

DEMET DINCEL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018



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

(DOKTORA TEZİ)

**BİYOLOJİK SIVILARDAN MEROPENEM'İN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE MİKTAR
TAYİNİ**

DEMET DİNCEL

**DANIŞMAN
PROF.DR. AHMET OLCAY SAĞIRLI**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**BİYOLOJİK SIVILARDAN MEROPENEM'İN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE MİKTAR
TAYİNİ**

DEMET DİNCEL

İKİNCİ DANIŞMAN: PROF.DR. GÜLAÇTI TOPÇU

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora öğrencisi Demet Dincel tarafından A. Olcay Sağırlı'nın danışmanlığında hazırlanan "Biyolojik Sıvılardan Meropenem'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Miktar Tayini" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 03/05/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sıdıka Toker

İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof. Dr. A. Olcay Sağırlı
İstanbul Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri

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



Jüri

Prof. Dr. Bedia Erim Berker
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Evrim Tekkeli
Bezmialem Vakıf Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

BEYAN

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

DEMET DİNCEL

İTHAF

Başta Babam ve Dayım olmak üzere mücadele etmeyi
bırakmayan tüm kişilere ithafen...

“ Yaşamak için mücadele şarttır!”

Gazi M. Kemal Atatürk

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca beni destekleyen, deneysel çalışmalarım için uygun ortam sağlayan, karşılaştığım zorluklar karşısında çözüm odaklı yaklaşımıyla beni cesaretlendiren, engin bilgi ve deneyiminden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Olcay SAĞIRLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca desteğini her zaman hissettiğim, doğal ürünler kimyası alanından farklı alanlarda da kendimi geliştirmem konusunda beni cesaretlendiren ve teşvik eden, akademik hayattaki başarısıyla bize her zaman örnek olan kıymetli eş danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneysel kısmında biyolojik örneklerin toplanması aşamasında yardımlarını esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan Şentürk ve Uzm. Dr. Elmas Biberici Keskin'e, Nöroloji Anabilim Dalında görevli Uzm. Dr. Çiğdem Deniz'e teşekkür ederim. Ayrıca bu süreçte yardımlarının yanı sıra manevi desteğini ve güler yüzünü eksik etmeyen sevgili arkadaşım Asistan Dr. Emine Mutlu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen, bu zorlu süreçte desteklerini her zaman hissettiğim iş arkadaşılığımızdan öte can dostlarım Arş. Gör. Dr. Burcu BÜTÜN, Arş. Gör. Tuba KUŞMAN, Arş. Gör. Gamze Ergin KIZILÇAY, Dr. Seda Damla HATİPOĞLU ve Uzm. Ecz. Esin ERÇİN'e ayrıca teşekkür ederim.

Dostluklarıyla her zaman yanımda olan, zorluklar karşısında beni teşvik eden ve hayatım boyunca yanımda olacaklarına inandığım pek kıymetli arkadaşlarım İpek ALŞAN, Mihriban KOÇ ve Seda DEMİRCİ'ye, ilgisini ve desteğini her zaman hissettiğim Esra H. KARAKULAK ve Nevhiz KAYA'ya, aynı yerde başladığımız bu uzun ve zorlu süreçte farklı yollarda ilerlesek de varlığını her daim hissettiğim Dr. Zeynep BEYAZKILIÇ'a teşekkür ederim.

Bugünün yaşanmasında en çok payı olan, hayatımın tüm evrelerinde olduğu gibi tez çalışmam boyunca da benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, yanımda olduklarını her zaman hissettiğim sevgili annem G. Sabiha DİNCEL, sevgili babam Mustafa DİNCEL ve sevgili kardeşim Serdar DİNCEL'e, sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim başta aile büyüklerimiz anneannem ve dedem olmak üzere, teyzelerim, dayılarım, kuzenlerim ve tüm geniş aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:3450



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XIII
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meropenem trihidrat	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojisi	6
2.1.3. Meropenem İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri	9
2.1.3.1. Avrupa Farmakopesine Göre Analiz Yöntemi.....	9
2.1.3.2. Spektrofotometrik Yöntemle Farmasötik Preparat Analizi.....	10
2.1.3.3. HPLC ile Farmasötik Preparat Analizi	12
2.1.3.4. HPLC ile Biyolojik Sıvı Analizi	13
2.1.3.5. Diğer Yöntemler.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	23
3.1.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler	23
3.1.2. Çözeltiler.....	23
3.1.2.1. Hareketli Faz Çözeltileri	25
3.1.2.2. Meropenem trihidrat Ana Stok Çözeltisi	25
3.1.2.3. İç Standart Çözeltisinin Hazırlanması.....	26
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	26
3.3. Meropenem'in Biyolojik Sıvılardan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi.....	27

3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	27
3.3.2. İç Standart Denemeleri.....	28
3.3.3. Serumdan Meropenem'in Ekstre Edilmesi İşlemi	28
3.3.4. Serumdan Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	34
3.3.5. Geri Kazanım Oranı	35
3.4. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Kriterleri	35
3.4.1. Seçicilik.....	35
3.4.2. Doğrusallık.....	36
3.4.3. Doğruluk	36
3.4.4. Kesinlik	36
3.4.5. Gözlenebilme Sınırı	37
3.4.6. Tayin Sınırı	38
3.4.7. Stabilitate	38
3.5. Serumdan Meropenem Miktar Tayini ve Uygulaması.....	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. Meropenem'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Tayini	40
4.1.1. Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi	40
4.1.2. İç Standart Seçimi	40
4.1.3. Serumdan Ekstraksiyon İşlemi.....	41
4.1.4. Serumdan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi	43
4.1.5. Geliştirilen Yöntemin Geri Kazanım Oranı	44
4.2. Yöntemin Validasyonu	45
4.2.1. Seçicilik.....	45
4.2.2. Doğrusallık.....	47
4.2.3. Doğruluk	47
4.2.4. Kesinlik	48
4.2.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	49
4.2.6. Stabilitate	49
4.3. Serumda Meropenem Miktar Tayini ve Uygulaması.....	50
5. TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	57
HAM VERİLER	62
ETİK KURUL KARARI	66

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	67
ÖZGEÇMİŞ	68



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Meropenem'in IR spektrumuna ait veriler.....	6
Tablo 4-1: Hareketli fazın gradient programlaması.....	40
Tablo 4-2: Elde edilen verim değerleri ve çözücü sistemleri	41
Tablo 4-3: Meropenem'in 0,2-60 µg/250 µL konsantrasyon aralığında katkılı serumda hazırlanan ölçü eğrisine ait pik alan oranları ve istatistiksel verileri	43
Tablo 4-4: Tablo 4-3'de verilen ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	44
Tablo 4-5: Meropenem'in serumdan geri kazanım oranı	45
Tablo 4-6: Serumda doğruluk değerleri.....	47
Tablo 4-7: Aynı gün içinde yapılan serumda yapılan Meropenem analizlerinin tekrarlanabilirliği	48
Tablo 4-8: Farklı günlerde yapılan serumda yapılan Meropenem analizlerinin tekrarlanabilirliği	48
Tablo 4-9: 4 °C' de karanlıkta bekletilen standart Meropenem çözeltilerinin stabilitesi	49
Tablo 4-10: Serum örneklerinde Meropenem'in stabilitesi	49
Tablo 4-11: Hasta 2-5'e ait Serumda Bulunan Meropenem Konsantrasyon Değerleri ..	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Meropenem trihidrat'ın molekül yapısı.	3
Şekil 2-2: 30 µg/mL konsantrasyonundaki Meropenem'in metanol çözeltisindeki UV spektrumu.....	4
Şekil 2-3: Meropenem'in IR spektrumu.	5
Şekil 4-1: Doripenem'in molekül yapısı.....	41
Şekil 4-2: Serumdan Ekstraksiyon İşlemi.....	42
Şekil 4-3: Meropenem'in 0,2-60 µg/250 µL konsantrasyon aralığında katkılı serumda hazırlanan ölçü eğrisi.	44
Şekil 4-4: Boş serum örneğine ait kromatogram.	45
Şekil 4-5: 30 µg iç standart ve 50 µg Meropenem katkılı serum örneğine ait kromatogram.	46
Şekil 4-6 : 30 µg/mL Doripenem standart çözeltisinin pik saflığı.....	46
Şekil 4-7: 50 µg/mL Meropenem standart çözeltisinin pik saflığı.	46
Şekil 4-8: 50 µg Meropenem katkılı serum örneğindeki Meropenem pik saflığı.....	47
Şekil 4-9 : H-1'e ait zaman-konsantrasyon ilişkisi.	50

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	: Tandem Kütle Spektrometrik Sıvı Kromatografisi
UPLC-MS/MS	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektroskopisi
MS	: Kütle Spektrometrisi
DAD	: Diyot Sıralı Dedektör
UV	: Ultraviyole (Mor ötesi)
IS	: İç standart
SPE	: Katı-Faz Ekstraksiyonu
HCl	: Hidroklorik asit
MeCN	: Asetonitril
MeOH	: Metanol
DHP-1	: Dehidropeptidaz-1
PBP	: Protein Bağlayıcı Proteinler
HILIC	: Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
AUC	: Eğri altında kalan alan
TEA	: Trietilamin
mM	: Milimolar
dk	: Dakika
v	: Hacim
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre

μL	: Mikrolitre
C	: Konsantrasyon
C_{max}	: Maksimum plazma konsantrasyonu
$\bar{A}$	: Pik alanları ortalaması
A	: Pik alanı
SD	: Standart sapma
RSD	: Bağlı standart sapma
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
SVH	: Serebrovasküler Hastalık
CA	:Kanser
H-1:	: Hasta-1
H-2:	: Hasta-2
H-3:	: Hasta-3
H-4:	: Hasta-4
H-5:	: Hasta-5

ÖZET

Dincel, D. (2018). Biyolojik Sıvılardan Meropenem'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD, Doktora Tezi. İstanbul.

Meropenem, parenteral olarak kullanılan ve insanlardaki dehidropeptidaz-1'e (DHP-1) karşı relatif olarak stabil olan bir karbapenem antibiyotiktir. Bundan dolayı DHP-1 inhibitörü ilavesine gerek yoktur. Meropenem, yaşamsal önem taşıyan bakteri duvarı sentezini bozarak bakterisid etki gösterir.

Bu tez çalışmasında çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan Meropenem'in insan serumundan kantitatif tayini için seçici ve hassas yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde sabit faz olarak 30°C sıcaklıkta C18 kolon (3,9 x 150 mm; 5 µm), metanol: asetik asit çözücü karışımı hareketli faz olarak kullanılmış ve gradient programlama uygulanmıştır. Ayrım 1 mL/dk akış hızında ve 300 nm dalga boyunda DAD (diyot sıralı dedektör) dedektörle gerçekleştirilmiştir. Meropenem'in serumdan ekstraksiyonu için o-fosforik asit: metanol çözücü karışımı ve iç standart olarak Doripenem kullanılmıştır. Katkılı serum örneklerinde konsantrasyona karşılık gelen pik alan oranları kullanılarak elde edilen ölçü eğrisi 0,2-60 µg/250µL konsantrasyon aralığında hazırlanmış, tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı sırasıyla 0,3 ve 0,08 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin klinik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, farklı enfeksiyonlara sahip hasta gönüllülerin 1000 mg ilacı intravenöz olarak almalarının ardından farklı saat aralıklarında serum örnekleri toplanmış ve Meropenem'in terapötik ilaç monitörizasyonu incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karbapenem, Meropenem, HPLC, Validasyon, TİM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3450

ABSTRACT

Dincel, D. (2018). A High Performance Liquid Chromatography Method for the Quantitative Determination of Meropenem in Biological Fluids. İstanbul University, Institute of Health Science, Analytical Chemistry. PhD Thesis. İstanbul.

Meropenem is a carbapenem antibiotic that is relatively stable against dehydropeptidase-1 in humans and used parenterally. For this reason, there is no need to add DHP-1 inhibitor. Meropenem, bacterial wall synthesis exerts a bactericidal action by disrupting vital.

In this study, a new, selective and sensitive high performance liquid chromatographic method has been developed and validated for the quantitative determination of Meropenem, is used in the treatment of various infections, in human serum. In the developed method, C18 column (3,9 x 150 mm; 5 µm) was selected as stationary phase at 30°C and methanol: acetic acid solution mixture was used as mobile phase with gradient programme. Chromatographic separation was carried out at a flow rate of 1 mL/min and detection was performed at 300 nm with DAD (diode array detector) detector. Doripenem was selected as an internal standard and ortho-phosphoric acid: methanol solution mixture was used for the extraction from serum samples of Meropenem. Calibration curve of spiked serum samples was achieved by plotting the ratio of concentration versus peak areas in concentration range of 0,2-60 µg/250 µL and LOD and LOQ values were found as 0,08 ve 0,3 µg/mL, respectively. In order to test the clinical applicability of this method, the patient volunteers with different infections after taking 1000 mg of intravenous drug, serum samples were collected at different time intervals and therapeutic drug monitoring of Meropenem has been investigated.

Key Words: Carbapenems, Meropenem, HPLC, Validation, TDM

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 3450

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakteri, tek başına bir hücreden oluşan, yaşayan küçük bir organizmadır ve insan vücudu, hava, su, toprak veya herhangi bir ortamda kendi kendine hayatta kalabilmekte ve çok hızlı üreyebilmektedirler. Bakterilerin neden olduğu enfeksiyon hastalıkları tüm dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen hastalıklar arasındadır. Gıda ve cinsel yol ile bulaşan enfeksiyonlar ve akut solunum yolu enfeksiyonları başta olmak üzere enfeksiyon hastalıkları tüm dünyada en önemli mortalite ve morbitide nedenleri arasında yer almakta ve bu hastalıkların tedavisi de oldukça önem kazanmaktadır. Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve insan sağlığı açısından çok büyük öneme sahip ilaç grubudur. Antibiyotikler, bazı bakterilerden ama çoğunlukla mantarlardan elde edilen, çok küçük dozlarda bile insana verildiğinde diğer bakteriler üzerinde öldürücü ya da üremelerini engelleyici etki gösteren, buna karşın insana zararı hiç olmayan veya çok az olan (seçici toksik etki) ilaçlardır. Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre bakteriyostatik ve bakterisid olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Bakteri hücrelerini dolaysız yok eden bakterisid grubu antibiyotikler; beta laktamlar, beta laktamaz inhibitörleri, polipeptidleri ve florokinonları kapsar (1).

Beta-laktam grubu antibiyotikler, günümüzde en yaygın kullanılan ve "beta-laktam" halkası olarak adlandırılan ortak kimyasal molekülleri ile diğer antibiyotiklerden ayırdedilmektedirler. Günümüzde birçok çeşidi bulunan beta-laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapılarına bakıldığında temelde 4 grupta toplandığı görülmektedir. Bunlar; Penisilin grubu beta-laktam antibiyotikler, Sefalosporin grubu beta-laktam antibiyotikler, Karbapenemler ve Monobaktam grubu beta-laktam antibiyotiklerdir (2).

Beta-laktamlar, gösterdikleri üstün etki spektrumları, mikroorganizmalar için yüksek ve seçici toksisiteleri, neredeyse tüm yaş gruplarında uygulanabilir olmaları, diğer gruplara göre relatif olarak düşük yan etkileri nedeniyle günümüzde en çok reçete edilen antibiyotikler arasındadır (3). Karbapenemler, β -laktam sınıfının, etkinlik spektrumu en geniş olan üyeleridir. Bu grupta İmipenem, Meropenem, Ertapenem ve Doripenem bulunur. Bu antibiyotikler çoğu kez intravenöz yoldan verilir ve kombinasyon halinde kullanılırlar (4). İlk bulunan ajan ise İmipenemdir. 1996 yılında karbapenem grubunun ikinci üyesi olan Meropenem, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve kullanıma girmiştir (5). Meropenem ultra geniş spektrumlu antibakteriyel

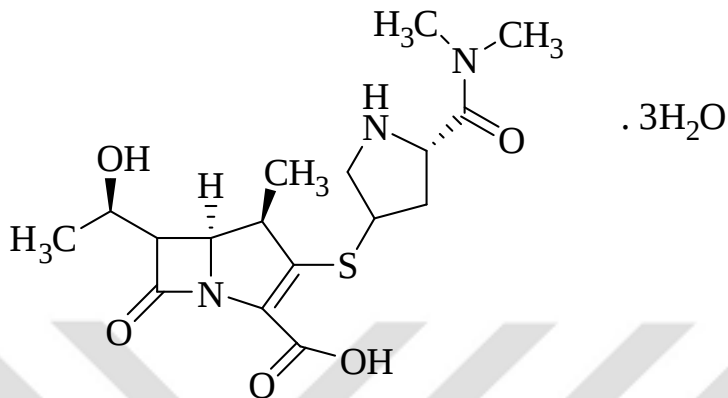
aktiviteye sahip olması nedeniyle Gram-pozitif ve Gram-negatif dahil olmak üzere klinik olarak önemli olan pek çok aerobik ve anaerobik bakterilere karşı son derece etkilidir (6). İntramüsküler uygulamalar tek veya birden fazla bakterilerin neden olduğu kronik bronşitin akut bakteriyel alevlenmeleri ve komplikasyonsuz idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde; intravenöz uygulamalar pnömoniler (hastanede edinilmiş pnömoniler dahil), idrar yolu enfeksiyonları, intra-abdominal enfeksiyonlar, endometrit ve pelvik enflamatuvar hastalıklar gibi jinekolojik enfeksiyonlar ve deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, menenjit ve sepsiseminin tedavisinde endikedir.

Meropenem'in biyolojik sıvılardan tayini için bugüne kadar literatürde yer alan çalışmalar (7) yöntemin pahalılığı, örnek hazırlama basamaklarının ve tayin süresinin uzun olması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu tez çalışmasında amaç, Meropenem'in biyolojik sıvılardan tespiti için örnek hazırlama basamaklarını, çözücü ve zaman kaybını en aza indireyecek hızlı, basit ve düşük maliyetli yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmektir. Bunun için Meropenem'in serumdan yüksek verimle ekstraksiyonu için uygun örnek hazırlama metoduna dayanan seçici ve hassas bir HPLC yöntemi belirlendikten sonra çeşitli enfeksiyonlara sahip hastalardan alınan serum örneklerine uygulanması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meropenem trihidrat

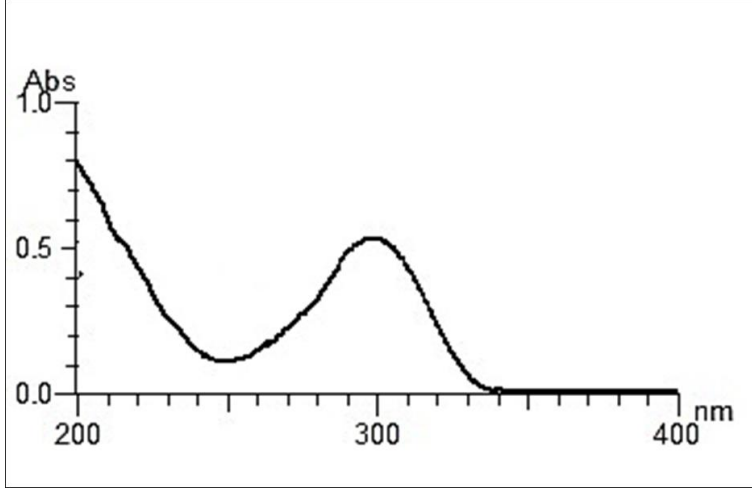
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1: Meropenem trihidrat'ın molekül yapısı.

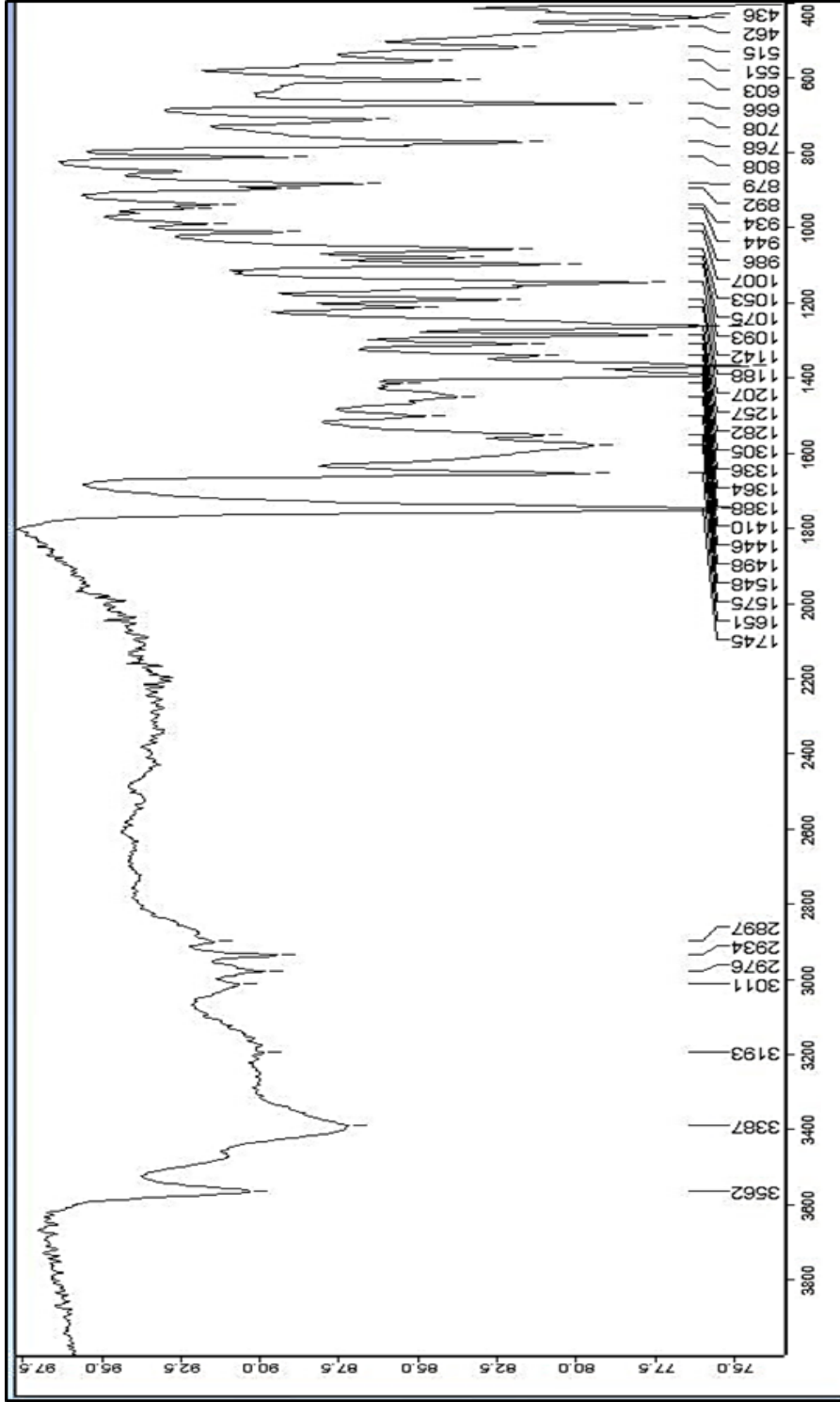
Meropenem trihidrat'ın kimyasal adı (4R,5S,6S)-3-[[[(3S,5S)-5-[(Dimetilamino) karbonil]-3-pirolidinil]tiyo]-6-[(1R)-1-hidroksietil]-4-metil-7-okso-1-azabisiklo[3.2.0] hept-2-ene-2-karboksilik asit trihidrattır (8) (Şekil 2-1). Kapalı formülü $C_{17}H_{25}N_3O_5S$ [$C_{17}H_{25}N_3O_5S \cdot 3H_2O$] olan Meropenem'in molekül ağırlığı 383,464 g/mol, trihidrat olarak ise molekül ağırlığı 437,52 g/mol'dür. Karboksil grubunun ve pirolidinil halkasındaki sekonder amin grubunun sırayla pK_a değerleri 2,9 ve 7,4; izoelektrik noktası ise 5,5'tir. Elementel analiz değerleri C: % 53,25, H: % 6,57, N: % 10,96, O: % 20,86, S: % 8,36'dır (8). Beyaz ve kirli beyaz arası değişen renkte kristalize toz halinde bir bileşiktir. İlk kez 1998 yılında sentezlenmiştir (9). Meropenem, dimetilsülfoksit, dimetil formamid ve % 5'lik potasyum dihidrojen fosfat (monobazik fosfat) çözeltisinde, diklorometanda ve metanolde iyi derecede çözünür, aseton veya eterde çözünmez (10). Meropenem'in erime noktasını tayin etmek zordur, çünkü bozunma ve renk değişimi erime olayından önce başlar. Meropenem trihidrat, parenteral olarak klinik kullanımında çözünürlüğünü artırmak için susuz sodyum karbonat ile karıştırılmaktadır (11, 12).

Meropenem'in 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda metanol çözeltisindeki UV spektrumu Şekil 2-2'de verilmiştir.



Şekil 2-2: 30 µg/mL konsantrasyonundaki Meropenem'in metanol çözeltisindeki UV spektrumu.

Meropenem'in Şekil 2-3'de verilen IR spektrumuna bakıldığında 3562 cm^{-1} 'de OH gerilmesini, 3387 cm^{-1} 'de pirolidin halkasına ait NH gerilmesini, beta laktam halkasında ve pirolidin halkasında yer alan CH gerilmeleri 2934 , 2897 ve 2976 cm^{-1} 'de, karboksilik asite ait C=O gerilmesi 1745 cm^{-1} 'de, halkada yer alan karbonil grubuna ait C=O gerilmesi 1651 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ayrıca IR spektrumuna ait veriler Tablo 2-1'de verilmiştir.



Şekil 2-3: Meropenem'in IR spektrumu.

Tablo 2-1: Meropenem'in IR spektrumuna ait veriler

Bağ	Dalga sayısı, cm ⁻¹
OH gerilme	3562
NH gerilme	3387
C-H gerilme	2934
C-H gerilme	2897
C-H gerilme	2976
C=O gerilme	1745
C=O gerilme	1651

2.1.2. Farmakolojisi

Meropenem, intravenöz yoldan kullanılan karbapenem yapılı yarı sentetik bir antibiyotiktir. 1986'dan bu yana kullanımda olan karbapenemler, beta-laktam antibiyotik grubunun en geniş spektrumlu üyeleridir (13). Tüm beta-laktam antibiyotikler; bakterilerde hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) transpeptidaz aktivitesini bloke ederek peptidoglikan sentezini engellemek suretiyle etki ederler. Sonuçta bu durum hücre duvarı sentezi yapılamayan bakterinin ozmotik direnç kaybına ve ölümüne neden olmaktadır (14). β -laktam antibiyotikler, penisilin klinik uygulamaya girdiği 1940'lardan beri çeşitli enfeksiyonların tedavisinde gittikçe artan miktarlarda kullanılmaktadır. Karbapenemler, β -laktam sınıfının, etkinlik spektrumu en geniş olan üyeleridir. Gittikçe daha sık karşılaşılan çoğul dirençli bakteri enfeksiyonları, karbapenemlere duyulan gereksinimi daha da artırmaktadır (15).

Karbapenemler hem plazmid kökenli hem de kromozom kökenli beta-laktamazlara dayanıklıdır. Ancak son dönemlerde karbapenemleri parçalayan metallo-beta-laktamaz ve serin karbapenemazların ortaya çıkışı endişe uyandırmaktadır (16, 17).

Etkinlikleri genel olarak şu mikroorganizmaları kapsamaktadırlar (18, 19):

- Gram negatif mikroorganizmalar (beta-laktamaz üreten *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas aeruginosa* genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten mikroorganizmalar dahil)
- Anaeroblar (*Bacteroides fragilis* dahil)
- Gram pozitif organizmalar (*Enterococcus faecalis* ve *Listeria* dahil)

Karbapenemler ciddi *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde bir aminoglikozit ile kombine edilmelidirler. Nedeni bilinmeyen ciddi enfeksiyonlarda, metisiline dirençli

stafilokok olasılığının yüksek olduğu durumlarda glikopeptidlerle kombine edilebilirler. Karbapenemlerin antianaerop etkinlikleri çok iyi olduğundan anaerop enfeksiyon düşünülen durumlarda yanına bir antianaerop ajan eklemenin hiçbir gereği ve yararı yoktur. Çok geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği ile karbapenemler, ağır enfeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler içinde oldukça değerlidir (20).

“Karbapenem” terimi penisilin laktam halkasının 4:5 pozisyonundan kaynaşmış, C-2 ile C-3 arasında çifte bağ içeren fakat C-1’de sülfür yerine karbon içeren yapıları için kullanılır. Karbapenemler ilk olarak “*Streptomyces cattleya*” tarafından üretilen ve “tienamisin” adı verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilen türevleridir (21, 22). Tienamisin ilk karbapenem olduğu için zamanla bütün karbapenemlere bir model bileşik olarak görev yapacaktır (23). Belirgin bir şekilde, Tienamisin kuvvetli ve geniş spektrumlu antibakteriyel ve beta laktamaz inhibitörü aktivitesi göstermiştir. Tienamisin “doğal bir ürün” olmasına rağmen, biyosentetik olarak elde edileceği yol bellidir, fakat saflaştırma işleminin verimi düşüktür. Zamanla, Tienamisin’in sentetik olarak hazırlanması büyük önem kazanmakta olup, özellikle önemli bir türevi olan İmipenem keşfedilmiştir (23). İlk bulunan üye İmipenem’den sonra 1996 yılı itibarıyla karbapenem grubunun ikinci üyesi olan Meropenem kullanıma girmiştir. Meropenem, karbapenem halkasına 1-β-metil grubu eklenerek elde edilmiştir. Meropenem, karbapenemlerin kimyasal yapısını daha ileriye taşıyan bir gelişme sunmuştur. Molekül yapısında yer alan 1β-metil substituenti dehidropeptidaz-1’e karşı bağıl dayanıklılık sağlar. Bu sebeple İmipenem-Silastatin’de olduğu gibi bir renal enzim inhibitörü ile kombine olarak verilmesi gerekmez (20, 24).

Meropenem, Tienamisin’in dimetilkarbamoil türevidir. Renal dihidropeptidaza dayanıklı olduğu için İmipenem’den farklı olarak tek başına paranteral kullanılır. Farmakolojik özellikleri ve antibakteriyel spektrumu İmipenem’inkine benzer. Etki alanları arasında belirgin bir fark yoktur. Genel olarak Meropenem’in Gram-pozitif bakterilere karşı etkisi İmipenem’e kıyasla daha düşük buna karşılık Gram-negatiflere etkinliği biraz daha fazladır. Erişkin dozu intramusküler enjeksiyon veya intravenöz enjeksiyon ya da infüzyonla 8 saatte bir 0,5 g ve ağır enfeksiyonlarda 1 g’dır. Pediatrik dozu 6-8 saatte bir 10-20 mg/kg’dır. İmipenem’e göre daha az yan tesir yapar. Konvülsiyon yapıcı etkisi çok daha düşüktür. Bu nedenle renal yetmezliği veya santral nörolojik sorunlu hastalarda tercih

edilecek karbapenem türevidir (25). 2001 yılında Ertapenem ve daha sonra Doripenemin ve diğer üyelerin gruba dahil olması ile karbapenem grubu genişleme göstermiştir. İmipenem erişkinlerde günde 4 kez (6 saat aralıklarla) 0.5 g olarak kullanılmaktadır. Çok ciddi infeksiyonlarda günlük maksimum 4x1 g'a çıkılabilir. Meropenem ise 8 saatte bir 1 g kullanılır. Maksimum dozu 3x2 g'dır. En önemli yan etkileri bulantı-kusma gibi gastrointestinal sistemde görülen etkilerdir.

Meropenem, yetişkinlerde ve çocuklarda (≥ 3 ay)'e bir veya birden fazla bakterinin neden olduğu pnömoniler ve nozokomiyal pnömoniler, idrar yolu enfeksiyonları, intra-abdominal enfeksiyonlar, endometrit ve pelvik enflamatuvar hastalıklar gibi jinekolojik enfeksiyonlar, deri ve deri yapısına ait enfeksiyonlar, menenjit, sepsis, febril nötropeni olan yetişkin hastalardaki enfeksiyonların tedavisinde endikedir.

Meropenem, parenteral olarak kullanılan ve insanlardaki dehidropeptidaz-1'e karşı relatif olarak stabil olan bir karbapenem antibiyotiktir. Bundan dolayı dehidropeptidaz-1 (DHP-1) inhibitörü ilavesine gerek yoktur. Meropenem, yaşamsal önem taşıyan bakteri duvarı sentezini bozarak bakterisid etki gösterir. Bakteri hücre duvarından kolayca penetre olabilmesi, bütün serin β -laktamlara yüksek düzeyde stabilize göstermesi ve Penisillin Bağlayıcı Proteinlere (PBP) belirgin affinitesi, Meropenem'in geniş bir aerobik ve anaerobik bakteri spektrumuna karşı güçlü bakterisid etkisini açıklar. Minimum bakterisid konsantrasyonları çoğunlukla minimum inhibitör konsantrasyonları ile aynıdır. Bakteri testlerinin %76'sında, MBC:MIC oranları 2 veya daha azdır.

Meropenem duyarlılık testlerinde stabildir ve bu testler normal rutin metodlarla yürütülebilir. *In vitro* testler, Meropenem'in çeşitli antibiyotiklerle sinerjik etkili olduğunu göstermiştir. *In vitro* ve *in vivo* testlerle Meropenem'in post-antibiyotik etkili olduğu tespit edilmiştir. Meropenem'in *in vitro* antibakteriyel spektrumu klinik olarak önemli olan Gram pozitif ve Gram negatif, aerobik-anaerobik bakteri suşlarının büyük bir kısmını kapsar.

Meropenem'in sağlıklı deneklerde, tek dozunun 30 dakikalık intravenöz infüzyon sonucu pik plazma seviyeleri; 250 mg doz için 11 μ g/ml, 500 mg için 23 μ g/ml ve 1 g için 49 μ g/ml civarındadır. Buna rağmen uygulanan doz ile hem maksimum plazma konsantrasyonu (C_{max}) hem de eğri altında kalan alan (AUC) arasında kesin bir farmakokinetik orantı yoktur. Ayrıca 250 mg ile 2 g doz aralığında plazma klirensinde 287 ml/dakikadan 205 ml dakikaya bir düşüş gözlenmiştir.

Meropenem'in sağlıklı deneklerde 5 dakikalık intravenöz bolus enjeksiyon ile uygulanması sonucu pik plazma seviyeleri 500 mg doz için 52 µg/ml ve 1 g'lık doz için 112 µg/ml'dir. 1 g Meropenem'in 2 dakika, 3 dakika ve 5 dakikalık intravenöz infüzyonları üçlü, çapraz çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Bu sürelerdeki infüzyonlar, sırasıyla 110, 91 ve 94 µg/ml pik plazma seviyeleri ile sonuçlanmıştır. 500 mg'lık intravenöz (IV) doz uygulamasından 6 saat sonra meropenem plazma seviyeleri 1 µg/ml veya bunun daha altındaki değerlere düşmüştür.

Böbrek fonksiyonları normal olan deneklerde 8 saatlik aralıkla çoğul doz uygulaması sonucu meropenem birikmesi olmamış ve Meropenem'in yarı ömrü yaklaşık 1,5 saat olarak belirlenmiştir. 12 saatte, uygulanan dozun yaklaşık % 70'i idrarla değişmeden atılır. Bu süreden sonra idrarla Meropenem atılımı son derece azdır. 500 mg'lık dozun uygulanmasından 5 saat sonra Meropenem'in üriner konsantrasyonları 10 µg/ml üzerinde bulunmuştur. Böbrek fonksiyonları normal olan deneklerde her 8 saatte bir 500 mg veya her 6 saatte bir 1000 mg'lık doz uygulanması sonucu plazma veya idrarda herhangi bir birikme oluşmamıştır. Böbrek yetmezliği olan hastalarda yapılan farmakokinetik çalışmaları, Meropenem'in plazma klirensinin, kreatinin klirensiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sebeple, böbrek bozukluğu olan hastalarda doz ayarlaması gereklidir.

Meropenem, bakteriyel menenjitli olan hastaların vücut sıvılarının (beyin-omurilik sıvısı da dahil) ve dokularının çoğuna iyi penetre olur ve bakterilerin çoğunu inhibe etmek için gerekenden yüksek konsantrasyonlara ulaşır (26). Meropenem, çocuklarda menenjitte dahil olmak üzere kullanımı onaylanmış tek karbapenemdir. Menenjit dışındaki endikasyonlar için imipenem-silastatin ve meropenemi karşılaştıran çalışmalara bakıldığında bu antibiyotiklerin yalnız ya da kombinasyonlar halinde bulunmasının etkinlik ya da güvenlik açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak son analizler Meropenem'in etkinliği ve güvenilirliğinin İmipenem-Silastatin' den daha iyi olduğunu göstermektedir.

2.1.3. Meropenem İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. Avrupa Farmakopesine Göre Analiz Yöntemi

Avrupa Farmakopesinde yer alan Meropenem'in HPLC ile analiz metodu aşağıda anlatıldığı gibidir (27).

Çözücü Karışımı: 1 mL trietilamin'in (TEA) üzerine 900 mL saf su eklenir ve pH=5 olacak şekilde fosforik asitle seyreltilerek hacmi 1000 mL'ye tamamlanır.

Örnek Çözelti A: 0,1 g madde çözücü karışımıyla çözünerek hacmi 25 mL'ye seyreltilir.

Örnek Çözelti B: 50 mg madde çözücü karışımıyla çözünerek hacmi 100 mL'ye seyreltilir.

Standart Çözelti A: 1 mL örnek çözelti A'dan alınarak çözücü karışımıyla seyreltilir ve hacmi 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözeltiden de 1 mL alınarak çözücü karışımıyla seyreltilerek hacmi 10 mL'ye tamamlanır.

Standart Çözelti B: Safsızlık A ve B'yi yerinde tespit edebilmek amacıyla örnek çözelti A'dan 10 mL alınarak 60°C'ye kadar 20 dakika boyunca ısıtılır ya da başka bir alternatif olarak 10 mL alınarak 8 saat boyunca ortam sıcaklığında bekletilir.

Standart Çözelti C: 50 mg Meropenem trihidrat hareketli fazda çözünerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Kromatografik sistem parametreleri:

Kolon: C18, 250 mm x 4.6 mm, 5µm

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Hareketli faz: Asetonitril: Çözücü karışımı (7:100)

Akış hızı: 1,6 mL/dk

Dedektör dalga boyu: 220 nm

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Yöntem: Hazırlanan standart çözeltiler ve örnek çözeltiler HPLC cihazında analiz edilir. Meropenem'in alıkonma zamanı 6 dk, safsızlık A ve B'nin alıkonma zamanı ise sırayla 0,5 ve 2,2 dakika olarak tespit edilmiştir. Analiz süresi 24 dakika'dır.

2.1.3.2. Spektrofotometrik Yöntemle Farmasötik Preparat Analizi

Homoda ve arkadaşları İmipenem, Meropenem ve Ertapenem'in farmasötik formülasyonlardan tayini için spektrofotometrik tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Bu metot, tris (o-fenantrolin)-demir (II) ya da tris(bipridil)-demir (II) şelatlarının oluşturulmasıyla farklı karbapenem türevleri ile karşılık gelen Fe III komplekslerinin indirgenmesi

prensibine dayanır. Demir III (Fe III)'e yükseltgeyici ve Demir II (Fe II)'ye indirgeyici ajanlar olarak sırayla 1,10-fenantrolin (Phen) ile 2,2''-bipridil (Bip) kullanılmıştır. Seçici şelat oluşturunca 1,10-fenantrolin (Phen) ile 2,2''-bipridil (Bip) gibi ajanlar kullanılarak serbest Fe II konsantrasyonu tayin edilebilmektedir. Karbapenemlerin tayini için kalibrasyon eğrisi 0,2-10 µg/mL aralığı lineer olarak bulunmuştur. 1,10-fenantrolin kullanılan metotta Meropenem için geri kazanım % 99,8 iken, 2,2''-bipridil kullanılan metotta ise % 101,7 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar karbapenemlerin farmasötik preparatlardan rutin kalite kontrol analizleri için uygulanabilir olduğunu göstermiştir (28).

Singh ve arkadaşları Meropenem ve Doripenem'in farmasötik dozaj formlarından tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirerek valide etmişlerdir. Metotun esas Fe (III)'ün karbapenemlerle girdiği reaksiyon sonucu Fe (II)'ye indirgenmesi ve oluşan bu Fe (II)'nin hekzasiyonaferat, 1,10-fenantrolin ve 2,2'-bipridil ile oluşturduğu renkli (prusya mavisi ve kırmızı) komplekslere dayanır. Her bir kompleksin olduğu yöntem için Meropenem'in LOD değerleri sırayla 1,73, 0,65, 0,86 µg/mL olarak LOQ değerleri ise yine sırayla 5,28, 1,97, 2,61 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Doripenem ve Meropenem'in saf formlarından ve farmasötik formülasyonlardan tayini için oldukça uygun bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Meropenem tayini için en hassas yöntemin Fe (II)'nin hekzasiyonaferat ile oluşturduğu prusya mavisi kompleksi olduğu belirtilmiştir (29).

Mendez ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in farmasötik dozaj formlarından tayini için UV spektrofotometrik ve HPLC yöntemi geliştirerek Uluslar arası Harmonizasyon Konferansına (ICH) göre valide etmişlerdir. UV spektrofotometrik metotta 5-35 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan Meropenem'in sudaki çözeltisi 298 nm dalga boyunda ölçülmüştür. HPLC yönteminde ise, sabit faz olarak RP C18 kolon (250 x 4,0 mm; 5 µm) hareketli faz olarak da o-fosforik asit ile pH=3'e ayarlanarak hazırlanan 30 mM fosfat tamponu: asetonitril (90:10; h/h) karışımı kullanılmıştır. UV dedektörle 298 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 10-70 µg/mL aralığı lineer olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4,24 ve 12,85 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin geri kazanımı % 99,72 olarak tespit edilmiştir. Her iki yönteminde rutin ilaç analizlerinde kolayca uygulanabilen yöntemler olduğu bildirilmiştir (30).

Marwada ve arkadaşları Meropenem'in ve Sulbaktam'ın farmasötik dozaj formlarından eş zamanlı tayini için UV spektrofotometrik ve HPLC yöntemi geliştirerek ICH'ye göre valide etmişlerdir. UV spektrofotometrik yöntemde Meropenem için kalibrasyon eğrisi aralığı 4-24 µg/mL olarak belirlenirken geri kazanım oranı % 98,52 olarak tespit edilmiştir. HPLC yönteminde ise, sabit faz olarak BDS C18 kolon (250 x 4,6 mm; 5 µm) hareketli faz olarak da metanol:asetonitril:su (10:20:70; h/h) karışımı kullanılmıştır. Ayırım 1 mL/dk akış hızında UV dedektörle 220 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Meropenem için 50-250 µg/mL aralığı lineer olarak bulunmuştur. Geri kazanım ise % 98,85 olarak tespit edilmiştir. Farmasötik dozaj formlara uygulandığında geliştirilen yöntemin yardımcı herhangi maddelerle girişim yapmadığı belirlenmiştir (31).

2.1.3.3. HPLC ile Farmasötik Preparat Analizi

Piontek ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem ve Ertapenem'in farmasötik preparatlardan tayini ve stabilitelerinin karşılaştırılması için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Meropenem tayini için Sabit faz olarak ters faz C18 kolon (5 µm, 250 mm x 4 mm), asetonitril-amonyum asetat (8:92; h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Ayırım 1.2 mL/dk akış hızında, 298 nm dalga boyunda UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Ertapenem ve Meropenem'in bozunma sırasındaki birinci dereceden hız sabitleri artan sıcaklıkta kuru havada, artan sıcaklık ve bağıl nem oranıyla ve sabit sıcaklıkta artan bağıl nem oranıyla olmak üzere 3 farklı şekilde tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Meropenem artan sıcaklıkta 363-393°K aralığında kuru havada daha fazla bozunurken Ertapenem'in bu sıcaklık aralığında bozunması daha yavaştır. Bununla birlikte nemin bu antibiyotiklerin bozunmasını etkileyen önemli bir faktör olduğu da tespit edilmiştir (32).

Ozkan ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in farmasötik dozaj formlarından, insan serum ve idrarından tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sefepim'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak ters faz C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) hareketli faz olarak da 15 mm KH₂PO₄ : asetonitril: metanol (84:12:4; h/h) karışımı H₃PO₄ ile pH=2,8'e ayarlanarak kullanılmıştır. Ayırım 1,0 mL/dk akış hızında UV dedektörle 307,6 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. İdrar örnekleri hazırlanırken katı-faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Meropenem'in plazmadaki dedeksiyon limiti 108,4 ng/mL, idrarda ise 179,3 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin geri kazanım aralığı serumda % 98,1-98,7, idrarda ise % 96,07-96,54 olarak bulunmuştur. Farmasötik

preparatlardan, idrar ve serumdan kaynaklı endojen maddelerle herhangi bir girişi saptanmamıştır. Geliştirilen yöntemin klinik uygulamada ilacı kullanan hastaların izlenmesi ve Meropenem'in tayini için hassas bir yöntem olduğu öngörölmüştür (33).

Negi ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in farmasötik dozaj formlarından tayini için HPLC yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide etmişlerdir. Sabit faz olarak ters faz C18 kolon (4,6 x 250 mm; 5µ) hareketli faz olarak su: asetonitril:metanol (15:3:2;h/h) karışımı H₃PO₄ ile pH= 7,5'e ayarlanarak kullanılmıştır. Ayırım 1.5 mL/dk akış hızında UV dedektörle 300 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi 55-165 ppm konsantrasyon aralığında lineer olarak bulunmuştur. Yöntemin geri kazanım aralığı ise % 99,19-99,70 olarak tespit edilmiştir (34).

2.1.3.4. HPLC ile Biyolojik Sıvı Analizi

Dupuis ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in sıçan plazmasından tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Seftazidim'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak ters faz C18 kolon (250 x 4,6 mm; 5 µm tanecik boyutlu) ve koruyucu olarak da yine C18 (20 x 3,9 mm) kolon, hareketli faz olarak da pH= 4,8 olan 0,01 M asetat tamponu (% 15 metanol içerisinde) kullanılmıştır. Örnek hazırlama aşamasında katı-faz ekstraksiyonu kullanılmıştır. Ayırım 1 mL/dk akış hızında ve dedeksiyon 296 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. LOQ değeri 0,125 µg/mL olarak tayin edilen yöntemin geri kazanım aralığı % 92,8-95,4 olarak bildirilmiştir (35).

Lee ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Meropenem'in sıçan plazmasından tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde örnek hazırlama aşamasında toplanan plazma örnekleri sistemin içinde yer alan RP-8 (25-40 µm) ön kolona gönderildikten sonra sistem içerisindeki analitik kolona gönderilerek analizi gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak C8 koruyucu kolon (4 x 10 mm) ve C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm tanecik boyutlu) kolon, hareketli faz olarak ise 50 mM fosfat tamponu (pH=7) ve asetonitril karışımı kullanılmışlardır. Yöntem 0,1-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Mutlak geri kazanımı ise % 97,7 olarak saptanmıştır (36).

Farin ve arkadaşları geliştirdikleri HPLC yönteminde Meropenem'in insan plazmasından tayini için katı-faz ekstraksiyonu kullanmışlardır. Çalışmada C8 koruyucu kolon sabit faz olarak hipersil C8 kolonu ve hareketli faz olarak ise 12,5 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponuyla:asetonitril (96,2: 3,8) karışımı kullanmışlardır. Ayrılma 1.5 mL/dk akış hızında ve dedeksiyon 296 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi aralığı 0,02-50 µg/mL olarak belirlenmiş ve yöntemin geri kazanım aralığı ise % 85,6 - % 102,2 olarak tayin edilmiştir (37).

Ehrlich ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HPLC ile entegre ekstraksiyon yöntemi kullanarak serumdan ve bronşiyal salgılardan Meropenem ve Seftazidim'in tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde herhangi bir ön hazırlık yapılmadan örnekler analize verilmiştir. Sistem içerisinde ekstraksiyon kolonundan geçen örnekler ardından analitik kolona enjekte edilmektedir. Ekstraksiyon için C18 dolgu maddesi içeren boyutları (25 x 4 mm, 2 µm) olan kartuş tercih edilmektedir. Analitik kolonun dolgu maddesi C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) boyutlarında olup, koruyucu kolon da yine C18 yapıdadır. Hareketli faz 50 mM sodyum dihidrojen fosfat (pH=5) tamponu: MeCN karışımı (5:95 ve 4:96; h/h) şeklinde izokritik olarak uygulanmıştır. Dedeksiyon 296 nm'de UV dedektörle, dedeksiyon limiti ise 0,5-20 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Geri kazanım aralığı % 89,4-105,2 olarak belirlenmiştir (38).

Ikeda ve arkadaşları plazmadan Meropenem tayini için basit ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, plazma örneklerindeki proteinler filtreli santrifüj cihazında ultrafiltrasyon yöntemiyle çöktürülmüştür. Sabit faz olarak C18 kolon (5 µm, 3,9 mm x 150 mm), hareketli faz olarak da 10 mM fosfat tamponu (pH=7,4)-asetonitril (90:10,h/h) karışımı kullanılmıştır. Ayrım, 1 mL/dk akış hızı ile kolon sıcaklığı 40 °C'de ve dalga boyu 300 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. 0,05-100 µg/mL aralığının lineer olduğu bulunmuş ve LOD değerinin 0,01 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Yöntemin geri kazanımı % 95 olarak bulunmuştur (39).

Bompadre ve arkadaşları serumdan Meropenem tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde ön hazırlık aşaması ve iç standart kullanılmasına gerek yoktur. Sisteme direk enjeksiyon yapılarak bağlantılı katı-faz ekstraksiyonu aşamasının ardından örnekler analiz edilebilmektedir. Ekstraksiyon kolonu olarak NH₂ dolgu maddesine sahip (5 cm x 2.1 mm; 40- µm silika) kolon kullanılmıştır. Sabit faz olarak ise C18 kolon (150 x 4,6 mm; 3 µm) hareketli faz 1 için % 5 metanol içinde 0,01 M fosfat tamponu (pH =7); hareketli faz 2 için ise metanol: 0,01 M fosfat tamponu (pH=7) (30:70: h/h) ve tetrabutylamonyum hidrojen sülfat karışımı kullanılmıştır. Ayrım, ekstraksiyon kolonu için 0,3 mL/dk akış hızında, analitik kolon için 1 mL/dk akış hızında ve UV dedektör kullanılarak 298 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi lineer

aralığı 1-100 µg/mL olarak saptanmıştır. Geri kazanım oranı ise % 98,5 olarak belirlenmiştir (40).

Legrand ve arkadaşları plazmadan İmipenem, Meropenem ve Ertapenem tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Seftazidim'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde proteinleri çöktürmek için asetonytril kullanılmıştır. Santrifüj ve azot altında uçurma işlemlerinin ardından örnekler sisteme enjekte edilmiştir. Sabit faz olarak C8 (5µm, 250 mm x 3 mm) kolon hareketli faz olarak da 0,1 M fosfat tamponu (pH=6.8): metanol karışımı kullanılmıştır. 298 nm dalga boyunda dedeksiyon yapılan maddelerin 0,5-80 µg/mL aralığının lineer olduğu tespit edilmiştir. Geri kazanımları sırayla % 82,2; % 90,8; % 87,7 olarak bulunmuştur (41).

Denooz ve arkadaşları Meropenem'in de aralarında olduğu beş tane β-laktam antibiyotiğin plazmadan tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. İç standart olarak Seforanid'in kullanıldığı yöntemde örnek saflaştırma işlemi katı-faz ekstraksiyonu yöntemi ile yapılmıştır. Sabit faz olarak C8 kolon (5 µm, 250 mm x 4,6 mm), hareketli faz olarak da asetonytril-fosfat tamponu (pH= 7,4) karışımı gradient modda uygulanmıştır. Dedeksiyon 200-400 nm dalga boyu aralığında uygulanmış yöntemin 2,5-60 µg/mL aralığında lineer olduğu tespit edilmiştir. Yöntemin geri kazanım aralığı % 74,3-79,7 şeklinde belirlenmiştir (42).

Verdier ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in de aralarında bulunduğu on iki tane β-laktam (amoksilin, sefepim, sefotaksim, seftazidim, seftriakson, kloksasilin, imipenem, oksasilin, penisilin, piperasilin, ticarcillin) antibiyotiğin plazmadan tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak ters faz C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) koruyucu kolon olarak da ters faz C18 (20 x 4,6 mm; 5 µm) ve hareketli faz olarak ise pH=2'ye HCl ile ayarlanan 10 mM fosforik asit-asetonytril karışımı kullanılmıştır. Proteinlerin çöktürülmesi için asetonytril kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisi lineer aralığı 5-250 µg/mL olarak saptanmıştır. Meropenem'in tayini UV dedektörle 298 nm' de gerçekleştirilmiştir. Meropenem'in 10, 100 ve 250 µg/mL konsantrasyonları için geri kazanım oranları % 114,7 ; 101,7 ; 100,3 olarak tayin edilmiştir (43).

Carlier ve arkadaşları Meropenem'in de aralarında olduğu yedi tane β-laktam (amoksilin, amfisilin, sefuroksim, seftazidim, piperasilin, klavulanik asit) antibiyotiğin plazmadan tayini için ultra performanslı sıvı kromatografisi/tandem kütle spektroskopisi (UPLC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak ters faz C18 kolon (100 mm x

2,1 mm; 1,7 μ m), hareketli faz olarak da su (% 0,1 formik asit içinde)-asetonitril (% 0,1 formik asit içinde) karışımı ikili (binary) gradient sistem kullanılmıştır. Proteinleri çöktürmek için asetonitril kullanılmış, ardından asetonitril-diklorometan ile geri ekstraksiyon yapılmıştır. Çalışmada yer alan antibiyotikler için mutlak geri kazanım % 60-72 aralığında, Meropenem için mutlak geri kazanım % 59,9 olarak bulunmuştur (44).

Colin ve arkadaşları Meropenem'in de aralarında bulunduğu beta laktam antibiyotiklerin (amoksisilin, ampicilin, fenoksimetilpenisilin, piperasilin, sefuroksim, sefadroksil, fluklokasilin, sefepim, seftazidim, tazobaktam, linezolid ve sefazolin) plazmadan tayini için UPLC-MS/MS yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide etmişlerdir. Sabit faz olarak RP-C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μ m) koruyucu olarak C18 kolon (5 x 2,1 mm; 1,7 μ m), hareketli faz olarak da % 5 asetonitril içinde bulunan asetik asit/amonyum asetat tamponu-asetonitril karışımı kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemde örnek hazırlama aşamasında katı-faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Meropenem için kalibrasyon eğrisi lineer aralığı 1,04-16,71 μ g/mL olarak tayin edilmiştir. Ayrım MS/MS dedektörle elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Meropenem için geri kazanım oranı % 78,1 olarak bulunmuştur (45).

Demiralay ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Ertapenem, Meropenem ve Doripenem'in idrardan tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak ters faz C18 kolon (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), hareketli faz olarak da metanol-su karışımı üç farklı oranda (% 18, 20, 22; h/h) olmak üzere kullanılmıştır. İdrar örnekleri metanol ile seyreltildikten sonra 0,45 μ L'luk mikro filtrelerden geçirilerek enjeksiyona verilmiştir. Ayrım 1,0 mL/dk akış hızında, kolon sıcaklığı 30°C ve dedeksiyon 220 ve 295 nm'de UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım aralığı Meropenem için % 99,75 - 100,52 olarak belirlenmiştir (46).

Chang ve arkadaşları Meropenem'in plazmadan tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Asetaminofen'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak C18 kolon hareketli faz ise asetonitril-5 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (10:90; h/h) karışımı uygulanmıştır. UV dedektörle 298 nm'de, 0,5-50 μ g/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Geliştirilen yöntem Meropenem'in farmakokinetik çalışmasına başarıyla uygulanmıştır (47).

Huang ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in bakteriyel mediyum (ortam) dan tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Örnek hazırlama aşamasında

filtreli (0,1 μ m, 0,5 mL) santrifüj cihazı kullanılmıştır. İç standart olarak Seftazidim'in kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak C8 kolon (50 mm x 2,1 mm ; 5 μ m) hareketli faz olarak da pH=4'e ayarlanan 10 mM amonyum format – asetronitril (% 0,1 formik asit içinde) karışımı gradient modda uygulanmıştır. Çalışmada konsantrasyon aralığı 0,05-25 μ g/mL olarak belirlenmiştir. Yöntemin geri kazanımı % 98 olarak tayin edilmiştir (48).

Rigo-Bonnin ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in biyolojik sıvılardan tayini için UPLC/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Ertapenem'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak C18 kolon (2,1 x 100 mm; 1,7 μ m), hareketli faz olarak da % 0,1 formik asit içeren su-asetonitril karışımı lineer gradient modda uygulanarak akış hızı 0,4 mL/dk olarak uygulanmıştır. Örnekler hazırlanırken vortex ve santrifüj ardından 900 μ L % 0,1 formik asit eklenmiş ve enjeksiyona verilmiştir. LOD değerleri plazma, diyazilat ve idrar örnekleri için sırayla 0,09 μ g/mL, 0,07 μ g/mL, 0,29 μ g/mL şeklinde tespit edilmiştir. LOQ değerleri ise yine plazma, diyazilat ve idrar örnekleri için sırayla 0,27 μ g/mL, 0,24 μ g/mL, 1,22 μ g/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanımları ise; plazma için % 77,6; diyalizat için % 70; idrar örnekleri için ise % 68,3 olarak tayin edilmiştir (49).

Zalewski ve arkadaşları Meropenem'in de içinde bulunduğu bazı karbapenem grubu antibiyotiklerin tayini için UPHLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak C18 kolon (2,1 x 100 mm) partikül boyutları 1,7 μ m; 2,6 μ m; 5 μ m olmak üzere farklı tipte kolonlar denenmiştir. Hareketli faz olarak ise 12 mmol amonyum asetat-asetonitril karışımı (90:10; 93:7; 96:4) gibi farklı oranlarda kullanılarak akış hızı 1 mL/dk'da ayırım sağlanmıştır. Dedeksiyon DAD dedektörle 298 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Meropenem'in LOD ve LOQ değerleri sırayla 1,7 μ m partikül boyutlu kolon için 0,14 ve 0,43 μ g; 2,6 μ m partikül boyutlu kolon için 0,03 ve 0,09 μ g; 5,0 μ m partikül boyutlu kolon için 0,01 ve 0,02 μ g olarak tayin edilmiştir (50).

Casals ve arkadaşları Meropenem'in plazmadan tayini için UHPLC yöntemi geliştirmişlerdir. İç standart olarak Seftazidim'in kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak C18 ODS-III kolon (2 x 75 mm ; 1,6 μ m) hareketli faz olarak ise fosforik asitle pH=7'ye ayarlanan 0,1 M Na₂HPO₄-metanol (87:13; h/h) karışımı kullanarak akış hızı 0,25 mL/dk'ya ayarlanarak ayırım sağlanmıştır. 295 nm dalga boyunda DAD dedektör ile tayin edilmiştir. Proteinleri çöktürmek için asetronitril kullanılmış, santrifüj sonrası elde edilen süzüntü/üst faz azot altında kuruluğa kadar uçurulmuştur. Oluşan çökelti MES [2-(N-

morfolino)etansülfonik asid] tampon çözeltisiyle çözündükten sonra enjeksiyona verilmiştir. LOQ değeri 0,5 µg/mL, geri kazanım ise % 70'in üzerinde tayin edilmiştir (51).

Carlier ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in de aralarında olduğu β-laktam (amoksisilin, sefuroksim, seftazidim, piperasillin) antibiyotiklerin plazmadan tayini için UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde sabit faz olarak C18 kolon (2,1 x 100 mm; 1,7 µm) hareketli faz olarak ise su:metanol (% 0,1 formik asit ve 2 mM amonyum asetat içeren) karışımı ikili (binary) gradient modda uygulanmıştır. Analiz edilen bütün bileşikler elektro spre yonizasyonlu (ESI) kaynaklı MS dedektörle pozitif iyon mod takibi ile izlenmiş ve Meropenem'in dedekte edilebilen konsantrasyon aralığı 0,5-80 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Meropenem için geri kazanım aralığı ise % 73-81 olarak bulunmuştur (52).

Ohmori ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in de aralarında bulunduğu sekiz farklı β-laktam (ampisilin, sefazolin, sefepim, sefmetazol, sefotaksim, doripenem ve piperasilin) antibiyotiğin serumdan tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Etil paraben'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak ters faz C18 kolon (50 x 2 mm; 3 µm) hareketli faz olarak da % 0,1 formik asit içeren 10 mM amonyum format:metanol karışımı ikili (binary) gradient modda uygulanmıştır. Örnek hazırlama aşamasında katı-faz ekstraksiyonu kullanılmıştır. Analiz edilen bütün antibiyotikler elektro spre yonizasyonlu (ESI) kaynaklı triple kuadrapol MS/MS dedektörle tayin edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi aralığı 0,1-50 µg/mL olarak tayin edilmiş, sadece Doripenem bu aralık dışında izlenmiştir. LOQ değer aralığı ise 0,005-0,5 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Yöntemin geri kazanımı ise Meropenem için % 62,3 Doripenem için % 49,1 olurken diğer bileşikler için ise % 80,2 olarak tayin edilmiştir (53).

Chahbouni ve arkadaşları Meropenem'in de aralarında bulunduğu beş farklı antibiyotiğin plazmadan tayini için UPLC-MS yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide etmişlerdir. Plazma örnekleri % 30'luk asetik asit ve % 10'luk amonyak çözeltileri sırayla eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz alınarak sisteme enjekte edilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (50 x 4,6 mm; 2,5 µm) hareketli faz olarak da % 4 formik asit içinde su: metanol karışımı kullanarak akış hızı 0,4 mL/dk'ya ayarlanarak ayırım sağlanmıştır. Çalışmada Meropenem için konsantrasyon aralığı 0,75-80 µg/mL olarak belirlenmiştir (54).

Kipper ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in biyolojik sıvılardan tayini için HPLC yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide etmişlerdir. Sabit faz olarak C18 kolon (4,6 x 150 mm; 5 µm) ve koruyucu kolon olarak da C18 (7,5 x 4,6 mm; 5 µm) hareketli faz olarak 0,05 M fosfat tamponu (H₃PO₄ ile pH=3'e ayarlanarak): asetonitril:metanol (86:12:2; h/h/h) karışımı kullanılmıştır. Ayrım 0,7 mL/dk akış hızında UV dedektörle plazma örnekleri için 302 nm, idrar örnekleri için 320 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiştir. Plazma örnekleri hazırlanırken proteinleri çöktürmek için metanol kullanılmış, idrar örnekleri için ise katı-faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi çalışma aralığı plazma için 0,1-150 µg/mL; idrar için ise 1-250 µg/mL olarak belirlenmiştir. Meropenem'in plazmadan geri kazanım oranı % 84, idrardan geri kazanım oranı ise % 100 olarak hesaplanmıştır (55).

Kameda ve arkadaşları Meropenem ve Biapenem'in peritoneal sıvısı (karın boşluğu sıvısı) ve safra sıvısından tayini için HPLC yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide edilmiştir. Sabit faz olarak C18 kolon (150 x 4,6 mm; 5 µm) hareketli faz olarak da 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH= 7,4' e ayarlanarak) : asetonitril (100:10; h/h) karışımı kullanılmıştır. Ayrım 1 mL/dk akış hızında UV dedektörle 300 nm dalga boyunda sağlanmıştır. Proteinleri çöktürmek için filtreli santrifüj cihazında ultrafiltrasyon yöntemi kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi çalışma aralığı Meropenem için peritoneal sıvıda 0,05-100 µg/mL safrada ise 0,1-100 µg/mL olarak belirlenmiştir. Meropenem için LOD değerleri peritoneal sıvıda 0,01 µg/mL olarak belirlenirken safra sıvısında 0,02 µg/mL olarak tayin edilmiştir. LOQ değerleri ise Meropenem için peritoneal sıvıda 0,05 µg/mL olarak tespit edilirken safra sıvısında 0,1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Meropenem'in peritoneal sıvıdan geri kazanım aralığı % 96,6-101,1, safra sıvısından geri kazanımı ise % 96,2-99,2 olarak hesaplanmıştır (56).

Abdulla ve arkadaşları Meropenem'in de içinde bulunduğu dokuz tane β-laktam antibiyotiğin (amoksisilin, benzilpenisilin, sefotaksim, sefuroksim, seftazidim, flukloksasilin, imipenem, piperasilin) plazmadan tayini için hidrofilik etkileşim kromatografisi/ kütle spektroskopisi (HILIC/MS) yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide etmişlerdir. Sefazolin'in iç standart olarak kullanıldığı bu yöntemde sabit faz olarak amid kolon (2,1 x 100 mm; 1,7 µm) hareketli faz olarak da 100 mM amonyum format (pH= 6,5'a ayarlanarak):asetonitril (20:80; h/h) karışımı kullanılmıştır. Ayrım 0,4 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Proteinleri çöktürmek için % 0,1 formik asit kullanılmıştır.

Meropenem için 0,2-40 µg/mL konsantrasyon aralığı lineer bulunmuştur. LOQ değeri ise 0,2 µg/mL olarak bulunmuştur. Meropenem için geri kazanım ortalaması % 115,5 olarak tespit edilmiştir (57).

Ferrone ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem, Levofloksasin ve Linezolid'in plazmadan tayini için UHPLC/PDA yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide etmişlerdir. Ulifloksasin'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak C18 (50 x 2,1 mm; 2,7 µm) kolon ve koruyucu kolon olarak ise C18 kolon (5 x 2,1 mm) hareketli faz olarak da HCl ile pH= 5,5'e ayarlanan 10 mM amonyum asetat: asetonitril+ metanol (80:20; h/h) karışımı kullanılmıştır. Her iki faza % 0,1'lik TEA eklenmiştir. Örnek hazırlama aşamasında yarı otomatik mikro ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Meropenem için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,004 ve 0,02 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Geri kazanım aralığı ise % 92,4-97,4 olarak tespit edilmiştir (58).

Matsuda ve arkadaşları Meropenem'in beyin-omurilik sıvısından tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak C18 kolon (4,6 x 150 mm; 5 µm) hareketli faz olarak da pH=7,4'e ayarlanarak hazırlanan 10 mM fosfat tamponu: asetonitril (100:10; h/h) karışımı kullanılmıştır. Ayrım 1,0 mL/dk akış hızında UV dedektörle 300 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlama aşamasında ultrafiltrasyon yöntemi kullanılmıştır. Meropenem için kalibrasyon eğrisi 0,05-50 µg/mL aralığı lineer olarak bulunmuştur. Yöntemin doğruluk aralığı % 99-109,5 olarak tayin edilirken, Meropenem için LOD değeri 0,01 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Meropenem için geri kazanım aralığı % 99,3-102,0 olarak hesaplanmıştır (59).

Sime ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in de aralarında bulunduğu yedi beta-laktam antibiyotiğin (piperasilin, benzilpenisilin, flukloksasilin, ertapenem, sefazolin, seftazidim) plazmadan tayini için HPLC/MS/MS yöntemi geliştirerek FDA'ya göre valide etmişlerdir. Flukonazol'un iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak RP C18 kolon (2,1 x 50 mm; 2,6 µm) hareketli faz olarak ise % 0,1 formik asit içeren su:asetonitril karışımı kullanılmıştır. Ayrım 0,3 mL/dk akış hızında sağlanmıştır. Proteinleri çöktürmek için % 0,1 formik asit içeren asetonitril kullanılmıştır. Yöntemin geri kazanımı Ertapenem için % 78 iken Meropenem ve diğer bileşikler için % 96 olarak hesaplanmıştır. LOQ değeri ise Meropenem için 0,1 µg/mL olarak tayin edilmiştir (60).

Di Rocco ve arkadaşları Meropenem'in de aralarında bulunduğu 12 tane penisilin, 12 tane sefalosporin, 5 tane karbapenem (biapenem, doripenem, ertapenem, imipenem,

meropenem) ve faropenem'in sığır kaslarından tayini için UHPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Örnek hazırlama aşamasında katı-faz ekstraksiyonu kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemde sabit faz olarak ters faz C18 kolon (2,1 x 100 mm; 1,7 µm) hareketli faz olarak da % 0,01 formik asit ve 0,2 mM amonyum asetat içeren su: metanol (% 0,01 formik asit içeren) karışımı ikili (binary) gradient modda uygulanmıştır. Örnek hazırlama yöntemi için katı-faz ekstraksiyonu kullanılmıştır. Analiz edilen bütün antibiyotikler pozitif elektro sprey iyonizasyonlu (ESI) kaynaklı MS/MS dedektörle tayin edilmiştir. Geliştirilen yöntemde Meropenem için kalibrasyon eğrisi aralığı 5-40 µg/kg olarak tayin edilmiştir. Meropenem için LOD değeri ve LOQ değerleri ise sırayla 0,3 ve 1,0 µg/kg olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemde Meropenem için bulunan geri kazanım % 66'dır (61).

Roth ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem'in serumdan tayini için HPLC yöntemi geliştirerek valide etmişlerdir. Sabit faz olarak C18 kolon (150 x 4,6; 5 µm) hareketli faz olarak pH=8,5 olan tris (hidroksimetil)aminometan tamponu (%15 metanol içinde) kullanılmıştır. Ayırım 1 mL/dk akış hızında UV dedektörle 300 nm dalga boyunda yapılmıştır. Örnek hazırlama aşamasında proteinlerin çöktürülmesi için katı-faz ekstraksiyonu yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi lineer aralığı 3,5-200 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Geri kazanım aralığı % 89-110 olarak bulunmuştur (62).

Pinder ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Meropenem'in de aralarında olduğu beta laktam (piperasilin, seftazidim, flukloksasilin) antibiyotiklerin tayini için HPLC yöntemi geliştirerek FDA'ye göre valide etmişlerdir. Ertapenem'in iç standart olarak kullanıldığı yöntemde sabit faz olarak C18 kolon (150 x 4,6 mm; 5 µm) ve koruyucu kolon olarak yine C18 kolon hareketli faz olarak da pH= 2,2 olan % 2,2 fosforik asit:asetonitril karışımı ikili (binary) gradient modda uygulanmıştır. Örnek hazırlama aşamasında proteinlerin çöktürülmesi için asetonitril kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi aralığı Meropenem için 2-200 µg/mL olarak LOQ değeri ise 2 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Meropenem için geri kazanım % 108,8 olarak bulunmuştur (63).

2.1.3.5. Diğer Yöntemler

Khataee ve arkadaşları Meropenem'in tayini için kemilüminesans yöntemi geliştirmişlerdir. Meropenem'in belirlenebilmesi için kemilüminesans sistem KMnO₄-rodamin B'nin CdS quantum noktaları varlığında gerçekleştirdiği reaksiyon sonucu oluşturulmuştur. CdS quantum noktalarının donör, rodamin B'nin ise alıcı olduğu

kemilüminesans enerji transferi gerçekleştirilmiştir. Bu güçlü söndürme etkisine dayandırılarak Meropenem tayini için yeni kemosensör geliştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çalışma aralığı 0.002–10.0 µg/mL olarak belirlenirken LOD değeri 0,8 µg/mL olarak tayin etmişlerdir (64).

Domes ve arkadaşları yürüttükleri çalışmada Meropenem, Moksifloksasin ve Piperasilin'in idrardan tayini için Raman spektroskopisi yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz edilen idrar örnekleri sigara içmeyen gönüllü kişilerden sağlandıktan sonra filtre edilerek kullanılmıştır. Rezonans eksitasyon/uyarılma dalga boyları 244 ve 257 nm'dir. LOD değeri Meropenem için $43,6 \pm 10,7$ µM olarak tayin etmişlerdir (65).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler

Çalışma süresince kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler aşağıdaki gibidir;

Meropenem trihidrat ($\geq$ % 98; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya)

Doripenem monohidrat ($\geq$ % 98; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya)

Metanol (HPLC'ye uygun, $\geq$ % 99,9; Merck, Darmstadt, Almanya)

Asetonitril (HPLC'ye uygun, $\geq$ % 99,9; Merck, Darmstadt, Almanya)

Orto-fosforik asit ($\geq$ % 85, ağ.; Merck, Darmstadt, Almanya)

Asetik asit (% 100, ağ.; Merck, Darmstadt, Almanya)

Hidroklorik asit ($\geq$ % 37, ağ.; Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum klorür ($\geq$ % 99,5; Merck, Darmstadt, Almanya)

Ultra saf su (HPLC saflığında)

3.1.2. Çözeltiler

% 0,9 NaCl (0,154 M) Çözeltisi:

0,9 g sodyum klorür tartılarak 100 mL'lik balon jojede saf su ile çözündürüldü ve hacmine tamamlandı.

o-Fosforik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması:

Örnek hazırlama aşamasında çöktürme denemeleri için kullanılan çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- **0,0741 M için;** 0,5 mL o-fosforik asit (% 85, ağ/ağ) alınarak,
- **0,111 M için;** 0,75 mL o-fosforik asit (% 85, ağ/ağ) alınarak,
- **0,1483 M için;** 1 mL o-fosforik asit (% 85, ağ/ağ) alınarak,
- **0,1853 M için;** 1,25 mL o-fosforik asit (% 85, ağ/ağ) alınarak,

100 mL'lik balon jojede metanol ile çözündürülerek hacmine tamamlandı.

- **0,741 M için;** 5 mL o-fosforik asit (% 85, ağ/ağ) alınarak,
- **1,112 M için;** 7,5 mL o-fosforik asit (% 85, ağ/ağ) alınarak,
- **1,26 M için;** 8,5 mL o-fosforik asit (% 85,ağ/ağ) alınarak,
- **1,483 M için;** 10 mL o-fosforik asit (% 85,ağ/ağ) alınarak,
- **1,853 M için;** 12,5 mL o-fosforik asit (% 85,ağ/ağ) alınarak,

100 mL'lik balon jojede saf su ile çözündürülerek hacmine tamamlandı.

Asetik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması:

Örnek hazırlama aşamasında çöktürme denemeleri için kullanılan çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

➤ **0,873 M için;** 5 mL asetik asit (% 100, ağ.) alınarak 100 mL'lik balon jojede metanol ile çözündürülerek hacmine tamamlandı.

- **1,746 M için;** 10 mL asetik asit (%100, ağ.) alınarak,
- **3,493 M için;** 20 mL asetik asit (%100, ağ.) alınarak,
- **5,240 M için;** 30 mL asetik asit (%100, ağ.) alınarak,
- **6,987 M için;** 40 mL asetik asit (%100, ağ.) alınarak,

100 mL'lik balon jojede saf su ile çözündürülerek hacmine tamamlandı.

Hidroklorik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması:

Örnek hazırlama aşamasında çöktürme denemeleri için kullanılan çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- **0,239 M için;** 2 mL hidroklorik asit (% 37, ağ.) alınarak,
- **0,418 M için;** 3,5 mL hidroklorik asit (% 37, ağ.) alınarak,
- **0,508 M için;** 4,25 mL hidroklorik asit (% 37, ağ.) alınarak,
- **0,598 M için;** 5 mL hidroklorik asit (%37, ağ.) alınarak,
- **1,196 M için;** 10 mL hidroklorik asit (%37, ağ.) alınarak,

100 mL'lik balon jojede saf su ile çözündürülerek hacmine tamamlandı.

3.1.2.1. Hareketli Faz Çözeltileri

% 0,0001 Asetik Asit (1,746 mM) Çözeltisi:

50 µL asetik asit (% 100, ağırlık/ağırlık) alınarak 500 mL'lik balon jodede saf su ile çözündürülerek hacmine tamamlandı.

3.1.2.2. Meropenem trihidrat Ana Stok Çözeltisi

250 mg Meropenem trihidrat tam olarak tartıldı, 5 mL'lik balonjodede % 0,9 NaCl ile çözündürüldü ve hacmine tamamlandı (50 mg/mL Meropenem baza eşdeğer). Stok çözelti +4 °C de yaklaşık 48 saat süre ile dayanıklıdır.

HPLC Yöntemi için ana stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan ara stok çözeltiler:

Stok çözelti 1: Ana stok çözeltiden 1 mL alınarak % 0,9 NaCl ile 5 mL'ye seyreltilerek konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Stok çözelti 2: Ana stok çözeltiden 1 mL alınarak % 0,9 NaCl ile 10 mL'ye seyreltilerek konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Stok çözelti 3: Ana stok çözeltiden 1 mL alınarak % 0,9 NaCl ile 50 mL'ye seyreltilerek konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Stok çözelti 4: Ana stok çözeltiden 1 mL alınarak % 0,9 NaCl ile 100 mL'ye seyreltilerek konsantrasyonu 500 µg/mL olacak şekilde hazırlandı.

Standart çözeltilerin hazırlanması için stok çözelti 4'den farklı hacimlerde (20 ve 50 µL) alınarak konsantrasyonları 0,2, 1, 5 µg/mL, stok çözelti 2'den farklı hacimlerde sırayla (10, 30, 50, 60 µL) alınarak konsantrasyonları 10, 30, 50, 60 µg/mL olacak şekilde toplamda 7 farklı konsantrasyonda % 0,9 NaCl çözeltisiyle seyreltilerek mutlak geri kazanımda kullanılmak üzere hazırlandı.

Serumdan ölçü eğri hazırlanmasında stok çözelti 1,2,3 ve 4 kullanıldı. Bu amaçla 50 µL'sinde 0,2-60 µg Meropenem olacak şekilde stok çözelti 1'den farklı hacimlerde sırayla (500 µL ve 600 µL) alınarak konsantrasyonu 1000 ve 1200 µg/mL; stok çözelti 2'den 600 µL alınarak konsantrasyonu 600 µg/mL; stok çözelti 3'den 1 mL alınarak konsantrasyonu 200 µg/mL; stok çözelti 4'den farklı hacimlerde sırasıyla (40 µL, 200 µL ve 1 mL) alınarak konsantrasyonu sırasıyla 4, 20, 100 µg/mL olacak şekilde metanol ile seyreltilerek toplamda 7 farklı konsantrasyonda standart çözelti hazırlandı.

3.1.2.3. İç Standart Çözeltisinin Hazırlanması

25 mg Doripenem baza eşdeğer Doripenem monohidrat tam olarak tartıldı, 5 mL'lik balon jode % 0,9 NaCl çözeltisiyle çözündürüldü ve hacmine tamamlandı (5 mg/mL Doripenem baza eş değeri). Stok çözelti +4 °C'de yaklaşık 48 saat süre ile dayanıklıdır. 30 µg/mL konsantrasyondaki standart çözeltisinin elde edilmesi için stok çözeltisinden 30 µL alındı ve % 0,9 NaCl çözeltisi ile 5 mL'ye seyreltilmesiyle hazırlandı. Serumdan ölçü eğrisi hazırlanmasında 50 µL'sinde 30 µg Doripenem olacak şekilde stok çözeltisinden 600 µL alındı ve 5 mL'ye metanol ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. Ultraviyole ve görünür bölge spektrofotometre cihazı (Hitachi U-2900 UV/VIS)
2. Infrared Spektrometre cihazı (Bruker-Alpha)
3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazı (Shimadzu Corporations Japan)
 - DGU 20 A₅ Degazer
 - LC 20 AT pompa sistemi (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
 - SPD-M20 A DAD Detektör (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
 - SIL-20 AC HT Otomatik numune örnekleyicisi
 - CT0-20A Kolon fırını
 - LC Solution Sistem yazılımı

Analitik kolonlar;

- Inertsil ODS-3 C18 kolon (150 x 3,9 mm; 5 µm)
 - Inertsil ODS-3 C18 kolon (150 x 4,6 mm; 3 µm)
 - Phenomenex ODS C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)
 - Agilent XDB C18 Kolon (150 x 4,6 mm; 5 µm)
 - Restek Pentaflorofenilpropil Kolon (150 x 4,6 mm; 5 µm)
 - Phenomenex Luna HILIC kolon (150 x 4,6 mm; 5 µm)
 - Koruyucu kolon; Phenomenex ODS C18 (4,0 x 3 mm; 5 µm)
4. Terazî (Denver Instrument TB 2150D)
 5. Girdap Karıştırıcı (IKA GENIUS 3)
 6. Santrifüj cihazı (Hettich Mikro 22 R)
 7. Ultra saf su cihazı (Pure Lab Elga)
 8. Ultrasonik banyo (Elma Ultrasonic LC 30 H)
 9. pH metre (Hanna pH 211)
 10. Otomatik pipetler (Eppendorf 200 µL ve 1000 µL'lik)
 11. Deney tüpleri (Vidalı siyah kapaklı, cam, 12 mL'lik)

12. Enjektör (1 cc, 2 cc ve 5 cc)
13. Enjektör Filtreleri (Nylon, 0.2 µm)
14. Balon jojeler (5, 10, 25, 50 ve 100, 500 mL'lik)
15. Beher (50, 100, 250 mL'lik)
16. HPLC vialleri ve kapakları (şeffaf ve amber renkli; 2 mL'lik hacimli)
17. HPLC vial insertleri
18. Erlen (250 mL'lik)
19. Pastör pipetleri (2 mL'lik, cam)

3.3. Meropenem'in Biyolojik Sıvılardan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi

Meropenem'in biyolojik sıvılardan HPLC ile analizinin yapılabilmesi için dedektör dalga boyları, duran faz, kolon sıcaklığı, hareketli faz sistemi, hareketli faz akış hızı gibi kromatografik koşullar belirlendi ve iç standart olarak kullanılacak madde araştırıldı. Belirlenen şartlar altında geliştirilen yöntem Meropenem'in biyolojik sıvılardan analizine uygulandı.

3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Literatür çalışmaları göz önüne alınarak uygun hareketli faz belirlenene kadar bir çok farklı sistem denenmiştir. Sabit ve hareket faz sistemlerinin seçimlerinde öncelikle Meropenem ve iç standart madde piklerinin uygun bir alıkonma zamanında elüe olması ve madde piklerinin hem birbirlerinden hem de biyolojik sıvıdan gelen girişimlerden ayrılmasına dikkat edildi. Hareketli faz olarak çeşitli akış hızlarında izokratik ve gradient sistemlerde o-fosforik asit ve asetik asitin çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltilerinin asetonitril ve metanol gibi çözücülerle değişik oranlardaki karışımları yanı sıra bu çözeltilerin hekzan-1-sülfonik asit ve TEA gibi iyon çifti oluşturmaya yardımcı ajanlar ile karışımları denenmiştir.

Sabit faz seçimi amacıyla dolgu maddeleri, ebatları ve partikül boyutları farklı kolonlar denenmiştir. Bunlar da sırasıyla ebatları 150 x 3,9 mm, tanecik boyutu 5 µm, kolon boyu 150 x 4,6 mm, tanecik boyutu 5 µm, ebatları 150 x 4,6 mm, tanecik boyutu 3 µm ve ebatları 250 x 4,6 mm, tanecik boyutu 5 µm olan farklı tipte C18 kolonlar ve kolon boyu 150 x 4,6 mm, tanecik boyutu 5 µm olan pentaflorofenil propil kolon ve ebatları 150 x 4,6 mm, tanecik boyutu 5 µm olan HILIC kolon kullanılarak 30 °C'de

denemeler gerçekleştirildi. Dedektör dalga boyunu belirlemek için ise 290, 298, 300, 310 nm'de çalışmalar yapıldı. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.1'de yer almaktadır.

3.3.2. İç Standart Denemeleri

Biyolojik sıvılarda HPLC yöntemiyle yapılan çalışmalarda sıklıkla ihtiyaç duyulan iç standart ile çalışma prensibinden yola çıkılarak bazı ön denemeler yapıldı. Bunun için İmipenem, Doripenem gibi maddelerin iç standart olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bölüm 4.1.1'de belirtilen kromatografi koşullarında HPLC ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2'de verilmiştir.

3.3.3. Serumdan Meropenem'in Ekstre Edilmesi İşlemi

Biyolojik sıvı uygulamalarında plazmanın elde edilmesinde kullanılan sodyum sitrat, EDTA vb. gibi maddelerin Meropenemin ekstraksiyona etki yapma ihtimali düşünülerek bu çalışmada serum tercih edildi.

Örnek hazırlama metodları içinde genelde protein çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu veya katı-faz ekstraksiyonu kullanılır. Serum proteinlerinin olası girişimlerini engellemek ve Meropenem'in serumdan ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için sıvı-sıvı ekstraksiyon ve çöktürme yöntemine yönelik aşağıda ayrıntıları verilen denemeler yapıldı.

a) *Sıvı-sıvı Ekstraksiyon*

500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 900 µL Metanol çözeltisinden ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 2000 µL kloroform (CHCl₃) çözeltisinden ilave edildi. Ardından yine iki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dk (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan organik faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi.

Bir başka denemede 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 900 µL Metanol çözeltisinden ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x2) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak %20'lik NaCl çözeltisinden 50 µL ve 2000 µL Kloroform eklendi. Tekrar iki dakika boyunca girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan organik faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün

20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Her iki denemenin de kromatogramlarında Meropenem ve Doripenem yayvan şekilde pik verdi. Bunun üzerine sıvı-sıvı ekstraksiyon için kullanılan çözücünün santrifüj öncesi eklenerek denenmesine karar verildi.

500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 900 µL Metanol ve 5000 µL Kloroform çözeltisinden ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan organik faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzütünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Aynı deneme santrifüj öncesi %20'lik NaCl çözeltisinden 50 µL eklenerek tekrar edildi.

Bir başka denemede 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 900 µL Metanol çözeltisinden ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıte karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x2) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 5000 µL Kloroform eklendi. Tekrar iki dakika boyunca vortexte karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x2) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan organik faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzütünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Her iki denemede de geri kazanımlar çok düşük çıktı.

Bunun üzerine ilk aşamada eklediğimiz Metanol yerine benzer polariteye sahip olan Asetonitril ve Aseton kullanılarak başka denemeler yapıldı. 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 1000 µL Asetonitril ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 5000 µL Kloroform eklendi. Tekrar iki dakika boyunca girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan organik faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzütünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi ancak Meropenem piki görülmedi. Bu sebeple Kloroformun santrifüj sonrası eklenerek çalışmanın tekrar yapılmasına karar verildi. 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 1000 µL Asetonitril ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 5000 µL kloroform eklendi. Tekrar iki dakika boyunca girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj

sonrası ayrılan organik faz alınarak 0,2 μm 'lik filtreden süzöldü. Elde edilen süzöntünün 20 μL 'si HPLC sistemine enjekte edildi.

Bir sonraki denemede 500 μL serum örneğine Meropenem'in 5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ çözeltisinden ve Doripenem'in 5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ çözeltisinden eklendikten sonra 1000 μL Aseton ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 5000 μL Kloroform eklendi. Tekrar iki dakika boyunca girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası ayrılan organik faz alınarak 0,2 μm 'lik filtreden süzöldü. Elde edilen süzöntünün 20 μL 'si HPLC sistemine enjekte edildi. Metanol yerine Asetonitril kullanıldığında pikler yarıma gösterdi, Aseton kullanıldığında ise Doripenem pikine girişimler oldu ve Meropenem pikinin ise yine yayvanlaştığı gözlemlendi.

Tüm bu denemelerin ışığında çalışmaya proteinlerin uygun bir çözücü ile çöktürölerek Meropenem'in elde edilmesine karar verildi.

b) Proteinlerin Çöktürölmesi

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle geri kazanımların düşük çıkması üzerine Meropenem'in serumdan çöktürme metoduyla ekstre edilip edilemeyeceği incelendi. Bu denemeler için 500 μL serum örneğine sırasıyla Meropenem'in 5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ çözeltisinden ve Doripenem'in 5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ çözeltisinden eklendikten sonra 1000 μL Metanol çözeltisinden ilave edildi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dakika (x2) 6000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üst faz alınarak 40°C'de azot altında kuruluğa kadar uçuruldu ve kalıntı (1:9) oranında MeOH: % 0,9 NaCl karışımının 1000 μL ilavesiyle çözöndüröldükten sonra 0,2 μm 'lik Nylon filtreden süzöldü. Elde edilen süzöntünün 20 μL 'si HPLC sistemine enjekte edildi. Bu deneme ekstraksiyon çözücüsü Metanol'ün hacmi 1500 μL 'ye çıkarılıp, santrifüj süresi 10 dakika (x3) 6000 rpm'de olacak şekilde tekrarlandı. Azot altında uçurma sırasında maddelerin bozunması sonucu piklerde yarıma göröldü. Bu sorunu gidermek amacıyla santrifüj sonrası alınan fazın uçurma işlemi yapılmadan direk HPLC sistemine enjekte edilmesine karar verildi. Filtrasyon ve süzme aşamasında değışiklik yapılarak çöktürme yöntemi yeniden denendi.

Bu amaçla 500 μL serum örneğine Meropenem'in 5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ çözeltisinden ve Doripenem'in 5 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ çözeltisinden eklendikten sonra 1000 μL Metanol çözeltisinden ilave edildi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dakika (x2) 6000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üst faz alındı. Önce 0,45 μm sonra 0,2 μm 'lik Nylon filtrelerden süzöldü. Elde

edilen süzütünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Sonuçta Meropenem pikine girişim gözlemlendi. Serumdan gelen girişimler ve hassasiyet düşüşü göz önüne alınarak santrifüj sonrası üst fazı ayırdıktan sonra tekrar azot altında uçurma işlemine dönme kararı verildi.

Maddelerin azot altında uçurulması sırasında bozunması dolayısıyla literatür taraması yapıldı. Literatürdeki çalışmalarda farklı konsantrasyondaki NaCl çözeltilerinin standart çözeltilere ilavesiyle karbapenem tipi antibiyotiklerin bozunmasının geciktiği belirtilmiştir (66). İç standart ilave etmeden sadece etken maddenin bozunmasını engellemek amacıyla serumu NaCl çözeltisi eklenerek çöktürme yöntemi tekrar denendi. 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/200µL çözeltisinden, % 0,9 NaCl çözeltisinden 50 µL ve 750 µL Metanol eklendi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dakika (x2) 6000 rpm'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası üst faz alınarak 40 °C altında azot altında kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı MeOH: % 0,9 NaCl (1:9) karışımının 1000 µL ilavesiyle çözüldükten sonra 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzütünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Serumu eklenen NaCl çözeltilerinin konsantrasyonları değiştirilmek suretiyle bu deneme sırayla % 1'lik, % 5'lik, % 20'lik, % 50'lik NaCl ve doymuş NaCl çözeltilerinden 50'şer µL ve 50 mg ve 100 mg katı NaCl eklenerek tekrarlandı. Etken maddenin bozunmasını engelleyen minimum NaCl konsantrasyonu araştırıldı. Aynı deneme aynı tuz çözeltilerinin santrifüj sonrası eklenmesiyle de denenecek tekrarlandı. Aynı deneme azot altında uçurulması sırasında etken madde bozunduğu için uçurma esnasındaki sıcaklık 35°C'ye düşürülerek tekrarlandı. Bu deneme % 20'lik ve % 50'lik NaCl çözeltilerinin 100 µL eklenmesiyle tekrar edildi. Aynı deneme % 20'lik NaCl çözeltisinden 200 µL ilave ederek ve azot altındaki uçurma işlemini tam kuruluğa kadar beklemeden sonlandırmak suretiyle tekrarlandı. Santrifüj sonrası % 20'lik ve %50'lik NaCl çözeltilerini eklediğimizde geri kazanımlar biraz artmış olsa da maddelerin azot altında bozunması tamamıyla engellenemediği için farklı çözüm yolları araştırıldı.

Geri kazanımın düşük çıkması sebebiyle NaCl çözeltisi yerine alternatif olabilecek başka çözeltiler araştırıldı. Bozunma ihtimalini azaltmak amacıyla daha düşük hacimlerle çalışılarak uçurma süresinin kısaltılmasına karar verildi. Bu amaçla 250 µL'lik serum örneğine Meropenem'in 5µg/100µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/100µL çözeltisinden eklendikten sonra 300 µL Metanol çözeltisinden ilave edildi. Hafifçe çalkalandıktan sonra 10 dakika (x2) 6000 rpm'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası üst faz

alındı. Üzerine % 20'lik KCl çözeltisinden 50 µL eklenerek azot altında 30°C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı (1:9) oranında MeOH: % 0,9 NaCl karışımının 500 µL ilavesiyle çözüldükten sonra 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Aynı deneme ekstraksiyon çözücüsü 300 µL Metanol yerine 300 µL Asetonitril ile değiştirilerek tekrarlandı. Aynı deneme santrifüj sonrası % 20'lik NaCl çözeltisinden 50 µL eklenmesiyle tekrarlandı. Aynı deneme Meropenem'in ve Doripenem'in 5 µg/50µL çözeltilerinden ve santrifüj sonrası % 20'lik NaCl çözeltisinin 50 µL eklenmesiyle tekrarlandı. Bu denemelerden sonra da geri kazanımlar yine düşük çıktığı gözlemlendi.

Bunun üzerine farklı bir organik çözücü ile çöktürme metodu denendi. Aseton ile çöktürme yaptıktan sonra azot altında uçurma yaparak deneme yapıldı. 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 1000 µL Aseton ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak % 20'lik NaCl çözeltisinden 50 µL eklendi ve ardından azot altında 37°C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 200 µL hareketli faz (Asetik asit: Metanol) ilavesiyle çözüldükten sonra 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Kromatogramda etken maddenin ve iç standardın piklerinin kuyruklandığı gözlemlendi.

Bunun üzerine başka bir denemede 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 1000 µL Metanol ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak % 20'lik NaCl çözeltisinden 50 µL eklendi ve ardından azot altında 33°C'de kuruluğa kadar uçuruldu. Kalıntı 500 µL hareketli faz (1,746 mM Asetik asit: Metanol) ilavesiyle çözüldükten sonra 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi.

Uçurma sırasında maddelerin bozunmasından dolayı daha az miktarlarda serum örnekleriyle denemeler yapıldı. 250 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 650 µL Metanol ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 0,45 ve 0,2 µm'lik filtrelerden sırasıyla süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte

edildi. Elde edilen kromatogramda piklerin yayvanlaşıp kirlilikler ile birlikte çıkması üzerine tekrar santrifüj yapılmasına karar verildi. Yeni denemede 250 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 650 µL Metanol ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Elde edilen bu kromatogramda piklerin kuyruklanması ve yarılmasının sebebi çöktürme işlemi için sadece Metanol kullanılmasından kaynaklanabileceğini düşündürdü. Bunun üzerine yeni denemede Metanol ile birlikte hareketli faz karışımı da ilave edildi. 250 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 50 µL hareketli faz karışımı ile 600 µL Metanol ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Elde edilen bu kromatogramda piklerin kuyruklanması bir önceki enjeksiyondaki kadar olmasa da yine de devam ettiği için hareketli faz karışımına yakın olabilmesi için eklenen asit çözeltisinin konsantrasyonu değiştirilerek denemelere devam edildi. Yeni denemede 250 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 1,746 M asetik asit/suda çözeltisinden 50 µL ve 600 µL Metanol ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika (x1) 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntünün 20 µL'si HPLC sistemine enjekte edildi. Aynı deneme 3,493 M asetik asit çözeltisinden 50 µL eklenerek tekrar edildi. Aynı deneme sırayla 1,746 M ve 3,493 M asetik asit/suda çözeltilerinden 100'er µL eklenerek ve 550 µL Metanol ilave edilerek tekrarlandı. Elde edilen kromatogramlara göre piklerde az da olsa yayvanlaşma gözlemlendi, bunun üzerine aynı denemeler santrifüj olmadan tekrarlandı. Bu denemelerde 250 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 5µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 1,746 M asetik asit çözeltisinden 50 µL ve 600 µL Metanol ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra sırasıyla 0,45 ve 0,2 µm'lik filtrelerden süzülürken ortamdaki kirliliklerin filtreyi tıkaması sonucu enjeksiyon yapılamadı. Bu sebeple denemelere santrifüj basamağı tekrar eklenerek devam edildi. Derişik asit katıldıkça madde bozunmaya ve pik alanları da düşmeye başlıyor. Bu sebeple yeni denemelerde 1,746 M asetik asit/su çözeltisinden 50 µL oranında eklenmesine

karar verildi. Ortamdaki asit oranı denemelerine hidroklorik asit, fosforik asit ve yine asetik asitle devam edildi. 250 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 2µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 1,483 M fosforik asit/su çözeltisinden 50 µL ve 600 µL Metanol ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Aynı deneme sırayla 1,853 M, 1,26 M, 1,112 M ve 0,741 M fosforik asit/su çözeltilerinden 50'şer µL; 1,196 M, 0,598 M, 0,508 M, 0,418 M ve 0,239 M hidroklorik asit/su çözeltilerinden 50'şer µL; 5,24 M ve 6,987 M asetik asit/su çözeltilerinden 50'şer µL oranlarında tekrarlandı. Fosforik asit denemelerinden elde edilen kromatogramlarda piklerdeki yarıma kayboldu. Metanol ile seyreltilerek hazırlanan fosforik asit çözeltisi ile de denemelere devam edildi. Bu amaçla 500 µL serum örneğine Meropenem'in 5µg/50µL çözeltisinden ve Doripenem'in 2µg/50µL çözeltisinden eklendikten sonra 0,1853 M fosforik asit/Metanol çözeltisinden 400 µL ilave edildi. İki dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 0,2 µm'lik filtreden süzüldü. Hareketli faz karışımı içerisinde asetik asit olduğu için aynı deneme çöktürme için 0,871 M asetik asit/Metanol çözeltisinden 400 µL kullanılarak tekrarlandı. Asetik asit kullanıldığında piklerde genişleme gözlemlendi, fosforik asit kullanıldığında ise pik genişlemesi sorunu gözlenmedi ve geri kazanım değeri yükseldiği görüldü. Bu aşamadan sonra Fosforik asit miktarı değiştirilerek sırasıyla 0,1483 M, 0,111 M ve 0,0741 M fosforik asit/Metanol çözeltilerinden 400'er µL şeklinde farklı oranlar ile yapılan çöktürme işlemleri sonucunda 0,111 M fosforik asit/Metanol çözelti karışımının 400 µL kullanılmasıyla hazırlanan serum örnekleriyle en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Gerçekleştirilen tüm örnek hazırlama işlemleri sonucunda Meropenem ve Doripenem'in serumdan ekstre edilmesinde bu örnek hazırlama yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir.

3.3.4. Serumdan Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

500 µL serum (1 mL'ye % 0,9 NaCl çözeltisi ile seyreltilmiş) örneklerine 0,2-60 µg/50 µL aralığında 7 farklı konsantrasyondaki standart Meropenem çözeltilerinden 50'şer µL ve 30µg/50µL konsantrasyonundaki Doripenem çözeltisinden ilave edilmesinin ardından üzerlerine 0,111 M fosforik asit: MeOH karışımından 400 µL eklendi ve 2 dakika boyunca girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra her bir örnek 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alınarak 0,2 µL'luk Nylon filtrelerden

süzüldü ve ardından HPLC sistemine 20'şer μL enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.4'de verilmiştir.

3.3.5. Geri Kazanım Oranı

Meropenem'in serumdan mutlak geri kazanım oranını belirleyebilmek için 1, 30 ve 50 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ 'lik olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda Meropenem katılmış serum örnekleri analiz edildi. Örnek hazırlama ve kromatografi işlemlerinden sonra elde edilen pik alanları, aynı konsantrasyondaki Meropenem'in % 0,9 NaCl ile hazırlanan standart çözeltilerinden elde edilen pik alanları ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.5'de verilmiştir.

3.4. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Kriterleri

Yeni bir yöntem geliştirilirken yöntemin amacı, kapsamı ve uygulaması tanımlanır. Performans parametreleri ve kabul kriterleri tanımlanır. Geliştirilen yöntemin validasyonu yapılır. Yöntem validasyonu, metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Analitik metod validasyonu, bir metodun performansını belirlemek için yapılan bir takım değişkenlere göre test ve ölçme işlemleridir. Çeşitli alanlarda verilen pek çok karar, yapılan ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilir. Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması gerekir. Uluslar arası kabul edilen çeşitli geçerlilik (validasyon) kriterleri mevcuttur. ISO/IEC, ICH, US EPA, US FDA, USP, cGMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş kriterler kullanılmaktadır. Buna göre validasyon kriterleri genellikle seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, aralık, gözlenebilme ve tayin sınırı ve stabiliteden oluşmaktadır. Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik yöntem validasyonu ICH kılavuzu Q2'ye göre yapıldı (67).

3.4.1. Seçicilik

Bir analitik yöntemin seçiciliği; beklenen fiziksel ve kimyasal girişimler veya engelleyiciler varlığında (serum, plazma, idrar gibi biyolojik matriksler, tablet yardımcı maddeleri vb.) sadece amaçlanan bileşen veya bileşenleri doğru şekilde ölçebilme yeteneğidir (67).

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla, serumdaki çalışmalar için boş deneme yapılarak interferans madde varlığı ve hareketli fazdan gelebilecek bir girişim olup olmadığı incelendi. Ayrıca hem Meropenem hem de Doripenem piklerinin saflıkları PDA dedektör ile incelendi.

Serum örneklerine ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1’de gösterilmiştir.

3.4.2. Doğrusallık

Doğrusallık aralığı; geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve doğrusallıkla sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır (67).

Bir analitik metodun doğrusallığı numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin konsantrasyon değerlerine karşılık elde edilen analiz sonuçlarının belirli bir aralık dahilinde doğrusal olması olarak açıklanır. Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için serumda Bölüm 3.3.3.4’de anlatıldığı şekilde Meropenem’i 7 farklı konsantrasyonda içeren karışımlar hazırlanarak analiz yapıldı. Meropenem için doğrusallık aralığı 0,2-60 µg/250 µL olarak çalışıldı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanlarına karşı konsantrasyonların doğrusallık grafikleri çizildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.2’de gösterilmiştir.

3.4.3. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu bu yöntem ile elde edilen analiz sonuçlarının gerçek (teorik) değerlere olan yakınlığıdır. Doğrusal aralık içinde yer alan en az 3 farklı konsantrasyonun en az 3 tekrarlı analizi yapılarak belirlenmeli ve % geri kazanım veya % bağıl ortalama hata olarak verilmelidir.

Geliştirilen yöntem için doğruluk çalışması seruma 1, 30 ve 50 µg/50 µL’lik konsantrasyonlarda hazırlanan Meropenem ve 30 µg/50 µL’lik konsantrasyonda hazırlanan iç standartın (Doripenem) katılmasıyla yapılmıştır. Elde edilen alan oranı değerleri ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyon değerleri bulundu. Bu konsantrasyonların teorik konsantrasyonlara bölümü sonucu ortaya çıkan yüzde geri kazanımlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı ve sonuçlar Bölüm 4.2.3’de bildirildi.

$$\% \text{ Geri Kazanım (verim)} = \frac{\text{Bulunan Konsantrasyon}}{\text{Eklenen Konsantrasyon}} \times 100$$

Geri kazanım sonuçlarının ortalaması, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri hesaplandı.

3.4.4. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığını olarak ifade edilir. Kesinlik 3 gruba ayrılarak incelenmektedir;

- a) *Tekrarlanabilirlik*: Aynı gün, aynı laboratuvar, aynı araştırmacı, aynı cihaz ile yapılan paralel tayinler arasındaki uygunluğu ifade eder.
- b) *Ara Tekrarlanabilirlik*: Farklı günlerde, aynı laboratuvar, aynı araştırmacı, aynı cihaz ile yapılan paralel tayinler arasındaki değişkenliği ifade eder.
- c) *Tekrar Üretilebilirlik*: Çok ortaklı çalışmalarda laboratuvarlar arası kesinliğin tayini için istenen bir parametredir.

Meropenem için kesinlik çalışması; aynı günde ve farklı günlerde 1, 30 ve 50 µg/50 µL'lik olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan Meropenem'in ve iç standart Doripenem'in 30 µg/50 µL'de hazırlanan çözeltilerinin seruma katılmasıyla yapılmıştır. Her konsantrasyon için analizler en az 6 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar % RSD olarak Bölüm 4.2.4'de verildi.

3.4.5. Gözlenebilme Sınırı

Bir analitik yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD), analizi yapılan örneğin belirttiği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimdir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesaplama bulunabilir. Üç farklı şekilde bulunabilir;

a) *Görsel Değerlendirme ile Belirlenmesi*; Gözlenebilme sınırı, tespit edilebilen en düşük konsantrasyon olarak kabul edilmektedir.

b) *Sinyal/Gürültü Oranı ile Belirlenmesi*; Düşük konsantrasyondaki analitin sinyali ile boş örneğin sinyali karşılaştırılmaktadır. Sinyal/gürültü (S/N) oranı 3:1 veya 2:1 arasında olan konsantrasyon, gözlenebilme sınırı olarak kabul edilmektedir.

c) *Yanıtın Standart Sapması ve Eğim ile Belirlenmesi*; Kalibrasyon eğrisinin eğimi ve y eksenini kestiği nokta üzerinden aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{m}$$

σ: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD), kalibrasyon eğrisinin eğimi ve y kesişiminin standart sapmasının kullanıldığı denkleme göre hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5'de verildi.

3.4.6. Tayin Sınırı

Bir analitik yöntemin tayin sınırı (LOQ), analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği doğrusallık sınırları içerisinde girmeyen veya doğrusallığın en alt derişimini oluşturan düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesaplama bulunabilir. Üç farklı şekilde belirlenebilir;

a) *Görsel Değerlendirme ile Belirlenmesi*; Kantitatif tayin yapılabilen en küçük konsantrasyon tayin sınırı olarak kabul edilmektedir.

b) *Sinyal/Gürültü Oranı ile Belirlenmesi*; Düşük konsantrasyondaki analitin sinyali ile boş örneğin sinyali karşılaştırılmaktadır. S/N oranı 10:1 olan konsantrasyon, tayin sınırı olarak kabul edilmektedir.

c) *Yanıtın Standart Sapması ve Eğim ile Belirlenmesi*; Kalibrasyon eğrisinin eğimi ve y eksenini kestiği nokta üzerinden aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{m}$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y keşişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Yöntemin tayin sınırı (LOQ), kalibrasyon eğrisinin eğimi ve y keşişiminin standart sapmasının kullanıldığı denkleme göre hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5’de verildi.

3.4.7. Stabilité

Çözeltili stabilitesinin saptanması için standart çözeltiler 4°C’de karanlıkta 8, 12, 24 ve 48 saat bekletilerek çalışmalar yapılmış elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6’da verilmiştir.

Serum örneklerinde Meropenem’in stabilitesi için 4°C’de 8 saat, üç defa dondurma çözme işleminden sonra, -20°C’de 14 gün saklama işleminden sonra ve otomatik numune örnekleyicisinde 4°C’de 8 saat sonra ölçümler yapılmış sonuçlar Bölüm 4.2.6’da verilmiştir.

3.5. Serumdan Meropenem Miktar Tayini ve Uygulaması

Yöntemin klinik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, hasta gönüllülere 1000 mg Meropenem’in intravenöz olarak uygulanmasının ardından terapötik ilaç düzeyi incelenmiştir.

Serumda Meropenem miktar tayini amacıyla farklı yaş grubuna ait farklı enfeksiyonlara sahip gönüllü 5 hastaya 24 saat boyunca 3 doz 1000 mg Meropenem'in intravenöz olarak uygulanmasından sonra aşağıda belirtilen saat aralıklarında 5-6 mL venöz kan örnekleri toplandı ve 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Bu işlem sonunda elde edilen serum örnekleri analiz edilene kadar -20°C'de saklandı. Toplanan örnekler Bölüm 3.3.3.4'de anlatıldığı gibi analiz edildi. Hasta bilgileri aşağıda bahsedildiği gibidir:

Hasta 1: 79 yaşında kadın hasta serebrovasküler hastalık (SVH) teşhisiyle tedavi görmekte ve aynı zamanda Akciğer enfeksiyonu vardır. Bu hastanın Meropenem'i yarım saat süren intravenöz şeklinde almasından ardından 0, 2, 6, 16, 18 ve 24 saat sonraki serum örnekleri toplanmıştır.

Hasta 2: 50 yaşında kadın hasta Kolanjiokarsinom teşhisiyle tedavi görmekte ve aynı zamanda Perikolanjitik absesi (abdominal enfeksiyonu) vardır. Bu hastanın Meropenem'i üç saat süren intravenöz şeklinde almasından ardından 0 ve 2,5 saat sonraki serum örnekleri toplanmıştır.

Hasta 3: 72 yaşında kadın hasta Metastatik Pankreas kanseri (CA) teşhisiyle tedavi görmekte ve aynı zamanda Akciğer enfeksiyonu vardır. Bu hastanın Meropenem'i yarım saat süren intravenöz şeklinde almasından ardından 0 saat ve 1 saat 40 dakika sonraki serum örnekleri toplanmıştır.

Hasta 4: 47 yaşında erkek hasta Kolanjiyo karsinom teşhisiyle tedavi görmekte ve aynı zamanda kan kültüründe *Pseudomonas aureuginosa* tespit edilmiştir. Bu hastanın Meropenem'i yarım saat süren intravenöz flakon şeklinde almasından ardından 0 ve 2 saat sonraki serum örnekleri toplanmıştır.

Hasta 5: 28 yaşında erkek hasta Pankreas apsesi teşhisiyle tedavi görmektedir. Bu hastanın Meropenem'i yarım saat süren intravenöz şeklinde almasından ardından 0 ve 1,5 saat sonraki serum örnekleri toplanmıştır.

Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3'te verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Meropenem'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Tayini

4.1.1. Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi

Meropenem'in HPLC ile analizinin yapılabilmesi için duran ve hareketli faz seçimi, akış hızı, kolon sıcaklığı, dedektör dalga boyu gibi kromatografik koşullar belirlendi ve iç standart olabilecek madde araştırıldı. Ayırma yöntemi belirlendikten sonra serumdan Meropenem analizi için uygun ekstraksiyon yöntemi belirlendi. Bu bölümde belirlenen koşullar ile elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

Serumdan gelebilecek olası girişimlerden Meropenem'in ayrılabilmesi 150 x 3,9 mm ebatlarında tanecik boyutu 5 µm olan bir C₁₈ kolon kullanıldı ve Meropenem ve iç standart pikleri başarılı bir şekilde ayrıldı. Koruyucu kolon olarak da ebatları 4,0 x 3,0 mm, tanecik boyutu 5 µm olan bir C₁₈ kolon kullanıldı. A (Metanol) ve B (1,746 mM Asetik asit çözeltisi) olmak üzere iki bileşenden oluşan bir hareketli faz seçildi ve Tablo 4-1'de verilen gradient programlama uygulandı. Akış hızı 1 mL/dakika, dedektör dalga boyu 300 nm, kolon sıcaklığı 30°C ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlendi.

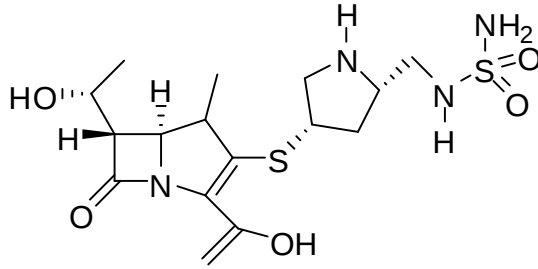
Tablo 4-1: Hareketli fazın gradient programlaması

Zaman (dk)	% A (Metanol)	% B (1,746 mM Asetik asit çözeltisi)
0	10	90
1,65	10	90
1,66	15	85
10	15	85

4.1.2. İç Standart Seçimi

Meropenem'in serumdan tayini için Bölüm 3.3.2'de bahsedilen etken bileşiklerle en uygun iç standardı belirlemek üzere bazı denemeler yapıldı. Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde örnek hazırlama metodu ile çalışıldı. Elde edilen kromatogramların değerlendirilmesi sonucu İmipenem'in serumdan ekstraksiyon verimi düşük çıkarken, Doripenem'in hem ekstraksiyon verimi yüksek çıkmış hem de 4,06 dakika gibi uygun bir

alıkonma zamanında izole ve keskin bir pik vermiştir. Bunun üzerine Doripenem iç standart olarak seçilmiştir.



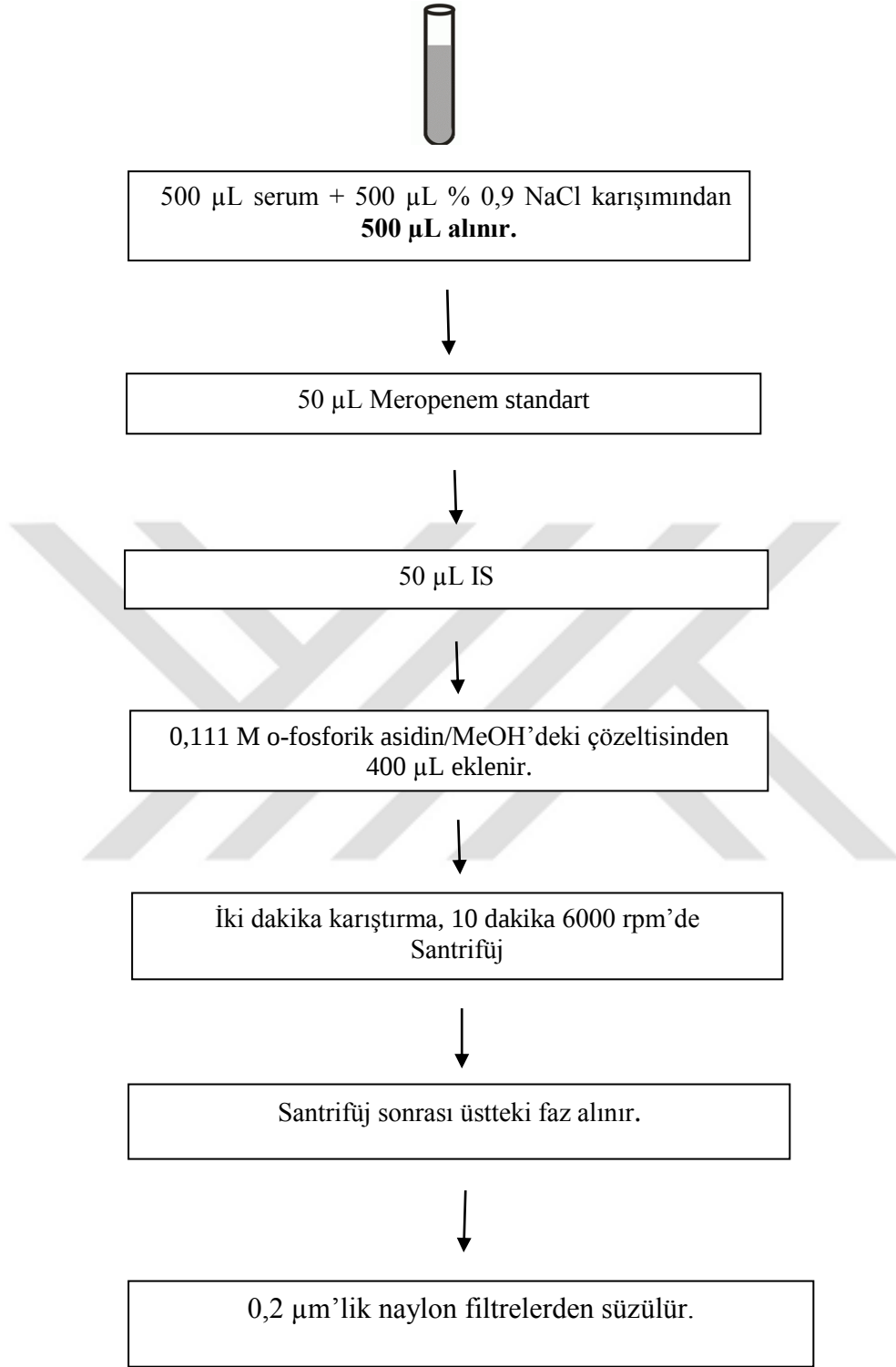
Şekil 4-1: Doripenem'in molekül yapısı.

4.1.3. Serumdan Ekstraksiyon İşlemi

Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde, farklı organik çözücülerle sıvı-sıvı ekstraksiyon denemeleri ve asidik, pH'lara getirilen serum örneklerinden çeşitli çözücüler ile proteinlerin çöktürülmesi metodu denemeleri yapıldı. Elde edilen verim değerleri ve çözücü sistemleri Tablo 4-2'de görülmektedir. Yapılan denemeler sonucunda Meropenem'in tayini için en yüksek geri kazanımı sağlayan 0,111 M fosforik asit/Metanol karışımının 400 µL kullanıldığı çöktürme metodu seçildi. Geliştirilen örnek hazırlama metodu Şekil 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: Elde edilen verim değerleri ve çözücü sistemleri

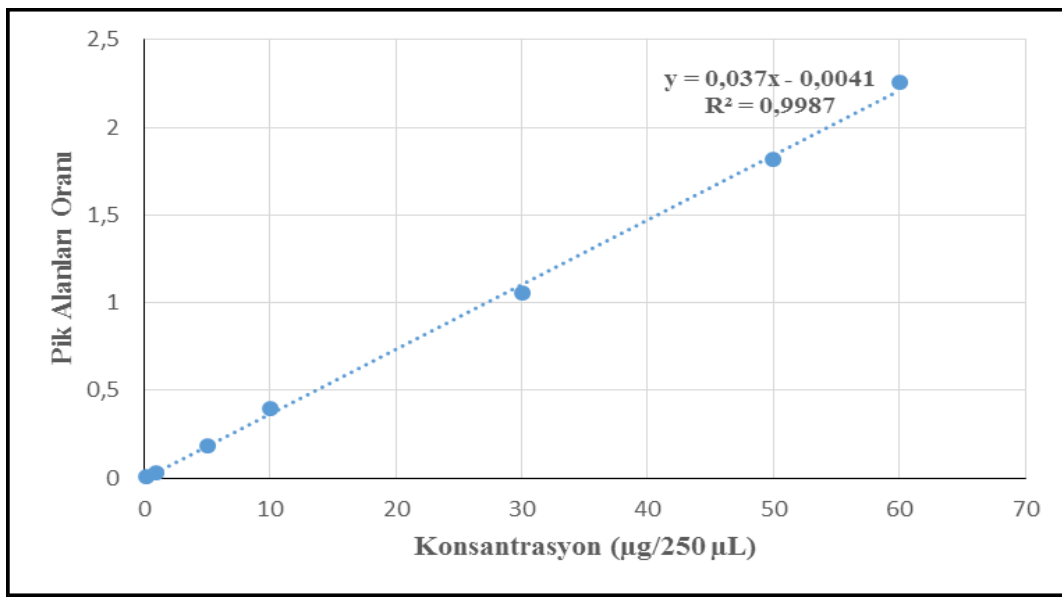
Yöntem	Ortam	Çözücü	Verim
Sıvı-sıvı ekstraksiyon	Metanol	Kloroform	% 48,95
	Asetonitril		% 7,41
	Aseton		% 12,605
Çöktürme	% 0,9 NaCl	Metanol Aseton	% 41,32 % 70,084
	1,746 M HAc	Metanol	% 75,26
	3,493 M HAc		% 77,89
	0,111 M H ₃ PO ₄	Metanol	% 94,94
	1,483 M H ₃ PO ₄		% 72,88
	1,260 M H ₃ PO ₄		% 63,147
	1,853 M H ₃ PO ₄		% 59,16



Şekil 4-2: Serumdan Ekstraksiyon İşlemi.

Tablo 4-4: Tablo 4-3’de verilen ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
Eğim	0,0381	0,0376	0,0370	0,0365	0,0363	0,0362	0,0370
Kesim noktası	0,0001	0,0007	0,0022	0,0073	0,0079	0,0064	0,0041
R ²	0,9981	0,9984	0,9989	0,9986	0,9985	0,9988	0,9987



Şekil 4-3: Meropenem’in 0,2-60 µg/250 µL konsantrasyon aralığında katkılı serumda hazırlanan ölçü eğrisi.

4.1.5. Geliştirilen Yöntemin Geri Kazanım Oranı

Meropenem’in serumdan geri kazanım oranını hesaplamak amacıyla 1, 30 ve 50 µg/250 µL olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Meropenem içeren serum örnekleri Bölüm 3.3.3.5’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen sonuçlara göre hesaplanan geri kazanım oranları Tablo 4.5’de verilmiştir.

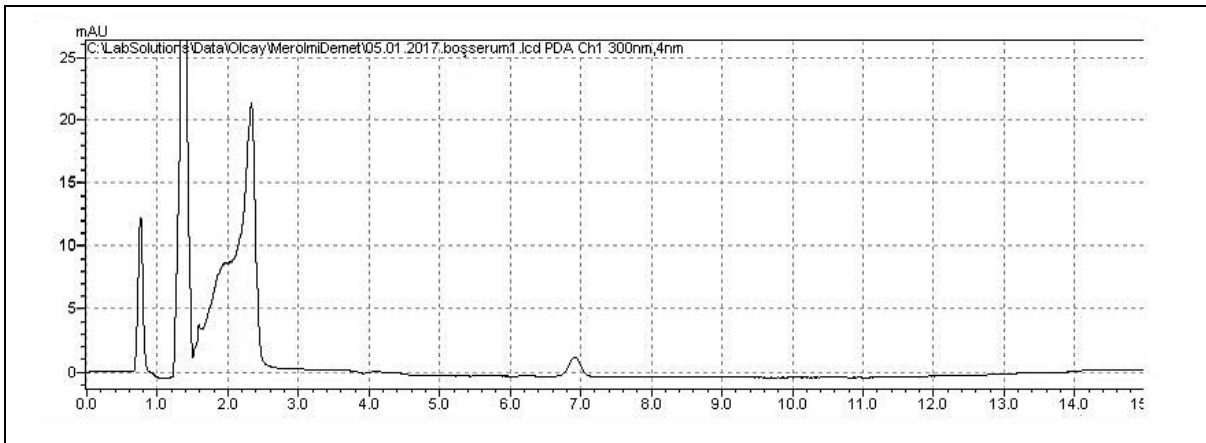
Tablo 4-5: Meropenem'in serumdan geri kazanım oranı

Seruma katılan Meropenem miktarı ($\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$)	Bulunan konsantrasyon ($\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$) $\pm$ SD	% Geri Kazanım	% RSD
1	0,8769 $\pm$ 0,0297	87,69	3,40
30	28,6283 $\pm$ 0,4949	95,42	1,73
50	49,1560 $\pm$ 1,4956	98,31	3,04

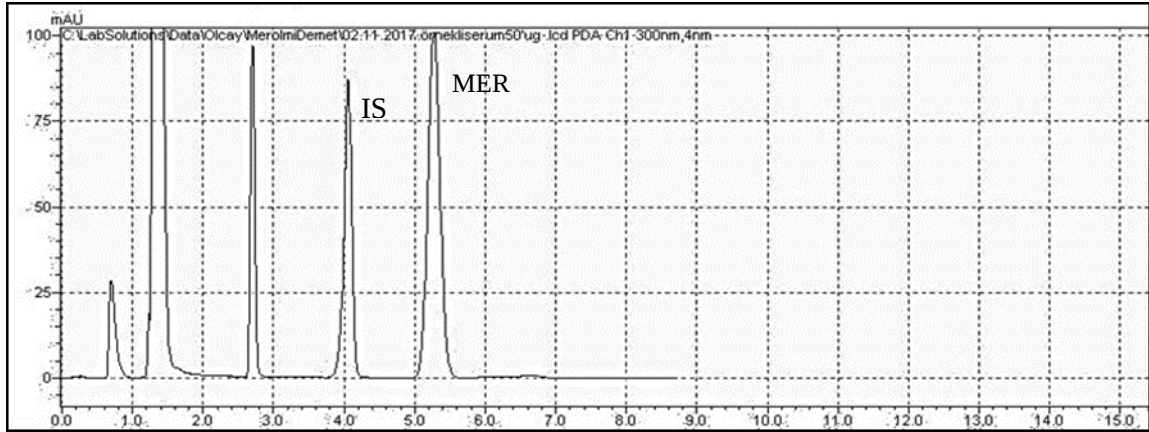
4.2. Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

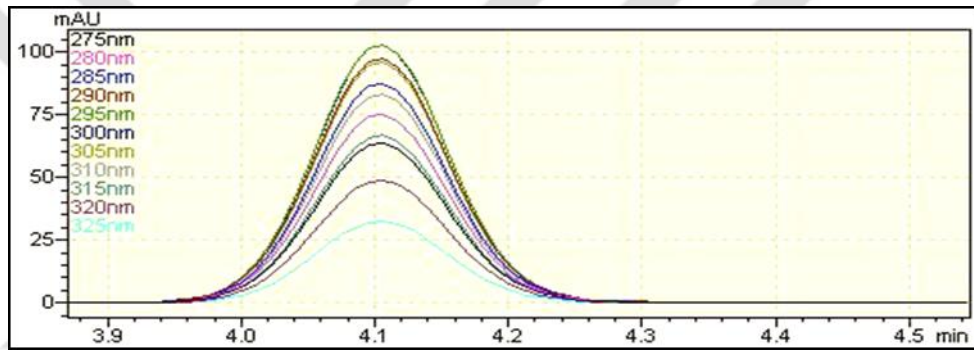
Yöntemin seçiciliğini tayin etmek amacıyla yapılan analizler sonucunda Meropenem ve IS piklerinin alıkonma zamanlarında hareketli fazın gradient sisteminden ileri gelen değişim pikleri ile serumdaki proteinlerden kaynaklanan herhangi bir girişim yapmadığı tespit edildi. Meropenem'in konsantrasyonu 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan standart çözeltisinin pik saflık indeksi 0,999977, IS (Doripenem'in) ise konsantrasyonu 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olan standart çözeltisinin pik saflık indeksi 0,999981'dir. Katkılı serum örneğindeki Meropenem pikinin saflık indeksi ise 0,999975'dir. Çözeltilere ait kromatogramlar Şekil 4-4, Şekil 4-5, Şekil 4-6 ve Şekil 4-7'de verilmiştir.



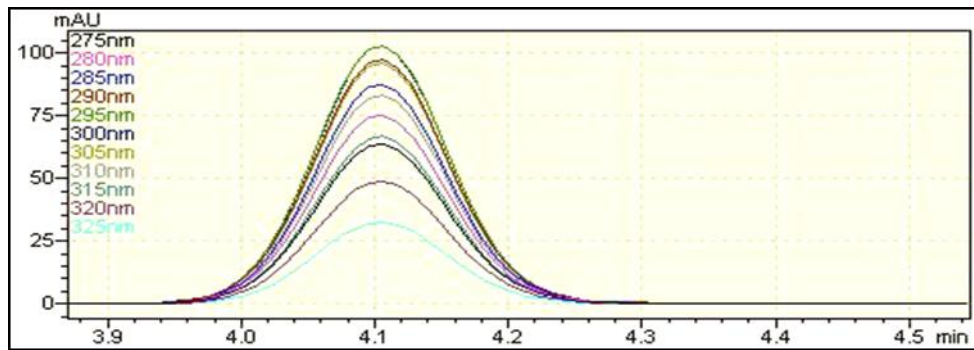
Şekil 4-4: Boş serum örneğine ait kromatogram.



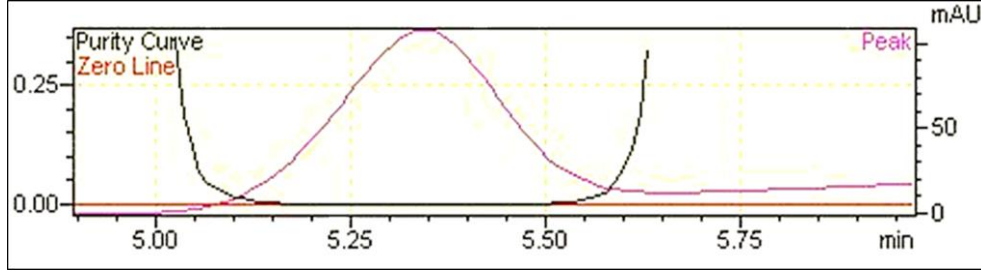
Şekil 4-5: 30 µg iç standart ve 50 µg Meropenem katkılı serum örneğine ait kromatogram.



Şekil 4-6 : 30 µg/mL Doripenem standart çözeltisinin pik saflığı.



Şekil 4-7: 50 µg/mL Meropenem standart çözeltisinin pik saflığı.



Şekil 4-8: 50 µg Meropenem katkılı serum örneğindeki Meropenem pik saflığı.

4.2.2. Doğrusallık

Doğrusallık aralığı 0,2-60 µg/250 µL olarak saptandı. Bu aralıktaki 7 noktaya ait doğrusallık grafikleri ve parametreleri ile ilgili sonuçlar serum için Bölüm 4.1.4'te verilmiştir.

4.2.3. Doğruluk

Meropenem için serumda 1, 30 ve 50 µg/250 µL'lik konsantrasyonlarda yapılan doğruluk çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4-6'da verilmiştir. RSD ve RME değerleri serumda sırayla % 2,03-3,65 ve % 1,24-10,43 olarak bulundu.

Tablo 4-6: Serumda doğruluk değerleri

	<i>Seruma eklenen Meropenem miktarı (µg/250 µL)</i>		
	1	30	50
Bulunan konsantrasyon (µg/250 µL)	0,9425	29,3544	51,1958
	0,9292	29,2107	50,4450
	0,8909	29,1890	49,4832
	0,8773	28,3680	49,3468
	0,8719	28,1721	48,1157
	0,8625	28,0816	47,6987
Ortalama	0,8957	28,7293	49,3808
RSD (%)	3,65	2,03	2,70
RME (%)	-10,43	-4,24	-1,24
Geri kazanım (%) ort.	89,57	95,76	98,76

4.2.4. Kesinlik

1, 30 ve 50 µg/250 µL'lik konsantrasyonlarda olmak üzere Meropenem içeren serum örnekleri Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri Tablo 4-7'te verilmiştir.

Farklı günlerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler ve bağıl standart sapma değerleri Tablo 4-8'te verilmiştir.

Tablo 4-7: Aynı gün içinde yapılan serumda yapılan Meropenem analizlerinin tekrarlanabilirliği

	<i>Seruma eklenen Meropenem miktarı (µg/250 µL)</i>		
	1	30	50
Bulunan konsantrasyon (µg/250 µL)	0,9415	29,3543	50,4589
	0,9292	29,2107	49,4832
	0,9043	29,0014	49,3468
	0,8773	29,1890	49,4499
	0,8719	28,1722	49,3468
	0,8625	28,0816	47,6987
Ortalama	0,8979	28,8349	49,2974
RSD (%)	3,618	1,9438	1,807
RME (%)	-10,22	-3,88	-1,41

Tablo 4-8: Farklı günlerde yapılan serumda yapılan Meropenem analizlerinin tekrarlanabilirliği

	<i>Seruma eklenen Meropenem miktarı (µg/250 µL)</i>		
	1	30	50
Bulunan konsantrasyon (µg/250 µL)	0,9292	29,1890	50,4589
	0,9194	29,1007	49,4741
	0,9043	29,0681	49,4499
	0,8773	29,0014	49,0465
	0,8625	28,1722	49,3468
	0,8575	28,0816	47,6987
Ortalama	0,8917	28,7688	49,2458
RSD (%)	3,3871	1,744	1,8183
RME (%)	-10,82	-4,104	-1,508

4.2.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Geliştirilen yöntemin tayin ve gözlenebilme sınırı, Bölüm 3.4.5 ve 3.4.6’da verilen kalibrasyon eğrisinin y kesişiminin standart sapması ve eğimin kullanıldığı denkleme göre hesaplandı. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,08 ve 0,3 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.2.6. Stabilite

Meropenem’in standart çözeltilerinin stabilitesinin tayini için Bölüm 3.4.7’de anlatıldığı şekilde 4°C’de karanlıkta 8, 12, 24 ve 48 saat bekletilerek yapılan çalışmaların sonucu Tablo 4-9’da verilmiştir.

Tablo 4-9: 4 °C’ de karanlıkta bekletilen standart Meropenem çözeltilerinin stabilitesi

		Bulunan Konsantrasyon (µg/250 µL) ± SD	% RSD	% RME
4°C’de ve karanlıkta	Başlangıç	29,5528 ± 0,004	0,14	-1,49
	8 saat sonra	29,5426 ± 0,016	0,06	-1,52
	12 saat sonra	29,5271 ± 0,005	0,02	-1,57
	24 saat sonra	29,5104 ± 0,0047	0,02	-1,63
	48 saat sonra	29,4902 ± 0,0049	0,02	-1,69

Serum örneklerinde Meropenem’in stabilitesi için 4°C’de 8 saat, üç defa dondurma çözme işleminden sonra, -20°C’de 14 gün saklama işleminden sonra ve otomatik numune örnekleyicisinde 4°C’de 8 saat sonra yapılan ölçüm sonuçları Tablo 4-10’da verilmiştir.

Tablo 4-10: Serum örneklerinde Meropenem’in stabilitesi

Seruma eklenen Meropenem miktarı (30 µg/250 µL)	Koşullar	Bulunan konsantrasyon (µg/250 µL)	% RSD	% RME
30	4°C’de 8 saat	29,5470 ± 0,005	0,017	-1,51
	Otomatik numune örnekleyicisinde 4°C’de 8 saat	29,546 ± 0,004	0,014	-1,51
	-20 °C’de 14 gün	28,7036 ± 0,078	0,27	-4,3
	3 defa dondurma-çözme işleminden sonra	28,488 ± 0,004	0,013	-5,04

4.3. Serumda Meropenem Miktar Tayini ve Uygulaması

Çeşitli enfeksiyona sahip gönüllü hasta grubundan 1000 mg Meropenem'in intravenöz olarak uygulanmasının ardından Bölüm 3.5'de yazılan zaman aralıklarında toplanan serum örnekleri Bölüm 3.5 ve 3.3.3.4' de anlatıldığı gibi analiz edilmiştir. Bu örneklerin içerdiği Meropenem miktarı serum için hazırlanan ölçü eğrilerine ait ortalama doğru denkleminden bulunmuştur (Tablo 4-3).

Hasta-1: Hasta Meropenem'i aldıktan 2, 6, 16, 18 ve 24 saat sonra alınan serum örneklerinin konsantrasyonları sırayla 3,27, 3,20, 2,44, 2,40 ve 0,6 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Bu hastaya ait zaman-konsantrasyon ilişkisini gösteren grafik Şekil 4-9'da verilmiştir.

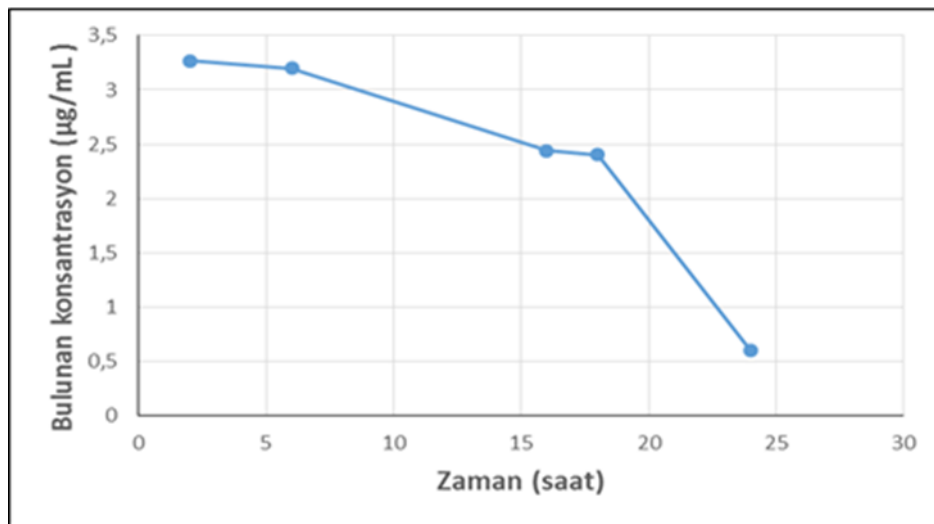
Hasta-2: Hastanın Meropenem'i aldıktan 2 saat 30 dakika sonra alınan serum örneğinin konsantrasyonu 42,96 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur.

Hasta-3: Hasta Meropenem'i aldıktan 1 saat 40 dk sonra alınan serum örneğinin konsantrasyonu 12,64 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur.

Hasta-4: Hasta Meropenem'i aldıktan 2 saat sonra alınan serum örneğinin konsantrasyonu 10,44 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur.

Hasta-5: Hasta Meropenem'i aldıktan 1 saat 30 dakika sonra alınan serum örneğinin konsantrasyonu 2,12 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur.

H-2, H-3, H-4 ve H-5'e ait sonuçlar Tablo 4-11'de verilmiştir.



Şekil 4-9 : H-1'e ait zaman-konsantrasyon ilişkisi.

Tablo 4-11: Hasta 2-5'e ait Serumda Bulunan Meropenem Konsantrasyon Değerleri

Hasta	Yaş- Cinsiyet	Enfeksiyon Tipi	Zaman	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)
H-2	50, Kadın	Perikolanjitik apse (Kolanjiyo karsinom)	2 sa 30 dk	42,96
H-3	72, Kadın	Akciğer enfeksiyonu (Metastatik Pankreas CA)	1 sa 40 dk	12,64
H-4	47, Erkek	<i>Pseudomonas aureuginosa</i> (Kolanjiyo karsinom)	2 sa	10,44
H-5	28, Erkek	Pankreas apsesi	1 sa 30 dk	2,12

5. TARTIŞMA

Meropenem geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik sınıfından karbapenem alt grubuna ait bir antibiyotiktir. Çok geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği ile karbapenemler, ağır enfeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler içinde oldukça değerlidir. Pnömoni ve nozokomiyal pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, intra-abdominal enfeksiyonlar, yoğun bakım ünitelerindeki ciddi enfeksiyonlarda, deri ve deri yapısına ait enfeksiyonlarda, menenjitte, endometrit ve pelvik enflamatuvar hastalıklar gibi jinekolojik enfeksiyonların tedavisinde intravenöz yolla kullanılan Meropenem, 1996 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (5).

Yapılan literatür araştırmalarına göre Meropenem'in hem farmasötik preparatlardan hem de biyolojik sıvılardan tayini için UV spektrofotometresi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) ve ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemleri bulunmaktadır. Genel olarak HPLC çalışmalarına bakıldığında geliştirilen yöntemde plazma örnekleri sistem içerisinde yer alan ekstraksiyon kolon aracılığıyla saflaştırılmış ve ardından analiz edilmiştir (36, 38, 40). Geri kazanım aralığını % 89-98 civarında sağlayan bu sistem örnek hazırlama basamağında büyük bir kolaylık sunarken sistem için gerekli olan ekstraksiyon sistemi her laboratuvarda bulunabilecek özellikte değildir. Diğer HPLC çalışmalarına göz atıldığında ise plazma örneklerinden Meropenem'in ekstraksiyon işlemi için özel filtreli santrifüj cihazı kullanılmış ardından sisteme enjeksiyon verilmiştir (39, 48, 56). Bu cihaz da yapılan çalışmalarda 0,05-100 µg/mL gibi geniş doğrusallık aralıkları elde edilirken örnek hazırlama aşamasında zamandan tasarruf etmesi ve hızlı analize olanak sağlamasıyla da büyük bir kolaylıktır. Ancak maliyetli olması dolayısıyla her laboratuvarda uygulanabilecek bir sistem değildir. LC-MS/MS ile yapılan çalışmalar incelendiğinde plazmadan Meropenem'i % 77,6 geri kazanım oranı sağlayan çalışmalar (49) olduğu gibi örnek hazırlama aşamasında katı-faz ekstraksiyonu (SPE) ve geri ekstraksiyon kullanılan çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda ise geri kazanım sırayla % 62 ve % 59 olarak bulunmuştur (44, 53). HPLC-MS ya da LC-MS/MS sistemleri ile genellikle daha hassas ve duyarlı çalışmalar yapılmasına karşın günümüzde hala oldukça pahalı ve her laboratuvarda bulunamayacak cihazlardır.

Tüm literatür çalışmaları göz önünde bulundurarak bu doktora tez çalışmasında Meropenem'in biyolojik sıvılardan tayini için HPLC-DAD dedektörü tercih edildi.

Öncelikle HPLC analizi için optimum koşulları belirlemek amacıyla çeşitli denemeler yapıldı. Farklı polaritede çeşitli oranlarda hazırlanan 20 mM (hekzano sülfonik asitli) o-fosforik asit:ACN, 10 mM o-fosforik asit (TEA ile pH=7'ye ayarlandı):ACN , 10 mM (Hekzano sülfonik asitli) o-fosforik asit:ACN; (80:20) ve (85:15) oranlarında, 1 mM tetraheptilamonyum iyod (pH=6,9): ACN; 0,2 M Borik asit tamponu (1 M NaOH ile pH=7,2'ye ayarlandı):MeOH; 1,746 mM Asetik asit: MeOH çözücü karışımları çeşitli oranlarda izokratik ve gradient programlar uygulanarak, değişik akış hızlarında denemeler yapılmıştır. Denemeler sırasında Meropenem ve iç standartın piklerinin uygun alıkonma zamanında ayrılmadan elüe olması ve madde piklerinin hem birbirlerinden hem de biyolojik sıvıdan gelen girişimlerden ayrılmasına dikkat edildi. Sabit faz olarak da farklı dolgu malzemelerine sahip HILIC, pentaflorofenil propil ve C18 kolonlar denenmiştir. Denenen sistemler arasında en iyi ayrılma ebatları 3,9 x 150 mm, partikül boyutu 5 µm olan C18 kolon ile 1 mL/dk akış hızıyla 1,746 mM Asetik asit: Metanol çözücü karışımlarının Tablo 4-1'de verilen gradient uygulaması ile elde edilmiştir. Bu koşullarda Meropenem'in alıkonma zamanı 5,3 dakika olarak tespit edilmiştir.

Farklı ilaç maddelerinin denenmesi sonucu geliştirilen kromatografi koşullarına en iyi uyum sağlayan Doripenem iç standart olarak belirlenmiştir. Doripenem'in alıkonma süresi 4,06 dakika olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları Meropenem'e ait pik alanlarının, iç standarda ait pik alanlarına oranlaması ile değerlendirilmiştir.

Bu yöntemin biyolojik sıvılara uygulanmasında plazmanın elde edilmesinde kullanılan sodyum sitrat, EDTA vb. gibi maddelerin Meropenem'in serumdan ekstraksiyon verimini etkileyeceği düşünülerek çalışmada serum tercih edilmiştir.

Serum proteinlerinin olası girişimlerini engellemek ve Meropenem'in serumdan ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için sıvı-sıvı ekstraksiyon ve çöktürme yöntemine yönelik farklı çözücülerle Tablo 3-1'de anlatıldığı şekilde çeşitli ön denemeler yapılmıştır. Metanol-Kloroform ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyon denemelerinde geri kazanımlar düşük çıkmıştır. Asetonitril-Kloroform sistemi kullanıldığında piklerde yarıma gözlenmiştir. Aseton-Kloroform sistemi kullanıldığında ise madde ve iç standart piklerine kirliliklerin karıştığı ve piklerin yayvanlaştığı belirlenmiştir. Bu sebeple sıvı-sıvı ekstraksiyon denemelerinden vazgeçilmiş, proteinlerin çöktürülmesi yöntemi denenmeye karar verilmiştir. Çöktürme yöntemi denemeleri için çeşitli çözücüler ve asidik reaktifler kullanıldı. İlk olarak Metanol ile çöktürme işlemi yapıldı ve santrifüj sonrası alınan üst faz

azot altında kurumaya bırakıldı. Ardından % 0,9 NaCl: Metanol karışımıyla çözüldü ve enjeksiyona verildi. Yapılan enjeksiyonda maddenin ve iç standart piklerinin yarıldığı gözlemlendi. Bunun üzerine literatür taraması yapıldı ve karbapenem tipi antibiyotiklerin NaCl çözeltisi ilavesiyle bozunmasının geciktiği bildirilmiştir. Böylece maddelerin bozunmasını engellemek için tuz çözeltilerinin konsantrasyonu artırarak deneme yapılmaya karar verildi. Sırayla %1'lik, %5'lik, %20'lik, %50'lik ve doymuş NaCl çözeltileri ve katı NaCl eklenerek çalışma tekrarlandı. Bu denemeler sonucunda da maddelerin azot altında uçurulma sırasında bozunmasının tamamıyla engelenemediği için NaCl yerine alternatif olabilecek farklı çözeltiler araştırıldı. Aynı deneme % 20'lik KCl çözeltisi ile tekrarlandı. Geri kazanımın yine düşük çıkması üzerine farklı organik çözücüler ile çöktürme metodu kullanılarak denemelere devam edildi. Asetonitril ve Aseton kullanılarak çöktürme işlemi tekrarlandı. Çöktürme işlemi ardından santrifüj ve azot altında uçurma işlemi tekrarlandı. Azot altında uçurma sonrası hareketli faz karışımı (asetik asit: metanol) kullanılarak enjeksiyona verilen serum örneklerinin piklerinde kuyruklanma görülmesi ve geri kazanımın düşük çıkması üzerine azot altında uçurma işleminden vazgeçildi. Santrifüj sonrası süzme işlemi ardından direk enjeksiyon yaparak denemelere devam edildi. Yeni denemelerde çöktürme çözücüsü olarak hareketli faz ve metanol karışımı kullanıldı. Elde edilen kromatogramlarda piklerin yine kuyruklandığı için çöktürme çözücüsü karışımının hareketli faza yakın olabilmesi amacıyla değişik konsanstrasyonlarda farklı asitli çözeltiler eklenmesine karar verildi. Ortamdaki asit oranı denemelerine asetik asit, hidroklorik asit ve fosforik asit kullanıldı. Bütün bu denemeler sonucunda Meropenem ve iç standart Doripenem'in serumdan en uygun ekstraksiyon metodunun Şekil 4-2'de anlatıldığı üzere o-fosforik asit:MeOH karışımı ile yapılan çöktürme metodu olduğuna karar verildi.

Belirlenen koşullarda çalışılarak 0,2-60 µg/250 µL konsanstrasyon aralığında ölçü eğrisi hazırlanmış ve konsantrasyona karşılık gelen pik alan oranlarıyla en küçük kareler yöntemi uygulanarak doğru denklemi hesaplandı. Denklem $A = 0,0370 C - 0,0041$ ve $R^2 = 0,9987$ olarak bulundu.

Geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri ölçü eğrisi yardımıyla hesaplandı. Bu amaçla eğrinin y kesişiminin standart sapmasının ölçü eğrisinin eğimine oranı σ/m değeri LOD için 3 ile LOQ'yi bulmak için 10 ile çarpıldı. Elde edilen sonuçlara göre hesaplanan hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,08 ve 0,3 µg/mL olarak bulundu.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda (sırasıyla 1 µg/250 µL, 30 µg/250 µL, 50 µg/250 µL) Meropenem içeren serum örnekleri 6 kez analiz edilmiş ve analizlere ait RSD % 1,818 -3,618 değerleri yöntemin kesinliğinin yeterli derecede yüksek olduğunu kanıtlamıştır.

Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla 1, 30 ve 50 µg/ 250 µL konsantrasyonlarda Meropenem içeren katkılı serum örneklerinde geri kazanım çalışması yapıldı. Bu amaçla katkılı serum örneklerinden elde edilen pik alan oranları, standart Meropenem ile çalışılarak elde edilen ölçü eğrisinde yerine konularak konsantrasyon hesaplanmış, bulunan sonuçlar % geri kazanım olarak bildirildi. Yapılan analizler sonucunda % 2,03-3,65 aralığındaki RSD değerlerinde serumdan ekstraksiyonla ortalama geri kazanım oranı % 89,57-98,76 arasında bulundu.

Geliştirilen yöntem Meropenem'in terapötik ilaç düzeyi takibi için farklı enfeksiyonlara sahip gönüllü hastalardan çeşitli zaman aralıklarında alınan serum örneklerine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçları incelediğimizde Meropenem'in hasta kanında kısa sürede C_{maks} 'a ulaşmasının ardından (ilaç vücuttan idrar yoluyla hızla atıldığı için) 1-2 sa aralığında vücuttaki ilaç konsantrasyon değerleri hızla düşmeye başlamıştır. H-1 için 3,27 µg/mL, H-2 için 42,96 µg/mL, H-3 için 12,64 µg/mL, H-4 için 10,44 µg/mL, H-5 için 2,12 µg/mL konsantrasyon değerleri bulunmuştur. H-2, H-3 ve H-4'e ait bulunan konsantrasyonlar diğer hasta grubunun kandaki ilaç konsantrasyon değerlerinden daha yüksektir, yani ilaçların vücuttan atılımı daha yavaştır. Bu hastaların farklı cinsiyet, farklı yaş grubu aralığı ve farklı tip enfeksiyonlara sahip olmaları dışında tek ortak noktaları kanser hastaları olmalarıdır. Kanser tedavisine yönelik kullanılan kemoterapötik ajanlarla oluşabilecek ilaç etkileşimleri dolayısıyla veya hastanın böbrek ve karaciğer metabolizmasının bozunabilmesi sebebiyle ilaç atılım mekanizmasında değişikliklere yol açabileceği düşünülmektedir. Literatürde de kanser hastalarının metabolizması ve ilaç direncini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (68, 69). H-2'nin en yüksek değer çıkmasının sebebi ise bu hastanın alerjisi dolayısıyla ilacı üç saat gibi daha uzun sürede intravenöz şekilde almasıdır. H-1 ve H-5'e ait hasta grubu enfeksiyon dışında çok ciddi bir hastalık geçirmemektedir. Kanserli hasta grubuyla kıyaslandığında farklı cinsiyete ve farklı yaş aralığına sahip olmalarına rağmen ilacın vücuttaki atılımı daha hızlı olduğundan ilaç

düzeyi düşük konsantrasyonlarda çıkmıştır. Sonuçlara bakıldığında her iki hasta grubunun da kendi aralarında uygunluk gösterdiği görülmüştür.

Bugüne kadar yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde Meropenem'in biyolojik sıvılardan tayini için geliştirilmiş yöntemler arasında bu tez çalışması yüksek geri kazanım oranı, örnek hazırlama kolaylığı ve analiz süresinin kısa olmasının yanı sıra düşük maliyetli olmasıyla önemli üstünlükler sağlamıştır. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntem kolay klinik uygulanabilirliği sayesinde Meropenem'in terapötik ilaç monitörizasyonu takibi için rahatlıkla kullanılabilecek niteliktedir.



KAYNAKLAR

1. Akkan AG. *Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları*. in *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*. 1997. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri.
2. Oncul O. *Antibiyotikler I*. in *Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*. 2012. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri
3. Ashby B, Turkington, C. *The Encyclopedia of Infectious Diseases*. 3 rd ed.: New York: Facts on File. 242; 2007.
4. Osler W. *The principles and practice of medicine*. New York, London, D. Appleton and company. 108.
5. U.S. Food & Drug Administration. Available from: <https://www.fda.gov/>.
6. Ruuskanen O. LE, Jennings L.C., Murdoch D.R. Viral pneumonia. 2011; **377**(9773): 1264-1275.
7. George RB. *Chest Medicine: Essentials of Pulmonary and Critical Care Medicine*. 5th ed. Chest Medicine (George), ed. Light RW, Matthay, M.A. , Matthay, R.A. . Philadelphia: Wolter Kluwers/Lippincott Williams & Wilkins. 353; 2006.
8. O'Neil MJ. The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. içinde *Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. O'Neil MJ, Editor. 2013. Cambridge, UK : Royal Society of Chemistry: England.
9. Prashad AS, Vlahos N, Fabio P, Feigelson GB. A highly refined version of the alpha-keto ester based carbapenem synthesis: The total synthesis of meropenem. *Tetrahedron Letters* 1998; **39**(39): 7035-7038.
10. ; Available from: <https://www.rxlist.com/merrem-iv-drug.htm>.
11. Mouton JW, Anker JN. Meropenem Clinical Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* 1995; **28**(4): 275-286.
12. Blumer JL. Meropenem: evaluation of a new generation carbapenem. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1997; **8**(2): 73-92.
13. Mulazimoglu M. 1986'dan Günümüze Karbapenemler. *Ankem Derg.* 2010; **24**: 33-35.
14. Gur D. Hastane İnfeksiyonlarında Önem Kazanan Gram-negatif Bakterilerde Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1997; **1**: 38-45.
15. Başaran SK, V. Doripenem: Klinik Uygulamada Yeni Bir Karbapenem. *Klinik Derg.* 2010; **23**(1): 2-5.
16. Le J, Castanheira, M., Burgess, D.S., McKee, B., Iqbal, R., Jones, R.N. Clonal Dissemination of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California. *J. Clin. Microbiol.*; **48**(2): 623-625.
17. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54**(1): 24-38.
18. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clin. Microbiol. and Infect.* 2008; **14**(12): 1102-1111.
19. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, ve ark. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 2007; **67**(7): 1027-1052.
20. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; **11**(4): 529-544.
21. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**(5): 489-495.

22. Mouton JW, Touzw DJ, Horrevorts AM, Vinks AA. Comparative pharmacokinetics of the carbapenems: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2000; **39**(3): 185-201.
23. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; **55**(11): 4943-4960.
24. Drusano G. Meropenem: laboratory and clinical data. *Clin Microbiol Infect* 1997; **3**(4): 51-59.
25. Kayaalp OS. *Akılci Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Vol. 1: Pelikan Yayıncılık. 213-215; 2012.
26. Üstünes L. Meropenem. 2011. Rx-Media Pharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.
27. *European Pharmacopoeia*. 8th ed.: EDQM Publication ID 15 July 2013.
28. Homoda AM, Kamel MS, Khaled E. New spectrophotometric microdetermination of carbapenem antibiotics derivatives in pharmaceutical formulations. *Journal of Taibah University for Science* 2016; **10**(1): 19-25.
29. Singh DK, Maheshwari G. Development and validation of spectrophotometric methods for carbapenems in pharmaceutical dosage forms. *Medicinal Chemistry Research* 2013; **22**(12): 5680-5684.
30. Mendez ASL, Steppe M, Schapoval EES. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; **33**(5): 947-954.
31. Marwada KR, Patel JB, Patel NS, Patel BD, Borkhatariya DV, Patel AJ. Ultraviolet spectrophotometry (dual wavelength and chemometric) and high performance liquid chromatography for simultaneous estimation of meropenem and sulbactam sodium in pharmaceutical dosage form. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2014; **124**: 292-299.
32. Cielecka-Piontek J, Zajac M, Jelinksa A. A comparison of the stability of ertapenem and meropenem in pharmaceutical preparations in solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; **46**(1): 52-57.
33. Ozkan Y, Kucukguzel I, Ozkan SA, Aboul-Enein HY. A rapid, sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, human serum and urine. *Biomedical Chromatography* 2001; **15**(4): 263-266.
34. Negi V, Chander V, Singh R, Sharma B, Singh P, Upadhaya K. Method development and validation of meropenem in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. *Indian Journal of Chemical Technology* 2017; **24**(4): 441-446.
35. Dupuis A, Minet P, Couet W, Courtois P, Bouquet S. Rapid and sensitive determination of meropenem in rat plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1998; **21**(16): 2549-2560.
36. Lee HS, Shim HO, Yu SR. High-performance liquid chromatographic determination of meropenem in rat plasma using column-switching. *Chromatographia* 1996; **42**(7): 405-408.
37. Farin D, Kitzes-Cohen R, Piva G, Gozlan I. High performance liquid chromatography method for the determination of meropenem in human plasma. *Chromatographia* 1999; **49**(5-6): 253-255.
38. Ehrlich M, Daschner FD, Kümmerer K. Rapid antibiotic drug monitoring: Meropenem and ceftazidime determination in serum and bronchial secretions by

- high-performance liquid chromatography–integrated sample preparation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2001; **751**(2): 357-363.
39. Ikeda K, Ikawa K, Morikawa N, Miki M, Nishimura SI, Kobayashi M. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for real-time therapeutic drug monitoring of meropenem in plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007; **856**(1-2): 371-375.
 40. Bompadre S, Ferrante L, De Martinis M, Leone L. Determination of meropenem in serum by high-performance liquid chromatography with column switching. *Journal of Chromatography A* 1998; **812**(1-2): 249-253.
 41. Legrand T, Chhun S, Rey E, Blanchet B, Zahar JR, Lanternier F, ve ark. Simultaneous determination of three carbapenem antibiotics in plasma by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2008; **875**(2): 551-556.
 42. Denooz R, Charlier C. Simultaneous determination of five beta-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2008; **864**(1-2): 161-167.
 43. Verdier MC, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentue-Ferrer D. Simultaneous Determination of 12 beta-Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; **55**(10): 4873-4879.
 44. Carlier M, Stove V, Roberts JA, Van de Velde E, De Waele JJ, Verstraete AG. Quantification of seven beta-lactam antibiotics and two beta-lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2012; **40**(5): 416-422.
 45. Colin P, De Bock L, T'Jollyn H, Boussery K, Van Bocxlaer J. Development and validation of a fast and uniform approach to quantify beta-lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2013; **103**: 285-293.
 46. Demiralay EC, Koc D, Daldal YD, Alsancak G, Ozkan SA. Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of these compounds in human urine. *Biomedical Chromatography* 2014; **28**(5): 660-666.
 47. Chang P, Dai LL, Zhang DJ, Wang BJ, Guo RC. Determination of Meropenem in Human Plasma by HPLC: Validation and its Application to Pharmacokinetic Study. *Latin American Journal of Pharmacy* 2014; **33**(5): 870-874.
 48. Huang LS, Haagensen J, Verotta D, Lizak P, Aweeka F, Yang K. Determination of meropenem in bacterial media by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2014; **961**: 71-76.
 49. Rigo-Bonnin R, Juvany-Roig R, Leiva-Badosa E, Sabater-Riera J, Perez-Fernandez XL, Cardenas-Campos P, ve ark. Measurement of meropenem concentration in different human biological fluids by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014; **406**(20): 4997-5007.

50. Zalewski P, Talaczynska A, Korban P, Garbacki P, Mizera M, Cielecka-Piontek J. An Approach to Transfer Methods from HPLC to UHPLC Techniques in Some Carbapenems. *Chromatographia* 2014; **77**(21-22): 1483-1487.
51. Casals G, Hernández C, Hidalgo S, Morales B, López-Púa Y, Castro P, ve ark. Development and validation of a UHPLC diode array detector method for meropenem quantification in human plasma. *Clinical Biochemistry* 2014; **47**(16): 223-227.
52. Carlier M, Stove V, De Waele JJ, Verstraete AG. Ultrafast quantification of beta-lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2015; **978**: 89-94.
53. Ohmori T, Suzuki A, Niwa T, Ushikoshi H, Shirai K, Yoshida S, ve ark. Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2011; **879**(15-16): 1038-1042.
54. Chahbouni A, van den Dungen FAM, Vos RM, den Burger JC, Sinjewel A, Wilhelm AJ, ve ark. An UPLC-MS detection method for the quantification of five antibiotics in human plasma. *Bioanalysis* 2015; **7**(18): 2321-2329.
55. Kipper K, Anier K, Leito I, Karjagin J, Oselin K, Herodes K. Rapid Determination of Meropenem in Biological Fluids by LC: Comparison of Various Methods for Sample Preparation and Investigation of Meropenem Stability. *Chromatographia* 2009; **70**(9-10): 1423-1427.
56. Kameda K, Ikawa K, Ikeda K, Morikawa N, Nakashima A, Ohge H, ve ark. HPLC Method for Measuring Meropenem and Biapenem Concentrations in Human Peritoneal Fluid and Bile: Application to Comparative Pharmacokinetic Investigations. *Journal of Chromatographic Science* 2010; **48**(5): 406-411.
57. Abdulla A, Bahmany S, Wijma RA, van der Nagel BCH, Koch BCP. Simultaneous determination of nine beta-lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2017; **1060**: 138-143.
58. Ferrone V, Cotellesse R, Di Marco L, Bacchi S, Carlucci M, Cichella A, ve ark. Meropenem, levofloxacin and linezolid in human plasma of critical care patients: A fast semi-automated micro-extraction by packed sorbent UHPLC-PDA method for their simultaneous determination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017; **140**: 266-273.
59. Matsuda T, Ikawa K, Ikeda K, Morikawa N, Tsumura R, Shibukawa M, ve ark. LC Method for the Determination of Meropenem in Cerebrospinal Fluid: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Chromatographia* 2009; **69**(9-10): 1031-1034.
60. Sime FB, Roberts MS, Roberts JA, Robertson TA. Simultaneous determination of seven β -lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B* 2014; **960**: 134-144.
61. Di Rocco M, Moloney M, O'Beirne T, Earley S, Berendsen B, Furey A, ve ark. Development and validation of a quantitative confirmatory method for 30 beta-lactam antibiotics in bovine muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2017; **1500**: 121-135.

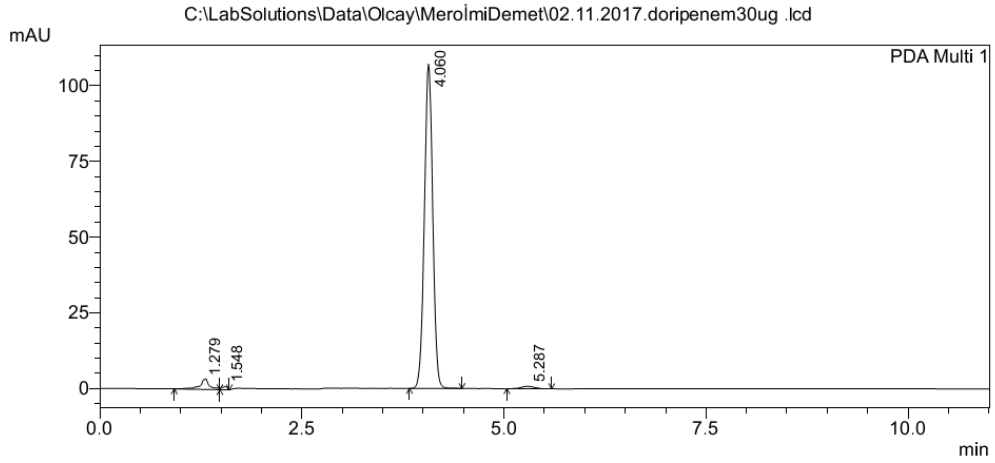
62. Roth T, Fiedler S, Mihai S, Parsch H. Determination of meropenem levels in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Biomedical Chromatography* 2017; **31**(5): 7.
63. Pinder N, Brenner T, Swoboda S, Weigand MA, Hoppe-Tichy T. Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics - Influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017; **143**: 86-93.
64. Khataee A, Lotfi R, Hasanzadeh A. A novel and sensitive chemosensor based on a KMnO₄-rhodamine B-CdS quantum dot chemiluminescence system for meropenem detection. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2017; **16**(2): 170-177.
65. Domes C, Domes R, Popp J, Pletz MW, Frosch T. Ultrasensitive Detection of Antiseptic Antibiotics in Aqueous Media and Human Urine Using Deep UV Resonance Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 2017; **89**(18): 9997-10003.
66. Cielecka-Piontek J, Szymanowska-Powalowska D, Paczkowska M, Lysakowski P, Zalewski P, Garbacki P. Stability, compatibility and microbiological activity studies of meropenem-clavulanate potassium. *Journal of Antibiotics* 2015; **68**(1): 35-39.
67. ICH. *Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2005; Available from: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>.
68. Rahman M, Hasan MR. Cancer Metabolism and Drug Resistance. *Metabolites* 2015; **5**(4): 571-600.
69. Trobec KC, Kos MK, Trontelj J, Grabnar I, Tschirner A, Palus S, et al. Influence of cancer cachexia on drug liver metabolism and renal elimination in rats. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 2015; **6**(1): 45-52.

HAM VERİLER

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : doripenem std.30 ug
Sample ID :
Tray# : 1
Vial # : 42
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 02.11.2017.doripenem30ug .lcd
Method File Name : meroimii.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 02.11.2017 12:29:32
Data Processed : 02.11.2017 12:40:35

<Chromatogram>

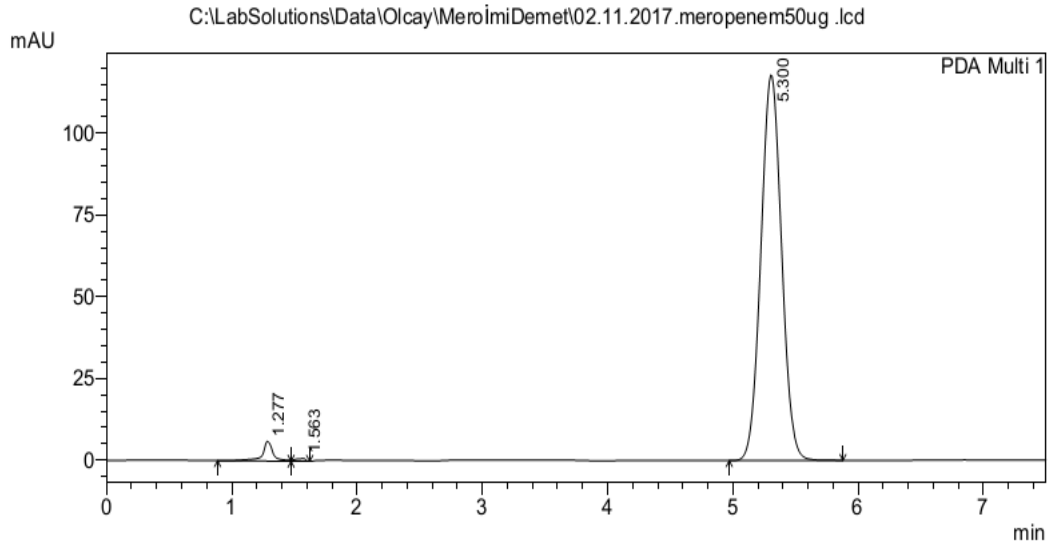


Doripenem'in konsantrasyonu 30 µg/mL olan standart çözeltisinin HPLC Kromatogramı

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : meropenem std. 50 ug
Sample ID :
Tray# : 1
Vial # : 31
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 02.11.2017.meropenem50ug.lcd
Method File Name : meroimii.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 02.11.2017 10:57:29
Data Processed : 02.11.2017 11:05:01

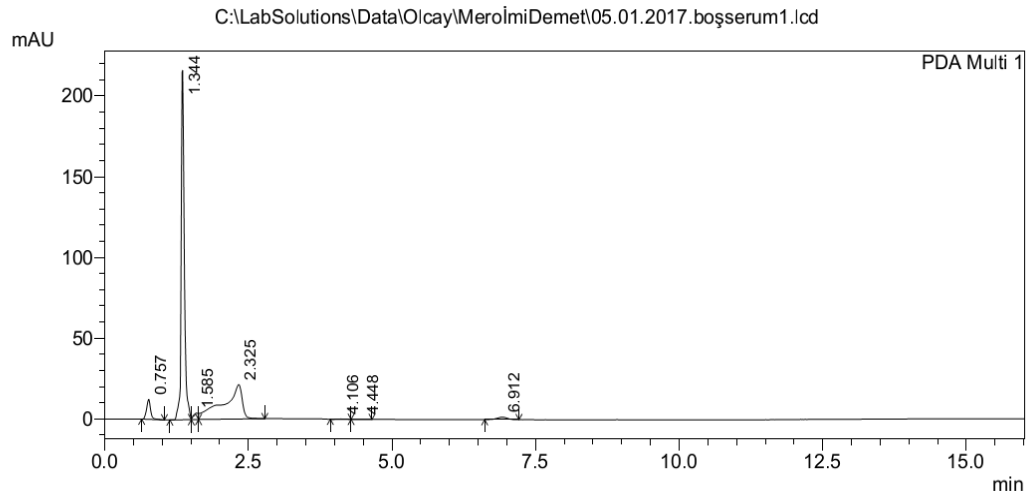
<Chromatogram>



Meropenem'in konsantrasyonu 50 µg/mL olan standart çözeltisinin HPLC kromatogramı

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

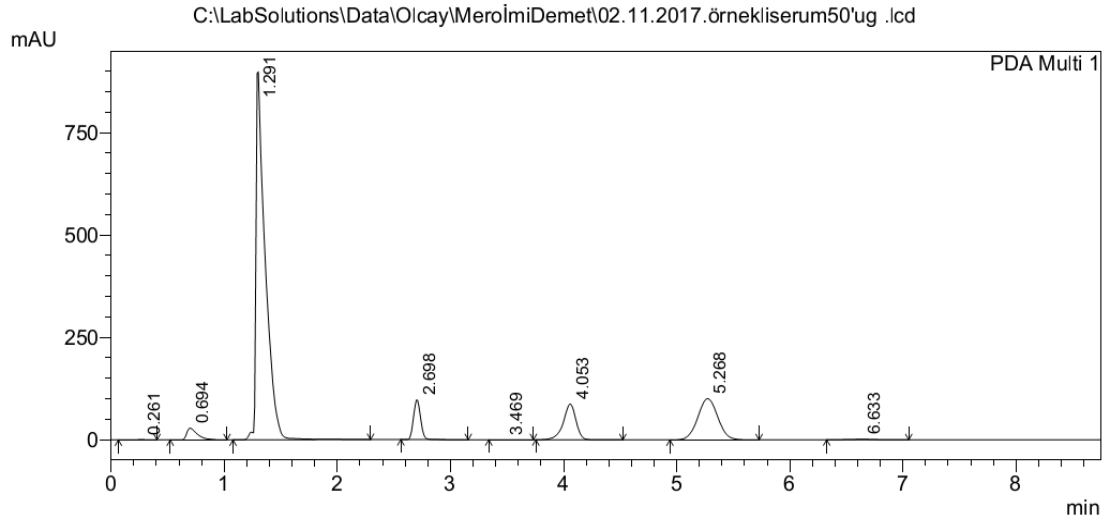
Acquired by : C:\LabSolutions\Data\Olca\MeroİmiDemet\05.01.2017.boşserum1.lcd
Admin
Sample Name : boş serum
Sample ID :
Tray# : 1
Vail # : 40
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 05.01.2017.boşserum1.lcd
Method File Name : meroimii.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 05.01.2017 13:36:25
Data Processed : 05.01.2017 13:52:29

<Chromatogram>

Boş serum örneğinin HPLC kromatogramı

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : örnekli serum 50' ug
Sample ID :
Tray# : 1
Vial # : 45
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 02.11.2017.örnekliserum50'ug .lcd
Method File Name : meroimii.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 02.11.2017 18:35:16
Data Processed : 02.11.2017 18:44:03

<Chromatogram>

30 µg/mL Doripenem ve 50 µg/mL Meropenem katkılı serum örneğine ait HPLC kromatogramı

ETİK KURUL KARARI

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Biyolojik Sıvılardan Meropenem ve Imipenem * in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

SAYI : 71306642/050-01-04 / 105

05.11.2014

KONU: Etik Kurul Kararı

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Adnan Menderes Bulvarı Vatan caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 1028
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	etikkurulu@bezmialem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Olcay SAĞIRLI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Analitik Kimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi BAP Birimi'ne başvuru yapılacak			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma		☐			
	Diğer ise belirtiniz. Yeni analiz yöntemi geliştirmek, terapötik ilaç izleme(in vitro) / Doktora tezi				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GONÜLLÜ OLUR FORMU	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

Sayfa 1 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Reha ERKOÇ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BİYOLOJİK SIVILARDAN MEROPENEMİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE MİKTAR TAYİNİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 11	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.sanaleczanemiz.com.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	aves.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	infek.med.ege.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	www.ilacpedia.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.science.gov İnternet Kaynağı	<% 1
8	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1