



FLOROKİNOLONLARIN HPLC-DAD İLE ANALİZİ İÇİN YENİ YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

THE NEW METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONES BY HPLC-DAD

Aysun DİNÇEL^{1*} , E. Damla GÖK TOPAK¹ , Feyyaz ONUR¹ 

¹Lokman Hekim Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, 06510, Ankara,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, farklı nesil florokinolonlardan; siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasinin ayrılması ve eş zamanlı analizine olanak sağlayan yeni, kolay, hızlı ve hassas bir HPLC-DAD yöntemi geliştirmektir.

Gereç ve Yöntem: Literatürlerde, etken maddede florokinolonların tek başına veya ikili karışımlarının ayrılması, analizi ve miktar tayinleri ile ilgili çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu çalışmada siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasin için en etkili ayırımı sağlayacak yeni bir HPLC-DAD yönteminin oluşturulması hedeflenmiştir. Farklı asidik ve bazik hareketli fazlar, tampon çözeltiler ve ayırım tipleri denenmiştir. En etkili ve seçici yöntemin XTerra, C18 (100 x 4.6 mm, tanecik boyutu 3.5 µm) analitik kolon ve metanol:borat tamponu (pH=9.1, 100 mM) içeren hareketli faz ile gradient elüsyonla 0.6 ml/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir. Genel olarak florokinolonların kromatografik tekniklerle analizinde floresan dedektör kullanıldığı gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ise ayırım 280 nm'de DAD dedektörü kullanılarak başarılmış ve siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasinin eş zamanlı tayinleri gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri çalışılan florokinolonların herbiri için 0.5-10 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Geliştirilen yöntem için validasyon çalışmaları da yapılmıştır.

Sonuç ve Tartışma: Siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasinin eş zamanlı tayinine izin veren basit, hızlı, hassas ve valide bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Enrofloksasin, HPLC-DAD, levofloksasin, moksifloksasin, siprofloksasin

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to develop a new, simple, rapid and sensitive HPLC-DAD

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Aysun Dinçel
e-posta / e-mail: Aysun.Dincel@lokmanhekim.edu.tr, Tel. / Phone: +905327078793

Gönderilme / Submitted : 03.08.2023

Kabul / Accepted : 22.08.2023

Yayınlanma / Published : 20.09.2023

method for the separation and simultaneous analysis of ciprofloxacin, levofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin from different generation of fluoroquinolones.

Material and Method: *In the literature, there are various methods for the separation, analysis and quantification of fluoroquinolones alone or in binary mixtures in active substance. In this study, it was aimed to develop a new HPLC-DAD method that would provide the most effective separation for ciprofloxacin, levofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin. Different acidic and basic mobile phases, buffer solutions and separation types were tested. The most efficient and selective method XTerra, C18 (100 x 4.6 mm, particle size 3.5 µm) analytical column and mobile phase containing methanol:borate buffer (pH=9.1, 100 mM) were used for gradient elution at a flow rate of 0.6 ml/min. In general, fluorescent detector was used in the analysis of fluoroquinolones by chromatographic techniques. In our study, separation was achieved by using DAD detector at 280 nm and simultaneous determinations of ciprofloxacin, levofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin were performed. The calibration curves were linear in the concentration range of 0.5-10 µg/ml for each of the fluoroquinolones studied. Validation studies were also performed for the developed method.*

Result and Discussion: *A simple, rapid, sensitive and validated HPLC-DAD method allowing simultaneous determination of ciprofloxacin, levofloxacin, enrofloxacin and moxifloxacin was developed.*

Keywords: *Ciprofloxacin, enrofloxacin, HPLC-DAD, levofloxacin, moxifloxacin*

GİRİŞ

Kinolonlar, sentetik antimikrobiyal ajanlardır ve 1962'de klorokin sentezinin bir yan ürünü olan nalidiksik asit olarak keşfedilmişlerdir. Sonrasında farklı sübstitüentlerin eklenmesi yoluyla kinolon çekirdeğinin modifikasyonu ile farklı florokinolonlar keşfedilmiştir. Norfloksasin, 6. karbon pozisyonuna bir flor eklenmesi sonrası elde edilen ilk "florokinolondur" (Şekil 1 Owens ve Ambrose [3]). Diğer ikinci nesil kinolonlar ise; siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin, enoksasin, fleroksasin, lomefloksasin, pefloksasin ve rufloksasindir. 1980'lerden beri bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir antibiyotik sınıfıdır. Bakteriyel DNA replikasyon sürecinde topoizomeraz II ve IV'ü inhibe ederek bakterilerin ölümüne yol açarlar. Florokinolonlar Gram-pozitif, Gram-negatif ve atipik bakterilere karşı kullanılan başlıca antibakteriyel ilaçlardır. Dört gruba ayrılırlar. Antibakteriyel ajanların konsantrasyonlarının izlenmesi etkili tedavi sağlar ve antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin artmasını önler. Ayrıca, olası toksikolojik etkilere karşı koruyucu tedavi yaklaşımına katkı sağlamaktadır. Florokinolonlar idrar yolu enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları dahil olmak üzere çok çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazı gastrointestinal ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadırlar [1-4]. İlerleyen çalışmalar ile daha geniş spektruma, daha yüksek etkinliğe sahip çeşitli yeni nesil florokinolonlar (üçüncü ve dördüncü nesil) üretilmiştir [5]. Sparfloksasin ve levofloksasin üçüncü, moksifloksasin dördüncü nesil bileşiklerdir ve sıklıkla tedavide tercih edilen kinolonlar arasında yer alırlar [6].

Siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve enrofloksasin kimyasal yapıları ve etkili oldukları bakteri türlerinin spektrumu bakımından farklılık gösterirler. Örneğin, siprofloksasin ve levofloksasin hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere karşı etkiliyken, moksifloksasin ve ofloksasin Gram-pozitif bakterilere karşı daha etkilidir. Enrofloksasin domuz, kedi ve köpeklerde Gram-negatif ve bazı Gram-pozitif bakterilere karşı kullanılmaktadır [6-7].

Farklı matrislerde florokinolonların analizi için birçok enstrümantal teknik kullanılmıştır. Literatürde genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve floresans detektör kullanılarak yapılan çalışmalar ile bazı yeni çalışmalarda voltametrik analiz uygulamaları, floresans spektroskopisi, kütle spektrometrisi uygulamaları da mevcuttur [8-13]. HPLC ve diyod sıralı dedektör (DAD) ile florokinolonların analizine yönelik ise kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur [14-15]. Bu çalışmada siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasinin HPLC-DAD sistemi ile eş zamanlı olarak analizine olanak sağlayacak, basit, seçici ve valide bir analitik yöntem oluşturulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Cihaz

Shimadzu sıvı kromatografi sistemi (LC-2030C), pompa (LC-10AT VP), yazılım (Class-VP 5.03), kontrol sistemi (SCL-10A VP), otomatik örnekleyici (SIL-10AD VP), ve diyod sıralı dedektör (DAD, SPD-10A VP)'den oluşmaktadır. Ayırım XTerra, C18 (100 x 4.6 mm, tanecik boyutu 3,5 µm) analitik kolon (Waters, Milford, MA, ABD) ile analiz sıcaklığı (30°C), 0.6 ml/dak akış hızında metanol-borat tamponu içeren (100 mM, pH 9.1) hareketli faz ile gradient elüsyonda yapılmıştır. DAD dedektör 280 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. pH 0.1 M formik asit kullanılarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µl olarak seçilmiştir. Tüm çözeltilerde tip 1 su kullanılmıştır (Simplicity 185 Water System, Millipore Corp., Bedford, MA, ABD). Analiz sonunda analitik kolon, hacminin yaklaşık 20 katı HPLC sınıfı su ve ardından metanol ile yıkanmıştır. Son olarak, kolon saf metanol içinde saklanmıştır. Bu prosedür her analiz sonrasında uygulanmıştır.

Kimyasallar

Bu çalışmada siprofloksasin (SF) ve levofloksasin (LF) analitik standartları Drogosan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir, moksifloksasin (MF), enrofloksasin (EF) ve kafein (iç standart, IS) analitik standartları Sigma-Aldrich (ABD)'den satın alınmıştır. Metanol, asetonitril (HPLC saflıkta), borik asit ve formik asit Sigma-Aldrich (ABD)'den satın alınmıştır. SF, LF, MF ve EF ile kafeinin stok çözeltileri 1 mg/ml olacak şekilde hareketli fazda hazırlanmış ve analizde kullanılacak çözeltiler, istenilen konsantrasyon değerlerine stok çözeltilerin hareketli faz ile seyreltilmesiyle günlük olarak hazırlanmıştır. Stok çözeltiler -20°C'da 1 hafta süresince saklanmıştır.

Kromatografik Çalışmalar

Çalışmada optimum kromatografik ayırma koşullarının belirlenmesi amacıyla çeşitli hareketli faz bileşimlerinde ve farklı sabit fazlarda denemeler yapılmıştır. Bu amaçla hareketli faz organik düzenleyici seçimi için metanol ve asetonitrilin florokinolonların analizine etkisi değişik konsantrasyonlarda çalışılarak incelenmiştir. Asetonitril kullanılarak hazırlanan hareketli faz ile iyi bir ayırım elde edilememiş, florokinolon piklerinde çakışmalar gözlemlenmiştir. En iyi ayırım için metanol tercih edilmiştir. Ek olarak en iyi ayırımın elde edilmesi amacıyla çeşitli sabit faz denemelerinin yapıldığı çalışmada da C8 ve C18 özelliğinde dolgu maddeleri içeren analitik kolonların 100-250 mm uzunluğunda olan sabit fazlar denenmiş ve XTerra, C18 (100 x 4.6 mm, tanecik boyutu 3.5 µm) en iyi ayırımın elde edildiği sabit faz olarak seçilmiştir. Yine hareketli faz bileşimi optimizasyon çalışmalarında değişik tampon çözeltiler ve pH denemeleri yapılmış bu amaçla fosfat tamponu ve borat tamponu ile yapılan çalışmalarda pH değerinin 3 ila 9.1 aralığında ayırım için kapasite faktörü ve pik simetri oranları ile olan etkileri incelenmiştir. En iyi ayırım hedeflenen dört florokinolon ve kafein (iç standart) için hareketli faz bileşiminin metanol (A) ve borat tamponu (B) (100 mM, pH 9.1) ile gradient elüsyonda elde edilmiştir. İç standart olarak kromatogramda diğer etken madde pikleri ile çakışmaması ve iyi bir ayırım elde edilmesi sebebiyle kafein tercih edilmiştir. Uygulanan gradient ayırım program Tablo 1'de verilmiştir. Hareketli faz 0.45 µm gözenek çaplı membran filtreden süzölmüş ve ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek çözünen gazlar uzaklaştırılmıştır.

Tablo 1. Analizde uygulanan gradient ayırım programı

Zaman (dk)	Metanol (A) (%)	Borat Tamponu (B) (%)
0-2	35	65
3-15	50	50
16	35	65

Validasyon Çalışmaları

Validasyon çalışmaları ICH gereklilikleri kapsamında incelenmiştir [16-17]. Bu kapsamda; elde edilen verilere göre her bir ilaca ait alıkonma zamanı, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik

tabaka sayısı hesaplanmıştır. Sistem uygunluk testi 1 µg/ml konsantrasyondaki standart karışım çözeltisinin altı tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında kromatogramlardan elde edilen pik eğri altı alan değerleri iç standarda (1 µg/ml) ait pik eğri altı alan değerlerine oranlanılmış ve her bir florokinolonun konsantrasyon değerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Elde edilen eğrilerden korelasyon katsayısı (r) değerleri incelenerek yöntem doğrusallığı değerlendirilmiştir. Ayrıca duyarlılık, seçicilik, doğruluk ve kesinlik çalışmaları üç farklı konsantrasyon değerinde (0.5, 1 ve 10 µg/ml, n=6) yapılmış, gün-içi ve günler-arası tekrarlı analiz sonuçları değerlendirilmiştir. İki farklı analizci tarafından yapılan tekrarlı analiz sonuçlarının karşılaştırılması ile tutarlılık analizleri de yapılmıştır. Sonuçlar t testi ve standart hata hesaplamaları yapılarak değerlendirilmiştir. Gözlenebilirlik sınırı (LOD) değeri; tekrarlanan (n=6) farklı standart çözelti analiz için sinyal/gürültü (S/G) değerinin 3'e eşit olduğu değer olarak alınmıştır. Alt tayin sınırı (LOQ) değeri ise tekrarlanan (n=6) farklı çözelti analiz için BSS değerinin %5'e eşit ve küçük olduğu değer olarak alınmıştır [18-19]. Analiz sıcaklığının ve hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin araştırılması çalışmasında 24 ila 35°C aralığında ve 0.4 ml/dk, 0.6 ml/dk, 0.8 ml/dk değerlerinde çalışmalar yapılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasinin HPLC-DAD sistemi ile eş zamanlı olarak analizine olanak sağlayacak yeni, basit ve seçici bir analiz yönteminin oluşturulması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda en iyi ayırım koşullarının ve en uygun organik düzenleyici konsantrasyonunun seçimi için bir dizi deneysel çalışmalar yapılmış aynı zamanda geliştirilen yöntem için validasyon parametreleri de incelenmiştir. Yöntem, siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasin için 0.5-10 µg/ml aralığında doğrusal olarak bulunmuştur. Elde edilen eğri denklemlerinden r^2 değerleri 1'e çok yakın olarak hesaplanmıştır (Tablo 2). En iyi ayırım koşullarının belirlenmesi çalışmaları kapsamında elde edilen verilere göre her bir etken maddeye ait alıkonma zamanı, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve hesaplanan teorik tabaka sayısı değerleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2. Yöntem için elde edilen doğrusal aralık ve hesaplanan değerler (n=6)

Florokinolon	Doğrusal Aralık (µg/ml)	Eğim	Kesişim	r	r^2	Eğim SH*	Kesişim SH*	LOD (µg/ml)
SF	0.5-10	0.807	0.012	0.9998	0.9996	0.064	0.014	0.15
LF	0.5-10	0.620	-0.161	0.9998	0.9996	0.059	0.021	0.15
EF	0.5-10	0.651	0.234	0.9999	0.9998	0.078	0.019	0.15
MF	0.5-10	1.677	0.082	0.9999	0.9999	0.098	0.017	0.15

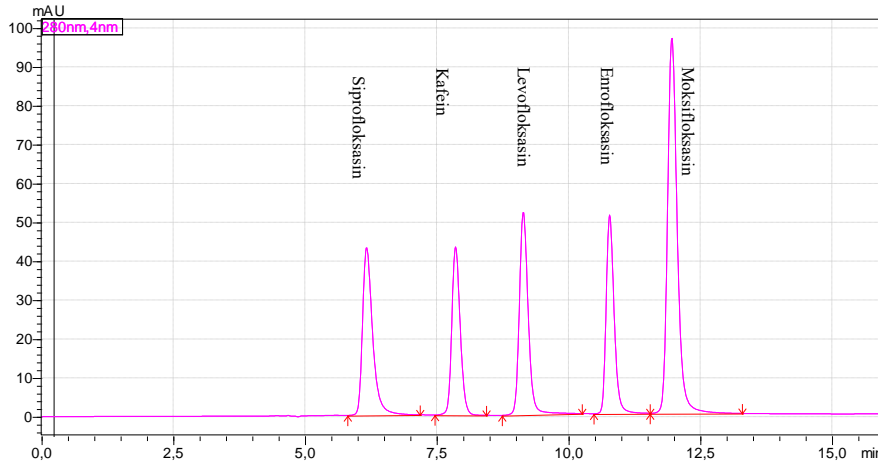
SH*: Eğim ve kesişimin standart hatası

Tablo 3. Sistem uygunluk parametrelerinin değerlendirilmesi (n=6)

Florokinolon	Alıkonma Zamanı (dk)	Kapasite Faktörü	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Tabaka Sayısı
SF	6.20±0.01	2.11	1.31±0.01	5860.11
LF	9.14±0.02	3.58	1.12±0.01	17286.53
EF	10.73±0.01	4.37	1.08±0.00	29950.78
MF	12.05±0.01	4.94	1.20±0.01	23600.80

Çalışma kapsamında incelenen dört farklı florokinolon için iyi bir ayırım elde edilmiştir (Şekil 1). Validasyon çalışmaları kapsamında yapılan duyarlılık, seçicilik, doğruluk ve kesinlik parametreleri için üç farklı konsantrasyon değerinde (0.5, 1 ve 10 µg/ml, n=6) deneyler yapılmış, gün-içi ve günler-arası tekrarlı analiz sonuçları bağıl hata (BH), bağıl standart sapma (BSS) ve bağıl standart hata (BH) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir (Tablo 4). Yöntemin seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla

yapılan çalışmalar sonucunda SF, LF, EF, MF ve IS piklerinin alıkonma zamanlarında hareketli fazın gradient sisteminden kaynaklanan herhangi bir girişimin olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 1. SF, LF, EF, MF ve kafeine ait kromatogram (1 µg/ml)

Tablo 4. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları (n=6)

Konsan. (µg/ml)		SF		LF		EF		MF	
		Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası	Gün İçi	Günler Arası
0.5	\bar{x}	0.49	0.49	0.50	0.50	0.49	0.49	0.48	0.49
	SH	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01
	BSS	2.23	2.01	1.23	0.50	2.01	1.95	0.16	4.13
	BH	1.06	-1.47	-0.83	0.13	-1.47	-1.47	-3.89	6.35
1.0	\bar{x}	0.99	1.02	0.97	1.01	0.99	1.02	1.04	1.01
	SH	0.05	0.03	0.01	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03
	BSS	1.57	3.41	0.89	3.29	1.57	3.41	0.63	3.29
	BH	0.65	1.62	3.20	0.77	0.65	1.62	1.98	0.77
10.0	\bar{x}	9.99	9.99	9.94	9.95	9.99	9.99	10.00	9.99
	SH	0.10	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
	BSS	0.15	0.15	0.11	0.30	0.15	0.15	0.16	0.16
	BH	0,14	0.12	0.57	0.46	0.14	0.12	0.05	0.06

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BSS: Bağıl standart sapma, BH: Bağıl standart hata

Geliştirilen yöntem için HPLC-DAD sistem uygunluğu alıkonma zamanı, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı esas alınarak değerlendirilmiştir. İncelenen parametreler için 6 tekrarlı yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır. Elde edilen değerler (Tablo 3) kabul edilen şartları sağlamaktadır kapasite faktörü >2, kuyruklanma faktörü ≤1.5 ve teorik tabaka sayısı >2000] içinde bulunmuş olup sistem hedeflenen ilaçların analizi için uygun olarak bulunmuştur [16-17].

Geliştirilen yöntem için en iyi ayırımı; XTerra, C18 (100 x 4.6 mm, tanecik boyutu 3,5 µm) analitik kolon kullanılarak metanol:borat tamponu (pH=9.1, 100 mM) içeren hareketli faz ile 0.6 ml/dak akış hızında gradient elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sıcaklığının ayırma etkisi üç farklı sıcaklık değerinde çalışılarak incelenmiş ve analiz sıcaklık değeri 30 °C olarak yine akış hızının ayırma etkisinin

araştırılması çalışmasında 0.4 - 0.8 ml/dk aralığında çalışmalar yapılmış ve 0.6 ml/dk olarak en iyi ayırım koşulu belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri her bir florokinolon için sırasıyla 0.15 ve 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır. Tutarlılık çalışmalarında iki farklı analizci tarafından elde edilen değerler karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p<0.05) (Tablo 5).

Tablo 5. Geliştirilen yöntemin tutarlılık verileri (n=6)

Florokinolon	1 µg/ml standart madde için eğri altı alan/iç standart eğri altı alan		
	Analizci 1	Analizci 2	P<0.05
	$\bar{x} \pm SH$	$\bar{x} \pm SH$	
SF	0.827±0.007	0.819±0.008	0.046
LF	0.457±0.005	0.454±0.006	0.014
EF	0.902±0.006	0.893±0.001	0.045
MF	1.797±0.013	1.713±0.011	0.033

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, p: Kesişimin olasılık değeri

Bu çalışmada, farklı nesil florokinolonlardan olan siprofloksasin, levofloksasin, enrofloksasin ve moksifloksasinin HPLC-DAD sisteminde eş zamanlı analizine olanak sağlayan yeni kolay, basit, seçici ve valide bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem literatürde yer alan HPLC-DAD yöntemlerinden farklı ve kısa sürede ayırım gerçekleştirebilmesine olanak sağlaması açısından bir alternatif sunmaktadır. Geliştirilen analiz yöntemi ilaç düzeyi takibinde ve değişik uygulamalarda yeni ve basit bir ayırım yöntemi olarak uygulanabilir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: A.D., E.D.G.T., F.O.; Tasarım: A.D., E.D.G.T., F.O.; Denetim: A.D., E.D.G.T., F.O.; Kaynaklar: A.D., E.D.G.T., F.O.; Malzemeler: A.D., E.D.G.T., F.O.; Veri Toplama ve/veya İşleme: A.D., E.D.G.T., F.O.; Analiz ve/veya Yorumlama: A.D., E.D.G.T., F.O.; Literatür Taraması: A.D., E.D.G.T., F.O.; Makalenin Yazılması: A.D., E.D.G.T., F.O.; Kritik İnceleme: A.D., E.D.G.T., F.O.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Leshner, G.Y., Froelich EJ, Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R.P. (1962). 1,8-Naphthyridine derivatives: A new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 5, 1063-1068. [\[CrossRef\]](#)
2. Andriole. V.T. (2005). The Quinolones: Past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases*, 41, S113-S119. [\[CrossRef\]](#)
3. Owens, R.C. Jr, Ambrose, P.G. (2005). Antimicrobial safety: Focus on fluoroquinolones. *Clinical Infectious Disease*, 40(Suppl 7), S144-S157. [\[CrossRef\]](#)
4. Bush, G.N., Diez-Santos, I., Abbott L.R., Maxwell A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules*, 25, 5662. [\[CrossRef\]](#)
5. Mitscher, L.A. (2005). Bacterial topoisomerase inhibitors: Quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chemical Reviews*, 105, 559-592. [\[CrossRef\]](#)
6. Çiftçi, E., Doğru, Ü. (2000). Florokinolonların pediatrikte kullanımı. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 53(4), 281-291.

7. Pallo-Zimmerman L.M., Byron J.K., Graves T.K. (2010) Flouroquinolones: Then and now. *Compendium Continuing Education for Veterinarians* 32, 1-9.
8. Vinícius de Faria, L., Marques de Farias, D., Lisboa, T.P., Matos, M.A.C., Munoz, R.A.A., Matos, R.C. (2022). Batch injection analysis with amperometric detection for fluoroquinolone determination in urine, pharmaceutical formulations, and milk samples using a reduced graphene oxide–modified glassy carbon electrode, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414, 5309-5318. [[CrossRef](#)]
9. Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S. (2009). Validation of a MLC method with fluorescence detection for the determination of quinolones in urine samples by direct injection. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(31), 3975-3981. [[CrossRef](#)]
10. Maia, A.S., Ribeiro, A.R., Amorim, C.L., Barreiro, J.C., Cass, Q.B., Castro, P.M.L., Tiritan, M.E. (2014). Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1333, 87-98. [[CrossRef](#)]
11. Watabe, S., Yokoyama, Y., Nakazawa, K., Shinozaki, K., Hiraoka, R., Takeshita, K., Suzuki, Y. (2010). Simultaneous measurement of pazufloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878, 1555-1561. [[CrossRef](#)]
12. Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J.F., Lombardo-Agüí, M., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M. (2015). A high-throughput method for the determination of quinolones in different matrices by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Methods*, 7, 253-259. [[CrossRef](#)]
13. Kumar, A.K.H., Sudha, V., Srinivasan, R., Ramachandran, G. (2011). Simple and rapid liquid chromatography method for determination of moxifloxacin in saliva. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879, 3663-3667. [[CrossRef](#)]
14. Yıldırım, S., Karakoç, H.N., Yaşar, A., Köksal, İ. (2020). Determination of levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin and gemifloxacin in urine and plasma by HPLC-FLD-DAD using pentafluorophenyl core-shell column: Application to drug monitoring. *Biomedical Chromatography*, 34(10), e4925. [[CrossRef](#)]
15. Xu, Y.H., Li, D., Liu, X.Y., Li, Y.Z., Lu, J. (2010). High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: Validation and application to a pharmacokinetic study in chinese volunteers. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878, 3437-3441. [[CrossRef](#)]
16. ICH, Harmonized Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH Steering Committee, 2014.
17. ICH, Harmonized Tripartite Guideline, on validation of analytical procedures Q2(R2), ICH Steering Committee, 2022.
18. Jenke, D.R. (1996). Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19(5), 737-757. [[CrossRef](#)]
19. Jenke, D.R. (1996). Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. III. Ruggedness, re-validation and system suitability, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19(12), 1873-1891. [[CrossRef](#)]