apolar karakterdeki bileşikler, ardışık analize ait kromatogramda pik verebilir ve dolayısıyla yanlış sonuçlar elde edilmesine sebep olabilirler. Kromatogramlardan da görülebileceği üzere, LEV-CIP ve MOX-GEM pik çiftleri birbirlerinden farklı polariteye sahiptirler ve kromatogramın farklı bölgelerinde gözlemlenmektedirler (Şekil 48). Gradient analiz kullanılarak pik çiftlerinin kolonu terk etme süreleri arasındaki farkın azaltılabileceği ve analiz süresinin kısaltılabileceği düşünülmüştür.

Yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı, izokratik yerine gradient analizin tercih edilmesine karar verilmiştir ve farklı gradient eğimlerde bir dizi yürütme yapılmıştır. Analize %12.5 yerine %11.5 ACN ile başlandığında LEV'in alıkonmasında artış gözlemlenmiştir. 0 dk, %11.5 ACN; 15 dk, %30 ACN kullanıldığında ayırımın optimum olduğu bulunmuştur. Belirtilen gradient şartlar altında elde edilen kromatogramlar değerlendirildiğinde, Poroshell 120 PFP kolonun analiz süresi ve ayırım gücü bakımından en iyi performansı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 49). Gradient analizde ACN yüzdesi zamana bağlı olarak artırıldığından MOX-GEM pik çiftinin alıkonması azalmış ve izokratik şartlar ile kıyaslandığında analiz süresinde yaklaşık 5 dk'lık bir azalma elde edilmiştir. Optimize şartlar altında, Poroshell 120 PFP kolonda MOX-GEM pik çifti 1.98 *R* ile 7.5 dk içerisinde ayrılmıştır.

HPLC analizlerinde yöntem seçiciliğini optimize etmek ve tekrar edilebilir kromatogramlar elde edebilmek için sıcaklık önemli bir araç olarak kullanılmaktadır (152–154). Kromatografik ayırımlarda sıcaklığın artırılmasının avantajlarından biri kolon etkinliğindeki artıştır. Bu durumun sebebi olarak, sıcaklık arttıkça hareketli faz viskozitesinin azalması ve analitin difüzyon hızındaki artış gösterilmektedir. Analitin difüzyon hızının artması van Deemter denklemindeki kütle transferi (C terimi) etkisini azaltmaktadır. Diğer taraftan kolondaki boyuna difüzyon (B terimi) etkisini arttırmaktadır (155, 156).

Çalışma kapsamında sıcaklığın etkisi 25-50 °C aralığında araştırılmıştır (Şekil 50, 51). Kolonu son terk eden analit olan GEM'in alıkonmasında yaklaşık %5'lik bir azalma gözlemlenmesine rağmen, kritik bant çiftinin *R* değeri artış göstermemiştir. İlaveten, sıcaklık arttırıldıkça, pik genişlikleri artmış ve buna bağlı olarak pik kapasitesi değeri azalmıştır. Bu durum kolon etkinliğinde bir azalma olduğunun göstergesidir.

Yöntem seçiciliğinin optimizasyonunda sıcaklık önemli bir parametre olarak kabul edilse de analitlerin büyük bölümü sıcaklık değişikliklerine karşı benzer alıkonma değişiklikleri sergilemektedir. Sıcaklığın analitin iyonizasyonunu değiştirdiği ya da örneğin birbirinden çok farklı fonksiyonel gruplara sahip analitler içerdiği durumlarda önemli değişiklikler gözlemlenmektedir (155, 157, 158). Sıcaklıktaki artışın ayırımı olumsuz şekilde etkilemesi, çalışma kapsamında ayırımı yapılan bileşiklerin aynı farmakolojik gruba dâhil oldukları için benzer kimyasal yapı ve fonksiyonel grupları içermelerinden kaynaklanabilir. Bu sebeplerden dolayı, optimum kolon sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir.

Poroshell 120 PFP kolonda 8. dk'dan sonra kolonu terk eden analit olmaması sebebi ile analiz süresinin kısaltılması için gradiente son şekli verilmiştir. Bu amaçla, ACN yüzdesindeki dk başına artış hesaplanmış (%1.233/dk) ve HPLC sisteminin ölü hacmi de göz önünde bulundurularak organik çözücü yüzdesindeki zamana bağlı artış korunacak şekilde 0 dk, %11.5 ACN; 7 dk, %20 ACN gradienti optimum olarak değerlendirilmiştir.

Çevresel ve biyolojik örneklerin ayırımı yapılırken, numunenin içerdiği kuvvetli tutulan bileşikler kolonu kirleterek kolon performansını düşürebilir ya da ardışık analizler yapıldığı zaman kromatogramlarda beklenmeyen bölgelerde pik vererek sonuçların yanlış değerlendirilmesine sebep olabilir. Bu tip olumsuzlukların önüne geçmek amacıyla, kromatografik şartların optimizasyonunda son olarak, gradient program içerisine kolon temizleme ve şartlandırma basamakları eklenmiştir. ACN oranı 7. dk'dan 9. dk'ya %20'den

%80'e çıkarılmış ve 3 dk boyunca örnek içerisindeki apolar bileşiklerin kolondan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından 12.-14. dk'lar arasında ACN oranı başlangıç şartı olan %11.5'e getirilmiş ve 14.-22. dk'lar arası kolon %11.5 ACN ile bir sonraki analiz için şartlandırılmıştır.

Plazma örneklerinin analize hazırlanmasında, basit, etkili ve ekonomik olması sebebi ile protein çöktürme işleminin kullanılmasına karar verilmiştir. ACN, MeOH ve %6'lık perklorik asit çözeltisi kullanılarak yapılan ön denemeler sonucu en iyi geri kazanımın ACN kullanıldığında elde edildiği gözlemlenmiştir. İlâveten, literatüre uyumlu olarak ACN kullanıldığı zaman tüpün dibine çöken protein miktarının MeOH ve perklorik asit çözeltisine kıyasla fazla olduğu gözlemlenmiştir (159). Örnek kaynaklı proteinlerin kromatografik analiz esnasında çökerek, kolonu tıkaması ihtimali de göz önünde bulundurularak hem maksimum geri kazanımın elde edildiği hem de en çok protein çöktürüldüğü için işlemde 1:2 (v/v) oranında örnek:ACN kullanılmasına karar verilmiştir.

Protein çöktürme işleminin ardından, üstte kalan sıvı sisteme direkt olarak enjekte edildiğinde, pik yarılmaları gözlemlenmiştir. Örnek:ACN oranı 1:2 (v/v) olarak belirlendiği için işlem sonrası elde edilen çözelti %66 oranında ACN içermektedir. Diğer taraftan, analiz başlangıcında hareketli faz bileşiminde %11.5 ACN bulunmaktadır. Enjeksiyon çözücüsünün, hareketli fazdan önemli ölçüde farklı olduğu durumlarda pik şekillerinde bozulmanın ve pik yarılmalarının gözlemlendiği literatürde yer almaktadır (160). Bu sorunun önüne geçmek için, protein çöktürme işlemi sonrasında üstte kalan çözeltinin 1:2 oranında deiyonize su ile seyreltilmesine karar verilmiştir.

Biyolojik örneklerin kromatografik analizinde FDA önemli bir otorite olduğundan, geliştirilen yöntem FDA kılavuzlarına uygun olarak valide edilmiştir (134, 136). Validasyon işlemine geçilmeden kromatografik parametrelerin analizin gerçekleştirilebilmesi için uygun olduğunun kanıtlanması için sistem uygunluk testi gerçekleştirilmiştir. Test kapsamında 2.5 µg/mL konsantrasyondaki standart kinolon çözeltisi 6 defa analiz edilerek k , R , T ve enjeksiyon kesinliği parametreleri sınır değerler ile karşılaştırılmıştır ($k \geq 2$, $R \geq 2$, $T \leq 2$ ve $BSS < 1$). MOX-GEM pik çifti arasındaki R hariç bütün değerler FDA tarafından belirtilen sınırlar içerisinde (Tablo 4). MOX-GEM arasındaki R değeri FDA kriterinden küçük bir miktar düşük olsa da pik saflıkları DAD yardımı ile kontrol edildiği için önemli bir sorun oluşturmamıştır. İlâveten, MOX ve GEM, FD yardımı ile farklı kanallarda saptandıkları için birbirlerinin cevabına girişim göstermemektedir. Sonuç olarak

değerlendirme yapıldığında, incelenen parametrelerin belirlenen sınırlar içerisinde olması sistem uygunluğunu kanıtlamıştır.

Florokinolonların idrarda tayininde, elde edilen r değerlerinin 0.9989'dan büyük olması yöntemin idrarda doğrusal olduğunu kanıtlar (Tablo 5). Yöntem doğrusallığının daha ileri seviyede incelenmesi için doğrusallık kontrol grafikleri çizilmiş ve elde edilen R^2 değerlerinin 0.9979'dan büyük olması yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir.

İdrarda bütün analitlerin LOQ değeri 2.5 µg/L olarak bulunmuştur. LOD değerleri ise istatistiksel olarak 1.03-1.69 µg/L aralığında hesaplanmıştır. Florokinolonların idrarda çok yüksek konsantrasyonlarda oldukları göz önünde bulundurulduğunda, gözlemlenen LOD ve LOQ değerleri yöntemin idrarda duyarlılığının yeterli düzeyde olduğunu göstermektedir.

Kromatografik analizde ölçülen cevabın sadece analite ait olduğunu kanıtlanması amacıyla, FDA tavsiyelerine uygun olarak altı farklı sağlıklı gönüllüden alınan örnekler analiz edilerek idrarda yöntem seçiciliği değerlendirilmiştir. Kromatogramlar incelendiğinde, analitlerin alıkonma zamanlarında endojen kaynaklı girişim yapan bileşiklere rastlanmamıştır (Şekil 53 ve 54). Buna ilaveten, tedavileri kapsamında florokinolonlar haricinde toplam 21 farklı ilaç (Tablo 15) kullanan beş hastanın idrar örneklerinin analizinde, birlikte kullanılan ilaçlardan kaynaklanan girişim yapan pikler gözlemlenmemiş ve kalite kontrol örneklerinin analizi ile elde edilenlere benzer kromatogramlar elde edilmiştir. Analitlerin idrarda analizinde DAD yardımı ile hesaplanan pik saflık indeksleri 0.9999'dan büyüktür. Bu durum, elde edilen piklerin saf olduğunu ve tek analit içerdiklerini kanıtlamaktadır.

İdrarda dört farklı konsantrasyonda, gün içi ve günler arası olmak üzere doğruluk ve kesinlik çalışmaları yürütülmüştür. Gün içi ve günler arası BSS değerleri sırası ile %0.35-5.48 ve %0.90-8.05 aralığındadır. Gün içi ve günler arası doğruluk ise sırasıyla %92.59-109.87 ve %89.55-107.65 aralıklarındadır (Tablo 7). Biyoanalitik yöntemlerde doğruluk ve kesinlik için sınır değer FDA'ye göre %15'tir. LOQ seviyesinde ise bu sınır %20'dir (161–163). Elde edilen bulgular yöntemin idrarda doğru ve kesin olduğunu göstermektedir. Analitlerin idrardan geri kazanımı bütün kalite kontrol seviyelerinde yöntemin etkinliğini gösterir şekilde yüksek bulunmuştur. İdrarda üç konsantrasyonda değerlendirilen geri kazanımlar %96.59-102.69 aralığındadır.

Florokinolonların idrarda kararlılıkları kısa süreli, uzun süreli ve donma-erime döngüsünde incelenmiştir ve bütün kararlılık parametreleri için %88.71-111.07 aralığında doğruluk elde edilmiştir (Tablo 9). FDA'ya göre analitlerin kararlı sayılabilmesi için, kararlılık çalışması yapılan örneklerin analizi ile elde edilen doğruluğun $\pm\%15$ aralığında olması gerekmektedir (136). Doğruluk değerlerinin belirlenen sınırlar içerisinde olması LEV, CIP, MOX ve GEM'in idrarda kararlı olduğunu kanıtlamıştır.

Florokinolonların plazmada tayininde 0.9996'dan büyük r değerleri elde edilmesi yöntemin plazmada doğrusal olduğunu göstermektedir (Tablo 10). Buna ilaveten, çizilen doğrusallık kontrol grafiklerinin R^2 değerlerinin 0.9993'ten büyük olması yöntemin plazmada doğrusallığını kanıtlar niteliktedir (Şekil 54).

Plazmadan analizde 100 $\mu\text{g/L}$ değeri bütün analitler için LOQ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak hesaplanan LOD değerleri ise 29.28-74.46 $\mu\text{g/L}$ aralığındadır. Florokinolon kullanan hastaların plazma analiz sonuçları incelendiğinde yöntemin florokinolonların plazmada bulunabileceği konsantrasyon aralığını kapsadığı ve plazmada tayin için yeterince hassas olduğu görülmektedir.

Yöntem seçiciliğinin plazmada kanıtlanması için altı sağlıklı gönüllüden elde edilen kromatogramlar incelenmiş ve analitlerin alıkonma pencerelerinde kolonu terk eden endojen kaynaklı girişim yapan bileşikler gözlemlenmemiştir (Şekil 56 ve 57). Hastaların tedavileri kapsamında kullandıkları diğer ilaçların da girişim yapmadığı görülmüştür. Son olarak yöntem seçiciliğinin kontrolünde DAD ile pik saflık indeksleri değerlendirilmiş ve 0.9999'dan büyük oldukları belirlenmiştir. Yukarıda bahsedilen bulgular, yöntemin LEV, CIP, MOX ve GEM'in plazma tayininde seçici olduğunu göstermiştir.

Gün içi ve günler arası olmak üzere doğruluk ve kesinlik çalışmaları plazmada dört farklı seviyede yürütülmüştür. BSS değerleri gün içi deneyler için %0.90-3.83 ve günler arası deneyler için %0.99-6.15 aralığındadır. Gün içi ve günler arası doğruluk ise sırasıyla %92.44-110.82 ve %91.81-111.94 aralıklarındadır (Tablo 12). Elde edilen değerler FDA'nın belirlediği sınırlar içerisinde ($\pm\%15$, LOQ için $\pm\%20$). Bu sonuçlar yöntemin plazmada doğru ve kesin olduğunu göstermektedir. Florokinolonların plazmadan geri kazanımları ise 3 konsantrasyon seviyesinde %79.46-93.75 aralığında bulunmuştur.

Plazmada yürütülen kararlılık çalışmaları kapsamında analitlerin kararlılıkları kısa süreli, uzun süreli ve donma-erime döngüsünde incelenmiştir. Kararlılık deneyleri yapılan örneklerin analizi sonucu %85.79-107.66 aralığında doğruluk elde edilmiştir (Tablo 14).

Elde edilen sonuçlar FDA tarafından belirlenen sınırlar içerisinde ($\pm\%15$) (136). Doğruluk değerlerinin belirlenen sınırlar içerisinde olması florokinolonların plazmada kararlı olduğunu göstermiştir.

Yöntemin idrarda uygulanabilirliğini kanıtlamak için Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yatan hastaların idrar örnekleri analiz edilmiştir. İdrar CIP ve LEV konsantrasyonları ilaç uygulamasından 4-6 saat sonra en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Farklı zamanlarda toplanan idrar örneklerindeki CIP konsantrasyonları 27.04-533.99 $\mu\text{g/mL}$ ve LEV konsantrasyonları 127.08-645.40 $\mu\text{g/mL}$ aralığında bulunmuştur (Tablo 16). Literatürde, örnek alma zamanına bağlı olarak idrarda CIP konsantrasyonları 10-1 000.5 $\mu\text{g/mL}$ (164–166) ve LEV konsantrasyonları 86-1 002 $\mu\text{g/mL}$ (45, 166–168) aralığındadır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Yöntemin plazmada uygulanabilirliği LEV, CIP ve MOX kullanan hastalardan alınan örnekler analiz edilerek kanıtlanmıştır (Tablo 17). Oral olarak LEV kullanan hastalar ile yapılan farmakokinetik çalışmalarda maksimum LEV plazma konsantrasyonu 3.98-8.53 $\mu\text{g/mL}$ aralığındadır (167, 169–174). Bu çalışma kapsamında plazma örneği analiz edilen 4 numaralı hastanın maksimum plazma LEV konsantrasyonu literatüre uyumlu olarak 4.56 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur.

CIP oral olarak (500 mg) uygulandıktan sonra maksimum plazma konsantrasyonuna (2.3-2.56 $\mu\text{g/mL}$) yaklaşık 1-3 saatte ulaşmaktadır (167, 170, 172, 175, 176). İlaç uygulamasından 2 saat sonra toplanan örneklerin analiz sonuçları değerlendirildiğinde Hasta 1 ve 2'nin maksimum plazma CIP seviyeleri literatür ile uyumludur. Diğer taraftan Hasta 3'ün plazma maksimum CIP konsantrasyonu (2.85 $\mu\text{g/mL}$) yüksek bulunmuştur. Hasta 3'ün ikinci ilaç uygulamasından önce alınan plazma örneği de diğer hastalarla karşılaştırıldığında yüksek miktarda CIP içermektedir. Buna ilaveten Hasta 3'ün idrar CIP seviyeleri diğer hastalarla kıyaslandığında düşüktür. Bu durum ilacın vücuttan daha yavaş şekilde atıldığını göstermektedir.

Böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda, maksimum CIP plazma konsantrasyonunun arttığı, ilacın yarılanma ömrünün uzadığı ve klirensinin önemli ölçüde azaldığı literatürde rapor edilmiştir (177–180). Hasta 3'ün plazma kreatin değeri [2.04 mg/desilitre (dL)], normal kabul edilen aralığın (0.67-1.17 mg/dL) üzerindedir.

Ölçülen yüksek plazma CIP seviyelerinin, Hasta 3'ün böbrek fonksiyonlarındaki bozukluktan kaynaklandığı düşünülmüştür.

MOX oral olarak (400 mg) uygulandıktan sonra maksimum plazma konsantrasyonuna (1.62-5.83 µg/mL) yaklaşık 1-2 saat sonra ulaşmaktadır (67, 170–172, 181–184). Hasta 5'in maksimum plazma MOX konsantrasyonu literatür ile kıyaslandığında bir miktar yüksektir. Hastanın kan albümin değeri (3 g/dL) olması gerekenin altındadır (3.5-5.2 g/dL). Ancak, MOX plazma proteinlerine düşük oranda (%26-50) bağlandığı için hipoalbuminemi ilacın farmakokinetik parametrelerini etkilememektedir (185, 186). Diğer taraftan Hasta 5, 75 yaşındadır. Yaşlılarda, kas atrofisi, yağ dokusu oranı artışı ve toplam vücut suyundaki azalmanın sonucu olarak, polar ilaçların dağılım hacimleri azalmaktadır ve bu durum yaşlı insanlarda ilaçların plazmada yüksek konsantrasyonda bulunmalarına sebep olmaktadır. Hasta 5'in plazmasında yüksek konsantrasyonda suda çözünür karakterdeki MOX saptanmasının vücut kompozisyonundaki yaşa bağlı değişikliklerden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür (187, 188).

Elde edilen sonuçlar, tedavi etkinliğinin artırılması ve antimikrobiyal ilaç toksisitesinin önlenmesi için, biyolojik sıvılarda ilaç seviyelerinin izlenmesi gerektiğini göstermiştir. Terapötik ilaç izleme, bu kapsamda tedavi başarısının artırılması için dozun kişiselleştirilmesi, toksisite riskinin azaltılması ve antimikrobiyal direnç gelişiminin önüne geçilmesi için bir araç olarak kullanılabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu çalışma kapsamında LEV, CIP, MOX ve GEM'in insan plazmasında ve idrarında hızlı ve güvenilir şekilde tayini için ilk defa bir HPLC-FD-DAD yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.
- Yöntem geliştirme çalışmaları kapsamında 5 farklı kolonda ayırım üzerine pH ve organik çözücü yüzdesi parametrelerinin etkisi incelenmiştir. En iyi ayırımın sağlandığı Poroshell 120 PFP kolon kullanılarak uyarma/emisyon dalga boyları, gradient şekli ve sıcaklık parametreleri incelenmiş ve optimize edilmiştir.
- Analitlerin ayırımında, fosfat tamponu (pH 2, 20 mM) ve ACN gradienti kullanılmış olup, 1 mL/dk akış hızı, 25 °C kolon sıcaklığı optimum olarak bulunmuştur.
- Florokinolonların yeterli seviyede ayırımı 7.5 dk'dan kısa süre içerisinde başarılmıştır. Toplam analiz süresi, kolon temizleme ve kolon şartlandırma basamakları dâhil 22 dk'dır.
- Gerekli görüldüğü durumlarda, gradient eğim sabit tutulup akış hızı artırılarak analiz süresi azaltılabilir.
- Plazma örneklerinin analize hazırlanmasında ACN ile basit şekilde protein çöktürme işlemi kullanılmıştır. Bu sayede sıvı-sıvı ekstraksiyon ya da katı faz ekstraksiyon gibi çok basamaktan oluşan yöntemlerden kaçınılmış, örnek hazırlama için harcanan zaman ve olası hata kaynakları azaltılmıştır.
- İdrar örneklerinin seyreltme işleminin ardından direkt sisteme enjekte edilmesi yöntem güvenilirliğini artırmıştır.
- Yürütülen validasyon çalışmaları, yöntemin plazma ve idrarda tüm analitlerin güvenilir bir şekilde tayininin yapılabilmesi için uluslararası gereklilikleri yerine getirdiğini göstermiştir.
- Geliştirilen yöntem florokinolonların analizinde yeni nesil core-shell kolon kullanımı, yüksek *R* değerleri, kısa analiz süresi, düşük saptama limitleri, yüksek doğruluk, kesinlik spesifik ve güvenilirlik gibi birçok önemli avantaj sunmaktadır.
- Yöntemin uygulanabilirliği beş hastadan alınan toplam 34 plazma ve idrar örneğinin analiz edilmesi ile kanıtlanmıştır. Yöntem, terapötik ilaç izleme, farmakokinetik ve toksikolojik çalışmalarda kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Blondeau JM (1999). Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: A review. *Clin Ther* 21: 3-40.
2. Zhanel GG, Noreddin AM (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: Focus on respiratory infections. *Curr Opin Pharmacol* 1: 459-463.
3. Oliphant CM, Green GM (2002). Quinolones: A comprehensive review. *Am Fam Physician* 65: 455-464.
4. Sharma PC, Jain A, Jain S (2009). Fluoroquinolone antibacterials: A review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm* 66: 587-604.
5. Czyrski A (2017). Analytical methods for determining third and fourth generation fluoroquinolones: A review. *Chromatographia* 80: 181-200.
6. Saleh GA, Askal HF, Refaat IH, Abdel-Aal FAM (2013). Review on recent separation methods for determination of some fluoroquinolones. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 36: 1401-1420.
7. Sousa J, Alves G, Fortuna A, Falcão A (2012). Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: A review. *Anal Bioanal Chem* 403: 93-129.
8. Lara FJ, del Olmo-Iruela M, García-Campaña AM (2013). On-line anion exchange solid-phase extraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection to determine quinolones in water and human urine. *J Chromatogr A* 1310: 91-97.
9. Maia AS, Ribeiro AR, Amorim CL, Barreiro JC, Cass QB, Castro PML, Tiritan ME (2014). Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1333: 87-98.
10. Bhattacharjee MK (2016). *Chemistry of antibiotics and related drugs*. 1st ed. Springer International Publishing, İsviçre; Sayfa:1-24.
11. Shlaes DM (2010). *Antibiotics: The perfect storm*. Springer International Publishing, Hollanda; Sayfa: 9-10.
12. Nicolaou KC, Rigol S (2018). *A brief history of antibiotics and select advances in their*

- synthesis. J Antibiot 71: 153-184.
13. Walsh CT, Wencewicz TA (2014). Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective. J Antibiot 67: 7-22.
 14. Walsh C, Wencewicz T (2016). Antibiotics: Challenges, mechanisms, opportunities. 2nd ed. ASM Press, Washington; Sayfa: 16-33.
 15. Džidić S, Šušković J, Kos B (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. Food Technol Biotechnol 46: 11-21.
 16. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol 33: 300-305.
 17. Vannuffel P, Cocito C (1996). Mechanism of action of streptogramins and macrolides. Drugs 51: 20-30.
 18. Yoneyama H, Katsumata R (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. Biosci Biotechnol Biochem 70: 1060-1075.
 19. Madaan A, Verma R, Kumar V, Singh AT, Jain SK, Jaggi M (2015). 1,8-Naphthyridine derivatives: A review of multiple biological activities. Arch Pharm 348: 837-860.
 20. Koga H, Itoh A, Murayama S, Suzue S, Irikura T (1980). Structure-activity relationships of antibacterial 6,7-and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. J Med Chem 23: 1358-1363.
 21. Koba M, Baczek T, Macur K, Bober L, Frąckowiak T, Buciński A, Rystok-Grabska D, Stasiak J, Koba K (2010). Factor analysis of microbiological activity data and structural parameters of antibacterial quinolones. J Mol Model 16: 327-335.
 22. Zhang G, Zhang S, Pan B, Liu X, Feng L (2018). 4-Quinolone derivatives and their activities against gram positive pathogens. Eur J Med Chem 143: 710-723.
 23. Scoper SV (2008). Review of third-and fourth-generation fluoroquinolones in ophthalmology: *In-vitro* and *in-vivo* efficacy. Adv Ther 25: 979-994.
 24. Ball P (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? J Antimicrob Chemother 46: 17-24.
 25. Scheld WM (2003). Maintaining fluoroquinolone class efficacy: Review of influencing factors. Emerging Infect Dis 9: 1-9.

26. Ezelarab HAA, Abbas SH, Hassan HA, Abuo-Rahma GEA (2018). Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. *Arch Pharm* 351: 1-13.
27. Chu DT, Fernandes PB (1989). Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 131-135.
28. Peterson LR (2001). Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis* 33: 180-186.
29. Beale JM, Block JH (2011). Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; Sayfa: 206-213.
30. Aldred KJ, McPherson SA, Turnbough CL, Kerns RJ, Osheroff N (2013). Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: Mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic Acids Res* 41: 4628-4639.
31. Livermore DM, Hope R, Reynolds R, Blackburn R, Johnson AP, Woodford N (2013). Declining cephalosporin and fluoroquinolone non-susceptibility among bloodstream *Enterobacteriaceae* from the UK: Links to prescribing change? *J Antimicrob Chemother* 68: 2667-2674.
32. Gagliotti C, Balode A, Baquero F, Degener J, Grundmann H, Gür D, Jarlier V, Kahlmeter G, Monen J, Monnet DL, Rossolini GM, Suetens C, Weist K, Heuer O (2011). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Eurosurveillance* 16: 1-5.
33. Hooper DC (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 31: 24-28.
34. Xiong X, Bromley EHC, Oelschlaeger P, Woolfson DN, Spencer J (2011). Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: Conserved surface loops direct the activity of a qnr protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res* 39: 3917-3927.
35. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 22: 438-445.

36. Sprandel KA, Rodvold KA (2004). Safety and tolerability of fluoroquinolones. Clin Cornerstone 6: 29-36.
37. Nicodemo AC, Robledo JA, Jasovich A, Neto W (1998). A multicentre, double-blind, randomised study comparing the efficacy and safety of oral levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of uncomplicated skin and skin structure infections. Int J Clin Pract 52: 69–74.
38. Levent Üstünes (2019). RxMediaPharma interaktif ilaç bilgi kaynağı. GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik San. ve Tic. A.Ş.
39. Grayson ML, Cosgrove SE, Crowe SM, Hope W, McCarthy JS, Mills J, Mouton JW, Paterson DL (2017). Kucers' the use of antibiotics: A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs. 7th ed. CRC Press, Florida; Sayfa: 1867-2321.
40. Davis R, Bryson HM (1994). Levofloxacin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy. Drugs 47: 677-700.
41. Langlois MH, Montagut M, Dubost JP, Grellet J, Saux MC (2005). Protonation equilibrium and lipophilicity of moxifloxacin. J Pharm Biomed Anal 37: 389-393.
42. Heaton VJ, Ambler JE, Fisher LM (2000). Potent antipneumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of gyrase and topoisomerase IV, an *in vivo* target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavable complexes *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 44: 3112-3117.
43. Islinger F, Bouw R, Stahl M, Lackner E, Zeleny P, Brunner M, Müller M, Eichler HG, Joukhadar C (2004). Concentrations of gemifloxacin at the target site in healthy volunteers after a single oral dose. Antimicrob Agents Chemother 48: 4246-4249.
44. Vybíralová Z, Nobilis M, Zoulova J, Květina J, Petr P (2005). High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. J Pharm Biomed Anal 37: 851-858.
45. Rambla-Alegre M, Esteve-Romero J, Carda-Broch S (2009). Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection. J Chromatogr B 877: 3975-3981.
46. Srinivas N, Narasu L, Shankar BP, Mullangi R (2008). Development and validation of

- a HPLC method for simultaneous quantitation of gatifloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin using levofloxacin as internal standard in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 22: 1288-95.
47. Espinosa-Mansilla A, De La Peña AM, Gómez DG, López FS (2006). Determination of fluoroquinolones in urine and serum by using high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection. *Talanta* 68: 1215-1221.
 48. Cavazos-Rocha N, Carmona-Alvarado I, Vera-Cabrera L, Waksman-De-Torres N, De La Luz Salazar-Cavazos M (2014). HPLC method for the simultaneous analysis of fluoroquinolones and oxazolidinones in plasma. *J Chromatogr Sci* 52: 1281-1287.
 49. Maia AS, Ribeiro AR, Amorim CL, Barreiro JC, Cass QB, Castro PML, Tiritan ME (2014). Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1333: 87-98.
 50. Watabe S, Yokoyama Y, Nakazawa K, Shinozaki K, Hiraoka R, Takeshita K, Suzuki Y (2010). Simultaneous measurement of pazufloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 878: 1555-1561.
 51. Arroyo-Manzanares N, Huertas-Pérez JF, Lombardo-Agüí M, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM (2015). A high-throughput method for the determination of quinolones in different matrices by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Methods* 7: 253-259.
 52. Morales-Cid G, Cárdenas S, Simonet BM, Valcárcel M (2009). Fully automatic sample treatment by integration of microextraction by packed sorbents into commercial capillary electrophoresis-mass spectrometry equipment: Application to the determination of fluoroquinolones in urine. *Anal Chem* 81: 3188-3193.
 53. Rote AR, Pingle SP (2009). Reverse phase-HPLC and HPTLC methods for determination of gemifloxacin mesylate in human plasma. *J Chromatogr B* 877: 3719-3723.
 54. Sagirli O, Demirci S, Önal A (2015). A very simple high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of gemifloxacin in human breast milk. *Luminescence* 30: 1326-1329.

55. Araújo BV de, Laureano JV, Grünspan LD, Costa TD, Tasso L (2013). Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats. *J Chromatogr B* 919-920: 62-66.
56. Al-Hadiya BMH, Khady AA, Mostafa GAE (2010). Validated liquid chromatographic-fluorescence method for the quantitation of gemifloxacin in human plasma. *Talanta* 83: 110-116.
57. Czyrski A, Sokół A, Szalek E (2017). HPLC method for determination of moxifloxacin in plasma and its application in pharmacokinetic analysis. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 40: 8-12.
58. Cañada-Cañada F, Espinosa-Mansilla A, de la Peña AM (2007). Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: Application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine. *J Sep Sci* 30: 1242-1249.
59. Kumar A, Malik AK, Tewary DK, Singh B (2008). Gradient HPLC of antibiotics in urine, ground water, chicken muscle, hospital wastewater, and pharmaceutical samples using C-18 and RP-amide columns. *J Sep Sci* 31: 294-300.
60. Yaroshenko IS, Khaimenov AY, Grigor'ev AV, Sidorova AA (2015). A chromatographic-mass spectrometric method for the determination of moxifloxacin in blood plasma for pharmacokinetic studies. *J Anal Chem* 70: 860-868.
61. Sousa J, Alves G, Campos G, Fortuna A, Falcão A (2013). First liquid chromatography method for the simultaneous determination of levofloxacin, pazufloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and trovafloxacin in human plasma. *J Chromatogr B* 930: 104-111.
62. Helmy SA (2013). Simultaneous quantification of linezolid, tinidazole, norfloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and gatifloxacin in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies in human volunteers. *Ther Drug Monit* 35: 770-777.
63. Pena A, Chmielova D, Lino CM, Solich P (2007). Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego river by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *J Sep Sci* 30: 2924-2928.
64. Seifrtová M, Pena A, Lino CM, Solich P (2008). Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography

- with a monolithic column and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem* 391: 799-805.
65. Laban-Djurdjević A, Jelikić-Stankov M, Djurdjević P (2006). Optimization and validation of the direct HPLC method for the determination of moxifloxacin in plasma. *J Chromatogr B* 844: 104-111.
 66. Xu YH, Li D, Liu XY, Li YZ, Lu J (2010). High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: Validation and application to a pharmacokinetic study in chinese volunteers. *J Chromatogr B* 878: 3437-3441.
 67. Kumar AKH, Sudha V, Srinivasan R, Ramachandran G (2011). Simple and rapid liquid chromatography method for determination of moxifloxacin in saliva. *J Chromatogr B* 879: 3663-3667.
 68. Lee SJ, Desta KT, Eum SY, Dartois V, Cho SN, Bae DW, Shin SC (2016). Development and validation of LC-ESI-MS/MS method for analysis of moxifloxacin and levofloxacin in serum of multidrug-resistant tuberculosis patients: Potential application as therapeutic drug monitoring tool in medical diagnosis. *J Chromatogr B* 1009-1010: 138-143.
 69. Ashfaq M, Khan KN, Rasool S, Mustafa G, Saif-Ur-Rehman M, Nazar MF, Sun Q, Yu CP (2016). Occurrence and ecological risk assessment of fluoroquinolone antibiotics in hospital waste of Lahore, Pakistan. *Environ Toxicol Pharmacol* 42: 16-22.
 70. Nemutlu E, Kir S, Özyüncü Ö, Beksaç MS (2007). Simultaneous separation and determination of seven quinolones using HPLC: Analysis of levofloxacin and moxifloxacin in plasma and amniotic fluid. *Chromatographia* 66: 15-24.
 71. Wang H, Gao M, Wang M, Zhang R, Wang W, Dahlgren RA, Wang X (2015). Integration of phase separation with ultrasound-assisted salt-induced liquid-liquid microextraction for analyzing the fluoroquinolones in human body fluids by liquid chromatography. *J Chromatogr B* 985: 62-70.
 72. Wang S, Wen J, Cui L, Zhang X, Wei H, Xie R, Feng B, Wu Y, Fan G (2010). Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for rapid determination of sinafloxacin, a novel fluoroquinolone in rat plasma using a fused-core C18-silica column. *J Pharm Biomed Anal* 51: 889-893.

73. Locatelli M, Ciavarella MT, Paolino D, Celia C, Fiscarelli E, Ricciotti G, Pompilio A, Di Bonaventura G, Grande R, Zengin G (2015). Determination of ciprofloxacin and levofloxacin in human sputum collected from cystic fibrosis patients using microextraction by packed sorbent-high performance liquid chromatography photodiode array detector. *J Chromatogr A* 1419: 58-66.
74. Mannemala SS, Kannappan V (2016). Multiple response optimization of a liquid chromatographic method for determination of fluoroquinolone and nitroimidazole antimicrobials in serum and urine. *Clin Biochem* 49: 587-595.
75. Jiménez V, Companyó R, Guiteras J (2011). Validation of a method for the analysis of nine quinolones in eggs by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* 85: 596-606.
76. Moema D, Nindi MM, Dube S (2012). Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 730: 80-86.
77. Denadai M, Cass QB (2015). Simultaneous determination of fluoroquinolones in environmental water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with direct injection: A green approach. *J Chromatogr A* 1418: 177-184.
78. Mirzajani R, Kardani F (2016). Fabrication of ciprofloxacin molecular imprinted polymer coating on a stainless steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber for sensitive determination of fluoroquinolones in biological fluids and tablet formulation using HPLC-UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 122: 98-109.
79. Liang H, Kays MB, Sowinski KM (2002). Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by high-performance liquid chromatography: Application to levofloxacin determination in human plasma. *J Chromatogr B* 772: 53-63.
80. Wang N, Zhu L, Zhao X, Yang W, Sun H (2013). Improved HPLC method for the determination of moxifloxacin in application to a pharmacokinetics study in patients with infectious diseases. *ISRN Pharmacol* 2013: 1-7.
81. Raju B, Ramesh M, Borkar RM, Padiya R, Banerjee SK, Srinivas R (2012). Development and validation of liquid chromatography-mass spectrometric method for simultaneous determination of moxifloxacin and ketorolac in rat plasma: Application

- to pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 26: 1341-1347.
82. Borrás S, Ríos-Kristjánsson JG, Companyõ R, Prat MD (2012). Analysis of fluoroquinolones in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Sep Sci* 35: 2048-2053.
 83. He K, Blaney L (2015). Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. *J Hazard Mater* 282: 96-105.
 84. Ramos Payán M, Bello López MÁ, Fernández-Torres R, González JAO, Callejón Mochón M (2011). Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) as a new approach for the HPLC determination of fluoroquinolones in biological and environmental matrices. *J Pharm Biomed Anal* 55: 332-341.
 85. Van Toi P, Pouplin T, Tho NDK, Phuong PN, Chau TTH, Thuong Thuong NT, Heemskerk D, Hien TT, Thwaites GE (2017). High-performance liquid chromatography with time-programmed fluorescence detection for the quantification of levofloxacin in human plasma and cerebrospinal fluid in adults with tuberculous meningitis. *J Chromatogr B* 1061–1062: 256-262.
 86. Montesano C, Curini R, Sergi M, Compagnone D, Celani G, Varasano V, Petrizzi L, Amorena M (2016). Determination of marbofloxacin in plasma and synovial fluid by ultrafiltration followed by HPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 123: 31–36.
 87. Djurdjevic P, Ciric A, Djurdjevic A, Stankov MJ (2009). Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 50: 117–126.
 88. Aufartová J, Brabcová I, Torres-Padrón ME, Solich P, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ (2017). Determination of fluoroquinolones in fishes using microwave-assisted extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Food Compos Anal* 56: 140-146.
 89. Sousa J, Alves G, Fortuna A, Pena A, Lino C, Falcão A (2011). Development and validation of a fast isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of norfloxacin, lomefloxacin and ciprofloxacin in human plasma. *Biomed Chromatogr* 25: 535-541.
 90. Nemutlu E, Katlan D, Özyüncü Ö, Kır S, Sinan Beksac M (2010). Quantification of

moxifloxacin and levofloxacin in curettage material by SPE-LC. *Chromatographia* 71: 1147-1150.

91. Pawliszyn J, Lord HL (2010). *Handbook of sample preparation*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc. Publication, New Jersey; Sayfa: 3-25.
92. Kohler I, Schappler J, Rudaz S (2013). Microextraction techniques combined with capillary electrophoresis in bioanalysis. *Anal Bioanal Chem* 405: 125-141.
93. Cervinkova B, Krcmova LK, Solichova D, Melichar B, Solich P (2016). Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: From sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Anal Bioanal Chem* 408: 2407-2424.
94. Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y (2018). Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *TrAC, Trends Anal Chem* 102: 123-146.
95. Soltani S, Jouyban A (2014). Biological sample preparation: Attempts on productivity increasing in bioanalysis. *Bioanalysis* 6: 1691-1710.
96. Issaq HJ (2002). *A century of separation science*. 1st ed. Marcel Dekker Publication, New York; Sayfa: 19-27.
97. Harvey D (2000). *Modern analytical chemistry*. 1st ed. McGraw-Hill Companies, Boston; Sayfa: 544-615.
98. Fornstedt T (2010). Characterization of adsorption processes in analytical liquid-solid chromatography. *J Chromatogr A* 1217: 792-812.
99. Kromidas S (2008). *HPLC made to measure: A practical handbook for optimization*. 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim; Sayfa: 149-248.
100. Wilson ID, Adlard ER, Cooke M, Poole CF (2000). *Encyclopedia of separation science*. 1st ed. Academic Press, London; Sayfa: 676-684.
101. Hage DS (2006). *Handbook of affinity chromatography*. 2nd ed. Taylor & Francis Group, Florida; Sayfa: 3-15.
102. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW (2010). *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. John Wiley & Sons Publication, New Jersey; Sayfa: 88-196.

103. Brown JN, Hewins M, Van Der Linden JHM, Lynch RJ (1981). Solvent degassing and other factors affecting liquid chromatographic detector stability. *J Chromatogr A* 204: 115-122.
104. Fanali S, Haddad PR, Poole CF, Schoenmaker P, Lloyd D (2013). *Liquid chromatography. fundamentals and instrumentation*. 1st ed. Elsevier, Massachusetts; Sayfa: 2-13.
105. Venn RF (2008). *Principles and practice of bioanalysis*. 2nd ed. CRC Press, Florida; Sayfa: 41-69.
106. Dong MW (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*. 1st ed. John Wiley and Sons Publication, New Jersey; Sayfa: 87-95.
107. Viñas P, Balsalobre N, López-Erroz C, Hernández-Córdoba M (2004). Liquid chromatographic analysis of riboflavin vitamers in foods using fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 52: 1789-1794.
108. Horvath CG, Preiss BA, Lipsky SR (1967). Fast liquid chromatography: An investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal Chem* 39: 1422-1428.
109. Guiochon G, Gritti F (2011). Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *J Chromatogr A* 1218: 1915-1938.
110. Gumustas M, Zalewski P, Ozkan SA, Uslu B (2019). The history of the core-shell particles and applications in active pharmaceutical ingredients via liquid chromatography. *Chromatographia* 82: 17-48.
111. Manchón N, D'Arrigo M, García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Ramos A, Martínez JA, Rostagno MA (2010). Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. *Talanta* 82: 1986-1994.
112. Hayes R, Ahmed A, Edge T, Zhang H (2014). Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1357: 36-52.
113. González-Ruiz V, Olives AI, Martín MA (2015). Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC, Trends Anal Chem* 64: 17-

28.

114. Cavazzini A, Gritti F, Kaczmariski K, Marchetti N, Guiochon G (2007). Mass-transfer kinetics in a shell packing material for chromatography. *Anal Chem* 79: 5972-5979.
115. Gritti F, Guiochon G (2012). Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency. *J Chromatogr A* 1221: 2-40.
116. Kaczmariski K, Guiochon G (2007). Modeling of the mass-transfer kinetics in chromatographic columns packed with shell and pellicular particles. *Anal Chem* 79: 4648-4656.
117. Wang X, Barber WE, Long WJ (2012). Applications of superficially porous particles: High speed, high efficiency or both? *J Chromatogr A* 1228: 72-88.
118. Cabooter D, Fanigliulo A, Bellazzi G, Allieri B, Rottigni A, Desmet G (2010). Relationship between the particle size distribution of commercial fully porous and superficially porous high-performance liquid chromatography column packings and their chromatographic performance. *J Chromatogr A* 1217: 7074-7081.
119. Wang X, Barber WE, Carr PW (2006). A practical approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research. *J Chromatogr A* 1107: 139-151.
120. Gritti F, Leonardi I, Abia J, Guiochon G (2010). Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography. Relationships between particle characteristics and column performance. *J Chromatogr A* 1217: 3819-3843.
121. Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Ishizuka N, Tanaka N (1998). Effect of domain size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 797: 121-131.
122. Nakanishi K (1997). Pore structure control of silica gels based on phase separation. *J Porous Mater* 4: 67-112.
123. Morisato K, Miyazaki S, Ohira M, Furuno M, Nyudo M, Terashima H, Nakanishi K (2009). Semi-micro-monolithic columns using macroporous silica rods with improved performance. *J Chromatogr A* 1216: 7384-7387.
124. Hara T, Makino S, Watanabe Y, Ikegami T, Cabrera K, Smarsly B, Tanaka N (2010).

- The performance of hybrid monolithic silica capillary columns prepared by changing feed ratios of tetramethoxysilane and methyltrimethoxysilane. *J Chromatogr A* 1217: 89-98.
125. Hara T, Kobayashi H, Ikegami T, Nakanishi K, Tanaka N (2006). Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains. *Anal Chem* 78: 7632-7642.
 126. Cabrera K, Lubda D, Eggenweiler HM, Minakuchi H, Nakanishi K (2000). A new monolithic-type HPLC column for fast separations. *J High Resolut Chromatogr* 23: 93-99.
 127. Cabrera K (2004). Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *J Sep Sci* 27: 843-852.
 128. Hormann K, Müllner T, Bruns S, Höltzel A, Tallarek U (2012). Morphology and separation efficiency of a new generation of analytical silica monoliths. *J Chromatogr A* 1222: 46-58.
 129. Gritti F, Guiochon G (2012). Measurement of the eddy dispersion term in chromatographic columns. II. Application to new prototypes of 2.3 and 3.2 mm I.D. monolithic silica columns. *J Chromatogr A* 1227: 82-95.
 130. Hormann K, Tallarek U (2013). Analytical silica monoliths with submicron macropores: Current limitations to a direct morphology-column efficiency scaling. *J Chromatogr A* 1312: 26-36.
 131. Miyazaki S, Takahashi M, Ohira M, Terashima H, Morisato K, Nakanishi K, Ikegami T, Miyabe K, Tanaka N (2011). Monolithic silica rod columns for high-efficiency reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1218: 1988–1994.
 132. Martin AJP, Synge RLM (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem J* 35: 1358-1368.
 133. Swartz ME, Krull IS (2012). Handbook of analytical validation. 1st ed. CRC Press, Boca Raton; Sayfa: 61-78.
 134. Center for Drug Evaluation and Research (1994). Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods.
 135. Bliesner DM (2006). Validating chromatographic methods: A practical guide. 1st ed.

John Wiley and Sons Publication, New Jersey; Sayfa: 8-15.

136. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2018). Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, Biopharmaceutics.
137. Nemutlu E (2008). Gebelikte profilaktik amaçlı kullanılan antibiyotiklerin miktar tayinleri için yöntem geliştirilmesi ve fetus geçişlerinin incelenmesi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
138. Ross DL, Riley CM (1990). Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. *Int J Pharm* 63: 237-250.
139. Golet EM, Xifra I, Siegrist H, Alder AC, Giger W (2003). Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ Sci Technol* 37: 3243-3249.
140. Ross DL, Riley CM (1982). Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. II. Acid ionization constants and their relationship to structure. *Int J Pharm* 83: 267-272.
141. Teutenberg T, Hollebekkers K, Wiese S, Boergers A (2009). Temperature and pH-stability of commercial stationary phases. *J Sep Sci* 32: 1262–1274.
142. Wyndham KD, O’Gara JE, Walter TH, Glose KH, Lawrence NL, Alden BA, Izzo GS, Hudalla CJ, Iraneta PC (2003). Characterization and evaluation of c18 HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. *Anal Chem* 75: 6781-6788.
143. Thévenon-Emeric G, Tchaplal A, Martin M (1991). Role of π - π interactions in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 550: 267-283.
144. Tanaka N, Goodell H, Karger BL (1968). The role of organic modifiers on polar group selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 158: 233-248.
145. Yıldırım S, Yaşar A (2018). A core-shell column approach to fast determination of synthetic dyes in foodstuffs by high-performance liquid chromatography. *Food Anal Methods* 11: 1581-1590.
146. Yıldırım S, Kadioğlu A, Sağlam A, Yaşar A, Sellitepe HE (2016). Fast determination

- of anthocyanins and free pelargonidin in fruits, fruit juices, and fruit wines by high-performance liquid chromatography using a core-shell column. J Sep Sci 39: 3927-3935.
147. Zhang W (2008). Fluorocarbon stationary phases for liquid chromatography applications. J Fluorine Chem 129: 910-919.
148. Bacalum E, Cheregi M (2017). Recent analytical applications of fluorinated hydrocarbon-based stationary phases in HPLC. J Liq Chromatogr Relat Technol 40: 59-68.
149. Fibigr J, Šatínský D, Solich P (2017). A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. J Pharm Biomed Anal 143: 204-213.
150. Verardo V, Riciputi Y, Garrido-Frenich A, Caboni MF (2015). Determination of free and bound phenolic compounds in soy isoflavone concentrate using a PFP fused core column. Food Chem 185: 239-244.
151. Fibigr J, Šatínský D, Solich P (2017). A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase. J Pharm Biomed Anal 134: 203-213.
152. Dolan JW (2002). Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. J Chromatogr A 965: 195-205.
153. Hu W, Hasebe K, Reynolds DM, Haraguchi H (1997). Separation of nucleosides and their bases by reversed-phase liquid chromatography using pure water as the mobile phase. Anal Chim Acta 353: 143-149.
154. Tran JV, Molander P, Greibrokk T, Lundanes E (2001). Temperature effects on retention in reversed phase liquid chromatography. J Sep Sci 24: 930-940.
155. Kazakevich Y, LoBrutto R (2007). HPLC for pharmaceutical scientists. 1st ed. John Wiley and Sons Publication, New Jersey; Sayfa: 811-830.
156. Warren FV, Bidlingmeyer BA (1988). Influence of temperature on column efficiency in reversed-phase liquid chromatography. Anal Chem 60: 2821-2824.
157. Zhu C, Goodall DM, Wren SAC (2005). Elevated temperature HPLC: Principles and applications to small molecules and biomolecules. LCGC North Am 23: 97-106.

158. Melander WR, Chen BK, Horváth C (1985). Mobile phase effects in reversed-phase chromatography. VII. Dependence of retention on mobile phase composition and column temperature. *J Chromatogr A* 318: 1-10.
159. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 785: 263-275.
160. Keunchkarian S, Reta M, Romero L, Castells C (2006). Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions. *J Chromatogr A* 1119: 20-28.
161. Moein MM, El Beqqali A, Abdel-Rehim M (2017). Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J Chromatogr B* 1043: 3-11.
162. Fachi MM, Leonart LP, Cerqueira LB, Pontes FLD, de Campos ML, Pontarolo R (2017). A systematic and critical review on bioanalytical method validation using the example of simultaneous quantitation of antidiabetic agents in blood. *J Chromatogr B* 1055-1056: 61-71.
163. González O, Blanco ME, Iriarte G, Bartolomé L, Maguregui MI, Alonso RM (2014). Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J Chromatogr A* 1353: 10-27.
164. Boy D, Well M, Kinzig-Schippers M, Sörgel F, Ankel-Fuchs D, Naber KG (2004). Urinary bactericidal activity, urinary excretion and plasma concentrations of gatifloxacin (400 mg) versus ciprofloxacin (500 mg) in healthy volunteers after a single oral dose. *Int J Antimicrob Agents* 23: 6-16.
165. Brumfitt W, Franklin I, Grady D, Hamilton-Miller JM, Iliffe A (1984). Changes in the pharmacokinetics of ciprofloxacin and fecal flora during administration of a 7-day course to human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 757-761.
166. Wagenlehner FME, Kinzig-Schippers M, Sörgel F, Weidner W, Naber KG (2006). Concentrations in plasma, urinary excretion and bactericidal activity of levofloxacin (500 mg) versus ciprofloxacin (500 mg) in healthy volunteers receiving a single oral dose. *Int J Antimicrob Agents* 28: 551-559.

167. Novelli A, Rosi E (2017). Pharmacological properties of oral antibiotics for the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *J Chemother* 29: 10-18.
168. Fish DN, Chow AT (1997). The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clin Pharmacokinet* 32: 101-119.
169. North DS, Fish DN, Redington JJ (1998). Levofloxacin, a second-generation fluoroquinolone. *Pharmacotherapy* 18: 915–935.
170. Bryskier A (2006). *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals*. 1st ed. ASM Press, Washington; Sayfa: 739-743.
171. Lubasch A, Keller I, Borner K, Koeppe P, Lode H (2000). Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2600-2603.
172. Wise R, Honeybourne D (1999). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones in the respiratory tract. *Eur Respir J* 14: 221-229.
173. Chien SC, Rogge MC, Gisclon LG, Curtin C, Wong F, Natarajan J, Williams RR, Fowler CL, Cheung WK, Chow AT (1997). Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2256-2260.
174. Chien SC, Chow AT, Natarajan J, Williams RR, Wong FA, Rogge MC, Nayak RK (1997). Absence of age and gender effects on the pharmacokinetics of a single 500-milligram oral dose of levofloxacin in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1562-1565.
175. US Food and Drug Administration (2019). Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/019537s68,19847s42,19857s49,20780s26,21473s241bl.pdf. [Accessed 18 December 2019].
176. Campoli-Richards DM, Monk JP, Price A, Benfield P, Todd PA, Ward A (1988). Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 35: 373-447.
177. Forrest A, Weir M, Plaisance KI, Drusano GL, Leslie J, Standiford HC (1988). Relationships between renal function and disposition of oral ciprofloxacin. *Antimicrob*

Agents Chemother 32: 1537-1540.

178. Singlas E, Taburet AM, Landru I, Albin H, Ryckelinck JP (1987). Pharmacokinetics of ciprofloxacin tablets in renal failure; influence of haemodialysis. *Eur J Clin Pharmacol* 31: 589-593.
179. Gasser TC, Ebert SC, Gravesen PH, Madsen PO (1987). Ciprofloxacin pharmacokinetics in patients with normal and impaired renal function. *Antimicrob Agents Chemother* 31: 709-712.
180. Boelaert J, Valcke Y, Schurgers M, Daneels R, Rosseneu M, Rosseel MT, Bogaert MG (1985). The pharmacokinetics of ciprofloxacin in patients with impaired renal function. *J Antimicrob Chemother* 16: 87-93.
181. US Food and Drug Administration (2019). Moxifloxacin full prescribing information. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021277s038lbl.pdf. [Accessed 18 December 2019].
182. Stass H, Dalhoff A, Kubitz A, Schühly U (1998). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a new 8-methoxy quinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2060–2065.
183. Stass H (1999). Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man. *J Antimicrob Chemother* 43: 83–90.
184. Zheng Y, Wang Z, Lui G, Hirt D, Treluyer JM, Benaboud S, Aboura R, Gana I (2019). Simultaneous quantification of levofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in microvolumes of human plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Biomed Chromatogr* 33: 1-10.
185. Bergogne-Bérézin E (2002). Clinical role of protein binding of quinolones. *Clin Pharmacokinet* 41: 741-750.
186. Rodvold KA, Neuhauser M (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Pharmacotherapy* 21: 233-252.
187. Fülöp Jr. T, Wórum I, Csongor J, Fóris G, Varga P, Leövey A (1985). Body composition in elderly people. *Gerontology* 31: 150-157.
188. Mangoni AA, Jackson SHD (2004). Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: Basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol*

57: 6-14.





EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI

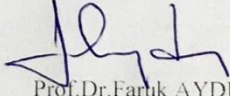
Sayı : 24237859-**677**
Konu: Etik Kurul onay belgesi

11/12/2017

Sayın; Doç. Dr. Ahmet YAŞAR
Analitik Kimya ABD.

"Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu İlaçların Biyolojik Sıvılardan Eşzamanlı Tayını İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu" başlıklı etik kurul 2017/153 protokol numaralı tez çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Faruk AYDIN
Etik kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

Ek 1 (Devam). Etik Kurul Onayı

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu İlaçların Biyolojik Sıvılardan Eşzamanlı Tayını İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu”		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2017 / 153		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Ahmet YAŞAR		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Analitik Kimya		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR. ÜNVAN/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Sercan YILDIRIM, Prof.Dr.İftihar KÖKSAL		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU				Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
OLGU RAPOR FORMU				Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
SİĞORTA	☐		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
İLAN	☐		
YILLIK BİLDİRİM	☐		
SONUÇ RAPORU	☐		
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER	☐		

Sayfa 1

Ek 1 (Devam). Etik Kurul Onayı

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 8	Tarih: 04/12/2017
	Doç.Dr.Ahmet YAŞAR'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan Arş.Gör.Sercan YILDIRIM'a ait "Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu İlaçların Biyolojik Sıvılardan Eşzamanlı Tayımı İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu" başlıklı 2017/153 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİMLİ
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raporör:	Tıbbi Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer.	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Y.Doç.Dr.Demet SAĞLAM AYKUT Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU-1

Sayın

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalında “*Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu İlaçların Biyolojik Sıvılardan Eş Zamanlı Tayini İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu*” isimli bir bilimsel araştırma (doktora tezi çalışması kapsamında) yürütülmektedir.

Bu araştırmadaki amaç, ülkemizde kullanılmakta olan siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve gemifloksasin ilaç etken maddelerinin insan kanında ve idrarında tayini için bir analitik yöntemin geliştirilmesidir. Araştırma sadece sizden alınacak kan ve idrar örnekleri üzerinde yapılacaktır. Sizden kan almak dışında size, ilaç enjekte etmek gibi başka hiçbir uygulama yapılmayacaktır. Yani, kan bağıışı ya da laboratuvar tetkiki için olduğu gibi kan ve idrar vermiş olmanız bu araştırmaya desteğiniz olacaktır.

Bu çalışma için sağlıklı ve son iki hafta içinde herhangi bir ilaç kullanmamış bir gönüllüden alınacak az miktardaki kan ve idrar örneği yeterli olacaktır. Eğer kabul ederseniz sizi bu araştırmaya dâhil etmek istiyoruz.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kimliğiniz her zaman gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmanızdan dolayı sizden herhangi bir para talep edilmeyecektir. Aynı şekilde size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmaya katılmak isterseniz size uygulanacak işlemler şu şekilde olacaktır. Öncelikle Prof. Dr. İftihar KÖKSAL (KTÜ Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı) tarafından muayene edileceksiniz. Daha sonra tek seferde 50 mL idrarınız (yaklaşık yarım çay bardağı) ve kolunuzdan 5 tüp (yaklaşık yarım çay bardağı) kan alınacaktır. Sizden alınan biyolojik sıvılar, insan idrarında ve plazmasında florokinolon tayini için geliştirilen yeni bir yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla kullanılacaktır. Belirtmelidir ki, sizden toplanan örnekler kullanılarak genetik veri incelemesi yapılmayacaktır. Yöntem geçerliliğinin kanıtlanmasının ardından, kalan idrar ve kan örnekleri tıbbi atık imha prosedürüne uygun olarak imha edilecektir.

Kan alma işlemi hastaneye başvurduğunuzda sıklıkla yapılan herhangi bir sağlık tetkiki için (örneğin kan şekeri tayini) yapılanın aynısı olup, tecrübeli sağlık personeli tarafından gerçekleştirilecektir. Fakat, kan alınırken iğne batması nedeniyle hafif bir acı duyabilirsiniz. Çok düşük bir ihtimal olsa da kan alırken veya kan aldıktan sonra iğne batırılan yerde kanamanın uzaması, kan damarının yırtılması sonucu kanın damar dışına çıkarak vücut boşluğuna akması ve deri altında koyu renkli geçici lekeler oluşması, damar içinde bir kan pıhtısının oluşması ve böylece kan akışını engellemesi, enfeksiyon, kol uyuşması, baş ağrısı, bayılma, tansiyon düşüklüğü, alerji, ödem ve iğne batırılan yerden bulaşarak enfeksiyon gelişmesi riskleri olabilir. Kan alma işlemi sırasında steril tek kullanımlık malzemeler kullanılacak olup bu yolla bir hastalık bulaşma riski yoktur. İşlemi gerçekleştirecek yetkili kişi bu risklerin farkında olup; bu risklerin gerçekleşmemesi için her türlü tedbir alınacaktır.

Araştırmaya katılmak zorunda olmadığınız gibi araştırmaya katılmayı kabul ettiğinizde, istediğiniz anda ayrılma hakkına da sahipsiniz. Ancak bu kararınızı bize önceden bildirirseniz araştırmanın bozulmasına meydan vermemiş olursunuz.

Ek 2 (Devam)

Araştırmadan elde edilen sonuçları talep etmeniz durumunda herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Bilgi edinmek istemiyorsanız lütfen yazılı formun altına belirtiniz.

Gönüllünün Beyanı

..... tarafından “**Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu İlaçların Biyolojik Sıvılardan Eş Zamanlı Tayini İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu**” isimli araştırma hakkında bana bilgi verildi. Araştırmanın amacı, uygulama biçimi ile riskleri ve bilgilerimle ilgili gizliliğin sağlanacağı konusunda yeterli açıklama yapıldı. Araştırma sırasında sorularım için Doç.Dr. Ahmet Yaşar (0505 226 83 03) ile temas edebileceğim bana bildirildi. İstediğim zaman araştırmadan çekilebileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım ile katılmaya olurum vardır.

Gönüllü

Adı Soyadı

Doğum Tarihi

Adres/Tel

İmza

Tanık

Adı Soyadı

Doğum Tarihi

Adres/Tel

İmza

Çalışmanın Yöneticisi:

Adı Soyadı : Doç. Dr. Ahmet YAŞAR

Adres/Tel : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 322 Nolu oda, Ortahisar/Trabzon

İmza :

Görüşme tarih ve saati:

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri,

Öğrenmek istiyorum ()

Öğrenmek istemiyorum ()

Ek 3. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-2

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU-2

Sayın

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalında “*Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu İlaçların Biyolojik Sıvılardan Eş Zamanlı Tayini İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu*” isimli bir bilimsel araştırma (doktora tezi çalışması kapsamında) yürütülmektedir.

Bu araştırmadaki amaç, ülkemizde kullanılmakta olan siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve gemifloksasin ilaç etken maddelerinin insan kanında ve idrarında tayini için bir analitik yöntemin geliştirilmesidir. Araştırma kapsamında siprofloksasin, levofloksasin veya moksifloksasin kullanan hastalardan alınacak kan ve idrar örnekleri analiz edilecektir. Bu çalışma için, tedavisinde florokinolon kullanan bir gönüllü hastadan alınacak az miktardaki kan ve idrar örneği yeterli olacaktır. Eğer kabul ederseniz sizi bu araştırmaya dâhil etmek istiyoruz.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kimliğiniz her zaman gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmanızdan dolayı sizden herhangi bir para talep edilmeyecektir. Aynı şekilde size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmaya katılmak isterseniz size uygulanacak işlemler şu şekilde olacaktır. Öncelikle Prof. Dr. İftihar KÖKSAL (KTÜ Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı) tarafından muayene edileceksiniz. Tedaviniz kapsamında florokinolon kullanmanız gerekiyor ise enfeksiyon hastalıkları servisine yatışınız gerçekleştirilecektir. Daha sonra tedavinizin bir parçası olarak, oral yolla kullandığınız florokinolonun ikinci ilaç uygulamasından hemen önce ve ikinci uygulamasından 2 saat sonra kolunuzdan 4 er mL kan alınacaktır (2 defa, toplam 8 mL, yaklaşık yarım yemek kaşığı). Buna ilaveten, ilk ilaç uygulamasından sonra sırasıyla 2., 4., 6., 8., 10. ve 12. saatlerde sizden steril ve dereceli idrar kaplarına 4 er mL idrar alınacaktır (6 defa, toplam 24 mL, yaklaşık 2 yemek kaşığı). Belirtilmelidir ki, sizden toplanan örnekler kullanılarak genetik veri incelemesi yapılmayacaktır. Yöntem geçerliliğinin kanıtlanmasının ardından, kalan idrar ve kan örnekleri tıbbi atık imha prosedürüne uygun olarak imha edilecektir.

Kan alma işlemi hastaneye başvurduğunuzda sıklıkla yapılan herhangi bir sağlık tetkiki için (örneğin kan şekeri tayini) yapılanın aynısı olup, tecrübeli sağlık personeli tarafından gerçekleştirilecektir. Fakat, kan alınırken iğne batması nedeniyle hafif bir acı duyabilirsiniz. Çok düşük bir ihtimal olsa da kan alırken veya kan aldıktan sonra iğne batırılan yerde kanamanın uzaması, kan damarının yırtılması sonucu kanın damar dışına çıkarak vücut boşluğuna akması ve deri altında koyu renkli geçici lekeler oluşması, damar içinde bir kan pıhtısının oluşması ve böylece kan akışını engellemesi, enfeksiyon, kol uyuşması, baş ağrısı, bayılma, tansiyon düşüklüğü, alerji, ödem ve iğne batırılan yerden bulaşarak enfeksiyon gelişmesi riskleri olabilir. Kan alma işlemi sırasında steril tek kullanımlık malzemeler kullanılacak olup bu yolla bir hastalık bulaşma riski yoktur. İşlemi gerçekleştirecek yetkili kişi bu risklerin farkında olup; bu risklerin gerçekleşmemesi için her türlü tedbir alınacaktır.

Araştırmaya katılmak zorunda olmadığınız gibi araştırmaya katılmayı kabul ettiğinizde, istediğiniz anda ayrılma hakkına da sahipsiniz. Ancak bu kararınızı bize önceden bildirirseniz araştırmanın bozulmasına meydan vermemiş olursunuz.

Ek 3 (Devam)

Araştırmadan elde edilen sonuçları talep etmeniz durumunda herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Bilgi edinmek istemiyorsanız lütfen yazılı formun altına belirtiniz.

Gönüllünün Beyanı

..... tarafından “**Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu İlaçların Biyolojik Sıvılardan Eş Zamanlı Tayini İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu**” isimli araştırma hakkında bana bilgi verildi. Araştırmanın amacı, uygulama biçimi ile riskleri ve bilgilerimle ilgili gizliliğin sağlanacağı konusunda yeterli açıklama yapıldı. Araştırma sırasında sorularım için Doç.Dr. Ahmet Yaşar (0505 226 83 03) ile temas edebileceğim bana bildirildi. İstedğim zaman araştırmadan çekilebileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım ile katılmaya olurum vardır.

Gönüllü

Adı Soyadı

Doğum Tarihi

Adres/Tel

İmza

Tanık

Adı Soyadı

Doğum Tarihi

Adres/Tel

İmza

Çalışmanın Yöneticisi:

Adı Soyadı : Doç. Dr. Ahmet YAŞAR

Adres/Tel : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 322 Nolu oda, Ortahisar/Trabzon

İmza :

Görüşme tarih ve saati:

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri,

Öğrenmek istiyorum ()

Öğrenmek istemiyorum ()

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : Yıldırım, Sercan
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri : 15.12.1991 İstanbul/Fatih
Telefon (İş) : 0462 377 88 46
E-Posta : sercanyildirim@ktu.edu.tr
Yazışma Adresi (İş) : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 222 Nolu Oda, Ortahisar/Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2014
Lise	Hasan Ali Yücel Anadolu Öğretmen Lisesi	2009

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2014-halen

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Analitik Kimya, Sıvı Kromatografisi

YAYINLAR

1. Yıldırım S, Kadioğlu A, Sağlam A, Yaşar A, Sellitepe HE (2016). Fast determination of anthocyanins and free pelargonidin in fruits, fruit juices, and fruit wines by high-performance liquid chromatography using a core-shell column. Journal of Separation Science 39: 3927-3935.

2. Yaşar A, Ulaş N, Yıldırım S (2016). Microwave assisted synthesis of 2'-/ 3'-azaflavones/azaflavonones and their N-alkyl derivatives. *Organic Communications* 4: 73-81.
3. Yıldırım S, Kadioğlu A, Sağlam A, Yaşar A (2017). Determination of phenolic acids and rutin in *Heliotropium thermophilum* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Instrumentation Science and Technology* 45: 35–48.
4. Barut EN, Barut B, Engin S, Yıldırım S, Yaşar A, Türkiş S, Özel A, Sezen FS (2017). Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of *Achillea millefolium*. *Turkish Journal of Biochemistry* 42: 493–502.
5. Yıldırım S, Yaşar A (2018). A Core-Shell Column Approach to Fast Determination of Synthetic Dyes in Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Analytical Methods* 11: 1581–1590.
6. Yıldırım S, Ulaş Çolak N, Yaşar A (2018). Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of donepezil in urine by HPLC using a core–shell column. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 41: 66–72.
7. Bekircan T, Yaşar A, Yıldırım S, Sökmen M, Sökmen A (2018). Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication, volatiles composition and rosmarinic acid content of *Thymus leucotrichus* Hal. shoots. *3 Biotech* 8: 1–9.
8. Çolak NU, Yıldırım S, Bozdeveci A, Yaylı N, Çoşkunçelebi K, Fandaklı S, Yaşar A (2018). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia staminea*. *Records of Natural Products* 12: 86–94.
9. Fandaklı S, Yaylı N, Kahriman N, Uzunalioglu E, Ulaş Çolak N, Yıldırım S, Yaşar A (2019). The Chemical Composition of Volatile Oil and Biological Activity of *Rhododendron caucasicum*. *Records of Natural Products* 13: 316–323.

BİLDİRİLER

1. Renda G, Sevgi S, Yaylı B, Yazıcı Bektaş N, Yıldırım S, Reis A (2015). Determination of phenolic compounds in five *Scrophularia* L. Species by HPLC-DAD and their

antimicrobial activity. ISOPS 11th International Symposium on Pharmaceutical Science, Ankara, 9-12 Haziran 2015, 378-379.

2. Özgen U, Aliyazicioğlu R, Şener SÖ, Badem M, Yildirim S, Ulaş N (2015). HPLC fingerprint analysis and quantification of phenolic compounds in some endemic *Cirsium* species. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 9-12 Haziran 2015, 389-390.
3. Barut B, Yildirim S, Özel A, Yaşar A (2015). Phenolic compounds and antioxidant activities of *lichen Pertusaria* sp. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 9-12 Haziran 2015, 206.
4. Yildirim S, Kadioğlu A, Sağlam A, Yaşar A (2016). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile *Heliotropium thermophilum*'da 13 fenolik asit ve rutin in eş zamanlı tayini. 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Isparta, 30 Mayıs - 3 Haziran 2016, 160.
5. Yildirim S, Kadioğlu A, Sağlam A, Yaşar A, Sellitepe HE (2016). Antosiyaninlerin core-shell kolon kullanılarak eş zamanlı kromatografik analizi. 16. Kromatografi Kongresi, Malatya, 31 Ağustos-2 Eylül 2016, 80.
6. Yaşar A, Ulaş Çolak N, Yildirim S (2016). DNA'nın ANT boyar maddesi ile boyanması. 16. Kromatografi Kongresi, Malatya, 31 Ağustos-2 Eylül 2016, 41.
7. Yildirim S, Yaşar A (2017). A core-shell column approach to fast determination of synthetic dyes in foodstuffs by high-performance liquid chromatography. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series, Ankara, 11-13 Ekim 2017, 371.
8. Yildirim S, Ulaş Çolak N, Yaşar A (2017). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of donepezil in urine by HPLC using a core-shell column. 3rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, Erzurum, 5-7 Ekim 2017, 82.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. -

HOBİLER

Gitar çalmak
Kitap okumak